

Entre homéostasie et développement, quelles stratégies pour régénérer ?

Brigitte Galliot

Département de Génétique et Évolution, Faculté des Sciences, Université de Genève, 4 boulevard d'Yvoy,
1211 Genève 4, Suisse

Auteur correspondant : Brigitte Galliot, brigitte.galliot@unige.ch

Reçu le 19 novembre 2010

Résumé – L'Hydre d'eau douce fournit un modèle très performant pour identifier les mécanismes qui sous-tendent la régénération d'un animal adulte, en particulier ceux qui, suffisamment robustes, ont été maintenus au cours de l'évolution. Après bissection à mi-corps, la régénération de la tête de l'Hydre est déclenchée par une vague de mort cellulaire massive suivie d'une prolifération compensatoire *via* l'activation de la cascade Wnt3 par les cellules apoptotiques. Ce processus pourrait représenter l'un des mécanismes de déclenchement de la régénération conservés au cours de l'évolution. Cependant la route suivie pour régénérer une structure aussi complexe que la tête varie suivant le niveau de bissection de l'animal. En effet, après décapitation, l'Hydre n'utilise pas l'apoptose inductrice de prolifération compensatoire pour régénérer sa tête. Or la densité en cellules souches varie significativement entre ces deux positions, suggérant que l'état cellulaire du tissu blessé influence le processus de régénération. À partir de ces observations, nous proposons un modèle tri-modulaire de la régénération, composé d'un « *module initial de réparation de la blessure* », suivi d'un module transitionnel nommé « *module inducteur de la régénération* », nécessaire au recrutement du troisième module, « *module de re-développement* » qui reforme la structure manquante. Parmi ces trois modules successifs, le module inducteur de la régénération est le plus fortement contraint par l'état homéostatique du tissu ou de l'organe au moment de la blessure et donc le plus variable.

Mots clés : Système modèle de l'Hydre / plasticité de la régénération adulte / apoptose et prolifération compensatrice / cascade de signalisation Wnt3- β -caténine

Abstract – Between homeostasis and development, which strategies to regenerate?

The *Hydra* model system is well suited to decipher the mechanisms underlying adult regeneration, specifically those that were robust enough to be maintained across evolution. After mid-gastric bissection head regeneration in *Hydra* relies on apoptosis-induced compensatory proliferation *via* the release of Wnt3 by the apoptotic interstitial cells and activation of the β -catenin pathway in the surrounding cycling interstitial cells. As apoptosis-induced compensatory proliferation is also at work in *Drosophila* regenerating imaginal discs, *Xenopus* tadpole regenerating their tail and mice regenerating their skin or their liver, this mechanism might represent an evolutionarily-conserved way to launch a regenerative response. However after decapitation, the analysis of the activation of the canonical Wnt pathway in decapitated *Hydra* showed that apoptosis-induced compensatory proliferation does not take place in this context. Given that the proportion of interstitial stem cells is significantly higher in the middle part than in the upper part of the body column, this suggested that the route taken to regenerate a structure as complex as the head dramatically varies according to the homeostatic status of the tissue at the time of injury. From these observations, we propose a tri-modular model for animal regeneration where the first module or

“wound healing module” is followed by a transient module named “inducing module of regeneration” that allows the recruitment of the third module named “re-development module”, necessary for repatterning the missing structure. We claim that among these three modules, the inducing module of regeneration is the most drastically constrained by the homeostatic conditions of any given tissue or organ at the time of injury and therefore the most variable.

Key words: Hydra model system / plasticity of adult regeneration / apoptosis and compensating proliferation / Wnt3- β -catenin signaling cascade

La nécessité de développer de nouveaux modèles pour comprendre les principes de la régénération

Les différents types de régénération animale

De multiples espèces animales appartenant à la plupart des *phyla* vertébrés ou invertébrés sont douées de régénération (figure 1), cependant le potentiel de régénération varie considérablement entre espèces, qu’elles appartiennent à différents *phyla*, ou au même *phylum* (Brookes & Kumar, 2008; Bely & Nyberg, 2010). Par ailleurs la plupart des espèces qui régénèrent peu à l’état adulte ont perdu ce potentiel régénératif au cours du développement. En fonction du stade de développement, et de la maturité sexuelle, nous distinguons cinq types de régénération (tableau 1) dont nous présentons ici brièvement les caractéristiques.

Si nous suivons la séquence chronologique du cycle de la vie, le potentiel régénératif le plus précoce peut être détecté chez l’embryon qui, dans de nombreuses espèces, est capable de *régulation embryonnaire*, c’est à dire capable de remplacer intégralement toute partie manquante après amputation. Ceci a été démontré initialement chez l’oursin (Driesch, 1900), puis ensuite chez le *Xénope*, le poulet et les embryons de mammifères (voir Galliot & Ghila, 2010).

Au stade larvaire, de nombreuses espèces d’insectes (criquet, mouche) mais aussi de vertébrés et en particulier d’amphibiens peuvent régénérer leurs appendices ainsi qu’un certain nombre d’organes. Cette *régénération larvaire* est très proche de la *régénération juvénile*. En effet après l’éclosion ou après la naissance, les organismes qui n’ont pas encore atteint la maturité sexuelle présentent fréquemment des capacités de régénération qui seront ensuite perdues à l’âge adulte ; ainsi les jeunes enfants et les jeunes rongeurs peuvent régénérer leur phalange distale (Yu *et al.*, 2010). Finalement une fois la maturité sexuelle atteinte, bien peu d’espèces sont capables de remplacer leurs organes ou leurs appendices ; cependant, curieusement, les espèces douées de régénération à l’âge adulte sont présentes dans un grand nombre de *phyla* (figure 1).

La régénération adulte peut en fait être divisée en deux classes, la première est appelée *régénération pédomorphique* et concerne les organismes qui suivent un développement hétérochronique (Gould, 2000). Dans ce cas, soit le développement sexuel trop précoce n’a pas permis l’achèvement du développement somatique (progénésis), soit le développement somatique trop lent n’est pas achevé lorsque l’animal parvient à sa maturité sexuelle (néoténie). Par opposition, la *régénération pleinement adulte* a lieu chez des organismes dont le développement sexuel et le développement somatique, restés synchrones, sont achevés.

Cependant, même en l’absence de régénération de structures complexes avec restauration d’une structure tri-dimensionnelle liée à la fonction, la plupart des espèces animales sont douées de renouvellement cellulaire et souvent de réparation tissulaire. Tandis que la réparation tissulaire et la régénération sont induites par des forces externes (blessure, lésions tissulaires, amputation), le renouvellement tissulaire qui résulte de la combinaison de la prolifération, de la mort et de la différenciation cellulaires, répond plus généralement à des signaux endogènes (Pellettieri & Sanchez Alvarado, 2007).

Les questions qui se posent sont alors les suivantes : quels sont les caractères partagés par tous ces processus régénératifs ? Est-il possible d’identifier des mécanismes communs qui sous-tendent la régénération chez un organisme adulte ? Quels sont les modèles les plus adaptés pour identifier ces principes ? *A priori* ce ne sont pas les modèles utilisés classiquement en génétique ! D’une part les mammifères ont un potentiel de régénération plus limité, ayant en effet perdu la possibilité de former un blastème de régénération, structure typique du re-développement adulte, essentielle pour la dynamique de la régénération. D’autre part, les génomes des espèces vertébrées ancestrales ont subi plusieurs cycles de duplications, d’où des génomes complexes et redondants chez les espèces vertébrées modernes. Par ailleurs les deux modèles d’invertébrés les plus puissants génétiquement, le nématode et la *Drosophile*, ne sont pas les plus appropriés pour étudier la régénération adulte car le renouvellement

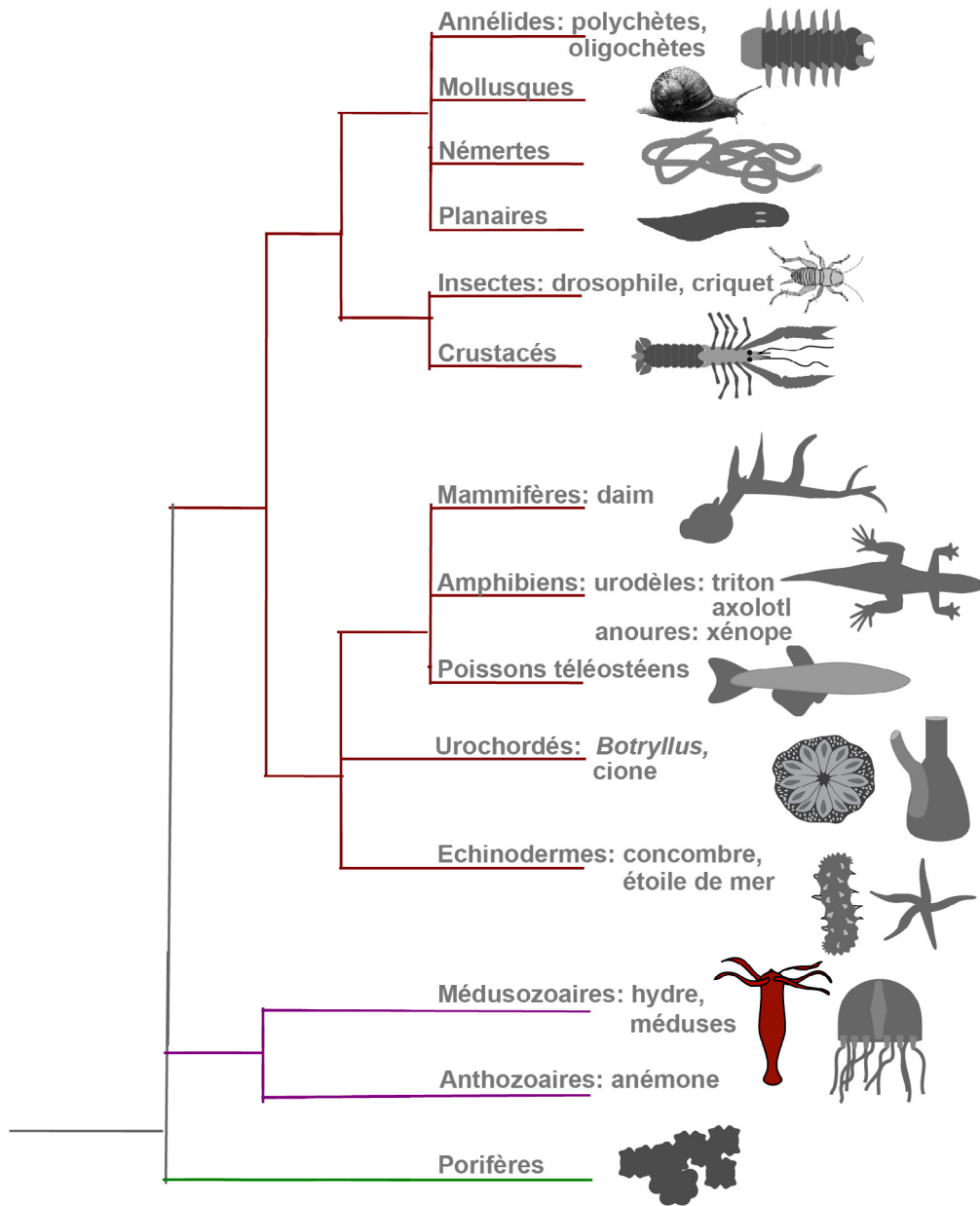


Fig. 1. Arbre phylogénétique des espèces présentant un fort potentiel de régénération. Celles schématisées sur la droite de l'arbre sont utilisées comme modèles pour analyser les mécanismes de la régénération animale.

de leurs tissus somatiques est limité (tel le renouvellement intestinal chez la mouche), voire inexistant à l'état adulte (comme chez le nématode). En conséquence, il apparaît impérieux d'identifier des modèles expérimentaux qui offrent la possibilité de tester de façon comparative les mécanismes cellulaires et moléculaires du renouvellement cellulaire en contexte homéostatique, et ceux de la réparation tissulaire et de la régénération adulte.

La force du système modèle de l'Hydre

Les travaux d'Abraham Trembley au cours du XVIII^e siècle ont permis de reconnaître l'Hydre d'eau douce d'une part comme un animal et non une plante (la question concernait l'ensemble des cnidaires à cette époque), d'autre part comme un modèle de régénération animale étonnant puisque l'Hydre remplace en quelques jours après bissection n'importe

Tableau 1. Critères et exemples caractérisant les différents types de régénération animale. Seuls les types 4 et 5 correspondent à un processus de régénération adulte, c'est-à-dire utilisant les ressources d'organismes ayant cessé de se développer et sexuellement mûrs (Tanaka & Ferretti, 2009 ; Galliot & Ghila, 2010).

Types de régénération	Stade de développement auquel la régénération a lieu	Contexte représentatif → type de structure régénérée
1. Régénération régulative	Embryogénèse	• <i>Xénope</i> → embryon entier • <i>Poulet</i> → tube neural
2. Régénération fœtale et larvaire	Organogénèse ou Développement larvaire (précédant l'éclosion ou la métamorphose)	• larve de <i>Drosophile</i> → appendices, • nymphe de <i>Cricket</i> → appendices, • têtard de <i>Xénope</i> → queue
3. Régénération juvénile	Organisme développé mais encore immature sexuellement	• Jeunes rongeurs, jeunes enfants → phalange distale
4. Régénération pédomorphique	Organisme adulte présentant une persistance des traits larvaires ou juvéniles due à un développement progénétique ou néoténique	• <i>Hydre</i> → toute partie du corps • <i>Axolotl</i> → appendices, queue
5. Régénération adulte	Organisme adulte ayant acquis une maturité sexuelle et somatique	• <i>Planaires</i> → toute partie du corps, • <i>Echinodermes</i> → intestin, bras, • <i>Poisson zèbre</i> → nageoires, cœur, système nerveux, • <i>Triton</i> → membres, mâchoire, cristallin, • <i>Daim</i> → bois

quelle partie de son corps (Trembley, 1744). L'Hydre est un hydrozoaire qui appartient au *phylum* des cnidaires, *phylum* qui, avec celui des cténophores, forme un groupe frère de celui des bilatériens (Philippe *et al.*, 2009). Cependant l'Hydre a un cycle de vie différent de celui de la plupart des hydrozoaires qui prennent la forme de méduse à l'âge adulte. En effet l'Hydre a perdu la faculté de se transformer en méduse, persistant donc toute sa vie au stade de polype considéré comme un stade larvaire. En conséquence la régénération de l'Hydre est du type pédomorphique.

L'Hydre présente une anatomie très simple, celle d'un tube qui à l'extrémité apicale différencie une tête avec un orifice appelée bouche, entourée d'un dôme (appelé hypostome), lui-même entouré à sa base d'un cercle de tentacules. L'extrémité basale (nommée pied) est simplement arrondie, caractérisée par des cellules sécrétrices qui produisent le mucus permettant à l'animal de s'attacher au substrat (figure 2A). Cette anatomie simple n'empêche pas l'Hydre d'élaborer des

comportements aussi complexes que la capture de nourriture (l'Hydre est carnivore) ou le déplacement actif grâce à un système neuromusculaire déjà complexe (Galliot *et al.*, 2009).

Formée de deux couches tissulaires, l'ectoderme et l'endoderme, l'Hydre différencie des types cellulaires qui correspondent aux types cellulaires basiques partagés par les eumétazoaires : des cellules épithéliales qui ont la particularité de différencier des myofibrilles, des cellules glandulaires qui sécrètent des enzymes digestives (très similaires à nos cellules pancréatiques exocrines), des cellules qui sécrètent du mucus, des neurones sensoriels et sensorimoteurs, des interneurons appelés cellules ganglionnaires (figure 2B). Par ailleurs, les cnidaires différencient des cellules mécano-sensorielles nommées cnidocytes ou nématocytes qui sont équipées d'un cil sensoriel mais également d'une capsule venimeuse (le nématocyste ou cnidocyste). Cette dernière structure constitue un trait spécifique des cnidaires. À côté

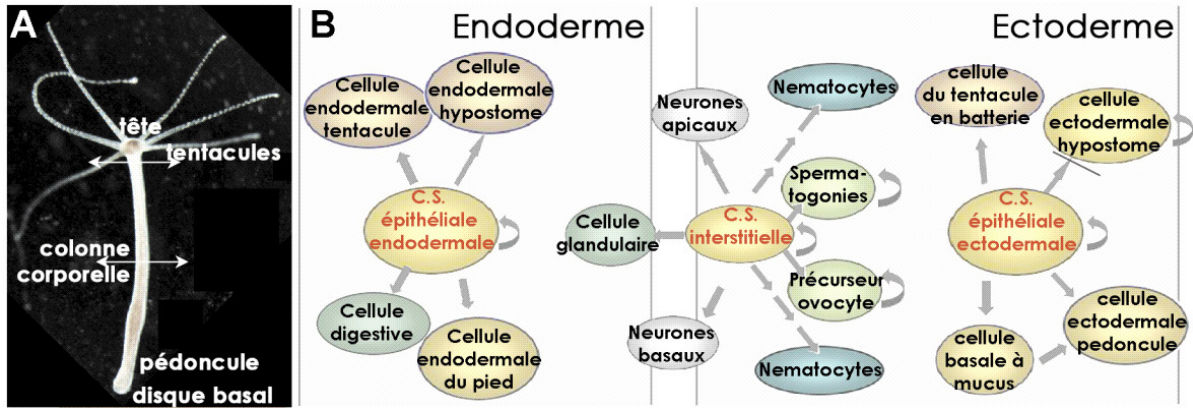


Fig. 2. (A) Anatomie de l'hydre. (B) Représentation schématique de l'organisation tissulaire et cellulaire de l'Hydre. Trois populations distinctes de cellules souches (C.S.) produisent les différents types cellulaires qui composent le feuillet externe ou ectoderme et le feuillet interne, endoderme. Une matrice extracellulaire nommée mésoglye sépare ces deux couches. Dans la colonne corporelle, les tissus de l'Hydre sont constamment renouvelés, d'une part, par les cellules interstitielles qui se divisent chaque jour, d'autre part, par les cellules épithéliales qui se divisent tous les trois ou quatre jours. Les cellules différenciées qui composent les extrémités sont régulièrement éliminées et remplacées.

de la différenciation somatique, la gamétogenèse et le développement embryonnaire obéissent également à des règles partagées avec les animaux bilatériens (Martin *et al.*, 1997; Alexandrova *et al.*, 2005).

Les formes de développement adulte de l'Hydre sont multiples : régulièrement nourrie, l'Hydre se reproduit de façon asexuée en bourgeonnant régulièrement (Otto & Campbell, 1977). Par ailleurs l'amputation de sa colonne corporelle à n'importe quel niveau induit un processus de régénération. Comme dans plusieurs espèces d'hydrozoaires, le processus de régénération peut même démarrer à partir de cellules réagréées obtenues après dissociation hyperosmotique des tissus (Noda, 1971; Gierer *et al.*, 1972). Plus banalement, le développement sexué est activé lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, telles la baisse de température et de lumière à l'automne ou la diminution de nourriture. Ces modifications de l'environnement induisent la gamétogenèse chez les polypes qui vont mourir après avoir produit des embryons. Ces embryons sont protégés par une épaisse cuticule qui leur permet de survivre jusqu'au moment où les conditions redeviennent favorables, ce qui dans la nature correspond au printemps suivant. Alors rapidement ces embryons terminent leur développement et éclosent (Martin *et al.*, 1997). Dans nos pays, de mai à fin octobre, il est donc facile de trouver des Hydres dans les étangs, volontiers attachées sous les feuilles de nénuphar.

De façon remarquable, l'Hydre partage avec la planaire de nombreuses caractéristiques, comme : (i) un stock de cellules souches pluripotentes qui produisent tout au long de la vie de l'animal des cellules germinales et des cellules somatiques (un cas plutôt rare chez les eumétazoaires dont les cellules germinales se

ségrégent tôt au cours du développement embryonnaire); (ii) un remplacement tissulaire continu grâce au stock de cellules souches très actives mitotiquement (stock unique chez la planaire, triple chez l'hydre); (iii) une reproduction asexuée efficace (le bourgeonnement chez la première, la fission chez la seconde); (iv) la capacité de régénérer toute partie manquante de leur corps; (v) une apparente absence de vieillissement tant que les animaux restent asexués (Brien, 1953; Martinez, 1998; Yoshida *et al.*, 2006; Pearson & Sanchez Alvarado, 2008).

Dans les deux systèmes modèles, des outils moléculaires et cellulaires performants ont été développés pour disséquer les mécanismes à l'origine de ces propriétés. En particulier dans les deux modèles, il est possible d'éteindre spécifiquement mais transitoirement l'expression de gènes grâce à l'ARN interférence, obtenue en nourrissant les animaux avec des bactéries qui produisent des ARNs double-brin (Newmark *et al.*, 2003; Reddien *et al.*, 2005; Chera *et al.*, 2006; Buzgariu *et al.*, 2008). Dans les deux systèmes, le séquençage de collections d'ADNc et de séquences génomiques a mis en évidence la grande conservation des cascades de signalisation au sein des eumétazoaires (Guder *et al.*, 2006; Sanchez Alvarado & Tsonis, 2006; Chapman *et al.*, 2010). Par ailleurs chez l'Hydre, des lignées transgéniques peuvent être produites, permettant ainsi de suivre le remodelage cellulaire induit par bissection (Wittlieb *et al.*, 2006; Khalturin *et al.*, 2007). Pour toutes ces raisons, la compréhension des mécanismes qui conduisent à la régénération de l'Hydre et de la planaire devrait permettre d'identifier quelques principes de régénération conservés des cnidaires aux animaux bilatériens.

Comment transcrire une blessure en un code de régénération ?

En effet, l'une des énigmes de la régénération est l'activation dans un organisme déjà développé de processus développementaux proches de ceux utilisés au cours de l'embryogenèse ou de l'organogenèse à la suite d'une blessure. L'analyse des phases immédiates et précoces consiste donc à caractériser les signaux délivrés au moment de l'amputation, signaux qui induisent une réponse cellulaire spécifique et transitoire, qui elle-même active le programme nécessaire au re-développement de la structure manquante. Nous ne discuterons pas ici cette dernière phase de re-développement, souvent similaire au programme de développement originel (Technau & Bode, 1999; Bryant *et al.*, 2002; Beck *et al.*, 2003; Pearl *et al.*, 2008).

Multiple programmes de régénération chez l'Hydre

Immédiatement après bissection transversale de l'axe apico-basal, les deux moitiés d'Hydre démarrent une suite de processus asymétriques par lesquels la moitié apicale régénère un pied en deux jours, la moitié basale une tête en trois jours. Les analyses biochimiques, cellulaires et moléculaires ont effectivement démontré que ces deux régions qui étaient adjacentes et identiques avant la bissection, subissent une réorganisation immédiate très différente afin de devenir rapidement des bourgeons de régénération spécifiques de la structure qu'ils vont régénérer. En particulier, après bissection au niveau mi-gastrique, l'activation de la voie MAPK et la phosphorylation du facteur de transcription CREB par la kinase RSK sont immédiatement observées du côté qui régénère une tête, induisant une apoptose massive des cellules de la lignée interstitielle et une augmentation rapide de la prolifération cellulaire (Kaloulis *et al.*, 2004; Chera *et al.*, 2009; Chera *et al.*, 2011). Ces deux types de régénération se distinguent sur bien des points puisque, dans le cas de la régénération du pied, il s'agit d'un processus proche de la réparation tissulaire incluant une phase de cicatrisation et une phase de différenciation des cellules du disque basal, tandis que dans le cas de la régénération de la tête, une étape de morphogenèse permet la mise en place d'une structure aussi complexe que la tête.

Cependant, mis à part ces deux types de régénération qui peuvent être comparés dans des tissus provenant d'un même animal, les analyses morphologiques, cellulaires et moléculaires ont également démontré que la régénération de la tête après décapitation (aussi appelée régénération « apicale » de la tête) et la régénération de la tête après bissection dans la région centrale du corps (aussi

appelée régénération « basale » de la tête) sont différentes. Après décapitation, les tentacules apparaissent d'abord, suivies de la bouche et de l'hypostome. Au contraire, après bissection mi-gastrique, l'hypostome se forme d'abord suivi des tentacules (Technau & Holstein, 1995). Cette différence peut s'expliquer par des différences quantitatives et qualitatives significatives entre ces deux régions : d'une part les cellules souches sont beaucoup plus nombreuses dans la région centrale de la colonne corporelle que dans les régions apicale et distale (David & Plotnick, 1980), d'autre part les cellules précurseurs situées à proximité des régions apicales et distales ont entamé leur détermination tandis qu'au niveau mi-gastrique, les cellules souches ne sont pas engagées vers une voie de différenciation apicale ou basale (Steele, 2002).

En résumé l'Hydre fournit un modèle dans lequel au moins trois programmes distincts de régénération peuvent être étudiés : (i) la régénération du pied qui ne requiert pas une morphogenèse complexe; (ii) la régénération apicale de la tête; et (iii) la régénération basale de la tête, le choix entre ces deux derniers programmes étant dicté par le statut de la région amputée. Ces programmes sont différents aux niveaux cellulaire et moléculaire et nous allons décrire ici les différents modes d'activation de la cascade Wnt qui conduisent à la régénération de la tête.

Les cellules apoptotiques, source de signalisation de la voie Wnt3 après bissection mi-gastrique

Après bissection au niveau mi-gastrique, le premier événement contrôlé par la voie Wnt3 au cours de la régénération de la tête de l'Hydre peut être détecté dès 15 minutes, lorsque les cellules de la lignée interstitielle (neurones, nématoblastes, nématocytes) proches du plan d'amputation sont soumises à une apoptose massive (Chera *et al.*, 2009). En effet, pendant une très courte période, le cytoplasme de ces cellules apparaît fortement Wnt3 immunopositif. Cependant cette phase immédiate et transitoire de surproduction de la protéine Wnt3 ne semble pas être sous contrôle transcriptionnel dans la mesure où une augmentation significative de l'abondance des transcrits n'est détectée que quelques heures plus tard (Hobmayer *et al.*, 2000; Chera *et al.*, 2009; Lengfeld *et al.*, 2009). Un scénario probable est que la protéine Wnt3 est en fait déjà présente dans les cellules qui vont mourir, vraisemblablement séquestrée dans un complexe dont la conformation, la cohésion ou la composition est modifiée par suite du stress de l'amputation. Ces modifications permettraient donc à la protéine Wnt3 de devenir détectable par immunofluorescence.

Ensuite le relargage de la protéine Wnt3 par les cellules apoptotiques permet d'activer la voie β -caténine

spécifiquement dans les cellules adjacentes qui n'ont pas été atteintes par la vague d'apoptose et sont dans la phase S du cycle cellulaire au moment de l'amputation. Cette activation est objectivée par la translocation nucléaire de la β -caténine entre 60 et 90 minutes après amputation, activation qui conduit à la division synchrone de ces cellules entre 3 et 4 heures après amputation (Chera *et al.*, 2009). En résumé, le stress de l'amputation dans cette région active immédiatement la voie de signalisation Wnt3- β -caténine dans les cellules interstitielles qui cyclent et migrent vers la zone d'amputation, induisant leur division synchrone (figure 3). Effectivement, huit heures après la bissection, la densité cellulaire du bourgeon de régénération est multipliée par trois. Ceci suggère que cette cascade joue un rôle essentiel dans l'activation par la blessure du programme de régénération de la tête.

De façon intéressante, le niveau d'apoptose semble être un paramètre essentiel de ce mécanisme car, lorsque le niveau d'apoptose est bas (comme dans les bourgeons qui régénèrent un pied), la cascade Wnt3- β -caténine n'est pas activée et lorsque le niveau d'apoptose est augmenté expérimentalement dans les bourgeons destinés à régénérer un pied, une surproduction du signal Wnt3 est notée, suivie d'une activation de la voie β -caténine dans les cellules en phase S, et finalement de la régénération d'une tête à la place d'un pied. Dans ce cas, la simple élévation du niveau d'apoptose suffit donc à forcer l'activation de la régénération de la tête dans une région destinée à régénérer un pied (Chera *et al.*, 2009). Cependant, comme l'ont montré les travaux du laboratoire Holstein, l'activation de la voie de signalisation Wnt- β -caténine n'est pas restreinte à cette phase immédiate de la régénération.

Régulation monophasique ou biphasique de la voie Wnt3 au cours de la régénération de la tête en fonction du niveau d'amputation

L'analyse de la régulation temporo-spatiale du gène *Wnt3* après décapitation et après bissection mi-gastrique a effectivement montré une surexpression dans les cellules épithéliales du bourgeon, précoce après décapitation (dès une heure), retardée après bissection mi-gastrique, les transcrits étant fortement détectés à partir de trois heures (Hobmayer *et al.*, 2000; Chera *et al.*, 2009; Lengfeld *et al.*, 2009). Cette induction de l'expression du gène *Wnt3* correspond au moment où l'activité organisatrice commence à apparaître dans le bourgeon, comme l'ont montré les expériences de transplantation (MacWilliams, 1983; Broun *et al.*, 2005; Lengfeld *et al.*, 2009). Parmi les différents gènes de type *Wnt*, *Wnt3* est effectivement le premier dont l'expression est induite, ce qui suggère

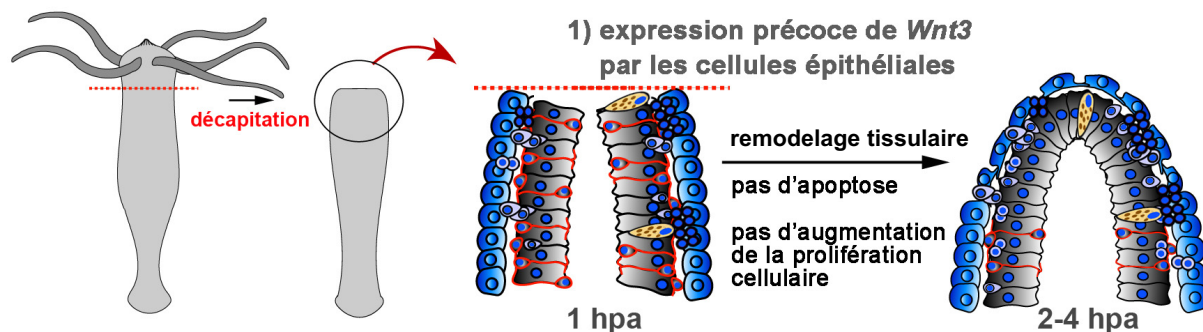
que *Wnt3* joue un rôle instructeur dans la formation du centre organisateur. Ensuite la plupart des différents gènes *Wnt* sont activés successivement au cours du premier jour de régénération, suggérant que la coordination temporelle de ces signaux au sein du bourgeon contrôle la régénération de la tête (Lengfeld *et al.*, 2009).

Cependant, les modes d'induction de la surexpression de *Wnt3* sont différents après décapitation et après bissection mi-gastrique. En effet si l'apoptose est inhibée après bissection mi-gastrique, l'activation précoce de la voie Wnt3- β -caténine n'est plus observée dans les cellules interstitielles et la surexpression deux heures plus tard du gène *Wnt3* dans les cellules épithéliales est abolie. Ce résultat indique que ces deux vagues successives d'activation de la voie Wnt3 sont liées, la première induisant la seconde (Chera *et al.*, 2009). Par contre après décapitation, l'activation de la voie Wnt3 dans les cellules épithéliales semble être directement induite, une activation de cette voie dans les cellules interstitielles n'ayant pas été observée (figure 3). En conclusion, nous distinguerons une signalisation Wnt3 immédiate et interstitielle, transitoire, probablement indépendante de la transcription et observée seulement au niveau mi-gastrique, d'une signalisation Wnt3 précoce et épithéliale, s'appuyant sur une régulation transcriptionnelle. Dans les deux contextes, régénération apicale et régénération mi-gastrique, l'expression Wnt3 épithéliale est soutenue tout le long du processus régénératif, jusqu'à ce que la nouvelle tête soit formée. Cette signalisation épithéliale apparaît donc nécessaire pour maintenir l'activité du centre organisateur.

La signalisation Wnt3 conduit à la formation de la tête chez l'Hydre

Le rôle essentiel joué par la cascade de signalisation Wnt3- β -caténine dans la régénération de la tête est démontré par quatre séries distinctes d'analyses fonctionnelles. Dans la première série d'expériences, Lengfeld *et al.* ont traité les polypes mutants reg-16 qui sont déficients pour la régénération de la tête avec de la protéine Wnt3 (Wnt3 hydre ou Wnt3 souris) pendant 20 heures et ont ainsi pu sauver le processus de régénération chez un grand nombre d'animaux (Lengfeld *et al.*, 2009). Ce traitement mime vraisemblablement l'effet du Wnt3 épithélial. Dans une deuxième approche, les mêmes auteurs montrent qu'une tranche de tissu gastrique incubée dans de la protéine Wnt3 pendant trois heures puis greffée sur un animal non traité induit plus fréquemment la formation d'une deuxième tête sur l'hôte. En l'absence d'analyses cellulaires, il est difficile de conclure quelle fonction Wnt3 est testée dans cette expérience, mais

régénération apicale de la tête



régénération basale de la tête

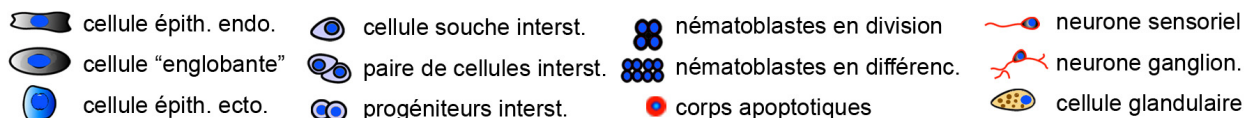
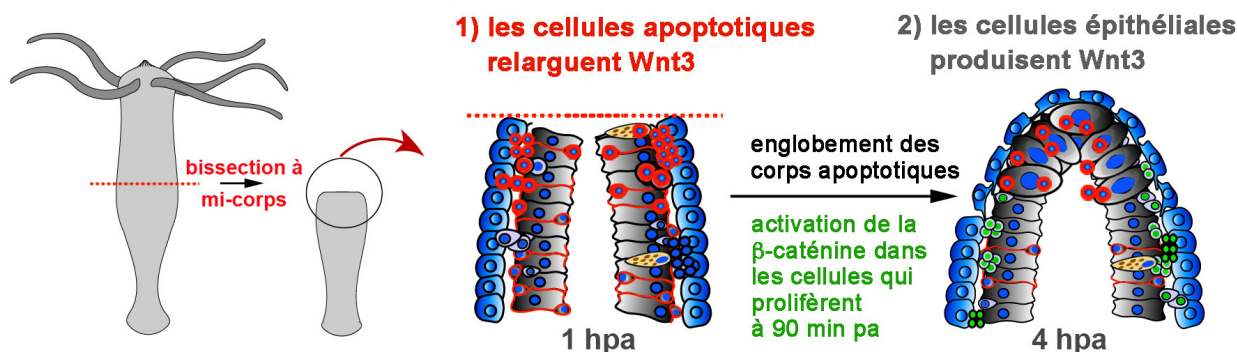


Fig. 3. Schéma comparant les phases précoces de la régénération de la tête de l'Hydre après décapitation (régénération apicale, partie supérieure) et après bissection à mi-corps (régénération basale, partie inférieure). Dans chaque contexte, l'organisation cellulaire des bourgeons de régénération est montrée. La ligne pointillée rouge représente le plan d'amputation. Au cours de la régénération apicale de la tête, l'amputation n'induit pas d'apoptose et les cellules épithéliales produisent rapidement le signal Wnt3. Au cours de la régénération basale de la tête, l'amputation induit l'apoptose de la plupart des cellules de la lignée interstitielle tandis que les cellules épithéliales de l'endoderme perdent leur polarité apico-basale et englobent les corps apoptotiques. En début d'apoptose, les cellules libèrent le signal Wnt3 qui active la cascade Wnt3-β-caténine dans les cellules avoisinantes qui cyclent (en vert), conduisant à leur rapide division mitotique. hpa : heures post-amputation.

étant donné la position de la greffe le long de l'axe du receveur, on peut s'attendre à ce que ce traitement Wnt3 mime plutôt l'effet immédiat du Wnt3 interstitiel, c'est-à-dire la synchronisation des cellules interstitielles proliférantes.

Dans un troisième type d'expériences, les polypes bissectés au niveau gastrique ont été exposés à un inhibiteur de l'apoptose qui bloque le processus régénératif. Lorsque les animaux sont en même temps incubés avec de la protéine Wnt3, le processus de régénération est sauvé, conduisant à 100 % d'animaux

régénérant leur tête contre 0 % chez ceux qui ne reçoivent pas de protéine Wnt3. Ceci prouve que la protéine Wnt3 exogène peut compenser l'absence de Wnt3 interstitielle (Chera *et al.*, 2009). Finalement les mêmes auteurs ont montré qu'une vague d'apoptose ectopique, obtenue en chauffant localement les bourgeons régénérant un pied, peut induire une sur-expression de Wnt3 dans les cellules apoptotiques, la translocation nucléaire de la β-caténine dans les cellules avoisinantes et la formation d'une tête ectopique. De nouveau, cette expérience démontre le rôle essentiel

joué par la voie Wnt3 immédiate interstitielle dans l'activation d'un programme de régénération de la tête.

Le modèle de l'Hydre confirme le lien entre prolifération compensatrice induite par l'apoptose et régénération

Bien que la régénération soit largement distribuée au sein du royaume animal, la question de savoir si des mécanismes de base sont partagés par différentes espèces au cours de cette régénération est loin d'être résolue (Brockes & Kumar, 2008; Tanaka & Ferretti, 2009; Bely & Nyberg, 2010). Récemment, nous avons proposé que la prolifération compensatrice induite par l'apoptose agisse comme un mécanisme conservé capable de déclencher une réponse de type régénératif à une blessure. Ce mécanisme semble en effet être à l'oeuvre chez la larve de mouche qui régénère ses disques imaginaux (Fan & Bergmann, 2008a; Bergantinos *et al.*, 2010; Morata *et al.*, 2011), chez le têtard de Xénope qui régénère sa queue (Tseng *et al.*, 2007), chez l'Hydre qui régénère sa tête après bissection mi-gastrique (Chera *et al.*, 2009), ou chez la souris qui régénère sa peau ou son foie (Li *et al.*, 2010). Par ailleurs l'apoptose a été détectée dans de nombreux contextes régénératifs tels que la planaire régénérant son corps (Hwang *et al.*, 2004; Pellettieri *et al.*, 2009).

Les radiologistes et les dermatologistes ont été en fait les premiers à établir une corrélation entre mort et prolifération cellulaire, ayant observé chez des patients que les régions avoisinant les zones irradiées proliféraient plus volontiers que les zones non irradiées (Danno & Horio, 1982; Kondo, 1988; Li & Wong, 1998). Effectivement en 1988, Sohei Kondo a proposé l'hypothèse selon laquelle « *L'inactivation de cellules radiosensibles par une irradiation à faible dose d'un organe en croissance ou se renouvelant lentement stimule la prolifération des cellules primordiales intactes. Cette augmentation de la prolifération cellulaire peut conduire, au moins pendant une courte période, à une augmentation de l'activité fonctionnelle de l'organe* ». Il a identifié le comportement des cellules qui meurent comme « *un suicide altruiste* » et a nommé ce processus « *la réparation par le remplacement cellulaire* » (Kondo, 1988).

L'apoptose étant un processus très rapide (en général complètement achevé en moins d'une heure), il fut très difficile d'identifier le relargage par les cellules apoptotiques de signaux qui stimulent la prolifération cellulaire des cellules avoisinantes. La confirmation de ce mécanisme fut apportée seulement en 2004 lorsque les généticiens de la mouche purent produire des cellules « non-mortes » qui expriment artificiellement l'inhibiteur de caspases p35. En effet à la

suite d'une irradiation ou bien de la surexpression de facteurs pro-apoptotiques, ces cellules « non-mortes » entrent normalement en apoptose mais ne terminent pas le processus apoptotique, les caspases effectrices étant inhibées (Huh *et al.*, 2004; Perez-Garijo *et al.*, 2004; Ryoo *et al.*, 2004). Cet état d'apoptose prolongé a permis de montrer que les signaux *wingless* (wg) et *decapentaplegic* (dpp) relargués par les cellules « non-mortes » du disque imaginal d'aile de la Drosophile induisent effectivement une prolifération compensatrice des cellules avoisinantes. De façon surprenante, le même signal Wnt3 fut identifié dans les cellules apoptotiques d'Hydre immédiatement après bissection, signal qui induit rapidement la division mitotique synchrone des cellules avoisinantes (Chera *et al.*, 2009).

La plasticité de la régénération est contrainte par les conditions homéostatiques

Cependant ces signaux mitogènes peuvent varier en fonction du statut des cellules qui entrent en apoptose. La meilleure illustration de ce concept est donnée par le disque imaginal de l'œil de Drosophile, où les cellules apoptotiques immortalisées situées dans le compartiment antérieur qui est prolifératif relarguent Wg et Dpp comme dans le disque imaginal de l'aile. Par contre, celles situées dans le compartiment postérieur où les cellules se différencient en neurones, relarguent Hedgehog (Hh) et non Wg ou Dpp (Fan & Bergmann, 2008a). Ces deux types de signalisation, qui dépendent donc de la niche cellulaire où ils sont initiés, correspondent en fait à deux formes distinctes de prolifération compensatrice induite par l'apoptose. En effet, dans les tissus qui prolifèrent, le relargage de Wg ou Dpp s'appuie sur l'activation de la caspase initiatrice Dronc (caspase 9) tandis que dans les tissus en voie de différenciation, le relargage de Hh s'appuie sur l'activation des caspases effectrices DrIce et DcpI (caspase 3) (Fan & Bergmann, 2008b).

De nouveau, un parallèle intéressant peut être fait avec le cas de l'Hydre chez qui les processus qui conduisent à la régénération de la tête diffèrent immédiatement selon le statut du tissu où la bissection a lieu. En effet l'Hydre utilise la prolifération compensatrice induite par l'apoptose seulement après bissection au niveau mi-gastrique, tandis que ce processus n'est pas activé après décapitation. Ces deux régions à partir desquelles la régénération de la tête est activée sont en fait très différentes : la région mi-gastrique contient une forte proportion de cellules souches tandis que la partie supérieure de la colonne gastrique contient peu de cellules souches mais des cellules progénitrices en voie de différenciation et des cellules différenciées (David & Plotnick, 1980; Steele, 2002).

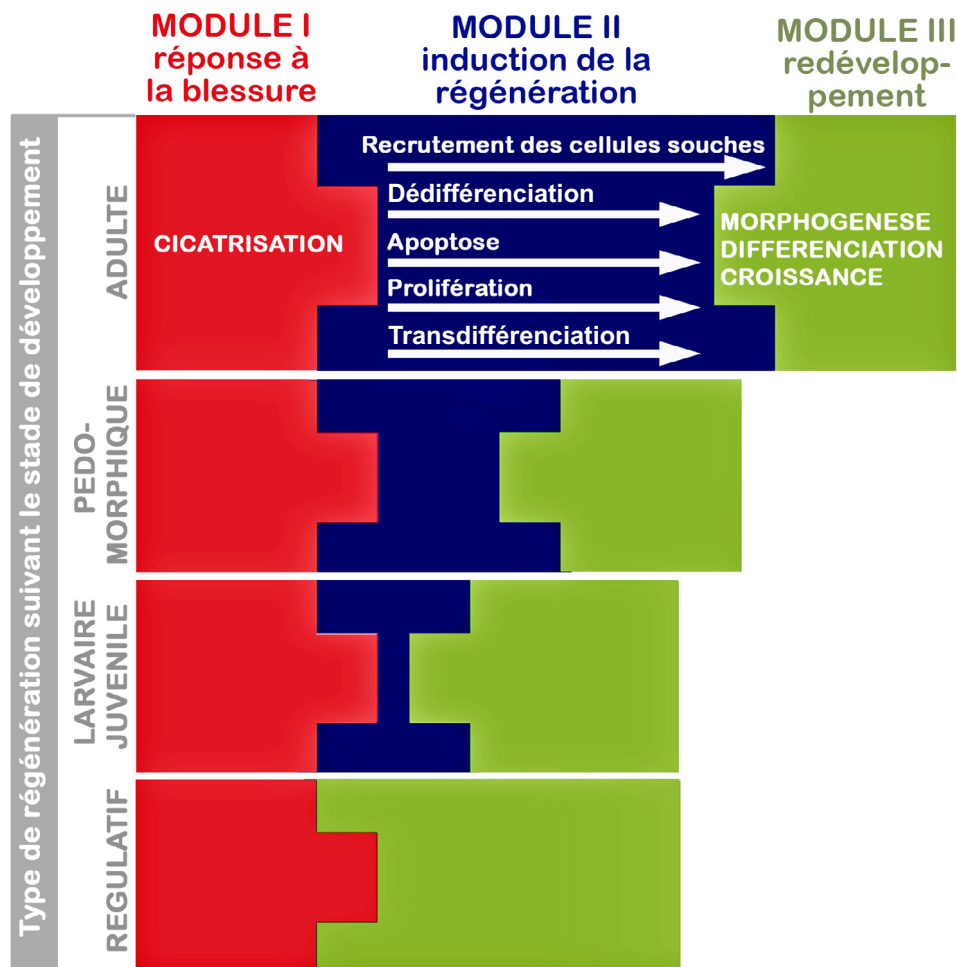


Fig. 4. Représentation de la structure tri-modulaire des différents types de régénération animale. Une réponse régénérative complète après lésion tissulaire ou amputation repose sur trois modules successifs, qui peuvent néanmoins se chevaucher : (I) un module de réparation à la lésion ; (II) un module inductif de la régénération ; (III) un module de redéveloppement. Les processus cellulaires impliqués dans le module I (non indiqués sur ce schéma) sont activés par les produits des gènes de réparation en présence ou en absence de régénération. Le module II est le plus variable de ces trois modules, reposant sur l'utilisation d'une palette de processus cellulaires qui peuvent se combiner. En effet, des espèces régénérant des structures homologues peuvent utiliser des routes différentes (comme les salamandres et le Xénope régénérant leurs appendices), une espèce donnée utilise généralement des routes différentes pour régénérer des structures différentes, ou même dans le cas de l'Hydre peut utiliser des routes différentes pour régénérer une même structure. Cette variabilité reflète les contraintes dues d'une part au stade de développement de l'organisme qui régénère, d'autre part à l'état homéostatique de la structure qui régénère au moment de la blessure. En effet, l'importance de ce module est inversement liée au dynamisme développemental de l'organisme. Par ailleurs ce module est conditionné par l'état homéostatique du tissu ou de la structure au moment de la lésion car il recrute et amplifie les outils cellulaires présents dans le tissu ou la structure au moment où a lieu la lésion. Il permet d'activer le programme de redéveloppement (module III), qui le plus souvent repose sur les cascades de signalisation utilisées au cours de l'organogenèse.

Ces résultats suggèrent fortement que, comme dans le cas de la *Drosophile*, l'environnement cellulaire influence de façon irrémédiable la réponse induite par la blessure qui lance le programme de régénération de la tête.

De façon plus générale, le fait que le contexte homéostatique contraigne les voies possibles de

régénération met en évidence une interaction entre mécanismes homéostatiques et programmes de développement qui apparaît comme une signature propre au phénomène de régénération, quel que soit le système utilisé comme modèle (Galliot & Ghila, 2010 ; Bergmann & Steller, 2010). Cette façon de considérer les processus régénératifs explique

pourquoi la régénération ne peut être réduite à un processus de *patterning* ou à une dynamique des cellules souches. Nous proposons un modèle tri-modulaire des processus régénératifs qui pourrait s'appliquer à la plupart des contextes où ils ont lieu : en effet nous voyons la régénération comme un processus essentiellement dynamique entre les deux bornes temporelles que sont le processus de réparation de la blessure et le re-développement de la structure qui a été détruite ou amputée. Par définition la connexion entre ces deux bornes doit être rétablie pour que le processus régénératif ait lieu (Simon *et al.*, 2009). Selon notre modèle, le choix parmi les routes possibles entre ces deux bornes est essentiellement dicté par les conditions homéostatiques du tissu ou de l'organe au moment de la blessure ou de l'amputation, conditions qui vont favoriser la différenciation et/ou l'apoptose, et/ou le recrutement de cellules souches, et/ou la trans-différenciation (figure 4). Par ailleurs la longueur du pont qui relie ces deux bornes est directement liée à l'intensité des processus de développement et de vieillissement en place dans l'organisme qui régénère : pratiquement aucun pont chez l'embryon mais un pont qui s'allonge au fur et à mesure que les processus développementaux s'éteignent et probablement, mais cela reste à prouver, que les tissus vieillissent chez l'adulte. Dans la construction de ce pont, le rôle précis joué par la prolifération compensatrice induite par l'apoptose reste encore à élucider.

Remerciements. Brigitte Galliot remercie les membres de son laboratoire pour leur excellente collaboration. Son laboratoire est financé par le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique, l'État du Canton de Genève, le projet pilote « Cellules Souches et Régénération » au sein du réseau national NCCR «Frontiers in Genetics», la donation Antoine et Georges Claraz, la Société Académique de Genève.

Références

- Alexandrova O., Schade M., Bottger A., David C.N., Oogenesis in Hydra: nurse cells transfer cytoplasm directly to the growing oocyte. *Dev Biol*, 2005, 281, 91–101.
- Beck C.W., Christen B., Slack J.M., Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate. *Dev Cell*, 2003, 5, 429–439.
- Bely A.E., Nyberg K.G., Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends Ecol Evol*, 2010, 25, 161–170.
- Bergantinos C., Vilana X., Corominas M., Serras F., Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology. *BioEssays*, 2010, 32, 207–217.
- Bergmann A., Steller H., Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal*, 2010, 3, re8.
- Brien P., La pérennité somatique. *Biol Rev*, 1953, 28, 308–349.
- Brookes J.P., Kumar A., Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2008, 24, 525–549.
- Broun M., Gee L., Reinhardt B., Bode H.R., Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway. *Development*, 2005, 132, 2907–2916.
- Bryant S.V., Endo T., Gardiner D.M., Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells. *Int J Dev Biol*, 2002, 46, 887–896.
- Buzgariu W., Chera S., Galliot B., Methods to investigate autophagy during starvation and regeneration in Hydra. *Methods Enzymol*, 2008, 451, 409–437.
- Chapman J.A., Kirkness E.F., Simakov O., Hampson S.E., Mitros T., Weinmaier T., Rattei T., Balasubramanian P.G., Borman J., Busam D., Disbennett K., Pfannkoch C., Sumin N., Sutton G.G., Viswanathan L.D., Walenz B., Goodstein D.M., Hellsten U., Kawashima T., Prochnik S.E., Putnam N.H., Shu S., Blumberg B., Dana C.E., Gee L., Kibler D.F., Law L., Lindgens D., Martinez D.E., Peng J., Wigge P.A., Bertulat B., Guder C., Nakamura Y., Ozbek S., Watanabe H., Khalturin K., Hemmrich G., Franke A., Augustin R., Fraune S., Hayakawa E., Hayakawa S., Hirose M., Hwang J.S., Ikeo K., Nishimiya-Fujisawa C., Aufschnaiter R., Eder M.K., Ogura A., Takahashi T., Steinmetz P.R., Zhang X., Gorny A.K., Salvenmoser W., Heimberg A.M., Wheeler B.M., Peterson K.J., Böttger A., Tischler P., Wolf A., Gojobori T., Remington K.A., Strausberg R.L., Venter J.C., Technau U., Hobmayer B., Bosch T.C., Holstein T.W., Fujisawa T., Bode H.R., David C.N., Rokhsar D.S., Steele R.E., The dynamic genome of Hydra. *Nature*, 2010, 464, 592–596.
- Chera S., de Rosa R., Miljkovic-Licina M., Dobretz K., Ghila L., Kaloulis K., Galliot B., Silencing of the Hydra serine protease inhibitor Kazal1 gene mimics the human SPINK1 pancreatic phenotype. *J Cell Sci*, 2006, 119, 846–857.
- Chera S., Ghila L., Dobretz K., Wenger Y., Bauer C., Buzgariu W., Martinou J.C., Galliot B., Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive Hydra head regeneration. *Dev Cell*, 2009, 17, 279–289.
- Chera S., Ghila L., Wenger Y., Galliot B., Injury-induced activation of the MAPK/CREB pathway triggers apoptosis-induced compensatory proliferation in Hydra head regeneration. *Dev Growth Differ*, 2011, 53, 186–201.
- Danno K., Horio T., Formation of UV-induced apoptosis relates to the cell cycle. *Br J Dermatol*, 1982, 107, 423–428.
- David C.N., Plotnick I., Distribution of interstitial stem cells in Hydra. *Dev Biol*, 1980, 76, 175–184.
- Driesch H., Die isolierten Blastomeren des Echinidenkeimes. *Arch Entwmech*, 1900, 10, 361–410.

- Fan Y., Bergmann A., Apoptosis-induced compensatory proliferation. The Cell is dead. Long live the Cell! *Trends Cell Biol*, 2008a, 18, 467–473.
- Fan Y., Bergmann A., Distinct mechanisms of apoptosis-induced compensatory proliferation in proliferating and differentiating tissues in the *Drosophila* eye. *Dev Cell*, 2008b, 14, 399–410.
- Galliot B., Ghila L., Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77, 837–855.
- Galliot B., Quiquand M., Ghila L., de Rosa R., Miljkovic-Licina M., Chera S., Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Dev Biol*, 2009, 332, 2–24.
- Gierer A., Berking S., Bode H., David C.N., Flick K., Hansmann G., Schaller H., Trenkner E., Regeneration of Hydra from reaggregated cells. *Nat New Biol*, 1972, 239, 98–101.
- Gould S.J., Of coiled oysters and big brains: how to rescue the terminology of heterochrony, now gone astray. *Evol Dev*, 2000, 2, 241–248.
- Guder C., Philipp I., Lengfeld T., Watanabe H., Hobmayer B., Holstein T.W., The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene*, 2006, 25, 7450–7460.
- Hobmayer B., Rentzsch F., Kuhn K., Happel C.M., von Laue C.C., Snyder P., Rothbacher U., Holstein T.W., WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature*, 2000, 407, 186–189.
- Huh J.R., Guo M., Hay B.A., Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr Biol*, 2004, 14, 1262–1266.
- Hwang J.S., Kobayashi C., Agata K., Ikeo K., Gojobori T. Detection of apoptosis during planarian regeneration by the expression of apoptosis-related genes and TUNEL assay. *Gene*, 2004, 333, 15–25.
- Kaloulis K., Chera S., Hassel M., Gauchat D., Galliot B. Reactivation of developmental programs: the cAMP-response element-binding protein pathway is involved in Hydra head regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 2363–2368.
- Khalturin K., Anton-Erxleben F., Milde S., Plotz C., Wittlieb J., Hemmrich G., Bosch T.C., Transgenic stem cells in Hydra reveal an early evolutionary origin for key elements controlling self-renewal and differentiation. *Dev Biol*, 2007, 309, 32–44.
- Kondo S., Altruistic cell suicide in relation to radiation hormesis. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 1988, 53, 95–102.
- Lengfeld T., Watanabe H., Simakov O., Lindgens D., Gee L., Law L., Schmidt H.A., Ozbek S., Bode H., Holstein T.W., Multiple Wnts are involved in Hydra organizer formation and regeneration. *Dev Biol*, 2009, 330, 186–199.
- Li Y.Q., Wong C.S., Apoptosis and its relationship with cell proliferation in the irradiated rat spinal cord. *Int J Radiat Biol*, 1998, 74, 405–417.
- Li F., Huang Q., Chen J., Peng Y., Roop D.R., Bedford J.S., Li C.Y., Apoptotic cells activate the “phoenix rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal*, 2010, 3, ra13.
- MacWilliams H.K., Hydra transplantation phenomena and the mechanism of Hydra head regeneration. II. Properties of the head activation. *Dev Biol*, 1983, 96, 239–257.
- Martin V.J., Littlefield C.L., Archer W.E., Bode H.R., Embryogenesis in Hydra. *Biol Bull*, 1997, 192, 345–363.
- Martinez D.E., Mortality patterns suggest lack of senescence in Hydra. *Exp Gerontol*, 1998, 33, 217–225.
- Morata G., Shlevkov E., Perez-Garijo A., Mitogenic signaling from apoptotic cells in *Drosophila*. *Dev Growth Differ*, 2011, 53, 168–176.
- Newmark P.A., Reddien P.W., Cebria F., Sanchez Alvarado A., Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, 11861–11865.
- Noda K., Reconstitution of dissociated cells of Hydra. *Zool Mag*, 1971, 80, 99–101.
- Otto J.J., Campbell R.D., Budding in Hydra attenuata: bud stages and fate map. *J exp Zool*, 1977, 200, 417–428.
- Pearl E.J., Barker D., Day R.C., Beck C.W., Identification of genes associated with regenerative success of *Xenopus laevis* hindlimbs. *BMC Dev Biol*, 2008, 8, 66.
- Pearson B.J., Sanchez Alvarado A., Regeneration, stem cells, and the evolution of tumor suppression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008, 73, 565–572.
- Pellettieri J., Sanchez Alvarado A., Cell turnover and adult tissue homeostasis: from humans to planarians. *Annu Rev Genet*, 2007, 41, 83–105.
- Pellettieri J., Fitzgerald P., Watanabe S., Mancuso J., Green D.R., Sanchez Alvarado A., Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev Biol*, 2009, 338, 76–85.
- Perez-Garijo A., Martin F.A., Morata G. Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signaling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development*, 2004, 131, 5591–5598.
- Philippe H., Derelle R., Lopez P., Pick K., Borchellini C., Boury-Esnault N., Vacelet J., Renard E., Houliston E., Queinnec E., Da Silva C., Wincker P., Le Guyader H., Leys S., Jackson D.J., Schreiber F., Erpenbeck D., Morgenstern B., Wörheide G., Manuel M., Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Curr Biol*, 2009, 19, 706–712.
- Reddien P.W., Bermange A.L., Murfitt K.J., Jennings J.R., Sanchez Alvarado A., Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Dev Cell*, 2005, 8, 635–649.
- Ryoo H.D., Gorenc T., Steller H., Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell*, 2004, 7, 491–501.
- Sanchez Alvarado A., Tsonis P.A., Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet*, 2006, 7, 873–884.
- Simon A., Berg D., Kirkham M., Not lost in translation Sensing the loss and filling the gap during regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, 2009, 20, 691–696.

- Steele R.E., Developmental signaling in Hydra: what does it take to build a “simple” animal? *Dev Biol*, 2002, 248, 199–219.
- Tanaka E.M., Ferretti P., Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10, 713–723.
- Technau U., Holstein T.W., Head formation in Hydra is different at apical and basal levels. *Development*, 1995, 121, 1273–1282.
- Technau U., Bode H.R., HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in Hydra. *Development*, 1999, 126, 999–1010.
- Trembley A., Mémoires pour servir à l’histoire d’un genre de polypes d’eau douce, à bras en forme de cornes, 1744 (Leiden).
- Tseng A.S., Adams D.S., Qiu D., Koustubhan P., Levin M., Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 2007, 301, 62–69.
- Wittlieb J., Khalturin K., Lohmann J.U., Anton-Erxleben F., Bosch T.C., Transgenic Hydra allow *in vivo* tracking of individual stem cells during morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103, 6208–6211.
- Yoshida K., Fujisawa T., Hwang J.S., Ikeo K., Gojobori T., Degeneration after sexual differentiation in Hydra and its relevance to the evolution of aging. *Gene*, 2006, 385, 64–70.
- Yu L., Han M., Yan M., Lee E.C., Lee J., Muneoka K., BMP signaling induces digit regeneration in neonatal mice. *Development*, 2010, 137, 551–559.