



HAL
open science

Rôle de la relation mitochondries-microtubules dans le devenir des axones après un trauma dans un dispositif microfluidique

Théo Andriot

► **To cite this version:**

Théo Andriot. Rôle de la relation mitochondries-microtubules dans le devenir des axones après un trauma dans un dispositif microfluidique. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS276 . tel-04831508

HAL Id: tel-04831508

<https://theses.hal.science/tel-04831508v1>

Submitted on 11 Dec 2024

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 de doctorat de
Sorbonne Université

École doctorale 158 – Cerveau Cognition et Comportement

Laboratoire Neurosciences Paris Seine - Équipe « Régénération et Croissance de l’Axone »

**Rôle de la Relation Mitochondries-Microtubules dans le
Devenir des Axones après un Trauma dans un Dispositif
Microfluidique**

Par Théo Andriot

Spécialité Neurosciences

Dirigée par Pr. Sylvia Soares

Présentée et soutenue publiquement le 30 Septembre 2024

Devant un jury composé de :

Pr. Nicolas GUÉROUT	Président
Pr. Jacques NOËL	Rapporteur
Dr. Cédric RAOUL	Rapporteur
Dr. Coralie FASSIER	Examinatrice
Dr. Marie-Christine MIQUEL	Examinatrice
Pr. Christian POÛS	Examineur
Pr. Sylvia SOARES	Directrice de thèse

Remerciements

La réalisation de cette thèse a été un long voyage passionnant et exigeant, marqué par de multiples défis et moments de doute. Sans le soutien inconditionnel et l'aide précieuse de nombreuses personnes, cette aventure n'aurait pas été aussi réussie.

Je remercie tout d'abord les professeurs Jacques Noël et Cédric Raoul, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également les docteurs Coralie Fassier et Marie-Christine Miquel ainsi que les professeurs Nicolas Guérout et Christian Poüs, d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je suis également reconnaissant envers la Fondation des gueules cassées, qui a financé ma dernière année de thèse et m'a ainsi offert les ressources nécessaires pour mener à bien ce projet.

Je remercie la docteure Fatiha Nothias de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir su favoriser un environnement de travail stimulant. Fatiha, merci de m'avoir accompagné dans ce parcours avec ta bonne humeur et d'avoir partagé avec moi tes connaissances.

J'ai eu la chance, dans cette équipe, d'avoir une directrice de thèse exceptionnelle à qui j'adresse toute ma reconnaissance. Sylvia, tu as toujours été bienveillante, humaine, disponible et patiente. Merci de m'avoir si bien accueilli, de m'avoir fourni un encadrement incroyable, des conseils avisés et un soutien constant tout au long de ces années. Tu as su partager et me transmettre ta passion, tes connaissances et ta rigueur scientifique en gardant ta porte toujours ouverte. Autant de qualités qui ont guidé ce travail ainsi que la personne que je suis. Tu m'as offert un sujet passionnant que tu m'as laissé m'approprier, et même compléter de mes idées, tout en me guidant sur le chemin de la science et du monde académique. J'espère que tu as pris autant de plaisir que moi à cheminer ensemble.

Merci également Jean-Michel. J'ai toujours pris plaisir à échanger avec toi et à écouter tes conseils avisés.

Merci aux membres de mon équipe — collègues devenus amis — Chaimae, Alice, Kadia, Uz, Thibaut, Isabelle, Clémence et Elias. Sans vous cette thèse n'aurait pas eu la même saveur et les immunos n'auraient pas été aussi réussies. Merci à Gauthier et Sonja, vous m'insupportez autant que je vous adore et c'est un privilège de faire partie avec vous des "Best Doctorants".

Je remercie également mes collègues physiciens, Chloé, sans qui l'essence même de ce travail n'aurait pas existé, P-E qui m'a entraîné au calcul mental, Guillaume pour les moments partagés en pièce de culture.

Enfin, la personne à qui je dois le plus n'est sans nul doute toi, Marie-Charlotte. J'ai la sensation que nous avons vécu les 400 coups dans cet institut, durant nos thèses respectives, en passant du stress à la joie et à ton fameux "one life". Pourtant, ce n'est que le début d'une longue amitié.

Merci à mes collègues du A3, tout particulièrement Virgile, Jessica, Katleen, Faustine, Lisa, Adèle, Baptiste et Laila. Sans oublier ceux, désormais ailleurs, qui m'ont pourtant si bien accueilli ici à mon arrivée : Delnia, Nolwenn, Josquin, Na, Teng, Xavier. Mais également ceux ailleurs dans l'institut, de l'IDPA jusqu'au Brainstorm : Agathe, Agnès, Baptiste, Symon, Maxime, Cuong, Jonas, Aurélien, Samar, Amina, Félix, Clara F., Clara G., Antoine, Svethna, Judith, Valentine.

Merci aussi à toutes les personnes de l'institut, la direction, la gestion, les plateformes, les ITA, chercheurs et enseignants, qui ont rendu cette expérience si agréable.

Je remercie les stagiaires que j'ai pu rencontrer et encadrer, les étudiants de Travaux Pratiques, pour m'avoir appris bien plus de choses que ce que j'ai pu vous partager.

Parce que ce travail de thèse s'est aussi poursuivi au-delà des murs du laboratoire, je remercie les équipes du Pantalon, du Crocodile, du Knight et du Mad Maker, où l'on trouve toujours du réconfort pour des soirées endiablées et parfois même ... enflammées. À défaut d'un prix Nobel (pour l'instant) je remercie chaque entreprise m'ayant montré son soutien au travers de *goodies* : ProteinTech, Eppendorf, Merck, Abcam, Ozyme, Lego.

Merci à mes amis, rencontrés tout au long de mon parcours, qui m'ont accompagné, soutenu, construit, de Toulouse à Limoges et jusqu'à Genève : Marie, Clara, Corentin, Thibaut, Andrea, Julien, Julie, Damien, Anaïs, Coralie, Alice, Jeff, Laura, Tim. Nos signes d'affection, bien que modestes, sont empreints d'une grande signification à mes yeux. Merci aussi aux amis rencontrés à Paris, Élise, Vincent et Adrien, qui m'ont accompagné du début à la fin et qui ont célébré avec moi chaque petite victoire.

Un merci tout particulier à ma famille, pour leurs encouragements constants et leur soutien tout au long de ce parcours, sans forcément tout comprendre.

Enfin, je tiens à te remercier ma merveilleuse Cécile, de m'avoir apporté ce qui a été jusqu'à présent l'année la plus épanouissante de ma vie, tant sur le plan personnel que scientifique.

À tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de cette thèse, et qui ne sont mentionnés ici, je vous adresse mes remerciements les plus sincères. Votre soutien a été une source inestimable de motivation et de force, et je suis profondément reconnaissant pour toute l'aide et les encouragements que j'ai reçus.

— Vous avoir dans mon cœur me mènera au paradis —

Résumé

Une lésion traumatique du système nerveux central (SNC) induit des mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à des dysfonctions irréversibles. En plus d'un environnement post-lésionnel non propice à la régénération axonale, le stress mécanique rend les neurones vulnérables. Au niveau moléculaire, la dégénérescence axonale est associée à des dommages mitochondriaux et une baisse d'ATP disponible, à une déstabilisation du cytosquelette, notamment des microtubules (MT), et finalement à la dégradation de l'axone. Il est montré que la stabilisation des MT ou le repositionnement des mitochondries, via le réseau de MT, stimulent la croissance des axones. Ainsi, les mitochondries et les MT sont essentiels pour déterminer le devenir de l'axone. Il est donc important de comprendre leur dynamique et leur régulation. Cependant, les mécanismes précis de l'interaction entre les mitochondries et les MT dans les axones post-lésionnels ne sont pas encore totalement élucidés. L'objectif de cette étude est de développer un modèle *in vitro* pour reproduire des réseaux simplifiés du SNC et effectuer un trauma mécanique afin de déchiffrer les processus de repousse axonale. Cela en évaluant la dynamique des MT et des mitochondries et son influence sur le devenir des axones. Nous nous sommes particulièrement intéressés au faisceau corticospinal (CST), dont les axones possèdent une faible capacité de régénération. Nous avons reproduit *in vitro* un faisceau orienté et fonctionnellement connecté assimilable au CST dans un nouveau système microfluidique. Ce dispositif permet l'application d'une lésion mécanique par compression, suivie d'une régénération axonale. En utilisant une approche pharmacologique pour moduler la stabilité des MT, la dynamique des mitochondries est analysée, ainsi que le devenir des axones après la lésion. Nos résultats révèlent qu'une acétylation accrue des MT dans l'axe des axones en régénération est associée à des MT stabilisés, qui restaurent la motilité des mitochondries, favorisant ainsi les mécanismes de régénération. Ces résultats soulignent le potentiel des médicaments ciblant les MT dans le développement de stratégies thérapeutiques.

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	5
Table des matières	7
Table des illustrations	9
Abréviations	11
Introduction	13
Contexte Général	15
I. Le système nerveux	17
1. Organisation	17
2. Lésion du système nerveux	22
2.1. Lésion de moelle épinière	27
2.1.1. Incidence, prévalence et impact économique	29
2.1.2. Thérapies	32
3. Plasticité post-lésionnelle	34
II. Les Microtubules	37
1. Structure et propriétés	38
1.1. Modifications Post-traductionnelles	41
1.2. Protéines associées aux microtubules	45
2. Fonctions des microtubules	49
3. Les microtubules comme cibles thérapeutiques	50
III. Les Mitochondries	53
1. Structure	53
2. Propriétés	55
2.1. Dynamique	55
2.2. Transport	59
3. Fonctions des mitochondries	61
4. Rôle des mitochondries dans la régénération	65
IV. Modèles expérimentaux	69
1. Culture de neurones <i>in vitro</i>	70
2. Systèmes microfluidiques	71
2.1. Évolution des systèmes microfluidiques	71
2.2. Procédés de fabrication	75
3. Modèle de lésion <i>in vitro</i>	78
Projet de recherche et Objectifs	81
Matériel & Méthodes	85

Résultats	91
I. Mise au point d'un système de lésion microfluidique	93
1. Lésion chimique	93
2. Lésion mécanique par étirement	95
3. Lésion mécanique par compression	98
II. Effet de l'état de la tubuline sur la dynamique mitochondriale et la régénération axonale	107
1. Article en préparation	107
2. Résultats supplémentaires	147
2.1. Effets des drogues du cytosquelette	147
2.2. Effet du milieu de culture post-lésionnel	154
3. Optimisation des protocoles	156
3.1. Système microfluidique	156
3.1.1. Fabrication des moules en résine polyglass	157
3.1.2. Assemblage des puces microfluidiques	159
3.2. Réalisation des co-cultures cortico-spinales	159
3.2.1. Troubleshooting	160
3.2.2. Viabilité des cultures	161
III. Expérimentations annexes	167
Discussion	169
Conclusion & Perspectives	185
Bibliographie	189
Annexes	237
Poster NeuroFrance	239
Poster FENS	240
Poster SfN	241
Curriculum Vitae	243

Table des illustrations

Figure 1 – Représentation de l'organisation neuronale dans la matière grise.....	17
Figure 2 – Schéma de l'organisation d'un neurone et de la communication nerveuse..	18
Figure 3 – Schéma de la transmission du potentiel d'action	19
Figure 4 – Représentation d'un neurone et des cellules gliales du SNC.....	20
Figure 5 – Schéma du Système Nerveux Central (SNC) et Périphérique (SNP).	21
Figure 6 – Événements cellulaires ayant lieu dans le SNP après une lésion.....	23
Figure 7 – Événements cellulaires après une lésion dans le SNC.....	24
Figure 8 – Subdivision d'une lésion de moelle épinière en deux compartiments	26
Figure 9 – Schéma des voies motrices corticospinales descendantes.....	28
Figure 10 – Répartition, étiologie et coût des lésions de moelle épinière traumatiques	29
Figure 11 – Organisation longitudinale de la moelle épinière et conséquences d'une lésion de moelle en fonction de la localisation.....	30
Figure 12 – Représentation schématique de l'étendue des conséquences sensorielles et motrices d'une lésion de moelle épinière.....	31
Figure 13 – Représentation schématique de l'avancée des stratégies thérapeutiques pour réparer les lésions médullaires.	33
Figure 14 – Schéma des différentes réponses potentielles de l'axone lésé et des neurones voisins, suite à une lésion.	34
Figure 15 – Eléments constituant le cytosquelette d'un neurone.....	37
Figure 16 – Structure, assemblage et instabilité dynamique des microtubules.....	39
Figure 17 – Modifications post-traductionnelles des microtubules.....	42
Figure 18 – Mécanismes d'acétylation et de tyrosination de la tubuline α	43
Figure 19 – Variations des modifications post-traductionnelles de la tubuline dans les différentes régions d'un neurone	45
Figure 20 – Localisation et structure des dimères alpha/beta-tubuline	48
Figure 21 – Fonctions des MT selon le type cellulaire.....	50
Figure 22 – Cytosquelette dans la structure du cône de croissance.....	52
Figure 23 – Structure de la mitochondrie.....	53
Figure 24 – Dynamique mitochondriale	56
Figure 25 – Transport mitochondrial, médié par les microtubules.....	60
Figure 26 – Processus de respiration cellulaire mitochondrial.....	65
Figure 27 – Schéma décrivant le comportement mitochondrial après lésion dans le système nerveux central.....	68
Figure 28 – Vue d'ensemble des différents systèmes de cultures cellulaire.....	72
Figure 29 – Représentation schématique du dispositif de culture microfluidique pour la reconstruction de réseaux neuronaux orientés	74
Figure 30 – Protocole de fabrication des puces microfluidiques.....	77

Figure 31 – <i>Différents systèmes de lésion en microfluidique</i>	79
Figure 32 – <i>Premier test de lésion chimique au triton</i>	94
Figure 33 – <i>Système de lésion par déformation de membrane</i>	96
Figure 34 – <i>Premier schéma du 18 janvier 2021 d'une puce microfluidique pour compression via des aimants</i>	99
Figure 35 – <i>Représentation schématique et photos d'une puce microfluidique pour compression</i>	101
Figure 36 – <i>Premier test de lésion par compression</i>	102
Figure 37 – <i>Observation de la déformation induite par la compression</i>	105
Figure 38 – <i>Évaluation du « sprouting » 24 heures après la lésion</i>	148
Figure 39 – <i>Quantification de l'effet de l'application de TSA 6heures après la lésion</i>	149
Figure 40 – <i>Effet de la TSA 48 heures et 96 heures après la lésion</i>	151
Figure 41 – <i>Quantification de l'effet des traitements appliqués dans la chambre proximale</i>	152
Figure 42 – <i>Effet de la combinaison de traitements sur la régénération</i>	153
Figure 43 - <i>Effet des facteurs trophiques sur la régénération</i>	155
Figure 44 - <i>Effet des facteurs trophiques sur l'activité calcique post-lésionnelle</i>	156
Figure 45 – <i>Étape de fabrication des moules en résine polyglass</i>	158
Figure 46 – <i>Survie des cultures au cours du temps</i>	163
Figure 47 – <i>Viabilité des cocultures cortico-spinales au cours du temps</i>	164
Figure 48 – <i>Lésion mécanique par compression appliquée à un réseau cortico-spinal de neurones de souris E14</i>	165
Figure 49 – <i>Effet du traitement neuroprotecteur sur la régénération axonale</i>	168

Abréviations

AAV	Virus Adéno-associé, <i>Adeno-Associated Virus</i>
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Diphosphate
AIF	Facteur inducteur de l'apoptose, <i>Apoptosis Inducing Factor</i>
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-Méthylisoxazol-4-Propionate
AMPc	Adénosine Monophosphate Cyclique
ANT	Translocase de nucléotides à adénine, <i>Adenine Nucleotide Translocator</i>
ASIA	Association américaine des blessés médullaires, <i>American Spinal Injury Association</i>
ATP	Adénosine Triphosphate
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau, <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CNTF	Facteur neurotrophique ciliaire, <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
CS	Cellule de Schwann
CSPG	Protéoglycanes de sulfate de chondroïtine, <i>Chondroitin Sulfate Proteoglycan</i>
CST	Faisceau cortico-spinal, <i>Cortico-Spinal Tract</i>
Ctx	Cortex
CtxSp	Cortico-Spinal
DIV	Jours <i>in vitro</i> , <i>Day In Vitro</i>
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
GABA	Acide gamma-aminobutyrique, <i>Gamma-AminoButyrique Acid</i>
GDNF	Facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales, <i>Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor</i>
GDP	Guanosine Diphosphate
GFAP	Protéine d'acides fibrillaires gliales, <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFP	Protéine verte fluorescente, <i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	Guanosine Triphosphate
HDAC	Histone Désacétylase
KIF	Protéine de la famille des kinésines, <i>Kinesin Family Protein</i>
MAG	Glycoprotéine associée à la myéline, <i>Myelin-Associated Glycoprotein</i>
MAP	Protéine associée aux microtubules, <i>Microtubule Associated Protein</i>
mCU	Uniporteur de calcium mitochondrial, <i>mitochondrial Calcium Uniporter</i>
MPT	Modification Post-Traductionnelle
MT	Microtubule(s)
MTA	Agent ciblant les microtubules, <i>Microtubule Targeting Agent</i>
MTOC	Centre organisateur des microtubules, <i>Microtubule Organizing Center</i>

NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
NT3	Neurotrophine-3
OMGp	Glycoprotéine de la myéline des oligodendrocytes, <i>Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein</i>
PBS	Tampon phosphate salin, <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDL	Poly-D-Lysine
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PKC	Protéine Kinase C
PTP	Pore de Transition de Perméabilité
RAG	Gènes associés à la régénération, <i>Regeneration-Associated Genes</i>
RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	Espèces réactive de l'oxygène, <i>Reactive Oxygen Species</i>
SCI	Lésion de moelle épinière, <i>Spinal Cord Injury</i>
SNC/CNS	Système Nerveux Central / <i>Central Nervous System</i>
SNP	Système Nerveux Périphérique
SNPH	Syntaphiline
Sp	Spinaux
SVF/FBS	Sérum de Veau Foetal / <i>Fetal Bovin Serum</i>
TBI	Lésion cérébrale traumatique, <i>Traumatic Brain Injury</i>
TIM	Translocase de la membrane interne, <i>Translocase of the Inner Membrane</i>
TOM	Translocase de la membrane externe, <i>Translocase of the Outer Membrane</i>
TSA	Trichostatine A

| Introduction

Contexte Général

Bien que l'humanité ait toujours été confrontée à diverses maladies, leur conception sociale est relativement récente. En 1964, Parsons conçoit la maladie comme une déviance sociale que la société doit contrôler. Il définit alors les rôles respectifs du médecin et du malade pour sortir de cette déviance (Rebhi et al., 2007). Critique de l'institution médicale, Ivan Illich postule en 1975 qu'elle induit une source de maladie, dont la médicalisation réduit l'autonomie de l'individu et amoindrit ses réactions et sa résistance (Baubérot, 1975). C'est dans cet esprit que les travaux de l'anthropologie sociale de la maladie — particulièrement prolifiques dans les années 1980 — privilégient ensuite l'étude des aspects sociaux et culturels de la maladie et mettent l'accent sur l'efficacité technique et symbolique des thérapeutiques ainsi que sur la dimension collective. Ils négligent alors les pratiques à caractères spirituels perçues comme irrationnelles.

Aujourd'hui, notre lutte contre la maladie s'appuie principalement sur la chirurgie, les médicaments, les thérapies adjuvantes et les dispositifs médicaux interventionnels. L'apparition et la généralisation des technologies avancées, du génie génétique aux organes artificiels, ouvre la voie à la médecine personnalisée, qui promet de repousser les frontières dans la prise en charge des pathologies (Guchet, 2017). Les possibilités d'intervention sur l'Humain sont donc grandes et les technologies de santé, qu'elles soient préventives, diagnostiques ou thérapeutiques, ont beaucoup évolué sous les effets des progrès de la biologie, de la physique, de la chimie et de l'informatique.

Pourtant, il existe encore des maladies, notamment celles liées au système nerveux, qui conduisent à une qualité et une durée de vie altérées, sans qu'aucune méthode efficace ne permette de prévenir ou de guérir ces syndromes. Et ce malgré plusieurs décennies de recherche active.

C'est notamment le cas des lésions du système nerveux central, en particulier au niveau médullaire. Dans ces lésions, l'écrasement par les structures osseuses induit la rupture des neurones, abolissant les communications nerveuses au sein de la moelle épinière. Ces pathologies affectent 15,4 millions de personnes dans le monde. Malheureusement, bien que certains tissus des mammifères adultes, comme la peau, soient capables de se reformer suite à une blessure, le système nerveux central adulte ne se régénère pas, résultant en une perte de fonction permanente et irréversible.

Historiquement, dès l'Égypte ancienne, ce traumatisme était diagnostiqué comme une maladie incurable (Van Middendorp et al., 2010). Ce pronostic a depuis été considérablement amélioré notamment depuis la théorisation des concepts de régénération, initialement introduit par Ramón y Cajal en 1907, et plus largement de « plasticité structurelle » (Stahnisch, 2022). Toutefois, ces lésions sont encore incurables et considérées hors de portée de la médecine à notre époque (Schwab, 2004).

La régénération axonale est la capacité d'un neurone à repousser son axone après une lésion, ce qui nécessite notamment la reformation d'un cône de croissance. Différents travaux, notamment ceux de l'équipe auprès de laquelle ce travail a été réalisé, ont permis de montrer l'implication de diverses structures, telles que le réseau de microtubules et le trafic intracellulaire associé.

Ainsi les progrès dans notre compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la capacité de régénération du système nerveux central permettent d'envisager diverses stratégies thérapeutiques. L'objectif, à terme, étant d'améliorer la condition de vie des personnes atteintes de lésions de la moelle épinière.

Dans ce contexte, j'ai dédié mon travail de thèse à l'étude de l'interaction entre les microtubules et les mitochondries, dans le devenir des axones après un traumatisme. Le partage de ce travail passera d'abord par le rappel de la composition et de l'organisation anatomique du système nerveux ainsi que les conséquences de ses lésions. Je définirai ensuite nos structures d'intérêt, pour observer que le cytosquelette est l'un des éléments clés du neurone. La régénération d'un neurone ne peut se faire sans le soutien des microtubules ni la production énergétique des mitochondries. Toutefois, l'approfondissement de tels mécanismes, compte tenu de la complexité de l'organisme, nécessite la mise en place de modèles expérimentaux que je détaillerai.

I. Le système nerveux

L'organisme se compose de différents organes et systèmes en interaction, chacun ayant sa fonction spécifique. Parmi eux, le système nerveux joue un rôle crucial dans la régulation des activités corporelles et l'adaptation aux variations de l'environnement. Lorsque ce système dégénère, ou développe des lésions, cela affecte l'ensemble de l'organisme.

1. Organisation

Le système nerveux est un ensemble cellulaire, organisé en circuits neuronaux. Ceux-ci traitent et transmettent des informations spécifiques pour fournir une réponse qui constitue la base des comportements (Purves, 2004) (figure 1). Cette transmission permet de réguler les fonctions de l'organisme en réponse aux changements de l'environnement interne et externe. Compte tenu de sa complexité, il est essentiel de commencer par identifier et définir ses composants fondamentaux ainsi que leur organisation spatiale, afin d'aborder notre sujet d'intérêt de manière éclairé.

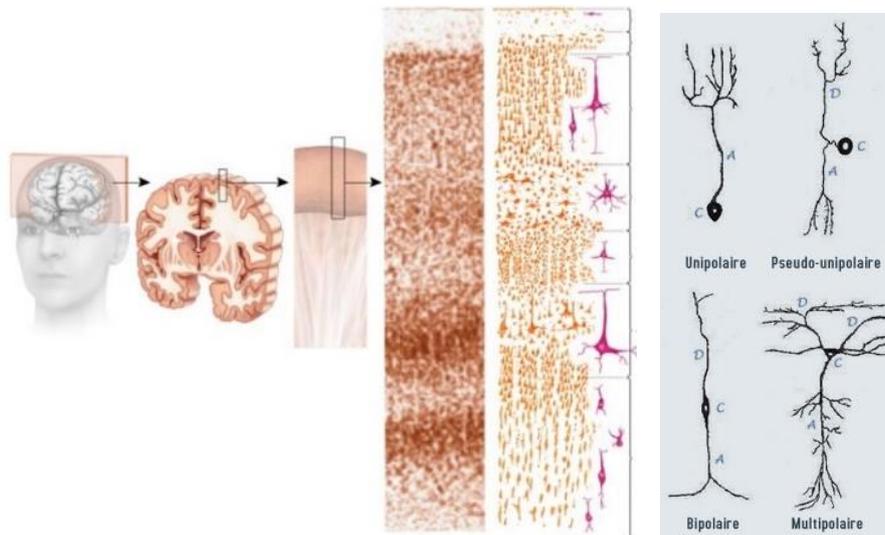


Figure 1 – Représentation de l'organisation neuronale dans la matière grise du cerveau des mammifères (Exemple des couches corticales du cerveau composés de plusieurs types neuronaux), et des différents types de neurones. A : Axone ; C : Corps cellulaire ; D : Dendrite. À partir de H. Fournié, V. Roy et V. Beauconsin -Université Ouverte des Humanités (UOH) / Université de Rouen Normandie.

La première cellule fondamentale du système nerveux à définir est le neurone (Cantile and Youssef, 2016), disposant d'une organisation polarisée, essentielle pour le transfert directionnel du signal. Les neurones se composent d'un corps cellulaire, le soma, qui abrite la machinerie cellulaire et métabolique de la cellule. À partir du soma s'étendent de nombreuses arborisations, les dendrites, qui permettent un transfert rétrograde du signal nerveux. S'étend également un prolongement unique jusqu'à plusieurs centaines de micromètres, l'axone (figure 2), par lequel s'effectue le transfert de l'influx nerveux aux cellules cibles (Purves, 2004). Toutefois il existe une diversité cellulaire au sein du système nerveux (voir figure 1). Ainsi, certains neurones réceptionnent les informations sensorielles, envoient des messages moteurs ou encore servent de relais d'informations.

Comme toute cellule, le neurone est protégé par une membrane qui assure notamment l'homéostasie, l'équilibre ionique et le contrôle de tous les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Grâce à leur morphologie et cette organisation complexe, l'information est transmise sous la forme de signaux électriques et chimiques. Le signal nerveux se propage au sein du neurone sous la forme d'un potentiel d'action, caractérisé par une dépolarisation de la membrane (figure 3), c'est-à-dire un déséquilibre transitoire des charges électriques facilité par l'ouverture de canaux ioniques.

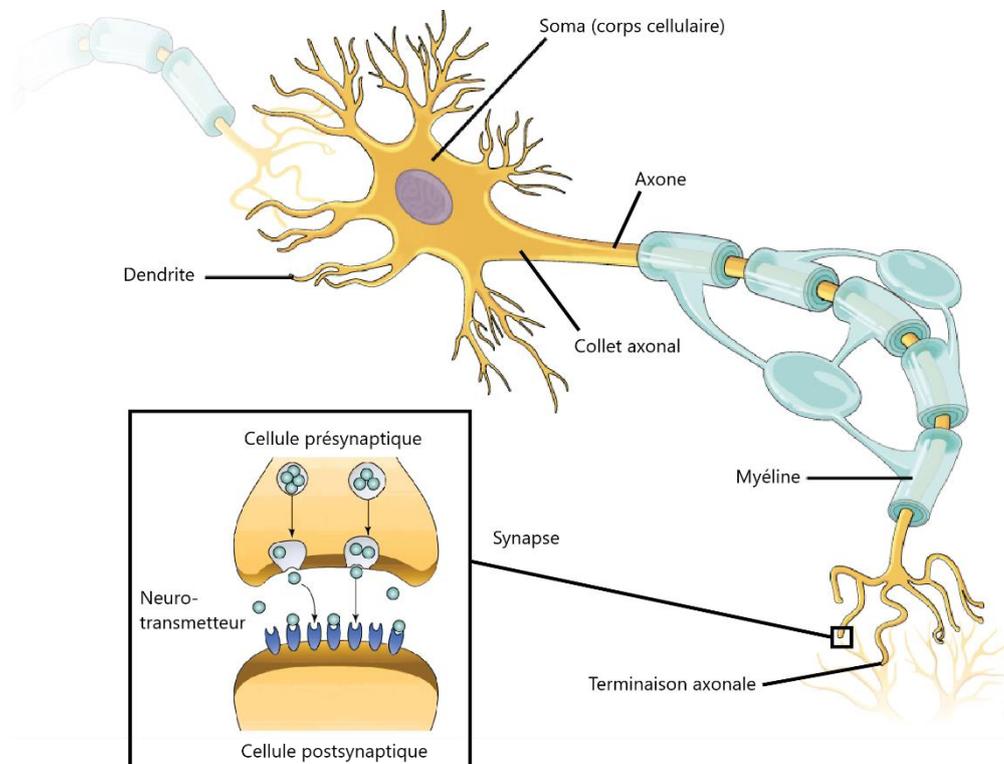


Figure 2 – Schéma de l'organisation d'un neurone et de la communication nerveuse au niveau d'une synapse dans le système nerveux central. À partir de Openstax College, *Biology* « 35.1 neurons and glial cells »

Le principal relais assurant la transmission de l'influx nerveux est la synapse (voir encadré figure 2) ; celle-ci peut-être chimique ou électrique. La synapse chimique, majoritaire, constitue une zone spécialisée fonctionnelle composée de trois éléments : la partie pré-synaptique axonale, qui convertit le signal électrique en sécrétion de neurotransmetteurs dans l'espace inter-synaptique, qui sont alors transmis et captés par les récepteurs de la partie post-synaptique dendritique, qui génère alors une dépolarisation membranaire. À l'inverse, dans la synapse électrique, les membranes des neurones sont directement reliées par des jonctions communicantes permettant le transfert des ions et la dépolarisation associée. Il existe de nombreux types de neurones, de neurotransmetteurs et, par conséquent de synapses, interconnectés en un réseau complexe et hétérogène. La connectivité synaptique entre les différents types de neurones se modifie en permanence afin d'intégrer de nouvelles informations et de répondre à l'environnement et ses perturbations. Ce processus constitue la plasticité neuronale.

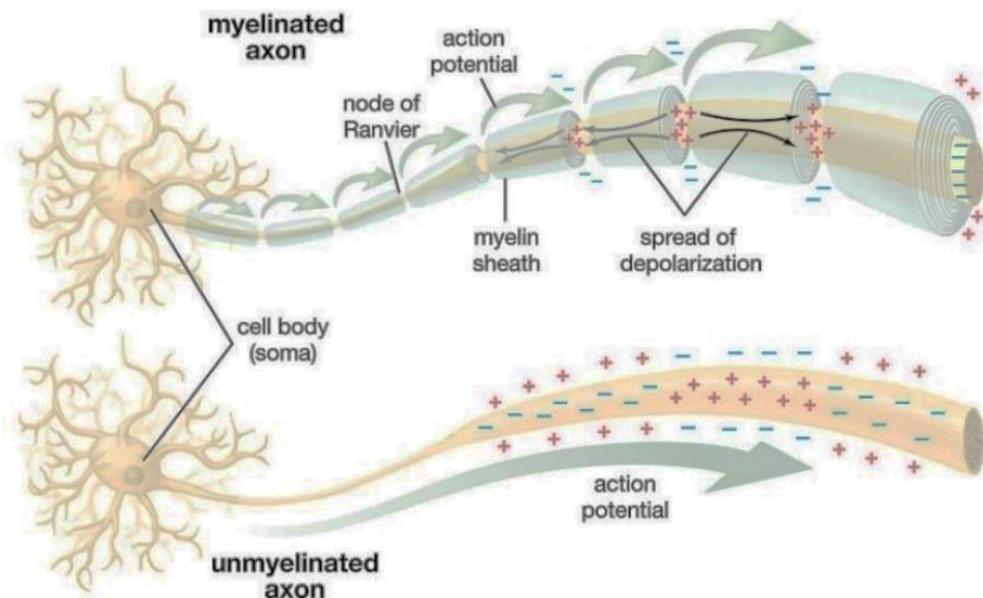


Figure 3 – Schéma de la transmission du potentiel d'action selon un mouvement saltatoire, grâce aux nœuds de Ranvier de la gaine de myéline. À partir de Openstax College, *Biology* « 35.1 neurons and glial cells ».

Les neurones ne fonctionnent jamais de manière isolée. Aussi les principales cellules constituant la diversité du système nerveux incluent les cellules gliales, parmi lesquelles se trouvent la microglie et la macroglie (Cantile and Youssef, 2016). En fonction de leur localisation il existe différents types de cellules macrogliales : astrocytes, oligodendrocytes et cellules épendymaires (au niveau central) ; cellules satellites et cellule de Schwann (au niveau périphérique) (figure 4). Elles permettent le maintien de l'intégrité des neurones et jouent également un rôle important dans la transmission du signal et la plasticité

neuronal. Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann assurent notamment la formation d'une structure lipidique et protéique appelée gaine de myéline, qui entoure les axones afin d'assurer une meilleure conduction du signal. Cette gaine n'est pas continue ; elle entoure l'axone par segments. L'alternance de segments myélinisés et amyéliniques forme les nœuds de Ranvier et permet une transmission plus rapide de la dépolarisation membranaire selon un mouvement dit saltatoire (voir figure 3). Le système nerveux est donc une structure complexe, diverse et dynamique.

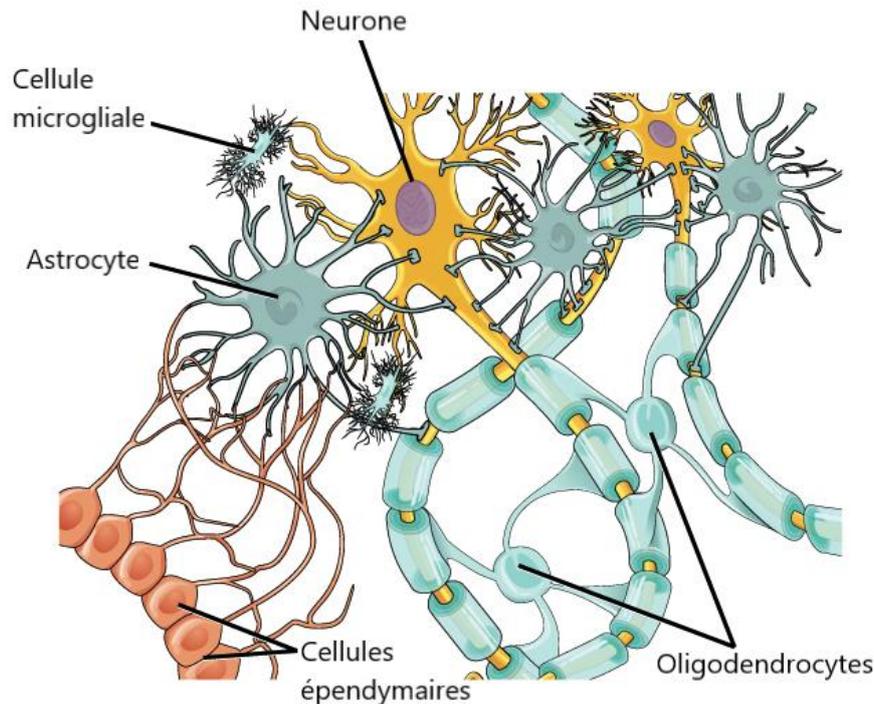


Figure 4 – Représentation d'un neurone et des cellules gliales du SNC qui constitue le circuit neural. À partir de Openstax College, *Biology* « 35.1 neurons and glial cells ».

Il est toutefois nécessaire de distinguer les différents systèmes. D'un point de vue anatomique, le système nerveux central (SNC) englobe l'encéphale et la moelle épinière. Par opposition au système nerveux périphérique (SNP), qui se trouve à l'extérieur du SNC et regroupe l'ensemble des nerfs sortant de la moelle, jusqu'à leurs effecteurs (Purves, 2004). Le SNP se subdivisant en différents systèmes assure la complexité des fonctions somatiques (volontaires) et végétatives de l'organisme (figure 5).

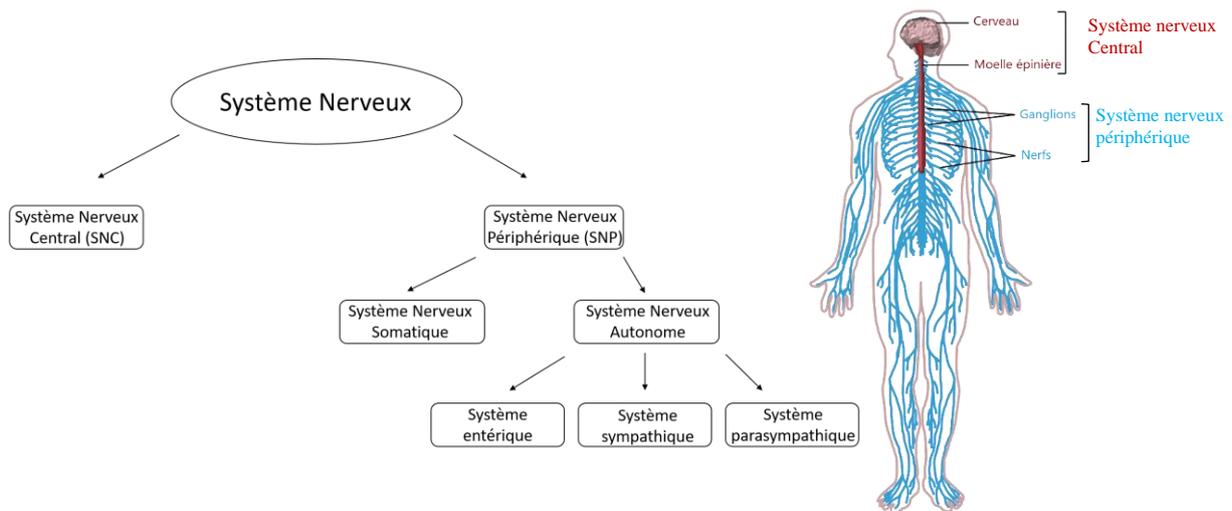


Figure 5 – Schéma du Système Nerveux Central (SNC) et Périphérique (SNP). Modifié à partir du site <https://www.khanacademy.org/science/biology/ap-biology/human-biology/neuron-nervous-system/a/overview-of-neuron-structure-and-function>

Ainsi, la moelle épinière constitue le lien entre les systèmes nerveux central et périphérique (figure 5) via de nombreuses voies de communication ascendantes, remontant les informations sensibles, et descendantes, transmettant les informations exécutives (Silva et al., 2014).

Il apparaît alors que les maladies perturbant les fonctions nerveuses représentent des défis particuliers, car elles perturbent un système organisé en réseau en perpétuel remaniement dont la fonction repose sur l'interconnexion spatiale correcte de ses différents constituants. Une lésion du système nerveux peut donc conduire à des pertes de fonctions sensorielles et motrices souvent irréversibles. Ces déficits sont notamment dus à une cascade d'événements cellulaires, moléculaires et biochimiques au sein du site lésionnel, où les réactions immunitaires et vasculaires entraînent la dégénérescence des axones (Cheriyana, 2014).

Au-delà des différences anatomiques et structurelles entre le système nerveux central et périphérique, ces systèmes répondent aussi différemment aux lésions. Dès le début du siècle dernier, Ramón y Cajal observait que, contrairement au système nerveux périphérique qui est capable de régénérer et de reconnecter ses cibles (Cajal and May, 1991; Zochodne, 2012), les axones du système nerveux central ont une faible capacité de régénération après une lésion. Cela représente un obstacle majeur à la récupération fonctionnelle. Toutefois, bien que les neurones qui meurent ne soient pas remplacés, ils disposent au niveau du SNC des mammifères, d'une capacité de régénération au cours

du développement. Tandis que cette capacité se maintient tout au long de leur vie au niveau périphérique. Cela suggère des différences dans les mécanismes impliqués propres à chacun des systèmes.

2. Lésion du système nerveux

Concernant les événements neuropathologiques au niveau du système nerveux périphérique, une lésion entraîne une rupture des membranes, facilitant ainsi l'entrée d'ions dans les axones. Cela provoque la propagation d'un signal rétrograde, l'activation de protéases calcium-dépendantes et une réorganisation du cytosquelette (Raivich and Makwana, 2007). Cela est suivi par le transport et l'activation de facteurs de transcription et une augmentation du taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) somatique, qui conduit à l'expression de gènes pouvant avoir deux effets opposés: la régénération ou la mort.

Deux phases sont décrites (Mietto et al., 2015). La première est caractérisée par des signaux pro-inflammatoires dus à la surrégulation de gènes pro-inflammatoires. Au cours de celle-ci se produit la dégénérescence Wallérienne (de la partie distale) responsable de la fragmentation de l'axone. Ces signaux entraînent l'activation et la différenciation des cellules de Schwann (CS) qui démyélinisent l'axone. Les débris de myéline permettent l'activation et la prolifération des CS et des fibroblastes, lesquels libèrent des cytokines favorisant l'activation des macrophages pour la phagocytose des débris. Progressivement, l'inflammation se réduit et cette phase est suivie par l'activation de signaux anti-inflammatoires et l'activation de gènes pro-régénérateurs, dits RAG (*Regeneration-associated genes*). Ces gènes codent pour des facteurs de transcription, des protéines de structure et du cytosquelette, des molécules d'adhérence et de guidage (Ma and Willis, 2015; Navarro et al., 2007). Les fibroblastes sécrètent alors des facteurs de croissance qui stimulent la formation de nouveaux vaisseaux. Tandis que les macrophages acquièrent un phénotype anti-inflammatoire. Les cellules de Schwann, elles, prolifèrent et sécrètent des facteurs neurotrophiques pour le guidage, la croissance et la remyélinisation des axones. Les protéines de la matrice extracellulaire sont également réorganisées et l'on retrouve l'expression de composants de la lame basale tels que la laminine et le collagène de type IV, pour permettre la croissance des axones (Mietto et al., 2015) (figure 6).

Ainsi, après une lésion du SNP, un microenvironnement permissif pour la croissance est formé, principalement par les cellules non neuronales. Cela stimule en retour les capacités

intrinsèques des neurones périphériques lésés. Les neurones adoptent un phénotype régénératif en synthétisant à nouveau des molécules non exprimées chez l'adulte dans des conditions physiologiques — telles que des protéines associées à la croissance et des composants structurels de la membrane —, mais en réduisant la synthèse des composants de la transmission synaptique (Navarro et al., 2007). La régénération dans le SNP dépend donc d'événements cellulaires et moléculaires bien orchestrés entre les neurones lésés et les cellules non neuronales (Cattin and Lloyd, 2016).

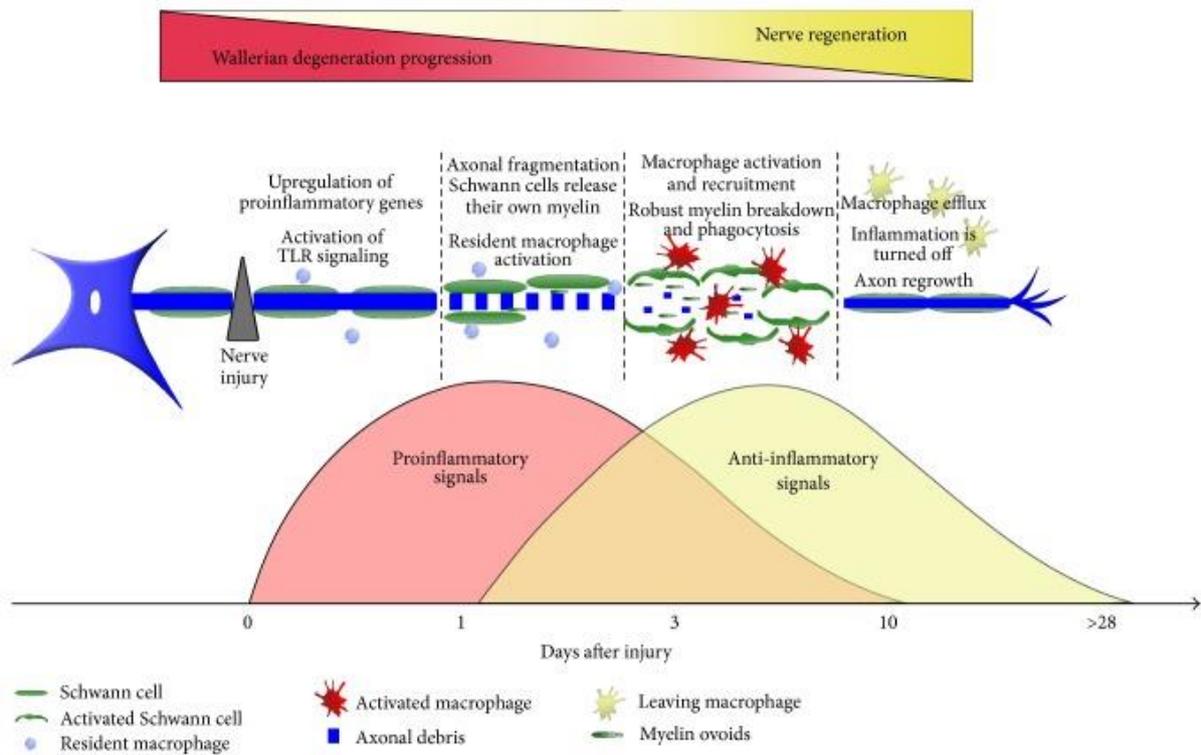


Figure 6 – Événements cellulaires ayant lieu dans le SNP après une lésion. D'après Mietto et al., 2015.

Par opposition, dans le système nerveux central, les événements précoces d'une lésion induisent une destruction du tissu et la mort des cellules. Basé sur les travaux d'Alfred R. Allen dès 1911, il a été postulé que de nombreux mécanismes cellulaires, moléculaires et biochimiques en découlent et induisent la progression des dommages, dits secondaires (Allen, 1911). Ainsi, la lésion primaire entraîne une rupture des membranes, notamment des axones, dont la dépolarisation du potentiel de membrane entraîne l'activation des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants pré-synaptiques, libérant des acides aminés excitateurs tels que le glutamate. Cela entraîne l'activation des récepteurs NMDA et AMPA, perturbant fortement l'équilibre ionique (Stys, 1998). Ces événements sont associés à la libération de dérivés réactifs de l'oxygène sous forme de radicaux libres (ROS) et la

peroxydation des lipides. Ce qui contribue à une forte excitotoxicité entraînant la mort programmée des cellules (apoptose), une déstabilisation du cytosquelette responsable de la fragmentation de l'axone et l'activation de la réponse inflammatoire (Schwab et al., 2006; Silva et al., 2014).

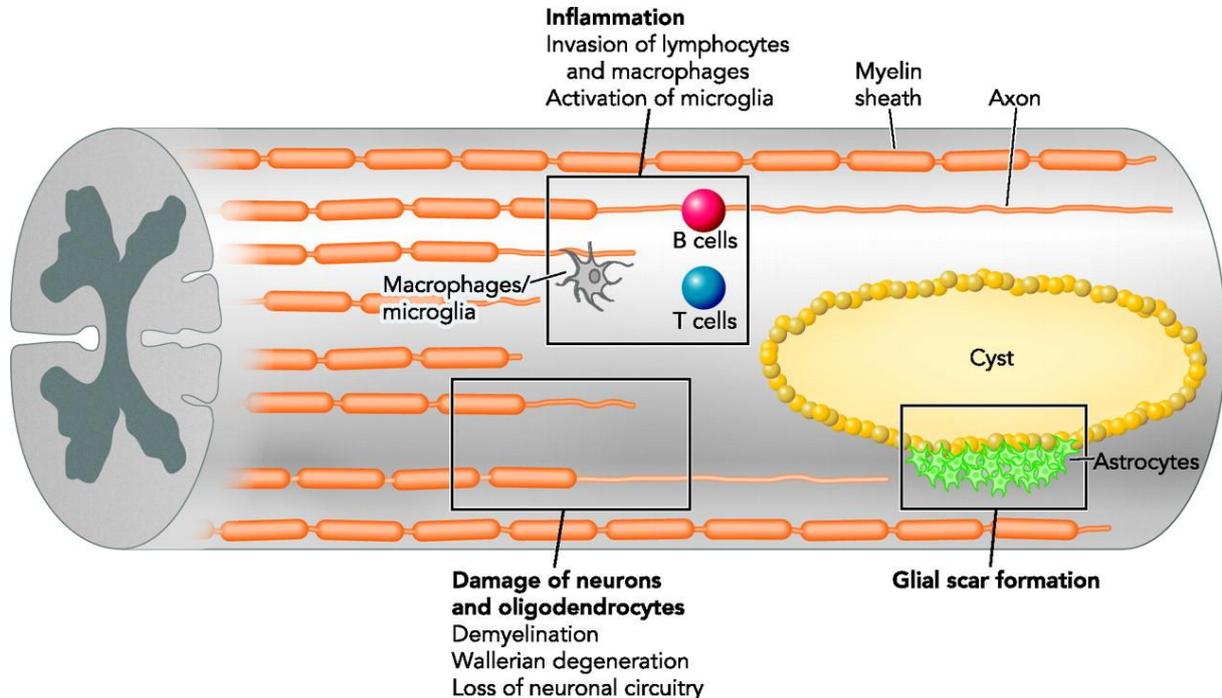


Figure 7 – Événements cellulaires après une lésion dans le SNC. D'après Obermair et al., 2008.

Les perturbations vasculaires, telle que la rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) — entraînant l'entrée sur le site lésionnel des cellules sanguines, immunitaires et des fibroblastes — conduisent à une ischémie et induisent une perte neuronale (Popovich et al., 1996; Silva et al., 2014; Tator and Fehlings, 1991; Zhou, 2014) (figure 7).

La libération de ROS agit également comme signal de progression de l'inflammation, qui entraîne des dommages supplémentaires du tissu initialement lésé, avec une perte neuronale et une démyélinisation (Hall, 1996; Horton, 2003; Hsu et al., 1996). En effet, les cellules inflammatoires, notamment les macrophages, sécrètent des protéases dont l'accès aux cellules est facilité par les dommages membranaires, et peuvent ainsi dégrader les éléments du cytosquelette (Mietto et al., 2015; Popovich et al., 1999). Par ailleurs, les débris de myéline libérés présentent des molécules inhibitrices pour la repousse axonale (Yiu and He, 2006), dont les trois principales sont MAG (Myelin Associated Glycoprotein), Nogo et OMgp (Oligodendrocyte Myelin glycoprotein) (Chaudhry and Filbin, 2007; McKerracher and Rosen, 2015; Schwab, 2004; Schwab and Strittmatter, 2014). L'action de ces inhibiteurs passe par leur couplage avec les récepteurs Ngr1/Troy, p75 et Lingo-1, qui activent une signalisation Rho/Rock conduisant au collapsus du cône

de croissance (Chaudhry and Filbin, 2007). Le blocage de ces molécules *in vivo* permettrait une régénération axonale sur de longues distances. En revanche, des travaux ciblant une triple déplétion de ces molécules inhibitrices mettent en évidence une amélioration de la régénération sans toutefois qu'il y ait un effet synergique (Lee et al., 2010). Ces inhibiteurs joueraient donc un rôle sans pour autant être centraux. Bien que ces inhibiteurs, notamment MAG, soient également présents dans l'environnement du SNP, les taux de laminine seraient suffisamment élevés pour neutraliser leurs effets. Par ailleurs, les débris de myéline y sont plus rapidement phagocytés.

Les cellules microgliales s'activent également, libèrent des cytokines et adoptent un phénotype macrophagique pour la phagocytose des débris. Finalement, les astrocytes deviennent réactifs à leur tour, marquant la phase chronique, et forment une cicatrice (figure 7), véritable barrière physique et chimique à la croissance, qui a longtemps représenté le principal frein à la régénération (Fawcett and Asher, 1999; Grimpe and Silver, 2002; Schwab et al., 2006). Communément appelée cicatrice gliale, on parlera plutôt de cicatrice fibrotique. En effet, la lésion se divise en deux parties : le cœur est composé de fibroblastes, de cellules NG2+ et de macrophages (Cregg et al., 2014; Shearer and Fawcett, 2001; Silver and Miller, 2004) et contient des protéines de la matrice comme la fibronectine, le collagène et la laminine. La périphérie est composée d'astrocytes réactifs. Entre les deux, une structure semblable à une « *glia limitans* », formée par les astrocytes est décrite (Shearer and Fawcett, 2001), dans laquelle leurs processus filamenteux s'entremêlent et expriment à leur surface des protéines de la matrice extracellulaire fortement inhibitrices, comme les Chondroïtines Sulfates Protéoglycanes (CSPG). Malgré son effet inhibiteur, des études récentes montrent que le remodelage de cette cicatrice serait en faveur de la récupération en synthétisant des molécules favorables à la régénération et qu'elle possède des propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires. En effet, l'ablation des astrocytes réactifs n'améliore pas la récupération et entraîne des perturbations de la réparation (Anderson et al., 2016; Sofroniew, 2009). Par ailleurs, l'utilisation de Chondroïtinase-ABC — qui clive les chondroïtines sulfates des protéoglycanes, rendant les CSPG moins inhibiteurs — a montré des résultats prometteurs dans la réparation de trauma du SNC chez les rongeurs et le chat (Bradbury et al., 2002; Kwok et al., 2012; Milbreta et al., 2014).

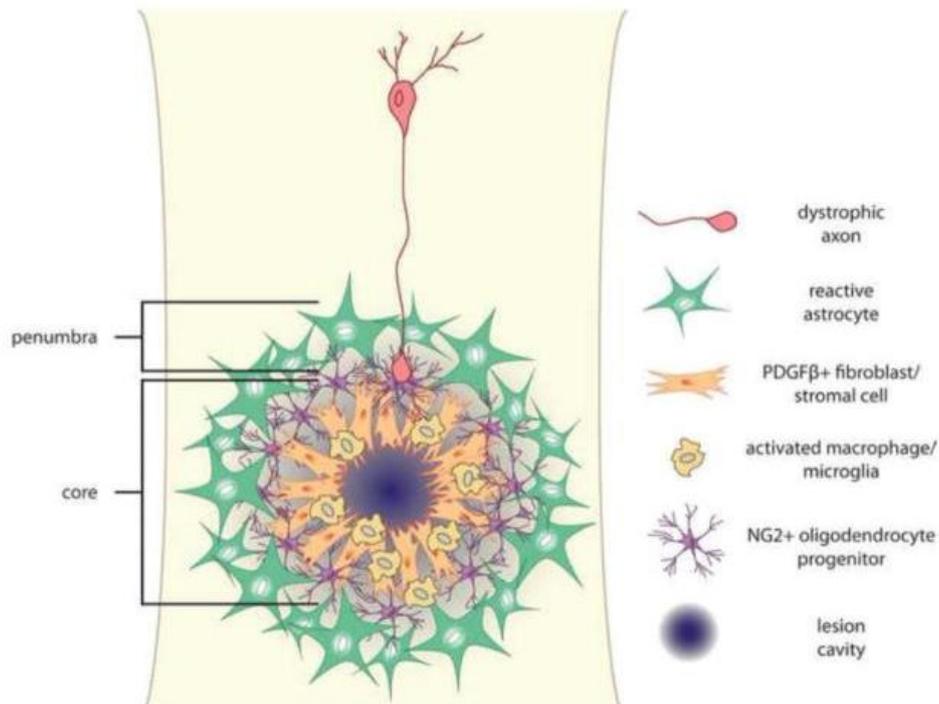


Figure 8 – *Subdivision d'une lésion de moelle épinière en deux compartiments (cœur et pénombre) et cicatrice fibrotique. D'après Cregg et al., 2014.*

La présence d'inhibiteurs s'accompagne de l'absence de facilitateurs, tels que des molécules du guidage axonal, des facteurs de croissance et des molécules d'adhérences, présents au cours du développement pour la croissance axonale (Anderson et al., 2018; Sofroniew, 2018). Ceci contribue à la théorie du chimiotactisme de Ramón y Cajal, selon laquelle l'attraction chimique par des substances neurotrophiques est essentielle pour la croissance et le guidage des axones durant le développement et après une lésion (Sperry, 1963; Weiss, 1934). À long terme, une cavité kystique remplie de fluide peut se développer au centre de la lésion — chez certaines espèces, comme le rat et l'homme — et la dégénérescence des axones myélinisés associée à une inflammation peut conduire à la formation de microcavités en amont et en aval de la lésion primaire. On parle alors de lésions secondaires.

Les neurones confrontés à ce nouvel environnement inhibiteur montrent une capacité intrinsèque de régénération limitée (Huebner and Strittmatter, 2009; Yiu and He, 2006). Leur capacité de croissance étant réduite une fois arrivés à maturité, ils montrent une faible réactivation de leur programme de croissance dans l'environnement inhibiteur d'une lésion. De multiples régulateurs génétiques sont mis en cause, tels que PTEN, mTOR, Arg-1 (Sofroniew, 2018). D'autre part, il a été montré qu'après une lésion

du SNC, il existe des tentatives de régénération restant infructueuses. L'environnement semble donc influencer la capacité de régénération, au même titre qu'une capacité de croissance intrinsèque adéquate.

2.1. Lésion de moelle épinière

Au niveau du SNC, la moelle épinière constitue le lien avec le SNP par des voies ascendantes et descendantes. Ainsi, une lésion à ce niveau récapitule les événements lésionnels du SNC détaillés précédemment et résulte en une interruption de la communication entre les centres nerveux supra-spinaux du cerveau et le reste du corps (pour revue Badhiwala et al., 2019).

Parmi les voies ascendantes et descendantes de la moelle, on trouve le faisceau cortico-spinal (CST). Il s'agit de la voie la plus longue, qui constitue la voie motrice pyramidale, permettant un lien topographique entre le cortex moteur et la moelle épinière. Par description neuroanatomique, il désigne les axones qui transmettent la commande motrice depuis le cortex cérébral jusqu'aux neurones de la corne antérieure de la moelle épinière (figure 9). En raison de sa localisation et de son trajet, on parle de voie pyramidale, qui intervient dans le contrôle de la motricité volontaire.

La voie pyramidale débute au niveau de la couche 5 du cortex moteur primaire (M1) via les neurones moteurs pyramidaux supérieurs. Ces axones, très longs, passent par la capsule interne, le tronc cérébral, où ils décussent à 90 % au niveau des pyramides bulbaires dans le bulbe rachidien chez les humains et les primates non humains, avant de parcourir la moelle épinière, jusqu'à faire une synapse avec les motoneurones inférieurs spinaux au niveau de la corne ventrale (Purves, 2004). Cette connexion directe des fibres corticales avec les neurones moteurs intra-spinaux se retrouve également sur d'autres modèles tels que le rat (Gu et al., 2017). À l'inverse, chez la souris, les axones corticaux font d'abord relais avec des populations d'interneurones spinaux gabaergiques et glutamatergiques, qui à leur tour projettent sur les neurones moteurs spinaux. Dans ce modèle, la connexion directe des fibres corticales et spinales existe dans une moindre mesure (Côté et al., 2018; Hughes and Todd, 2020).

Les motoneurones projettent ensuite vers les muscles en quittant le SNC via des racines ventrales. Cette voie permet ainsi la transmission d'une information motrice volontaire qui subit sur son trajet de nombreuses régulations par des structures corticales (cortex

prémoteur), sous-corticales (ganglions de la base) et spinales (interneurones de la moelle) pour permettre un mouvement fin et contrôlé.

Dans un traumatisme de la moelle épinière, les neurones intra-spinaux localisés au site lésionnel meurent et les axones ascendants et descendants tendent à dégénérer de manière rétrograde. Ainsi, les axones des neurones du faisceau cortico-spinal sont particulièrement affectés et possèdent une faible capacité de régénération.

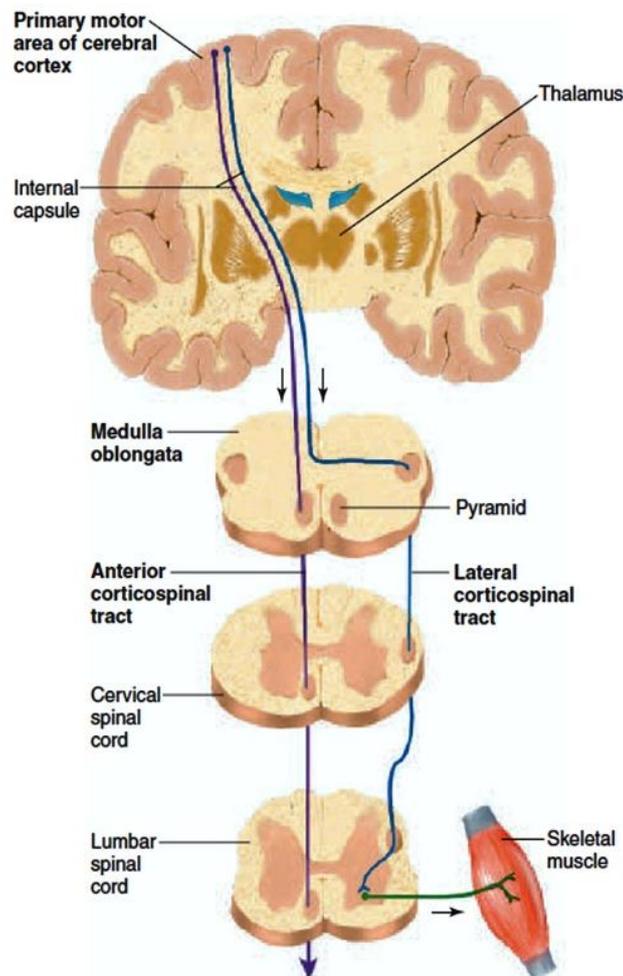


Figure 9 – Schéma des voies motrices corticospinales descendantes antérieures et latérales. D'après Silva et al., 2014.

2.1.1. Incidence, prévalence et impact économique

Ces pathologies dévastatrices entraînent des dommages neurologiques qui provoquent des handicaps sensoriels, moteurs et cognitifs à long terme. Leur prévalence est estimée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) entre 250 000 et 500 000 cas dans le monde chaque année. Ainsi en 2021, l'OMS estime qu'environ 15,4 millions de personnes vivent avec une lésion de la moelle. Les principales causes sont d'origine traumatique (accidents de la circulation, chutes et violences), sans distinction de sexe ni d'âge, mais affectant principalement les hommes de 45 à 60 ans (Witiw and Fehlings, 2015; Zhao and Fawcett, 2013) (figure 10). Ces lésions représentent également un lourd fardeau social et économique (figure 10). Comme l'estime le Centre statistique national américain sur les lésions de la moelle épinière, les coûts varient de 1,5 à 3 millions de dollars américains par personne souffrant de lésion traumatique tout au long de leur vie, selon l'emplacement et la gravité de la lésion (Fehlings, 2017).

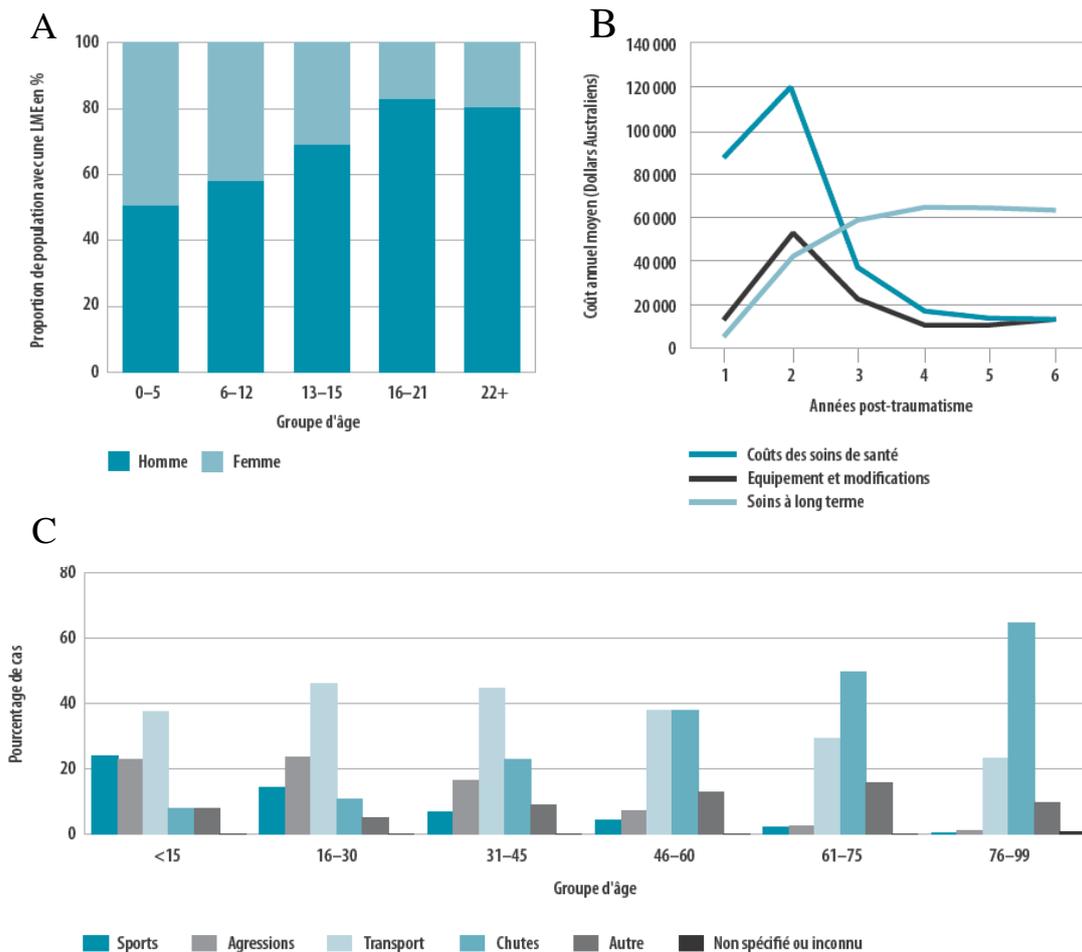


Figure 10 – Répartition, étiologie et coût des lésions de moelle épinière traumatiques par sexe et âge (A et C). Coût annuel moyen post lésion par type de coût pour la tétraplégie (B). D'après OMS, 2014.

En fonction de la localisation et de la gravité de la blessure, les lésions médullaires peuvent être incomplètes ou complètes et sont classées selon l'échelle de déficience ASIA — *American Spinal Injury Association* — (Kirshblum et al., 2011). Cette échelle est utilisée pour évaluer la gravité d'une lésion. Elle se compose de plusieurs critères, notamment moteurs et sensori-moteurs, afin d'attribuer un grade à la lésion, allant de A à E :

- Grade ASIA - A : Perte totale de la fonction sensorielle et motrice en dessous du niveau de la lésion.
- Grade ASIA - B : Préservation de la sensation, mais perte totale de la fonction motrice en dessous du niveau de la lésion.
- Grade ASIA - C : Préservation partielle de la sensation et de la fonction motrice en dessous du niveau de la lésion.
- Grade ASIA - D : Préservation de la sensation et de la fonction motrice, bien que la force musculaire soit diminuée par rapport à la normale.
- Grade ASIA - E : Fonction sensorielle et motrice normale.

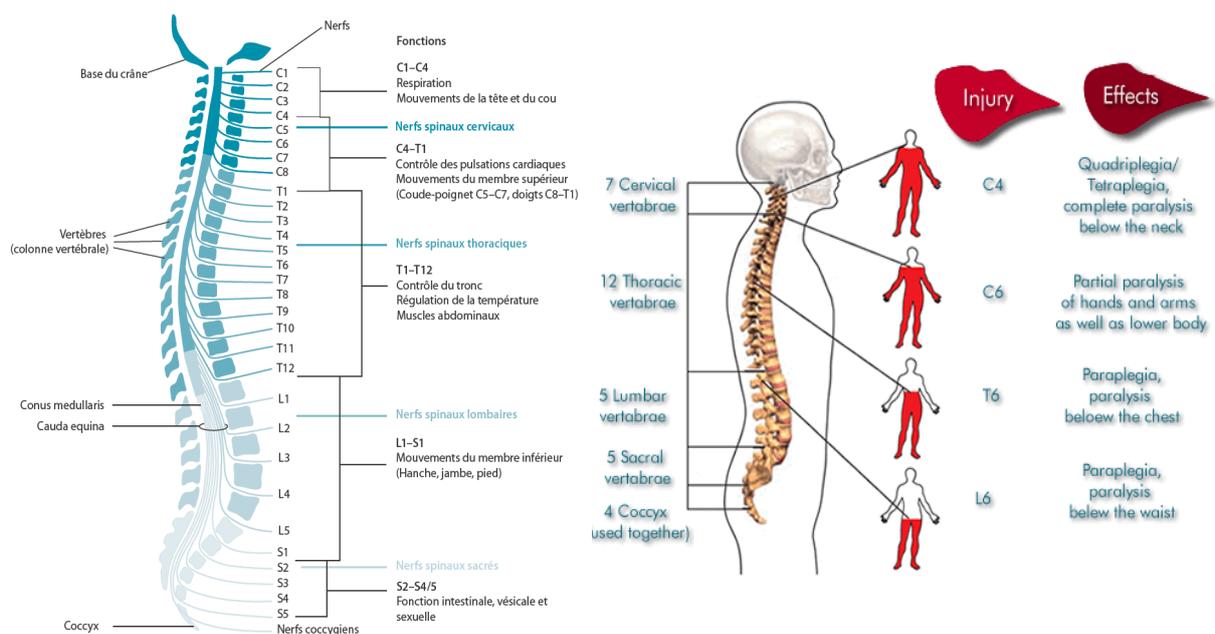


Figure 11 – Organisation longitudinale de la moelle épinière et conséquences d'une lésion de moelle en fonction de la localisation. À partir de OMS, 2014 et du site <http://www.living-with-attendant-care.info/>

Lorsqu'elles affectent les régions thoracique ou lombaire, il en résulte une paraplégie ; les patients conservent alors l'usage de leurs bras et de leurs mains. Une lésion cervicale entraîne une tétraplégie ; les patients perdent alors le contrôle total de leurs bras, mains et jambes. La description des conséquences de ces lésions est souvent limitée à la perte

partielle ou totale de fonction motrice et sensitive (figure 11). Cependant, cela ne représente pas l'ensemble des troubles observés. Les patients atteints souffrent également de pertes des fonctions viscérales (figure 12), ce qui réduit leur autonomie, détériore leur qualité de vie et augmente de deux à cinq fois le risque de mort prématurée, selon l'OMS.

Comprendre et traiter ces lésions n'est pas chose facile, car elles ne sont ni homogènes ni reproductibles. Tout d'abord, en raison de l'existence de différentes morphologies qui varient en taille et en conséquence anatomique telles que les lésions dites complètes et incomplètes (O'Shea et al., 2017). Une lésion anatomiquement complète entraîne l'absence totale de connectivité neuronale sur toute la largeur de la moelle épinière. Contrairement aux lésions anatomiquement incomplètes, qui sont des lésions plus petites et qui affectent seulement une partie du tissu neural tout en préservant une certaine connectivité neuronale. Celles-ci peuvent encore maintenir une communication qui soutient potentiellement la récupération spontanée.

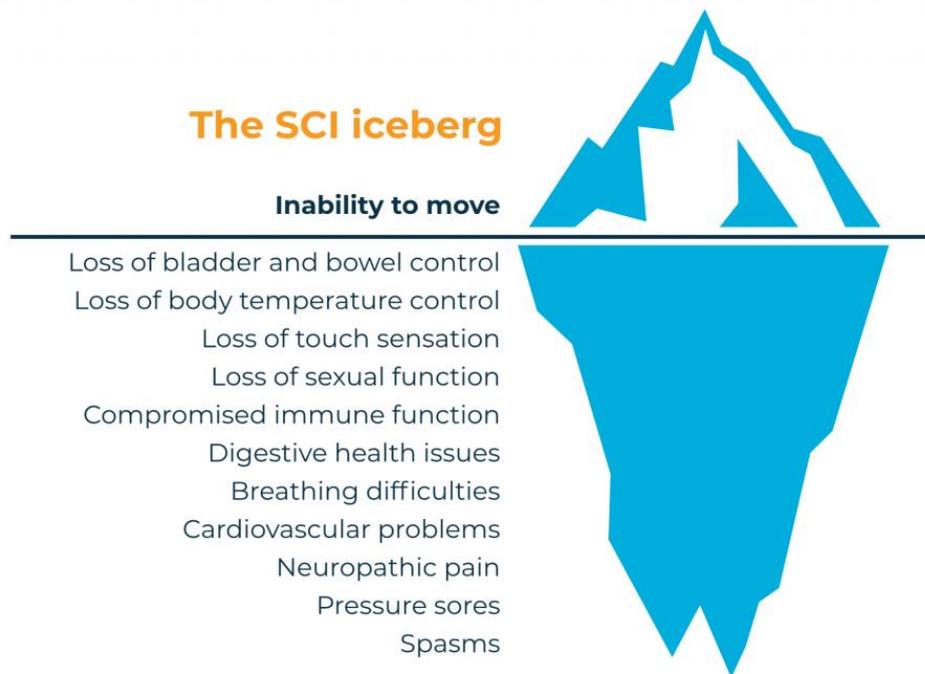


Figure 12 – Représentation schématique de l'étendue des conséquences sensorielles et motrices d'une lésion de moelle épinière. À partir du site <https://www.spinalcure.org.au/>

2.1.2. Thérapies

Après une telle lésion, la régénération repose sur la formation d'un nouveau cône de croissance actif, qui fait appel à un remaniement de l'architecture cellulaire. Toutefois, les processus de régénération sont très énergivores. Cette énergie peut être fournie par les mitochondries. Par ailleurs, rétablir un circuit fonctionnel dans le SNC endommagé constitue un défi à plusieurs niveaux, tant intrinsèques qu'extrinsèques. Ainsi, compte tenu de la complexité de cette pathologie, il n'existe à ce jour aucun traitement thérapeutique efficace. Les seuls traitements administrés en clinique incluent la décompression chirurgicale, la réhabilitation et éventuellement l'utilisation de méthylprednisolone. Toutefois, l'utilisation de cet agent anti-inflammatoire est désormais controversée et non recommandée (Cabrera-Aldana et al., 2017; Hugenholtz et al., 2002). En l'absence d'un traitement efficace, la recherche se concentre non seulement sur des approches de biologie cellulaire et moléculaire telles que la régénération axonale, mais également sur la compréhension des principes de réparation de la moelle épinière. Les chercheurs tendent à explorer de nouveaux domaines, tels que l'ingénierie ou encore les neurotechnologies, afin de stimuler la plasticité du réseau et permettre une récupération fonctionnelle (figure 13).

La nécessité de cibler plusieurs aspects des lésions afin d'envisager une récupération fonctionnelle est désormais bien renseignée. Ainsi les possibilités thérapeutiques s'intéressent notamment à la neuroprotection (pour réduire les dommages secondaires), la neuro-régénération et la plasticité (pour limiter les facteurs inhibiteurs, permettre une régénération intrinsèque et un guidage des axones), la neuro-restauration (pour assurer la remyélinisation et la restauration de la conductivité) ainsi que la neuro-reconstruction du tissu (Schwab et al., 2006). Afin de regrouper ces aspects, la combinaison de stratégies thérapeutiques est de plus en plus étudiée.

Grâce aux efforts considérables de la communauté scientifique et neuroscientifique, nous avons désormais une compréhension de plus en plus claire des lésions de la moelle épinière et de la réponse du système. Cela n'aurait pas pu être atteint sans l'utilisation de modèles expérimentaux, lesquels permettent la collecte de connaissances fondamentales sur les cellules, les tissus et les organes. Toutefois, l'approfondissement des connaissances plus cliniquement pertinentes nécessite de nouveaux modèles plus précis, abordant les mécanismes sous-jacents des lésions, afin d'envisager la mise en place de stratégies thérapeutiques. Cependant, compte tenu de la complexité de l'organisme et des voies

traversant la moelle épinière, il est nécessaire de développer des modèles adaptés et simplifiés pour pouvoir les étudier.

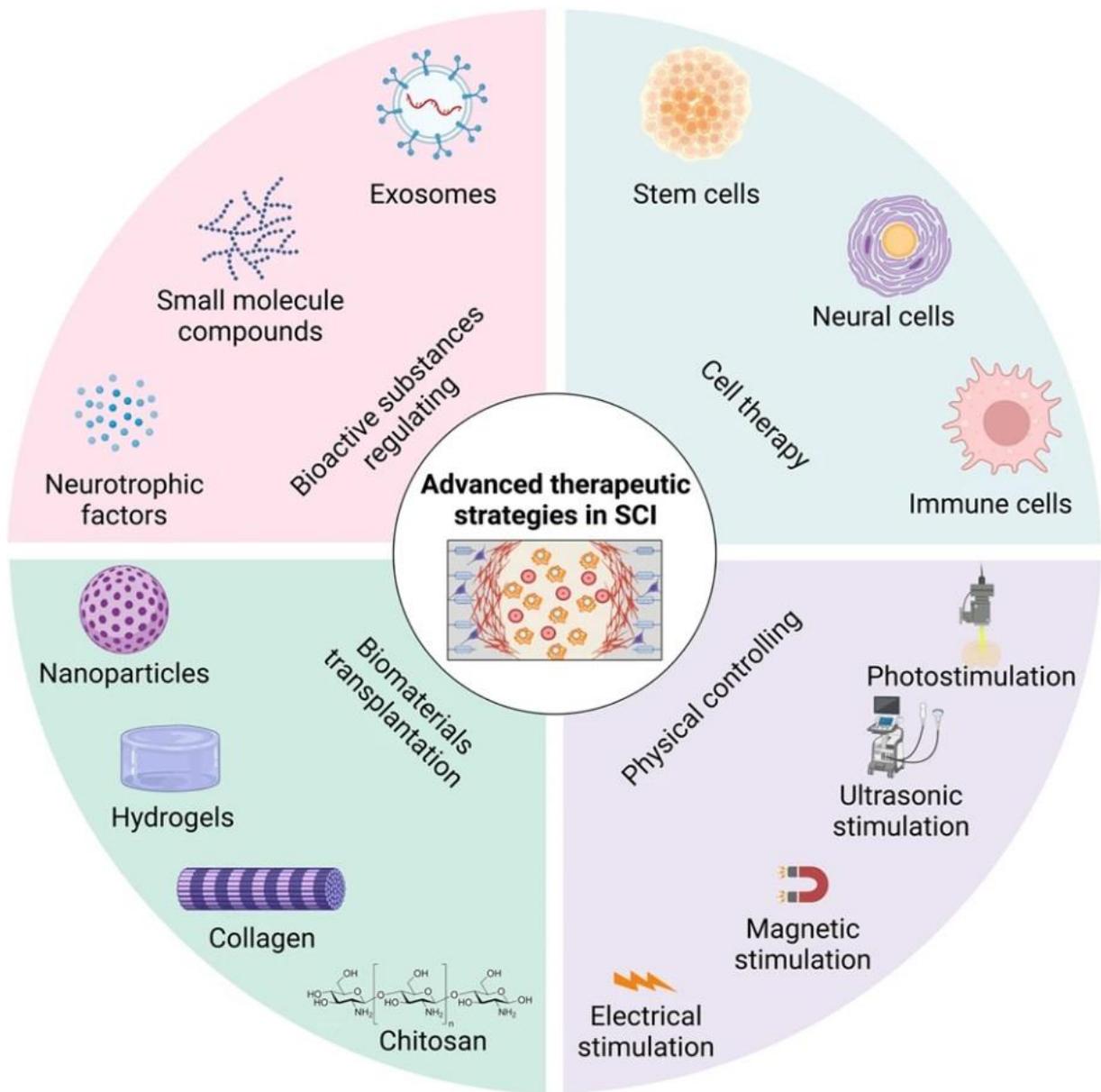


Figure 13 – Représentation schématique de l'avancée des stratégies thérapeutiques pour réparer les lésions médullaires. Les stratégies comprennent la régulation des substances bioactives, la thérapie cellulaire, la transplantation de biomatériaux et la neuromodulation. D'après Hu et al., 2023.

3. Plasticité post-lésionnelle

Bien qu'il soit généralement admis que la régénération axonale dans le SNP est possible, elle n'est que rarement complète chez l'homme et dépend de la distance que doivent parcourir les axones. Malgré l'absence de régénération à travers le site lésionnel dans le SNC, une plasticité post-lésionnelle est observée (Aguayo, 1985). Cela représente la capacité du système nerveux à remodeler ses synapses en réponse à des perturbations internes ou externes (Cotman and Nieto-Sampedro, 1984). Suite à la dégénérescence wallérienne induite par la lésion, cette plasticité peut correspondre tant à une régénération directe des axones endommagés, qu'à une régénération via des collatérales (on parle de « sprouting »). Ces collatérales peuvent provenir des neurones endommagés en amont de la lésion ou des axones voisins épargnés (Sofroniew, 2018) (figure 14).

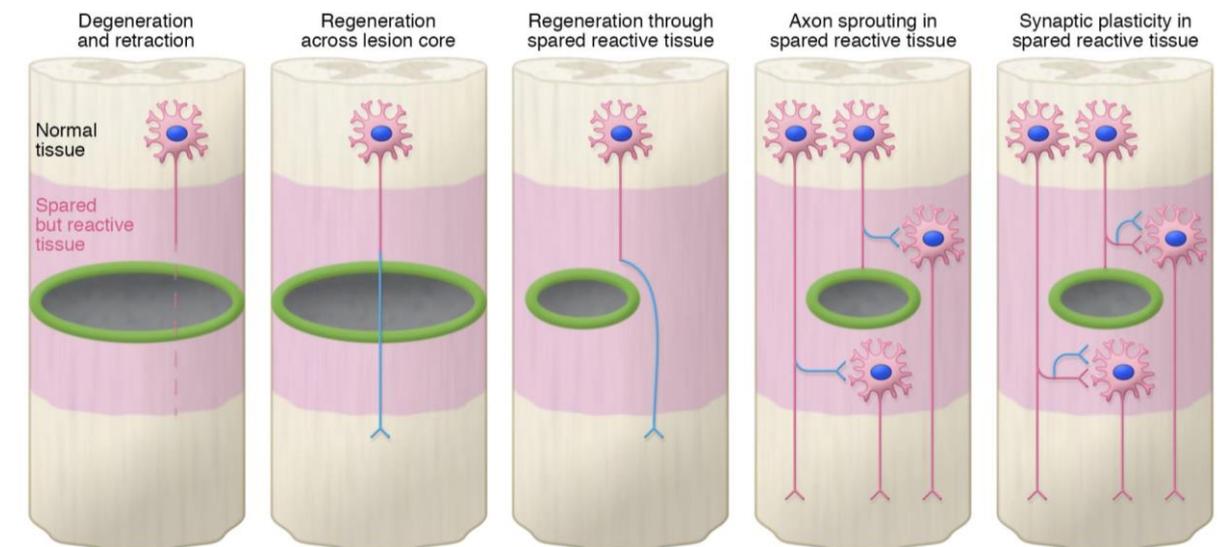


Figure 14 – Schéma des différentes réponses potentielles de l'axone lésé et des neurones voisins, suite à une lésion. D'après O'Shea et al., 2017.

Cette plasticité spontanée post-lésionnelle a été décrite dans plusieurs régions du SNC, comme le cortex moteur, le cortex sensoriel, le cervelet ou l'hippocampe (Blesch and Tuszynski, 2009). Dans la moelle épinière, ce sprouting peut conduire à des récupérations fonctionnelles, notamment grâce à une réinnervation du tractus corticospinal dorsal lésé, par le tractus ventral resté intact, ou grâce à de nouvelles connexions des neurones proprio-spinaux (Raineteau and Schwab, 2001). Plusieurs travaux ont démontré que cette plasticité présente de nombreux points communs avec le développement et la croissance axonale, notamment une réorganisation du cytosquelette (Soares, 2007, 2002).

En effet, l'extrémité de l'axone lésé doit reformer une structure motile capable de traverser l'environnement et de reconnecter une cible, à l'image d'un cône de croissance durant le développement.

Ainsi, après une lésion, les axones peuvent régénérer ou dégénérer. Cependant, les mécanismes moléculaires contrôlant cette réponse restent non élucidés.

II. Les Microtubules

De la même manière que les vertébrés possèdent une ossature, le cytosquelette représente l'ossature de la cellule. Découvert en 1970 (Fischer and Fowler, 2015), c'est un réseau complexe et dynamique présent dans toutes les cellules eucaryotes. Son rôle majeur est d'organiser spatialement et temporellement la cellule (Fletcher and Mullins, 2010). Il est constitué de trois types d'éléments : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules (MT) (figure 15), tous formés par l'autoassemblage de sous-unités protéiques spécifiques.

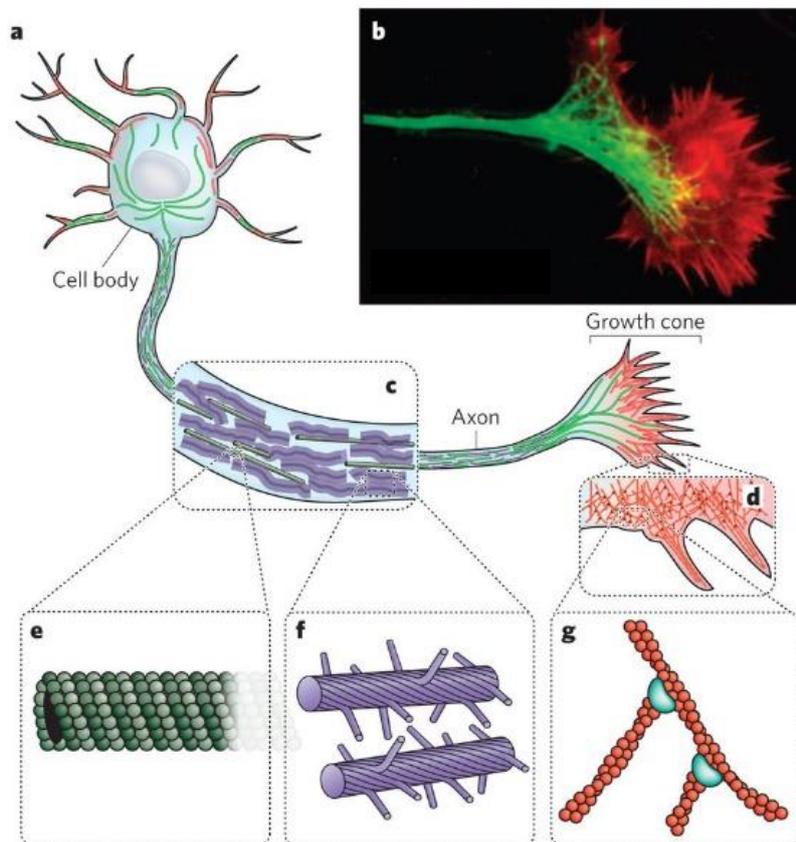


Figure 15 – *Éléments constituant le cytosquelette d'un neurone (a), jusqu'au cône de croissance (b) MT en vert, actine en rouge. On retrouve dans les neurones et le long des axones différents filaments (c) notamment des MT organisés en protofilament (e), des neurofilaments (f) et de l'actine (d et g). D'après Fletcher and Mullins, 2010.*

Les éléments du cytosquelette présentent un caractère dynamique, leur permettant de se renouveler en grande partie en quelques heures (Fischer and Fowler, 2015). Ceci permet aux cellules d'adapter continuellement leur morphologie et leur fonction. L'assemblage protéique hautement dynamique du cytosquelette est à l'origine de ses fonctions dans le maintien de l'architecture des cellules. Cela confère une résistance mécanique aux déformations, et permet l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire.

L'étude des polymères du cytosquelette est une aire de recherche active depuis plus de 70 ans. Mais les MT ont été découverts plus tardivement. Le terme « microtubule » a été utilisé pour la première fois en 1963. Leur structure n'était alors pas observée dans toutes les cellules, car les méthodes de fixation utilisées ne permettaient pas de les préserver. L'introduction de nouveaux agents fixateurs, comme le glutaraldéhyde, ont permis d'identifier les MT comme une structure du cytosquelette ubiquitaire en 1965 (Borisy et al., 2016). La façon dont la cellule contrôle certaines de ses fonctions physiologiques via son cytosquelette est désormais de plus en plus documentée. Il reste cependant à mieux explorer comment les polymères du cytosquelette permettent aux cellules de s'adapter aux changements de leur environnement. Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur la dynamique des microtubules et sur sa régulation, dans des conditions post-lésionnelles.

1. Structure et propriétés

Les MT sont des polymères polarisés et dynamiques qui s'auto-assemblent, conservés dans toutes les cellules eucaryotes, depuis les levures jusqu'aux mammifères (Galjart, 2005; Hashimoto, 2015). Ils sont plus abondants dans les cellules nerveuses où ils représentent environ 20% des protéines totales (Oakley, 2000).

Ce sont des composants essentiels de structures stables comme les cils et flagelles, ainsi que de structures plus labiles comme le fuseau mitotique. Après la découverte de l'unité de base, la tubuline, par Borisy et Taylor, de nombreuses études ont été menées afin de caractériser cette protéine. Les tubulines constituent une famille multigénique qui compte sept membres : α , β , γ , δ , ϵ , ζ et η (Dutcher, 2001; Ludueña, 2013; McKean et al., 2001). Les δ -, ϵ -, ζ - et η -tubulines sont retrouvées dans les centrioles qui sont les composants du centrosome, le centre organisateur des MT, où l'on retrouve la γ -tubuline impliquée dans la nucléation des MT.

C'est en 1980 que le mécanisme physico-chimique de l'assemblage des MT a été découvert. Les microtubules sont composés de monomères des sous-unités α - et β -tubulines, structurellement similaires, avec une taille de 4-5 nm et une masse moléculaire d'environ 55 kDa (soit ~ 450 acides aminés). Néanmoins, ces deux sous-unités de tubuline ne partagent que 40% d'identité de séquence en acides aminés (Nogales, 2000). Ce sont des protéines globulaires qui s'associent tête à queue spontanément et de façon non covalente sous la forme d'un hétérodimère α/β de 110kDa en présence de GTP. Ce qui forme des protofilaments linéaires (Desai and Mitchison, 1997; Fischer and Fowler, 2015) (figure 16). Les protofilaments s'associent à leur tour latéralement en un feuillet se refermant sur lui-même. Le rapprochement des feuillets forme un cylindre creux de 25 nm de diamètre (Chrétien et al., 1995; Desai and Mitchison, 1997). Les microtubules sont constitués de 13 protofilaments organisés en « lattice » (Song and Mandelkow, 1993), ce qui en fait un composant rigide du cytosquelette, pouvant atteindre quelques dizaines de micromètres (Wade and Hyman, 1997). Cet assemblage nécessite de l'énergie qui provient de l'hydrolyse du GTP (Kononova et al., 2015) (figure 16).

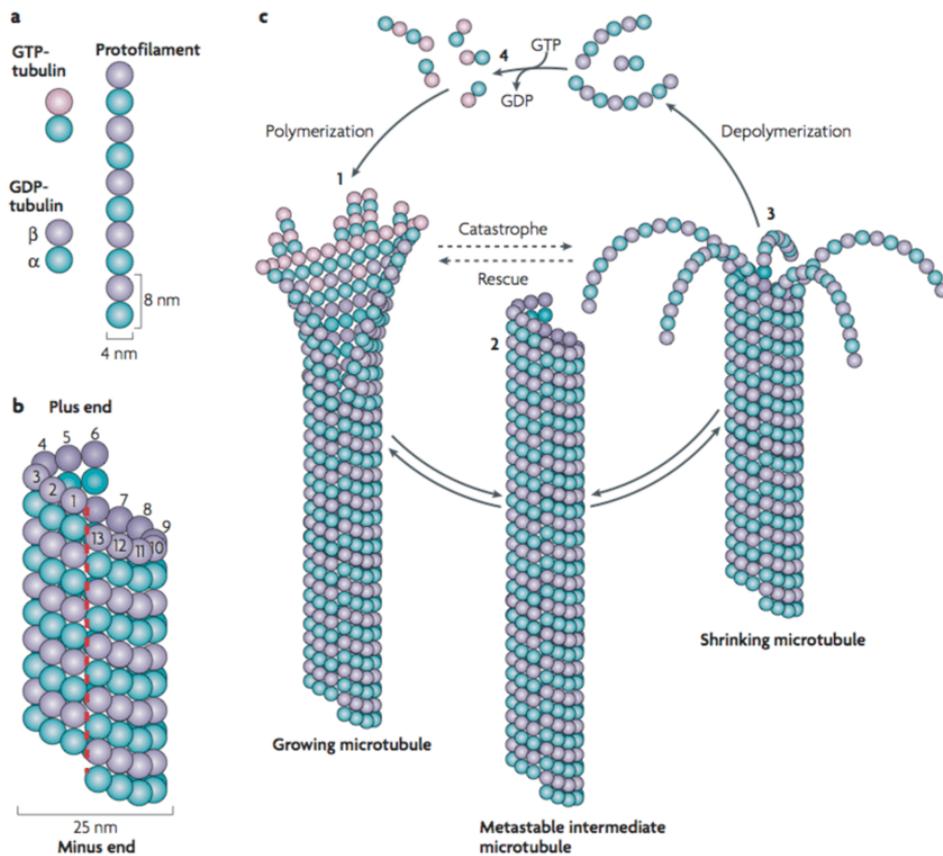


Figure 16 – Structure, assemblage et instabilité dynamique des microtubules. D'après Akhmanova and Steinmetz, 2008.

Les liens longitudinaux et latéraux non-covalents entre les sous-unités α/β -tubulines stabilisent les MT (Kononova et al., 2015). Toutefois, le réseau microtubulaire est également une structure polarisée hautement dynamique. L'assemblage tête à queue des dimères de tubuline est à l'origine de cette polarité intrinsèque avec deux extrémités distinctes, dites extrémités « plus » ou (+) et « moins » ou (-), de propriétés chimiques différentes. Dans les cellules, l'extrémité (-) est ancrée au centre organisateur des MT (*MTOC* — *Microtubule-Organizing Center*) situé près du noyau et souvent stabilisée. Alors que l'extrémité (+) est orientée vers la périphérie, explorant l'espace cellulaire (Mitchison and Kirschner, 1984a). Ainsi, l'extrémité (+) présente en général dans la cellule un comportement plus dynamique que l'extrémité (-), avec des phases de polymérisation et de dépolymérisation alternées (Jiang and Akhmanova, 2011; Wade and Hyman, 1997). Ce comportement est appelé instabilité dynamique (Desai and Mitchison, 1997; Mitchison and Kirschner, 1984). L'instabilité dynamique des MT se caractérise par leur vitesse de polymérisation et de dépolymérisation, ainsi que la fréquence temporelle et spatiale des transitions qui entrecoupent les cycles de polymérisation/dépolymérisation. Ces transitions sont appelées dans un cas « catastrophe », lors du passage d'une phase de polymérisation à une phase de dépolymérisation. Elle peut être causée par l'accumulation de caractéristiques déstabilisantes et inclut la perte d'une structure terminale protectrice. Dans un autre cas, on parle de « sauvetage », lors du passage d'une phase de dépolymérisation à une phase de polymérisation ou à une pause (figure 16) (Gardner et al., 2013).

L'assemblage des MT et leur dépolymérisation vont dépendre de l'état lié au GDP ou au GTP de la tubuline. La β -tubuline, pouvant échanger son GTP, est exposée au niveau de l'extrémité (+), tandis que l' α -tubuline est exposée au niveau de l'extrémité (-) (Nogales et al., 1999; Nogales, 2000). Quand un MT croît, l' α -tubuline nouvellement incorporée vient compléter la poche GTP de la β -tubuline précédente (Nogales et al., 1999, 1998). Sur la β -tubuline, ce GTP est hydrolysé et l'énergie est stockée dans la fibre et libérée lors du désassemblage, permettant le comportement dynamique des MT (Galjart, 2005). L'hydrolyse du GTP n'est pas immédiate après l'incorporation d'un nouvel hétérodimère, mais elle est stimulée par l'incorporation de nouvelles sous-unités de tubuline. Ce retard à l'hydrolyse est à l'origine de la formation d'une coiffe de tubuline-GTP (« GTP cap »). Cette dernière permettrait une stabilisation relative des extrémités (+) du MT en les protégeant d'événements de dépolymérisation (Hyman et al., 1992).

Pour assurer des fonctions biologiques très variées, la cellule utilise le transport bidirectionnel médié par les MT (Hirose et al., 1995) et différencie également son réseau de MT en de multiples sous-ensembles. Pour cela, elle s'appuie sur l'expression d'isotypes hétérogènes de tubuline et sur un ensemble complexe de modifications post-traductionnelles, formant le code de la tubuline.

1.1. Modifications Post-traductionnelles

Bien que très conservée dans l'évolution des eucaryotes (Gadadhar et al., 2017), la tubuline montre aussi un haut degré d'hétérogénéité (Ludueña, 2013). Les cellules génèrent différents sous-types de MT distincts, dont la variabilité est due aux isotypes de tubuline, ainsi qu'à des modifications post-traductionnelles.

Les sous-unités d' α et β -tubulines, sous forme solubles ou polymérisées, peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles (MPT), voire plusieurs (Carsten and Bulinski, 2011; Y. Song and Brady, 2015). La plupart étant réversibles après la dépolymérisation (Carsten and Bulinski, 2011; Gadadhar et al., 2017; Wloga and Gaertig, 2010). La combinaison de nombreuses MPT constitue le code de la tubuline. Celui-ci est lu par des effecteurs cellulaires, dont des protéines associées aux MT — (MAP) *Microtubules-Associated Proteins* — (Verhey and Gaertig, 2007). Elles influencent l'architecture, la dynamique, l'interaction et l'activité des MT dans la cellule. Par ailleurs, pouvant s'accumuler sur des microtubules stables, elles peuvent servir de marqueurs de stabilité pour les MT.

Initialement dans un dimère de tubuline libre non polymérisé, la sous-unité α est tyrosinée. Une fois polymérisée en MT, l' α -tubuline peut être détyrosinée et acétylée ce qui lui confère une plus forte stabilité (Y. Song and Brady, 2015). Les dimères de tubuline peuvent aussi être polyglutamylés, phosphorylés, ou polyglycylés.

La majorité des MPT est retrouvée dans les derniers acides aminés de la queue C-terminale de l' α -tubuline (comme c'est le cas pour la détyrosination/tyrosination), ou à la fois sur l' α - et la β -tubuline (pour la (poly)glutamylatation et la (poly)glycylation). Les autres modifications, telles que la palmitoylation, la phosphorylation, la S-nitrosylation et la polyamination touchent aussi la région C-terminale. À l'extrémité N-terminale de l' α -tubuline, les modifications de la Lys40 (acétylation, méthylation), sont les seules à se faire dans la lumière des MT (Soppina et al., 2012) (figure 17).

Après leur identification, l'étude des MPT a été poursuivie avec la découverte des enzymes impliquées (Akella et al., 2010; Janke et al., 2005; Rogowski et al., 2009; Van Dijk et al., 2007). Ces enzymes peuvent subir une régulation spatio-temporelle (Fischer and Fowler, 2015), et montrent des spécificités d'expression tissulaire et de localisation subcellulaire. Elles sont très conservées et sont essentielles pour un développement cellulaire et cérébral normal (Erck et al., 2005; Ikegami et al., 2007), montrant leur importance dans la physiologie. Le niveau de ces MPT peut aussi être modifié dans des pathologies, et de ce fait, a été proposé comme marqueur de certains cancers et désordres neurologiques (Garnham and Roll-Mecak, 2012).

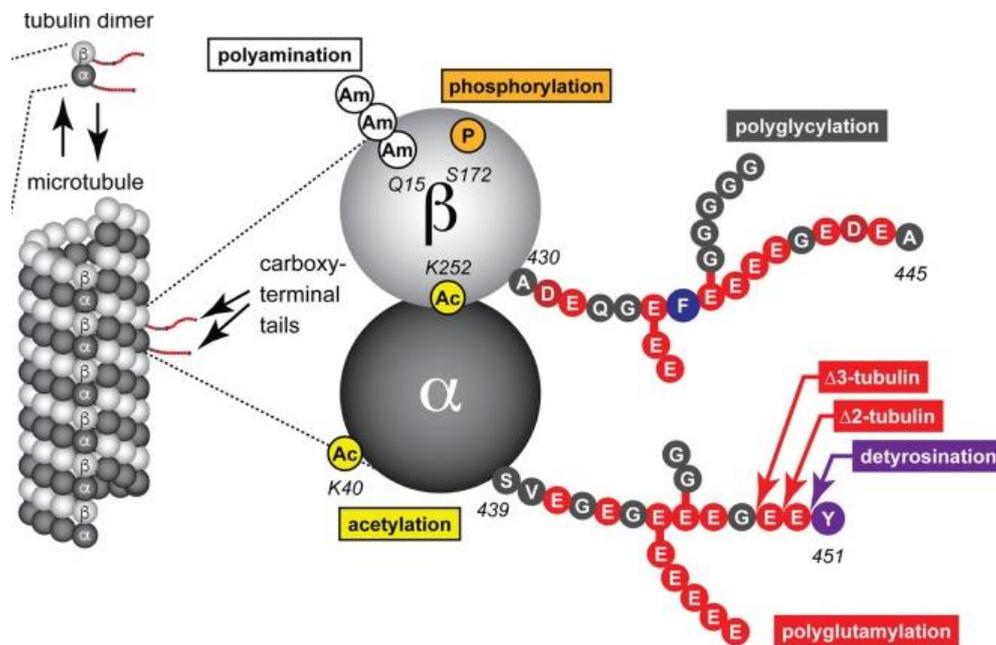


Figure 17 – *Modifications post-traductionnelles des microtubules.* D'après Chakraborti et al., 2016.

La Tyrosination - détyrosination

La tubuline α est initialement synthétisée avec une tyrosine en position C-terminal. Cette tyrosine peut être clivée par des carboxypeptidases (telles que VASH1 et VASH2, associées à SVBP, ou MATCAP) au cours de l'assemblage des microtubules, exposant ainsi un résidu glutamate. Ce retrait de la tyrosine peut être restauré grâce à une Tubuline Tyrosine Ligase (TTL), qui permet l'ajout d'un nouveau résidu tyrosine sur des monomères de tubuline libre (figure 18). La tubuline possède donc un cycle d'un état tyrosiné à un état détyrosiné (Lafanechère and Job, 2000). La tyrosination est donc associée à des monomères de tubuline non polymérisés ou dont la polymérisation est récente (Gobrecht et al., 2016). À l'inverse, la détyrosination ne conduit pas à une stabilisation des microtubules, mais traduit plutôt la durée de vie du microtubule

(Khawaja et al., 1988). Concrètement, plus un microtubule est détyrosiné, plus cela fait longtemps que l'assemblage a eu lieu.

L'action de la CCP1 étant accrue pendant le développement des neurones moteurs et la régénération, cela suggère un rôle dans la croissance des neurites (Y. Song and Brady, 2015). À l'inverse, la liaison de la TTL interfère avec la polymérisation et sa surexpression inhibe la polymérisation des MT in vivo (Szyk, 2011).

L'acétylation - désacétylation

Il s'agit d'une modification tardive réalisée par l' α -TAT dans la lumière interne du MT sur un résidu Lys40 ou Lys252 de l' α -tubuline et reversée par l'enzyme Histone Désacétylase HDAC6 ou par l'histone désacétylase Sirt2 (Carsten and Bulinski, 2011) (figure 18). L'acétylation est généralement associée à un état stable des MT formés (Eshun-Wilson et al., 2019). Elle intervient dans le transport intracellulaire et la motilité, en recrutant des protéines du transport, telles que la dynéine. En parallèle, il a été montré que la stabilité des MT est impliquée dans la régénération (Ruschel et al., 2015) et que l'acétylation influe la réponse axonale. En effet, réduire l'acétylation pourrait soutenir la dynamique des MT et ainsi la régénération des axones (Chen and Rolls, 2012). Toutefois cette modification a également été observée dans des axones en régénération et en dégénérescence (Tang, 2014). Par ailleurs, le niveau d'acétylation des MT est un facteur important permettant aux cellules de s'organiser et de coordonner plusieurs voies de signalisation le long des MT. Par exemple, en condition de stress, l'hyper-acétylation est un processus rapide et réversible résultant en l'induction d'une α TAT1, via la libération de ROS (Mackeh et al., 2014), augmentant la fragmentation des mitochondries par l'induction de la phosphorylation de Drp1 sur la Ser616, de manière dépendante de la voie Kinésine-1/JIP-1/JNK (Perdiz et al., 2017). Cette hyperacétylation influencerait également le recrutement d'Hsp90 par les MT impliqués dans l'apoptose (Giustiniani et al., 2009).

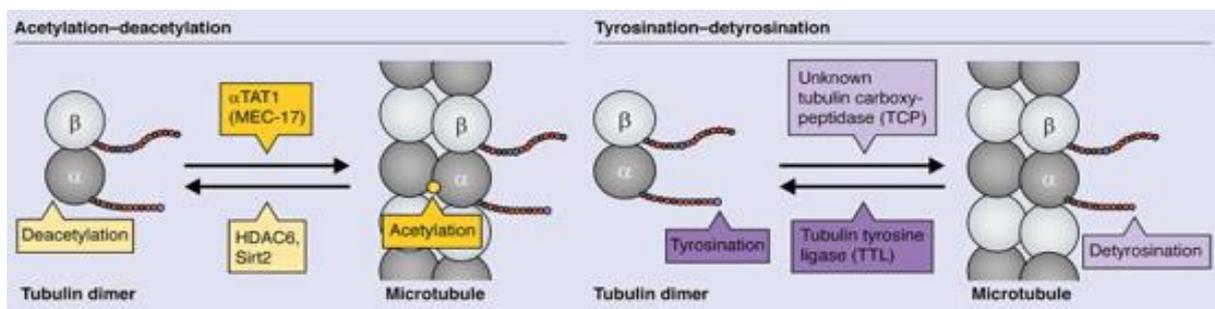


Figure 18 – Mécanismes d'acétylation et de tyrosination de la tubuline α . D'après Gadadhar et al., 2017.

Ainsi, le « code de la tubuline » semble impacter, ou au moins renseigner, l'état des microtubules. L'expression des modifications de la tubuline est ainsi observée de manière différentielle selon leur localisation et en fonction de l'âge des neurones (figure 19). Dans des neurones matures, on notera la présence de tubuline plus acétylée à proximité du soma et dans le corps axonal, associée à un réseau plus stable. À l'inverse, à l'extrémité distale de l'axone, où la structure est plus dynamique, la tubuline sera moins acétylée. Alors que dans des neurones en développement le niveau d'acétylation est globalement réduit, associé à un réseau plus dynamique (Lowery and Vactor, 2009; Y. Song and Brady, 2015).

Compte tenu du lien entre acétylation et stabilité, cette modification pourrait être une cause ou une conséquence des dommages axonaux. Plusieurs études font l'hypothèse d'un effet sur la régénération (Cho and Cavalli, 2012; Lin et al., 2015; Riviaccio et al., 2009). C'est pourquoi durant cette étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'acétylation et la détyrosination des tubulines, afin de cibler l'état des MT.

Dans le système nerveux, la tubuline est une protéine extrêmement représentée. Il est donc aisé de concevoir qu'il s'agit de structure très importante pour les neurones, tant d'un point de vue de leur croissance, de leur architecture et de leur fonctionnement. De même, il faut tenir compte des partenaires des microtubules tels que les MAP, de deux types — structurales et motrices — qui soutiennent le fonctionnement des microtubules et permettent d'acheminer le long des microtubules à des endroits précis de la cellule des composants, tels que des vésicules de sécrétion ou des mitochondries.

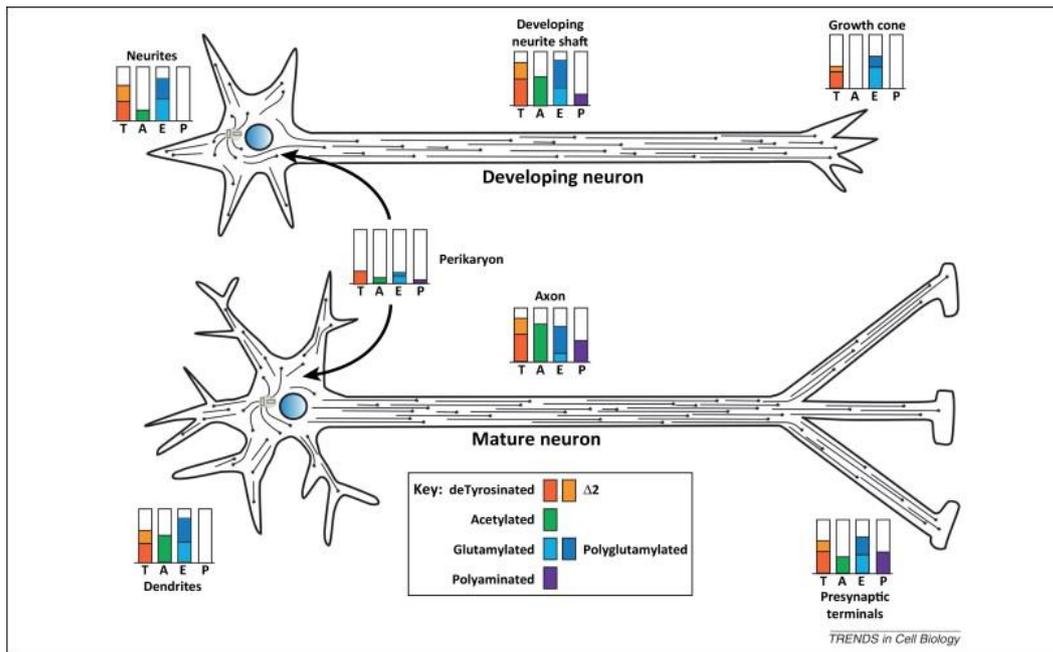


Figure 19 – Variations des modifications post-traductionnelles de la tubuline dans les différentes régions d'un neurone et au cours de la différenciation neuronale. D'après Song and Brady, 2015.

1.2. Protéines associées aux microtubules

Les MT assurent diverses fonctions cellulaires et leurs activités doivent être finement régulées. Pour cela des protéines régulatrices associées aux MT, appelées MAP (*Microtubule-Associated Proteins*), permettent un remodelage rapide et drastique du cytosquelette microtubulaire durant des processus cellulaires variés (Akhmanova and Steinmetz, 2015; Vaart et al., 2009). Ces protéines peuvent se lier aux sous-unités de tubuline solubles ou polymérisées (Nogales and Zhang, 2016) (figure 20).

On retrouve deux classes, les MAP dites structurales, qui sont des protéines se liant sur les MT, pour la régulation de la dynamique et des interactions avec les constituants cellulaires. Parmi elles, il existe des MAP stabilisatrices et déstabilisatrices. Enfin, la deuxième classe comprend les MAP dites motrices assurant le transport de composants le long des microtubules.

MAP structurales

Ce sous-groupe de MAP contient des protéines impliquées dans la promotion de la croissance ou la stabilisation des MT (Van Der Vaart et al., 2011). Ces facteurs se lient généralement aux MT formés, mais peuvent aussi lier la tubuline libre (Brouhard, 2015; Mimori-Kiyosue et al., 2005).

Les MAP stabilisatrices vont stabiliser et permettre la croissance des MT en réduisant la probabilité de catastrophe, en favorisant les sauvetages ou en diminuant la vitesse de dépolymérisation. Elles comprennent des protéines telles que TAU, MAP1 ou MAP2. On trouve notamment MAP1A dans les neurones et dendrites adultes, et MAP1B dans les axones en développement et les dendrites adultes (Halpain and Dehmelt, 2006; Tortosa et al., 2011). Par ailleurs, la forme phosphorylée de MAP1B pourrait être un marqueur de plasticité (Nothias et al., 1996; Soares et al., 2007). Un autre type de protéines stabilisatrices se fixant à l'extrémité des MT en croissance et qui se dissocient lors de la dépolymérisation, sont les +TIP protéines (*plus-end Tracking Proteins*). Parmi elles on retrouvera notamment EB1, CLASP, CLIP-170 (Goodson and Jonasson, 2018; Schuyler and Pellman, 2001).

En revanche, les MAP déstabilisatrices sont impliquées dans le désassemblage et vont perturber les MT en induisant des catastrophes, en empêchant les sauvetages ou en augmentant la vitesse de dépolymérisation (Akhmanova and Steinmetz, 2010; Bowne-Anderson et al., 2015; Howard and Hyman, 2009; Vaart et al., 2009). Parmi elles, on trouve les kinésines dépolymérisantes, telles que la kinésine-13 (Akhmanova and Steinmetz, 2015), qui est une dépolymérase utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour retirer la coiffe GTP des extrémités des MT (Bailey et al., 2016), ce qui favorise les catastrophes (Akhmanova and Steinmetz, 2015). Elles incluent également des protéines de séquestration, qui dépolymérisent les MT indirectement en se liant aux sous-unités de tubuline libres afin de prévenir leur polymérisation. La plus caractérisée étant la stathmine (Goodson and Jonasson, 2018). Enfin, ces MAP contiennent aussi des enzymes protéolytiques de coupure des MT, appartenant à la famille des AAA+ (*ATPase Associated with various cellular Activities*). Elles retirent les dimères de tubuline dans le polymère, créant ainsi de nouvelles extrémités. Trois types d'enzymes protéolytiques sont connus : la katanine, la spastine et la fidgetine (Bailey et al., 2016; Goodson and Jonasson, 2018).

MAP motrices

Ce groupe de MAP participe quant à lui au transport des divers constituants cellulaires et moléculaires en utilisant la polarité des MT. Ces MAP comprennent les dynéines et les kinésines qui sont des moteurs moléculaires pouvant se mouvoir le long des MT, généralement de manière unidirectionnelle, en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP (Breuss et al., 2017; Franker and Hoogenraad, 2013; Mallik and Gross, 2004; Marchisella et al., 2016). La direction, dans laquelle sont transportées ces cargaisons via

les MT, est déterminée en fonction du moteur moléculaire choisi. Elles sont également impliquées dans la répartition des organites dans le cytoplasme et l'organisation du réseau microtubulaire (Mallik and Gross, 2004) (voir transport des mitochondries figure 25).

La dynéine cytoplasmique est un moteur moléculaire d'environ 1,2 MDa. C'est la MAP motrice majeure du transport rétrograde, dirigée de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) des MT et ceci sur de longues distances. Elle transporte une grande variété de cargaisons, allant d'ARN messagers à des organites entiers (Mallik and Gross, 2004). Du fait de leur rétention au niveau des extrémités (+), les dynéines font partie de la grande famille des +TIP (*plus-end Tracking Proteins*).

Structurellement, la dynéine possède deux chaînes lourdes (HC) d'environ 500 kDa, deux chaînes intermédiaires (IC) et intermédiaires légères (LIC), ainsi que trois chaînes légères (LC). Le domaine moteur (de 380 kDa, soit environ 3000 acides aminés) est contenu dans la chaîne lourde et possède le site de liaison aux MT (Cianfrocco et al., 2015; Roberts et al., 2013). Ce domaine moteur est à l'origine du mouvement mécanique de traction, basée sur un cycle mécano-chimique, grâce à l'hydrolyse de l'ATP (Imamura et al., 2007). La queue N-terminale de la chaîne lourde contient les sites de fixation aux deux chaînes intermédiaires (IC et LIC) qui permettent le recrutement des cargaisons (Cianfrocco et al., 2015; Dodding and Way, 2011; Jha and Surrey, 2015; Oiwa and Sakakibara, 2005; Roberts et al., 2013). La dynéine fonctionne avec le complexe multiprotéique, dynactine. Celui-ci augmente la processivité du moteur, en constituant un point d'appui supplémentaire sur le MT (Chowdhury et al., 2015; Jha and Surrey, 2015; Reck-Peterson, 2015; Roberts et al., 2013).

En parallèle, les kinésines, aussi appelées KIF (*Kinesin Family proteins*) assurent le transport antérograde dirigée vers l'extrémité (+) des MT, c'est-à-dire vers la périphérie cellulaire. Comme les dynéines, en transportant des cargaisons via les MT, elles sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires, telles que l'organisation du cytosquelette microtubulaire, le transport axonal, le mouvement d'organites, de vésicules et de molécules dans le cytoplasme (Ferreira et al., 2014; Hirokawa et al., 2009). Les kinésines de mammifères sont classées en quinze familles différentes, en fonction de leurs caractéristiques structurales (Hirokawa et al., 2009; Miki et al., 2001). Parmi elles, les kinésines conventionnelles (kinésines-1 à 12) sont les plus importantes, et plus particulièrement la kinésine-1. Les membres de la famille de la kinésine-1 (KIF5A, KIF5B, KIF5C) sont ubiquitaires et abondamment exprimés dans les cellules (Hirokawa et al., 2009; Hirokawa and Noda, 2008).

Structurellement, la kinésine-1 est une protéine hétérotétramérique, constituée d'un homodimère de deux chaînes lourdes (*KHC* — *Kinesin Heavy Chains*) de 120 kDa et de deux chaînes légères (*KLC* — *Kinesin Light Chains*) de 64 kDa. Les chaînes légères contrôlent l'activité du complexe, en fixant les cargaisons (Hirokawa et al., 2009). Les chaînes lourdes contiennent le domaine moteur, responsable de l'activité motrice grâce à la fixation de l'ATP et son activité ATPasique (Vale and Fletterick, 1997). Il assure également la liaison aux MT. Les kinésines-1 transportent environ une quarantaine de cargaisons en s'associant à des protéines d'échafaudages, pour coordonner l'activité motrice du moteur moléculaire, telles que les protéines JIP (*JNK-Interacting Proteins*), Milton/TRAK (*Trafficking Kinesin binding proteins*), syntaxines ou Huntingtine. Ces protéines adaptatrices permettent de faciliter le transport intracellulaire en augmentant l'interaction transitoire des moteurs avec les MT. Il est intéressant de noter que la liaison de la kinésine-1 aux MT est coopérative. Cela signifie que la fixation d'un moteur moléculaire le long du MT favorise la liaison d'autres moteurs (Muto et al., 2005).

En parallèle, il est à noter que les modifications post-traductionnelles des isotypes α - et β -tubulines peuvent réguler l'activité de certaines MAP. Par exemple, la détyrosination et l'hyper-acétylation des MT régule l'expression et le recrutement des moteurs moléculaires, telles que la dynéine et la kinésine-1 (Dunn et al., 2008; Kaul et al., 2014; Kreitzer et al., 1999; Lin et al., 2002; Reed et al., 2006). De plus, la liaison de la kinésine-1 aux MT est sensible à la (poly)glutamylation, qui influence aussi l'affinité de liaison de MAP1A, MAP1B, MAP2 et Tau avec les microtubules (Bonnet et al., 2001; Boucher et al., 1994).

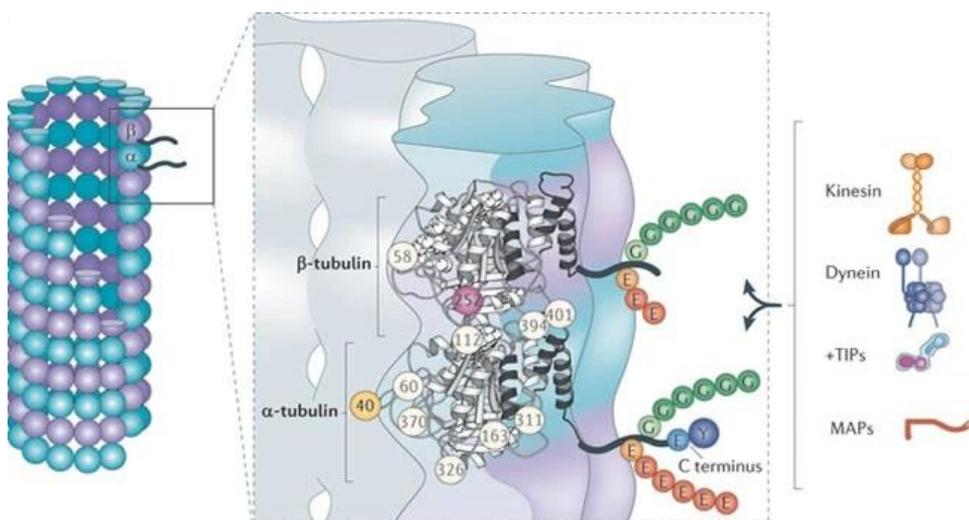


Figure 20 – Localisation et structure des dimères alpha/beta-tubuline et interaction avec les protéines associées aux MT (MAP structurales et motrices). D'après Janke and Bulinski, 2011.

2. Fonctions des microtubules

En raison de leur polarité intrinsèque et de leur dynamique (Choi et al., 2002), les MT sont impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires, tels que le trafic intracellulaire, le maintien de l'architecture, la polarité, la migration, la différenciation, la division, la survie et la mort des cellules (Bowne-Anderson et al., 2015; Fletcher and Mullins, 2010; Gundersen and Cook, 1999; Muroyama and Lechler, 2017) (figure 21). Toutefois, l'un des rôles principaux des MT est d'assurer le trafic intracellulaire de cargaisons, de vésicules et de macromolécules, en servant de « rails » aux moteurs moléculaires (Akhmanova and Steinmetz, 2015).

Dans les neurones, les MT assurent la polarisation neuronale (Conde and Cáceres, 2009) et s'étendent le long des axones et des dendrites, où les kinésines assurent le transport jusqu'aux synapses des vésicules et des mitochondries (Hirokawa and Noda, 2008; Hu et al., 2013; Larti et al., 2015; Nangaku et al., 1994). Dans d'autres types cellulaires, les MT ainsi que les tubulines (δ , ϵ , ζ et η), jouent aussi un rôle très important dans la division cellulaire. Ils constituent alors le fuseau mitotique — la structure nécessaire pour séparer les chromatides répliquées dans les cellules filles — via la génération d'une force mécanique (Kononova et al., 2015; McKean et al., 2001).

Ils ont aussi un rôle majeur dans l'apoptose, lors de laquelle ils sont réorganisés en un réseau pour maintenir l'intégrité de la membrane plasmique (Oropesa Ávila et al., 2015). De même que dans l'autophagie qui assure la dégradation de constituants cellulaires grâce aux lysosomes, afin de maintenir l'homéostasie cellulaire (Mackeh et al., 2013). Par ailleurs, la forte présence de tubulines dans le cerveau et son importance dans le trafic neuronal font que les dysfonctionnements et dérégulations des MT sont à l'origine de maladies (Akhmanova and Steinmetz, 2015).

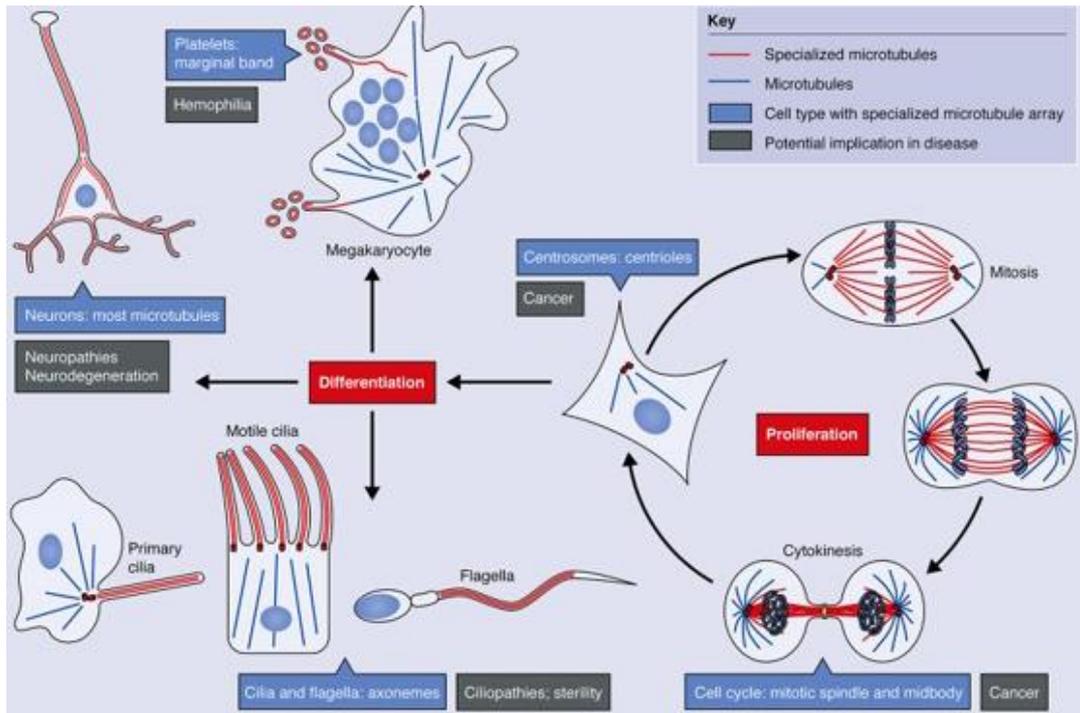


Figure 21 – Fonctions des MT selon le type cellulaire. D'après Gadadhar et al., 2017.

3. Les microtubules comme cibles thérapeutiques

Du fait de leurs fonctions variées, les microtubules sont une cible importante lors des thérapies anticancéreuses (Calligaris et al., 2010; Kingston, 2009; Risinger et al., 2009). Effectivement, les agents antimitotiques couramment utilisés bloquent la formation du fuseau, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules cancéreuses (Penna et al., 2017; Prota et al., 2013; Salmela and Kallio, 2013). La plupart de ces agents ciblant les MT, on parle de MTA (*Microtubule-Targeting Agents*), proviennent des plantes (Xie and Zhou, 2017). Ils se lient sur des sites spécifiques, soit de la tubuline libre, soit de la tubuline polymérisée (Amos, 2011; Calligaris et al., 2010; Dumontet and Jordan, 2010; Jordan and Wilson, 2004; Penna et al., 2017).

Les classes de MTA les plus répandues et ayant le plus de succès thérapeutiques dans les cancers sont les taxanes (Penna et al., 2017). Les taxanes (principalement le paclitaxel, ou Taxol®) et les épothilones sont des agents stabilisateurs des MT (Penna et al., 2017), facilitant l'assemblage et la stabilisation des MT.

Le paclitaxel a été découvert lors d'une campagne de recherche de composés actifs anticancéreux présents chez les plantes dans les années 1960 (Cragg, 1998). Ce composé a été isolé originellement dans des extraits bruts venant de l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia Nutt*) (Xie and Zhou, 2017). Le paclitaxel se lie dans le domaine intermédiaire de la β -tubuline à l'intérieur de la lumière des MT (Wani et al., 1971), où

il dispose de plusieurs sites de liaison via l'extrémité N-terminale, sur une région spécifique appelée site de liaison du Taxane. La liaison du paclitaxel aux microtubules résulte en une diminution de la dynamique des MT et l'arrêt des cellules en mitose (Rovini et al., 2011; Xie and Zhou, 2017). La diminution de l'instabilité dynamique des MT par le paclitaxel est montrée par une altération de l'évolution de leur longueur en fonction du temps. En parallèle le paclitaxel stabilise les MT en empêchant leur dépolymérisation et en stimulant l'assemblage des dimères, ainsi qu'en stabilisant les liens latéraux entre MT voisins (Elie-Caille et al., 2007; Prota et al., 2013; Zanic et al., 2013).

Toutefois il est décrit que cette molécule possède au niveau du système nerveux des effets neurotoxiques (Gornstein and Schwarz, 2017; Klein and Lehmann, 2021). De plus, utilisée à de fortes concentrations, en plus d'induire une stabilisation des MT elle induit une hyper-acétylation des MT (Mariana Brizuela et al., 2015), perturbant alors le fonctionnement du réseau. C'est pourquoi d'autres études ont permis de mettre en évidence les épothilones, isolées originellement à partir de la mycobactérie *Sorangium cellulosum* (Dumontet and Jordan, 2010). Il s'agit d'analogues du taxol, ciblant les MT avec des mécanismes d'actions similaires, notamment des sites de fixation communs - site de liaison du taxane - et des effets similaires, démontrant toutefois moins de toxicité (Bollag et al., 1995).

En parallèle, d'autres molécules qui ciblent les MT mais induisent cette fois la dépolymérisation sont également connues, telles que le nocodazole. Toutefois, malgré leur efficacité, les composés anti-microtubulaires présentent d'importants effets secondaires indésirables tels que les neuropathies (Jordan and Wilson, 2004; Penna et al., 2017). En plus de ces effets toxiques, l'une des limites à l'utilisation de ces agents est que les cellules présentent des résistances innées ou acquises aux traitements, modulée par les différents isoformes de tubuline ou la liaison de protéines régulatrices (Bates and Eastman, 2017; Parker et al., 2017).

Les MT sont également des cibles intéressantes dans le cas des lésions du système nerveux. Pour parvenir à une repousse axonale l'extrémité lésée doit reformer une structure motile capable de traverser le nouvel environnement, appelée cône de croissance. Celui-ci doit présenter à sa surface des récepteurs spécifiques lui permettant de répondre aux signaux de l'environnement et de guider son extension. L'adressage de ces récepteurs depuis le soma jusqu'à l'extrémité, l'élongation et le guidage du cône sont régulés par le trafic intracellulaire orchestré par les MT. Ces derniers sont alors

réorganisés en permanence pour s'adapter au mieux à l'extension des neurites. Le cône de croissance peut se décomposer en trois domaines : un domaine central C, contenant des MT stables et organisés en faisceaux ; un domaine transitoire T contenant les structures contractiles d'actine-myosine ; et un domaine périphérique P composé de lamellipodes et filopodes, dans lesquels on retrouve de l'actine et des MT dynamiques (Lowery and Vactor, 2009). En raison de leur instabilité dynamique, les MT, à ce niveau, poussent et se rétractent permettant l'exploration des lamellipodes (Tanaka and Kirschner, 1991) (figure 22). On retrouve dans le domaine central et le long de l'axone des MT riches en tubuline tyrosinée, avec de nombreux cycles de polymérisation/dépolymérisation qui envahissent les filopodes (Bouquet and Nothias, 2007). Quant aux MT plus stables, ceux-ci sont enrichis en tubuline acétylée et/ou détyrosinée. Ils sont également retrouvés dans le domaine C mais absents de la partie distale. Les axones sont donc composés d'un réseau de MT dont la régulation fine permet un équilibre entre stabilité et dynamique, nécessaire à la croissance, l'élongation et la régénération des neurones.

Compte tenu du lien étroit entre l'extension du cône de croissance et le cytosquelette, un défaut de régénération pourrait être lié à des anomalies du trafic intracellulaire ou du maintien des MT, notamment régulés par les modifications de la tubuline.

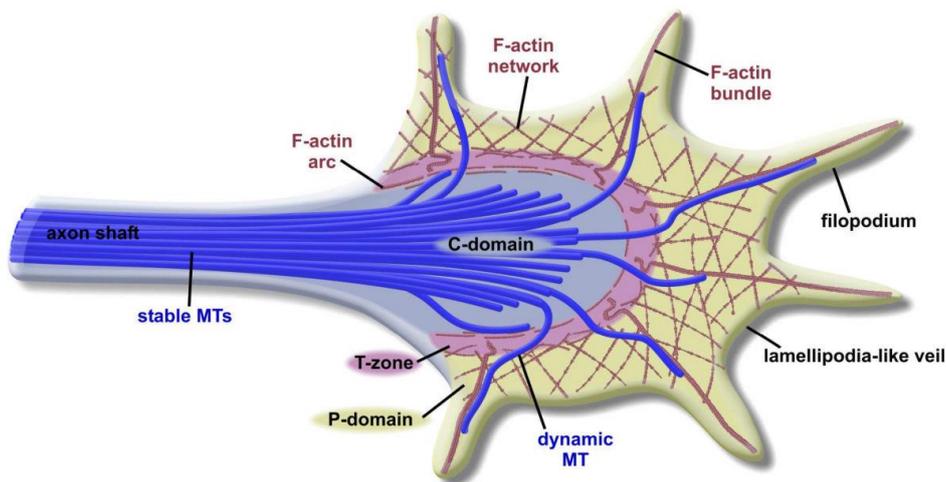


Figure 22 – Cytosquelette dans la structure du cône de croissance, divisé en 3 domaines : central C, transitoire T et périphérique P. D'après Lowery and Vactor, 2009.

III. Les Mitochondries

La mitochondrie est le principal fournisseur d'énergie utilisable par la cellule, l'ATP. On parle de « centrales énergétiques de la cellule ». Le premier à découvrir l'existence des mitochondries en 1857 fut le physiologiste Von Kölliker qui les décrit comme des « granules étranges ». Elles furent nommées « mitochondries » en 1898, en référence à leur morphologie, *Mitos* "fil" et *chondros* "granule" (Ernster and Schatz, 1981). La première isolation fut réalisée en 1934 (Bensley and Hoerr, 1934). Toutefois, une description de l'ultrastructure mitochondriale ne fut possible qu'après les progrès de la microscopie électronique.

1. Structure

Les mitochondries sont des organites hérités maternellement, présents dans la plupart des cellules eucaryotes. Ces organites peuvent se présenter sous différentes formes, mais sont généralement cylindriques, situées dans le cytoplasme et leur diamètre varie entre 1 et 2 μm . La plupart des cellules humaines contiennent entre 500 et 2000 mitochondries, mais leur nombre de copies et leur structure varient en fonction du type cellulaire et des besoins énergétiques. Les mitochondries sont en mouvement continu dans la cellule, notamment dans les zones très demandeuses en énergie au moyen de protéines associées au cytosquelette (Bereiter-Hahn, 1990; Bereiter-Hahn and Vöth, 1994; Jakobs, 2006).

Ces organites sont délimités par deux membranes distinctes, une interne et une externe, séparées par un espace intermembranaire dont la composition est similaire à celle du cytosol (figure 23).

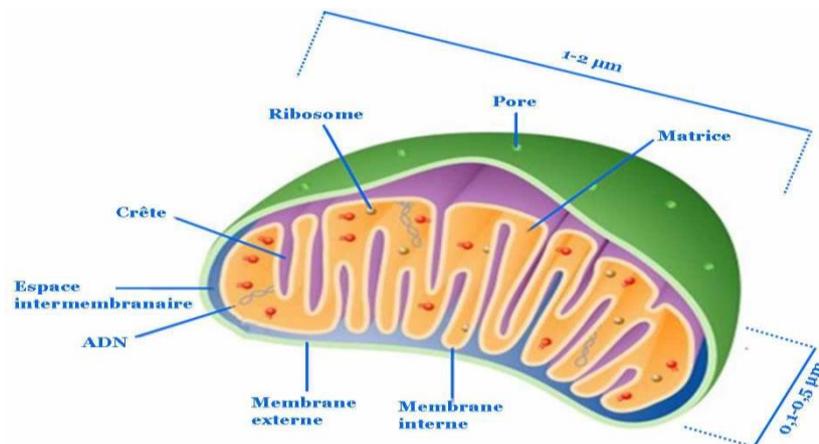


Figure 23 – Structure de la mitochondrie. Schéma adapté à partir du site <http://www.vscht.cz>

Membrane mitochondriale externe

La membrane mitochondriale externe (*OMM* — *Outer Mitochondrial Membrane*) est une bicouche lipidique, composée d'environ 50 % de protéines et 50 % de lipides. L'OMM possède une forte proportion de phospholipides riches en phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphatidylinositol (PI) (Horvath and Daum, 2013). Cette membrane est perméable grâce à la présence d'une protéine transmembranaire, VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), qui forme un canal laissant passer les molécules de faible poids moléculaire, inférieures à 10 kDa (telles que anions, cations, pyruvates, acides gras et nucléotides) (Shoshan-Barmatz et al., 2010). Les molécules de poids moléculaire supérieur à 10 kDa, possédant un signal d'adressage mitochondrial, peuvent traverser la membrane au niveau de complexes d'importation constitués du complexe de translocase de la membrane externe (*TOM* : *Translocase of the Outer Membrane*) (Pfanner and Meijer, 1997). De plus, les mitochondries étant des organites très dynamiques, elles peuvent interagir avec d'autres compartiments cellulaires tels que le réticulum endoplasmique, le noyau et d'autres mitochondries à travers des régions spécifiques de l'OMM (Cogliati et al., 2016). L'OMM sert également d'ancrage pour les protéines impliquées dans différentes voies de signalisation telles que la fusion/fission mitochondriale et l'apoptose (Cogliati et al., 2016).

Membrane mitochondriale interne

La membrane mitochondriale interne (*IMM* — *Inner Mitochondrial Membrane*) est également une bicouche lipidique, dont la composition diffère. Elle contient environ 80 % de protéines et seulement 20 % de phospholipides, et enferme une matrice de type gel. La différence de composition est due au fait que cette membrane abrite des protéines impliquées dans différents processus, en particulier la phosphorylation oxydative, responsable de la production d'ATP (Schlame, 2021). Le système de phosphorylation oxydative est composé de la chaîne respiratoire mitochondriale (quatre complexes protéiques, eux-mêmes composés de différentes sous-unités) et de l'ATP synthase. En raison de sa composition lipidique riche en cardiolipine, elle est très peu perméable aux ions et le passage de molécules à travers cette membrane nécessite la présence de transporteurs spécifiques. Ainsi, les protéines sont importées grâce à la translocase de la membrane interne (*TIM* : *Translocase of the Inner Membrane*) (Pfanner and Meijer, 1997). Dans certaines situations, la membrane interne devient librement perméable à tous les composés de taille inférieure à 1.5 kDa. Cette modification de perméabilité de la membrane interne, appelée transition de perméabilité, est due à l'ouverture d'un canal

non spécifique appelé le pore de transition de perméabilité (PTP) (Zoratti and Szabb, 1995).

La membrane interne se replie sur elle-même formant de nombreuses invaginations qui forment les crêtes mitochondriales et augmentent ainsi la surface de l'IMM (Dimroth et al., 2000; Hunte et al., 2000; Lea and Hollenberg, 1989), c'est au niveau de ces crêtes que sont préférentiellement enchâssés les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'ATP synthase (Gilkerson et al., 2003). Enfin, la matrice, compartiment interne de la mitochondrie, est le siège de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs ou l'oxydation des acides gras et contient donc toutes les enzymes nécessaires à ces voies. Elle renferme également l'ADN mitochondrial, circulaire et dépourvu d'introns et d'histones. Chaque mitochondrie possède un nombre variable de copies de cet ADN qui code notamment pour 13 protéines qui composent une partie de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Espace intermembranaire

L'espace intermembranaire (IMS) est la région enfermée entre les deux membranes. En raison des caractéristiques de perméabilité de la membrane externe, la composition chimique de cet espace est proche de celle du cytoplasme. De nombreuses protéines ont été identifiées dans l'IMS (Backes and Herrmann, 2017), incluant le facteur inducteur d'apoptose et le cytochrome c. De plus, il contient une forte concentration en protons lui conférant une charge positive.

2. Propriétés

2.1. Dynamique

Les mitochondries sont des organites particulièrement dynamiques qui se déplacent, fusionnent et se divisent en permanence afin de maintenir leur homéostasie, tant d'un point de vue morphologique (longueur, densité) que métabolique (contrôle de la qualité fonctionnelle) (Bertholet et al., 2016). Que ce soit en condition physiologique ou pathologique, elles réalisent des phénomènes de fusion et de fission cruciaux pour le développement, la survie et la mort cellulaire (Otera et al., 2013).

Ces phénomènes permettent notamment d'adapter la fonction mitochondriale à la demande énergétique. La fission mitochondriale permet à une mitochondrie endommagée

de se séparer de la mitochondrie saine. Tandis que la fusion mitochondriale facilite l'interaction et la fusion de deux mitochondries, qui se réparent mutuellement et peuvent favoriser la production énergétique. Cela démontre un équilibre crucial entre la fission et la fusion (B. Wang et al., 2021). L'impact de ces phénomènes a notamment été mis en évidence au cours du développement, par une réorganisation de la forme des mitochondries associée à un « switch » métabolique à l'origine de la différenciation neurale dans la moelle épinière en développement et impliqué dans la neurogenèse adulte (Arrázola et al., 2019). Des petites mitochondries fonctionnellement immatures avec une forte activité d'enzyme glycolytique sont présentes dans des cellules prolifératives et non différenciées. Tandis que des mitochondries matures plus grandes et allongées, avec une forte activité oxydative — caractérisant des cellules métaboliquement actives — sont présentes dans des neurones différenciés (Arrázola et al., 2019; McCarron et al., 2013; Mils et al., 2015). Les protéines qui réalisent ces phénomènes sont des enzymes de remodelage des membranes, dont l'expression est régulée durant la maturation neuronale à la fois *in vitro* et *in vivo* (Bertholet et al., 2013). Elles appartiennent à une famille de GTPase, les dynamines. On trouve la « dynamin-related protein » (Drp1), la « mitofusine » (Mfn) et l'« Optic atrophy 1 » (Opa1) (Lee and Yoon, 2016).

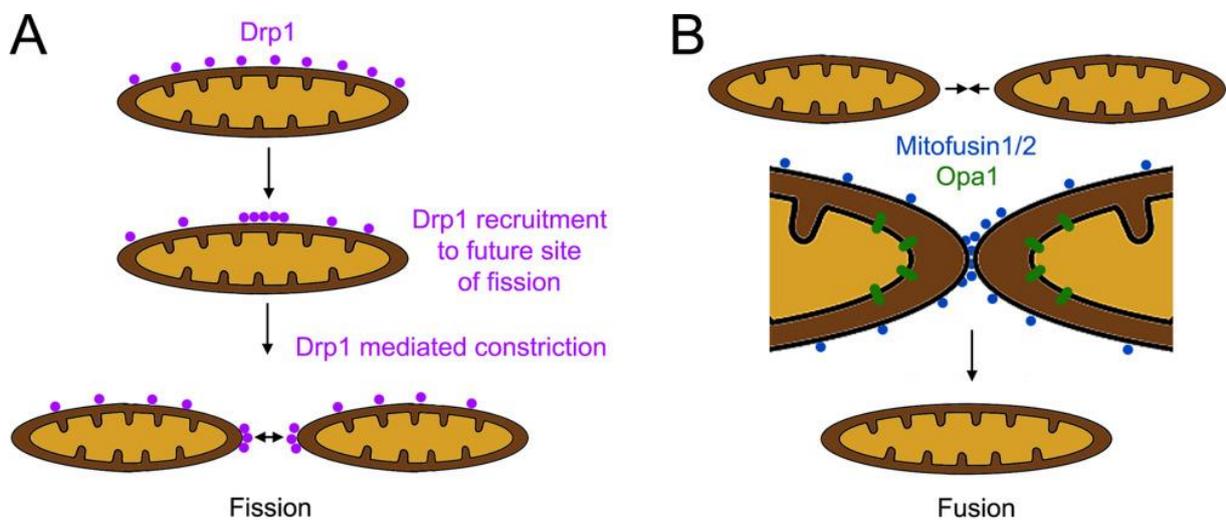


Figure 24 – *Dynamique mitochondriale (A : Fission, par Drp1 ; B : Fusion, par Mfn1/2 et Opa1). D'après (Smith and Gallo, 2018).*

Le mécanisme de fission résulte en la scission d'une mitochondrie en deux, cela implique chez les mammifères la protéine Drp1 (dynamin-related protein 1) (Praefcke and McMahon, 2004) (figure 24). Ainsi, l'inhibition de la fission par délétion génétique de DRP conduit à la genèse de mitochondries anormalement longues (Berthet et al., 2014;

Steketee et al., 2012). Il s'agit d'une protéine cytoplasmique, recrutée par des facteurs de fission mitochondriale de la membrane externe qui s'accumule aux futurs sites de fission pour former un anneau contractile autour de la membrane (Labrousse et al., 1999; Legesse-Miller et al., 2003; Otera et al., 2013; Sesaki and Jensen, 1999; Smirnova et al., 2001). Toutefois, une constriction des mitochondries est également possible par le réticulum endoplasmique associé aux filaments d'actine et de myosine II (Korobova et al., 2014; Lee and Yoon, 2016).

Des travaux sur un homologue de Drp1 présent chez les levures, Dnm1, ont permis de mettre en évidence le mode d'action commun de ses protéines. L'hydrolyse du GTP semble induire une réduction du diamètre des spirales de Drp1/Dnm1 (Fukushima et al., 2001; Naylor et al., 2006), et ainsi permettre la scission des membranes mitochondriales. De plus, la fixation du GTP semble suffisante pour l'autoassemblage de la protéine et son adressage à la mitochondrie. Tandis que son hydrolyse est essentielle pour achever la division mitochondriale en effectuant la fission des membranes. Toutefois, des différences entre Drp1 et Dnm1 pourraient signifier la nécessité de l'intervention de facteurs supplémentaires, chez les mammifères, dans l'autoassemblage de Drp1 *in vivo*, notamment pour la formation de structures de diamètre adéquat à la constriction des mitochondries. Plusieurs modifications post-traductionnelles de Drp1 peuvent influencer son activité. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 637 par une protéine kinase dépendante de l'AMPc (Chang and Blackstone, 2007; Cribbs and Strack, 2007), diminue les interactions intramoléculaires de Drp1, inhibe l'activité GTPase de la protéine et par conséquent inhibe la fission mitochondriale. Cette phosphorylation est toutefois réversible par la calcineurine qui déphosphoryle ce résidu, ce qui active la fission mitochondriale (Cereghetti et al., 2008; Cribbs and Strack, 2007). La sérine 600 de Drp1 est également phosphorylée par la protéine kinase 1, ce qui augmente l'affinité de la protéine à la mitochondrie, stimulant la fission des membranes (Han et al., 2008).

Les protéines impliquées dans la fission mitochondriale sont associées à la membrane externe. Cela suppose que la fission de la membrane externe entraîne celle de la membrane interne. Cependant, cette hypothèse semble débattue dans la littérature. En effet, dans des cellules HeLa, la fission des deux membranes se déroule de manière asynchrone (Karbowski et al., 2004). De plus, chez *C. elegans*, la surexpression d'un mutant de Drp1 incapable d'hydrolyser le GTP inhibe la fission de la membrane externe sans affecter celle de la membrane interne (Labrousse et al., 1999). Enfin, bien qu'une analyse fonctionnelle soit nécessaire pour affirmer cette hypothèse, certains travaux

suggèrent l'existence d'une machinerie de fission de la membrane interne (Jakobs et al., 2003; Legesse-Miller et al., 2003).

À l'inverse, la fusion de deux mitochondries implique le rapprochement et l'interaction des membranes externes puis internes. Deux acteurs sont impliqués dans ce phénomène, les mitofusines Mfn1 et Mfn2, agissant sur la membrane externe, et Opa1, agissant sur la membrane interne (Lee and Yoon, 2016) (figure 24). Ces deux ensembles de protéines sont en étroite collaboration pour assurer la fusion des deux membranes de manière coordonnée et maintenir leur intégrité et fonctionnalité ainsi que les compartiments qu'elles délimitent. Le rôle de ces protéines dans la fusion a été mis en évidence par des tests de fusion sur des fibroblastes embryonnaires de souris invalidées pour les gènes MFN1 et MFN2 (Mfn1^{-/-} et Mfn2^{-/-}). Ces souris présentent un réseau mitochondrial fragmenté, démontrant le rôle de ces protéines dans la morphologie mitochondriale (Chen et al., 2003). Les deux protéines mitofusines 1 et 2 sont ancrées à la membrane externe grâce à deux domaines transmembranaires (Rojo et al., 2002; Santel and Fuller, 2001). Elles sont capables d'interagir de manière homotypique ou hétérotypique grâce à leur domaine HR2 (Heptad Repeat 2) et permettent ainsi la juxtaposition des mitochondries, qui est l'étape clé précédant la fusion des membranes (Chen et al., 2005; Detmer and Chan, 2007; Koshiba et al., 2004).

En parallèle, la surexpression d'Opa1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris qui présentent des mitochondries ponctiformes conduit à la formation d'un réseau filamenteux et interconnecté (Cipolat et al., 2004). Au contraire, l'extinction de l'expression du gène OPA1 entraîne la fragmentation du réseau mitochondrial dans des cellules HeLa qui présentent habituellement un réseau mitochondrial filamenteux (Gripic et al., 2004; Olichon et al., 2003). Cela se traduit par une incapacité des mitochondries à fusionner lors de tests de fusion (Arnoult et al., 2005; Chen et al., 2005). Ces résultats sont également retrouvés dans un knock-down de OPA1 sur des neurones corticaux embryonnaires de rats, entraînant une altération de la morphologie, de la distribution et de la fonction mitochondriale (Bertholet et al., 2013).

Le gène codant pour Opa1 a été identifié lors de la recherche de l'homologue humain de Mgm1p chez *Saccharomyces cerevisiae* et Msp1 chez *Schizosaccharomyces pombe*, deux dynamines apparentées impliquées dans la fusion de la membrane interne mitochondriale (Guillou et al., 2005; Jones and Fangman, 1992; Landes et al., 2010; Pelloquin et al., 1998; Wong et al., 2000). Opa1 serait ancrée à la membrane interne, au niveau des crêtes mitochondriales, grâce à une région hydrophobe amino-terminale, toutefois la majeure

partie de la protéine est située dans l'espace intermembranaire (Griparic et al., 2004; Landes et al., 2010; Olichon et al., 2002; Satoh et al., 2003).

2.2. Transport

L'homéostasie cellulaire est également assurée par le transport des mitochondries, afin d'assurer la distribution intracellulaire des mitochondries dans les sites de forte consommation d'ATP (Bertholet et al., 2016). Ce transport bidirectionnel est réalisé via les MT (Höög et al., 2007; Yaffe et al., 2003) et alimenté par l'ATP produit par la respiration mitochondriale (Zala et al., 2013). Ainsi, l'utilisation de drogues comme le nocodazole ou la vinblastine, perturbant spécifiquement le réseau de microtubules, affecte la distribution des mitochondries (Ligon and Steward, 2000; Morris and Hollenbeck, 1995; Yaffe et al., 1996).

Le transport mitochondrial est également animé par un état stationnaire. Pour cela la syntaphiline (SNPH) — une protéine responsable de l'ancrage mitochondriale — se lie d'une part par son domaine C-Terminal chargé positivement et contenant un domaine « Mitochondrial-binding domain » à la membrane mitochondriale externe (Chen et al., 2009; Kang et al., 2008). D'autre part au microtubule par un domaine « Microtubule-binding domain », ce qui permet d'assurer l'encrage des mitochondries. La régulation de cet ancrage fait également intervenir la chaîne courte LC8 de la dynéine. L'expression de cette protéine est régulée au cours du développement (Kang et al., 2008). Elle n'est pas présente à l'état embryonnaire, peu présente à l'état post-natal mais apparaît dans les neurones adultes avec la maturation du réseau (B. Zhou et al., 2016). Ce profil d'expression coïncide avec l'hypothèse d'un transport mitochondrial progressivement réduit et considéré comme un mécanisme intrinsèque limitant la capacité de régénération des neurones adulte. La balance entre motilité, pause et ancrage répond aux changements physiologiques (Lin and Sheng, 2015), afin que les aires métaboliquement actives aient suffisamment d'ATP (Cheng and Sheng, 2020).

Des déficits du trafic mitochondrial et de l'ancrage conduisent à une distribution inadéquate de l'ATP et une accumulation des mitochondries endommagées (Cheng and Sheng, 2020). Ainsi, dans les axones matures, la majorité des mitochondries sont stationnaires et servent de source d'énergie locale et de tampon intracellulaire au Ca^{2+} (voir paragraphes fonctions des mitochondries). À l'inverse, au cours du développement, le transport des mitochondries très rapide (de l'ordre du micromètre par seconde) sur de

longues distances, fournit l'énergie nécessaire à l'extrémité distale pour permettre l'élongation (Hollenbeck and Saxton, 2006). L'enrichissement de mitochondries sur leur lieu d'utilisation, en particulier au niveau des synapses, des cônes de croissance ou des nœuds de Ranvier, fait appel à un mouvement dit antérograde. Celui-ci a lieu depuis le soma vers les régions distales et implique l'utilisation des kinésines liées aux MT. Le mouvement rétrograde s'effectue au contraire en sens inverse des zones distales vers le soma, en lien avec les dynéines.

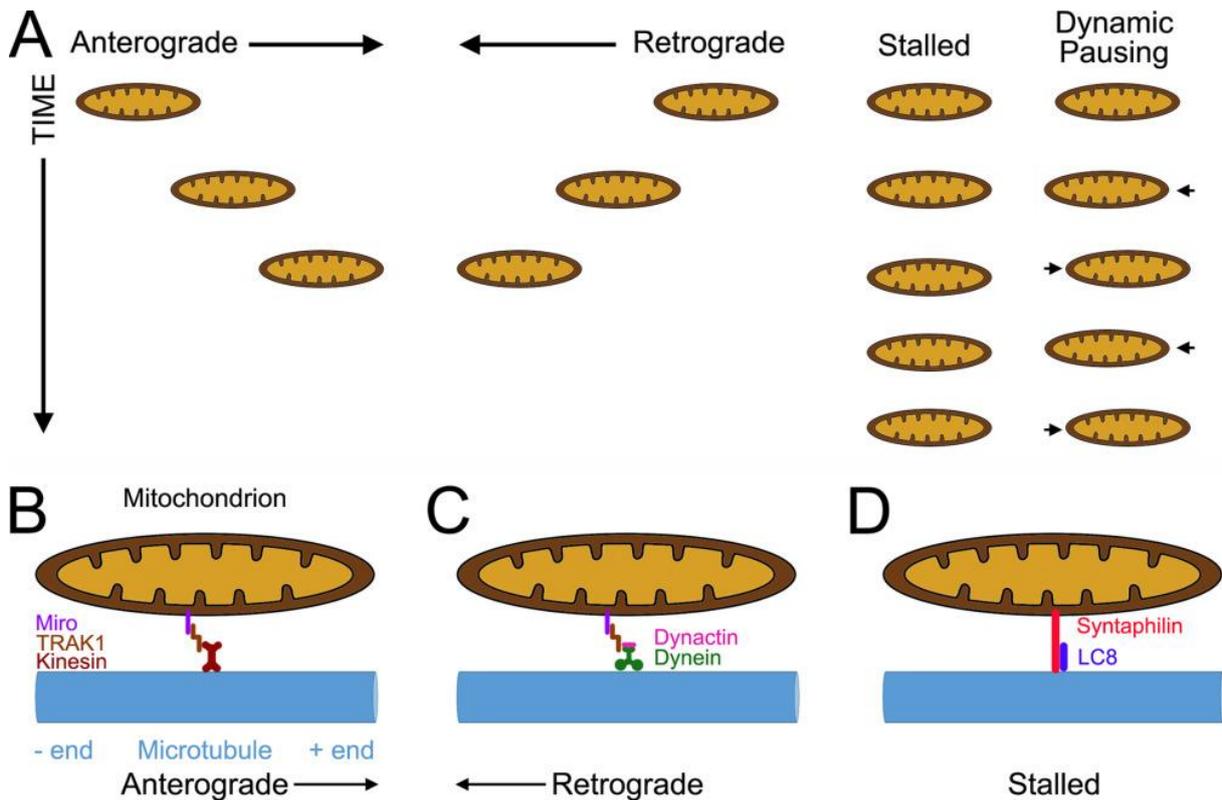


Figure 25 – Transport mitochondrial, médié par les microtubules, via des protéines motrices (dynéine et kinésines), adaptateurs et protéines d'ancrage. D'après Smith and Gallo, 2018.

Chez les mammifères, les kinésines 1 et 3 assurent le transport antérograde. Elles sont reliées aux MT et à la membrane externe mitochondriale, en interagissant avec les protéines adaptatrices Miro et Milton/TRAK (Birsa et al., 2013; Smith and Gallo, 2018). Concernant le transport rétrograde, la dynéine se lie au complexe dynactine. Ensemble, ils interagissent avec le complexe adaptateur Miro-Milton/TRAK (Lin and Sheng, 2015; Nangaku et al., 1994; Schroer, 2004; Tanaka et al., 1998; Varadi et al., 2004) (figure 25). Miro est une protéine GTPase de la membrane externe mitochondriale (Fransson et al., 2003) et possède un domaine capable de lier le Ca^{2+} cytosolique. Cette liaison induit un changement de conformation modifiant le complexe Kinésine-TRAK-miro et stoppe le

transport antérograde des mitochondries (Sheng, 2017). Des mutations de Miro entraînent une perturbation de la distribution des mitochondries dans les neurones, ce qui peut conduire à des déficits locomoteurs et une mort prématurée chez certaines espèces (Guo et al., 2005). À l'inverse, une surexpression de Miro augmente la motilité mitochondriale (Lin and Sheng, 2015).

Plusieurs études menées sur des neurones et des cellules musculaires suggèrent également l'intervention du cytosquelette d'actine dans le transport des mitochondries par l'interaction d'une liaison Actine-Myosine. Toutefois, cela reste controversé (Kuznetsov et al., 1992; Langford, 2002; Ligon and Steward, 2000; Morris and Hollenbeck, 1995).

3. Fonctions des mitochondries

La fonction principale des mitochondries est le maintien de l'homéostasie énergétique des cellules, pour alimenter les réactions métaboliques et activités biologiques essentielles à la croissance, la survie et le fonctionnement cellulaire (Lin and Sheng, 2015; Rolfe and Brown, 1997). Elles assurent également l'homéostasie calcique, la régulation du niveau de ROS, et sont impliquées dans la signalisation et la mort cellulaire (Lin and Sheng, 2015; Smith and Gallo, 2018).

La production d'énergie se fait à partir de la glycolyse, la lipolyse, ainsi que la dégradation des acides aminés. Cette dégradation n'apporte toutefois que 10 % des besoins énergétiques. La synthèse d'ATP mitochondrial va alors impliquer l'oxydation des substrats et la consommation d'oxygène. Ce processus est appelé la respiration cellulaire. Dans ce processus, le transport d'électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale (qui comprend quatre complexes protéiques de I à IV, eux-mêmes composés de différentes sous-unités) et de l'ATP synthase (figure 26), aboutit à une série de réactions d'oxydo-réduction. On parle de phosphorylation oxydative. Réalisée dans la membrane interne mitochondriale, elle permet la transformation de l'énergie chimique contenue dans les nutriments en ATP (Chaban et al., 2014; Dimroth et al., 2000; Gilkerson et al., 2003; Hüttemann et al., 2007; Sheng, 2017).

La dégradation des nutriments permet de fournir à la chaîne respiratoire des équivalents réduits sous forme de $\text{NADH}+\text{H}^+$ et de FADH_2 (Goedeke and Shulman, 2021). Ces molécules sont réoxydées par transfert de leurs électrons sur un accepteur final qui est

l'oxygène. Cette étape est réalisée par l'intermédiaire d'une chaîne de transport sur laquelle les électrons vont transiter en fonction de leur potentiel d'oxydo-réduction. Par exemple, la forme réduite du NAD⁺, le NADH, peut facilement perdre deux électrons, alors que l'oxygène ayant une forte affinité capture ces électrons. Il va donc s'établir le long de la chaîne respiratoire un gradient de potentiels d'oxydo-réduction. Les électrons vont transiter de molécules à faible potentiel (tels que le NAD⁺, qui a un potentiel de -320 mV) vers des molécules à fort potentiel (tels que l'oxygène, qui a un potentiel de +816 mV). Au niveau des complexes I, III et IV, le transfert des électrons s'accompagne d'un pompage des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, générant ainsi une force proton-motrice. Cette force est la somme du gradient de pH et du potentiel membranaire d'environ -150 mV (négatif du côté matriciel). Ce gradient électrochimique est ensuite utilisé par l'ATP synthase pour la phosphorylation de l'ADP en ATP (figure 26). L'ATP ainsi formé est alors exportée dans le cytosol par le complexe de la translocase des nucléotides adényliques (ANT). Ainsi, dans ce processus, l'oxydation des substrats est couplée à la synthèse d'ATP par la force proton-motrice (Saraste, 1999). Au final, ce sont environ 32 molécules d'ATP qui sont produites par molécule de glucose consommée.

Il apparaît que la production d'ATP requiert une provision de métabolites tels que les acides gras, le pyruvate et les acides aminés dans l'espace matriciel. L'enveloppe mitochondriale contient donc de nombreuses protéines de transport, échangeurs et transporteurs. Le transport s'effectue sur des sites bien précis, nommés « sites de contact mitochondriaux », au niveau desquels les deux membranes sont rapprochées. Ces mouvements ioniques transmembranaires sont à l'origine de la formation d'un potentiel de membrane. Pour s'approvisionner activement en métabolites, les mitochondries utilisent comme la membrane plasmique de la cellule, un gradient électrochimique pour faciliter le transport au travers de la membrane interne. La membrane plasmique utilise le gradient de Na⁺ pour le transport de glucose ou les échangeurs Na⁺/H⁺ pour la régulation du pH. Tandis que les mitochondries utilisent dans la membrane interne le gradient de protons (H⁺) des complexes I, III et IV qui sont actionnés par l'association transitoire avec des électrons provenant du NADH. Ainsi, ces complexes réalisent un potentiel de 150 mV.

En parallèle de la production énergétique, les mitochondries contiennent peu de calcium dans les cellules au repos, mais peuvent en accumuler de grandes quantités lors d'une entrée stimulée. Elles peuvent libérer cette charge calcique lors de la récupération (Nicholls, 2005). Les effets physiologiques d'un taux élevé de calcium intra-mitochondrial

sont nombreux. Ils comprennent l'ajustement de la production aérobie d'ATP, la transmission synaptique et l'excitabilité, la régulation de la dynamique et du trafic des organites, la médiation de la signalisation vers le noyau, la régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'activation de la libération des signaux de mort (Chinopoulos and Adam-Vizi, 2010; Duchen, 2004; Mattson et al., 2008; Nicholls, 2005; Starkov, 2010). Le calcium a notamment un effet sur la morphologie et la motilité mitochondriale ainsi que sur le métabolisme mitochondrial. Une augmentation de la concentration matricielle en calcium entraîne la translocation de la protéine Drp1, initiant la fission qui résulte en une fragmentation du réseau mitochondrial (Breckenridge et al., 2003). De plus, cela stimule l'activité de différentes déshydrogénases, notamment la pyruvate déshydrogénase, la NAD⁺-isocitrate déshydrogénase et la 2-cétoglutarate déshydrogénase (McCormack and Denton, 1980). Ce qui conduit à une augmentation de la concentration en NADH qui sera utilisé par la chaîne respiratoire pour synthétiser de l'ATP. Une élévation temporaire de la concentration mitochondriale en calcium peut stimuler la production d'ATP, mais cette stimulation perdure jusqu'à une heure après l'augmentation transitoire de la concentration en calcium. Il semble alors exister un mécanisme de « mémoire » mitochondriale permettant de répondre à une demande soutenue en ATP (Jouaville et al., 1999).

Enfin, le calcium mitochondrial est impliqué dans les mécanismes apoptotiques. Un des éléments clés de cette voie est le relargage du cytochrome C et de l'AIF (« Apoptosis Inducing Factor ») dans l'espace intermembranaire (Kroemer et al., 1995; Yang et al., 1997). Ils activent alors, directement ou indirectement, la caspase 3. Une surcharge calcique entraîne l'ouverture du pore de transition de perméabilité, ce qui induit le gonflement mitochondrial et peut entraîner la sortie de ces molécules hors de la mitochondrie et ainsi déclencher l'apoptose.

Pour cela, le calcium cytoplasmique doit pénétrer la mitochondrie et traverser ses membranes. La membrane externe mitochondriale contient des protéines (les porines) qui forment de larges pores, tels que le canal sélectif des anions voltage-dépendant (VDAC). Les mitochondries situées à proximité des lieux de relargage du calcium par le réticulum endoplasmique peuvent également former des microdomaines enrichis en calcium (Csordas, 1999; Rizzuto et al., 1998), permettant d'alimenter les systèmes d'import de calcium. Ces domaines de haute concentration calcique peuvent également être formés par couplage fonctionnel entre le système d'import mitochondrial et les canaux d'entrée du calcium de la membrane plasmique (Rizzuto et al., 1999). Enfin, l'import de calcium par les mitochondries pourrait être modulé par des protéines solubles

qui orientent le calcium vers la mitochondrie suite à une stimulation par un agoniste. Cette voie d'action a notamment été démontrée pour certains isoformes de PKC (Pinton et al., 2004).

Grâce au potentiel membranaire mitochondrial négatif généré par la force proton-motrice, le calcium entre dans la mitochondrie par un transporteur électrogénique, un uniport mCU (Mitochondrial Calcium Uniporter) localisé dans la membrane interne mitochondriale. Ce transporteur possède un site d'activation ainsi qu'un site de transport (Gunter and Pfeiffer, 1990). Cet uniporteur, un canal sensible au Ca^{2+} lorsqu'il est ouvert par un taux élevé de Ca^{2+} cytosolique, permet au Ca^{2+} de s'écouler dans la matrice le long du gradient électrochimique de la mitochondrie (Gunter and Sheu, 2009; Nicholls and Budd, 2000). La libération de Ca^{2+} par la mitochondrie dans les neurones est principalement régulée par un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Crompton et al., 1978).

Enfin, de manière à réduire les dommages oxydatifs à la cellule et assurer un contrôle de la qualité des mitochondries, celles qui ne fonctionnent pas correctement sont éliminées par autophagie (Ashrafi et al., 2014). Ce processus implique les deux protéines, PINK1 et Parkin (Wang et al., 2011), pour permettre le recrutement et la formation du phagophore puis de l'autophagosome avant dégradation.

La mitochondrie n'est donc pas simplement l'usine énergétique de la cellule mais aussi un composant actif et finement régulé du métabolisme cellulaire, capable d'adapter son fonctionnement à la variation de la demande en ATP. Cela est réalisé par une modification directe de l'efficacité de conversion énergétique mitochondriale, mais également par l'établissement d'un dialogue rétrograde vers le noyau aboutissant à des modifications de la quantité de protéines qui composent la chaîne respiratoire. La mitochondrie a été montrée comme étant la cible de régulation par de nombreuses hormones, parmi lesquelles les hormones glucocorticoïdes qui interviennent dans de nombreux processus cellulaires et métaboliques et aboutissent à la mise en place d'un état hypermétabolique au niveau du corps entier.

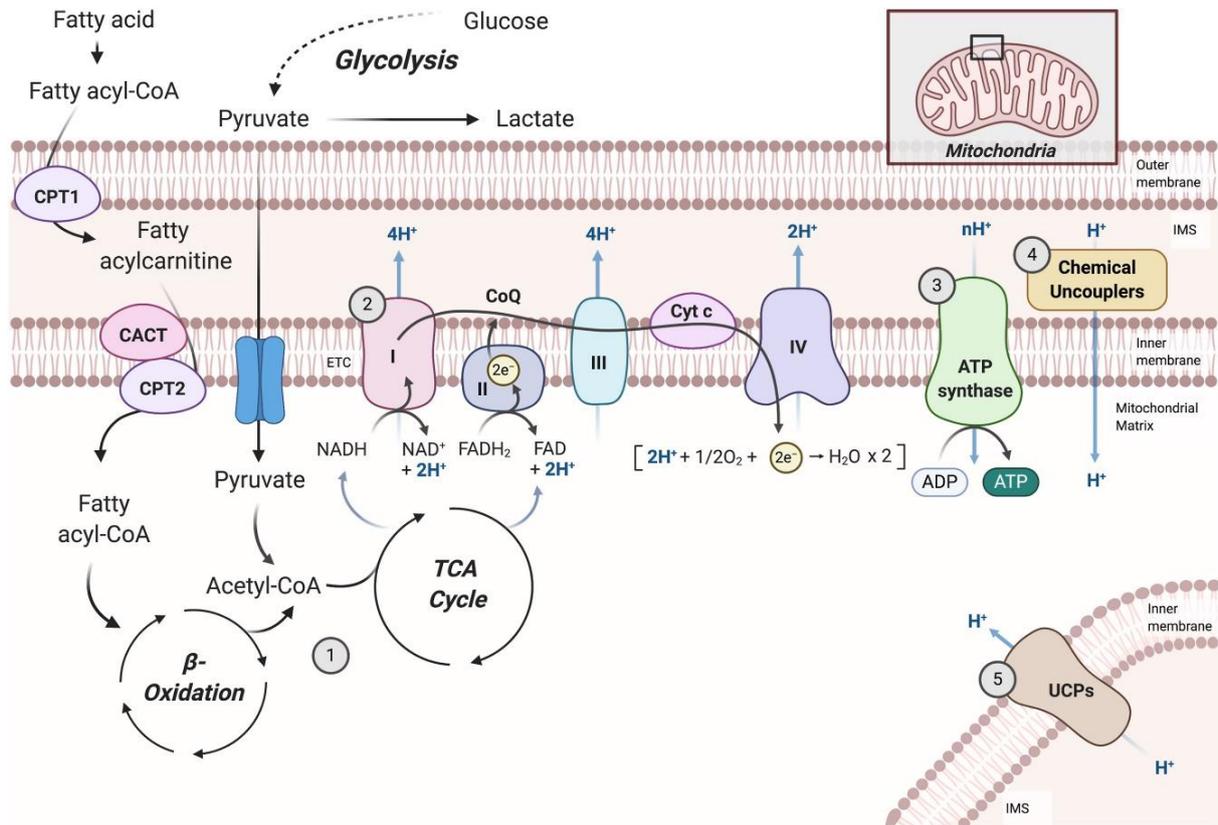


Figure 26 – *Processus de respiration cellulaire mitochondriale. Les étapes de la respiration cellulaire impliquent (1) le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), (2) la chaîne de transport d'électrons (ETC) et (3) l'ATP synthase. Le découplage des substrats d'oxydation et de l'ATP est médié par (4) des agents chimiques ou (5) des protéines de découplage (UCP). D'après Goedeke and Shulman, 2021.*

4. Rôle des mitochondries dans la régénération

L'une des caractéristiques de nombreux troubles neurodégénératifs est un dysfonctionnement mitochondrial. Compte tenu de leur rôle métabolique, ces mitochondries doivent être remplacées pour assurer la survie des cellules (Cheng and Sheng, 2020; Mattson et al., 2008). De la même manière, à la suite d'une lésion du système nerveux des dommages mitochondriaux sont observés. Il se produit une dépolarisation du potentiel de membrane des neurones. Un flux de calcium est alors libéré permettant l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriaux (mPTP). Cela conduit à une destruction de la membrane externe mitochondriale, l'induction d'un stress oxydatif — traduit par la libération de ROS et de protéines pro-apoptotiques (Pivovarova and Andrews, 2010; B. Zhou et al., 2016) —, et altère la synthèse d'ATP par une chute de NAD⁺. Or il a été démontré que le NAD⁺ possède un effet axoprotecteur en interagissant avec sirT3 (une histone désacétylase mitochondriale

dépendante du NAD⁺). Celle-ci va désacétyler le complexe I de la chaîne mitochondriale et réguler l'ouverture du pore mPTP. Ce qui va réduire la libération du cytochrome C, donc l'activation de l'apoptose. En effet, si l'on utilise une molécule telle que la roténone, qui réduit la production énergétique (en inhibant précisément le complexe 1), on observe une libération du cytochrome C et une mort neuronale. En revanche, un pré-traitement au NAD prévient cette dégénérescence. De plus, des enzymes productrices de NAD⁺, telle que NMNAT2, sont transportées de manière antérograde à l'extrémité distale de l'axone pour promouvoir cet effet protecteur. Ainsi un signal d'apoptose induit par une lésion diminue le transport axonal des enzymes productrice de NAD, rendant les axones sensibles à la dégénérescence (Magnifico et al., 2013). En parallèle le NAD⁺ possède un effet indirect sur la stabilité des MT. En effet, il pourrait augmenter la fixation de MAP stabilisatrice EB (notamment EB1 et EB3) par une interaction impliquant aussi sirT3. De manière globale, une chute de NAD⁺ induit une réduction de la production d'ATP, une déstabilisation du cytosquelette et une perturbation de la dynamique mitochondriale, conduisant à la fragmentation de l'axone et une dégénérescence (Harkcom et al., 2014; Lassus et al., 2016; Magnifico et al., 2013).

À la suite d'une lésion, la libération de Ca²⁺ intracellulaire induit une surcharge calcique, qui au niveau mitochondrial active l'ouverture du pore PTP induisant la perte du potentiel de membrane et conduisant à des mitochondries gonflées, avec une localisation axonale anormale associée à la rétraction de l'axone (Pozo Devoto et al., 2022; Xu et al., 2018). Bien que dans les étapes précoces, on observe une augmentation de la fusion mitochondriale, les perturbations de cette dynamique mitochondriale entraînent une surexpression de Drp1. Cela induit une augmentation de la fission, favorise la production de ROS qui réduit le potentiel de membrane de la mitochondrie, libère le cytochrome C et la caspase3 pro-apoptotique (Jia et al., 2016; Wang and He, 2009). Cette fission mitochondriale résultant d'une dysfonction mitochondriale inhibe la stabilisation des microtubules et la régénération axonale et induit l'apoptose (Csordás et al., 2018).

La régénération des axones est un processus énergivore. Il implique donc la présence de mitochondries dans le cône de croissance (El Bejjani and Hammarlund, 2012; Patrón and Zinsmaier, 2016; Tennyson, 1970; Yamada et al., 1971), en particulier dans le domaine C où elles sont transportées pour apporter les ressources nécessaires (Gollihue et al., 2018; Misgeld et al., 2007; Narayanareddy et al., 2014). L'étude de *C. elegans* montre que les axones en régénération possèdent une plus forte densité de mitochondries au niveau de la zone de croissance (Han et al., 2016). Par ailleurs, les mitochondries sont aussi

présentes au niveau des points de branchement des axones et des terminaisons synaptiques (Kang et al., 2008; Spillane et al., 2013). Il a également été observé dans des modèles de souris Alzheimer, possédant une altération de l'intégrité synaptique associée à une réduction du nombre d'épines, que l'augmentation de la respiration mitochondriale restaure la densité dendritique, ainsi que la proportion d'épines associées aux mitochondries (Richetin et al., 2017).

Dans un contexte cellulaire et moléculaire post-lésionnel tel que décrit, la mise en place du cône de croissance ne peut alors pas être assurée d'un point de vue énergétique. Pour cela, la stimulation du transport mitochondrial, notamment par l'inhibition de la Syntrophine, améliore la migration mitochondriale dans la partie distale, où la demande énergétique est particulièrement forte. Ce qui permet de retrouver l'intégrité de la dynamique mitochondriale afin de combler les déficits et favoriser la repousse axonale (Guo et al., 2005; Han et al., 2016; B. Zhou et al., 2016). De plus, la surexpression d'une protéine ARM CX1, qui favorise la fixation de la mitochondrie avec Miro1 pour le transport, favorise également la régénération axonale (Cartoni et al., 2016). Le transport et notamment le repositionnement des mitochondries après une lésion permettrait donc de favoriser la croissance (Cartoni et al., 2017; Smith and Gallo, 2018). En parallèle, impacter la dynamique mitochondriale, en favorisant la fusion mitochondriale et en inhibant sa fission, affecte positivement la régénération axonale. Dans un modèle de lésion médullaire, il a été observé que la Loureirine B, un flavonoïde issue de la sève de dragonnier, augmente significativement Mfn1 favorisant la fusion mitochondriale et ainsi la régénération axonale (Wang et al., 2019). Compte tenu des effets négatifs induits par la surexpression de Drp1 après une lésion décrits précédemment, l'inhibition de Drp1 semble pouvoir favoriser la récupération et réduire l'apoptose (Jia et al., 2016). Toutefois, des mitochondries anormalement longues peuvent présenter une plus faible probabilité de transport le long de l'axone (Kiryu-Seo, 2016; Steketee et al., 2012). Il a également été démontré sur des lésions périphériques et centrales, que réduire la respiration mitochondriale réduit la régénération axonale (Han et al., 2016). Cela renforce l'idée que les mitochondries jouent un rôle central dans le processus de régénération du SNC (McEwen et al., 2011).

Les mitochondries représentent donc un composant essentiel de la régénération et de l'extension axonale, en forte interaction avec le cytosquelette (figure 27). La relation microtubules-mitochondries semble donc pouvoir jouer un rôle important dans le devenir d'un axone post-lésionnel.

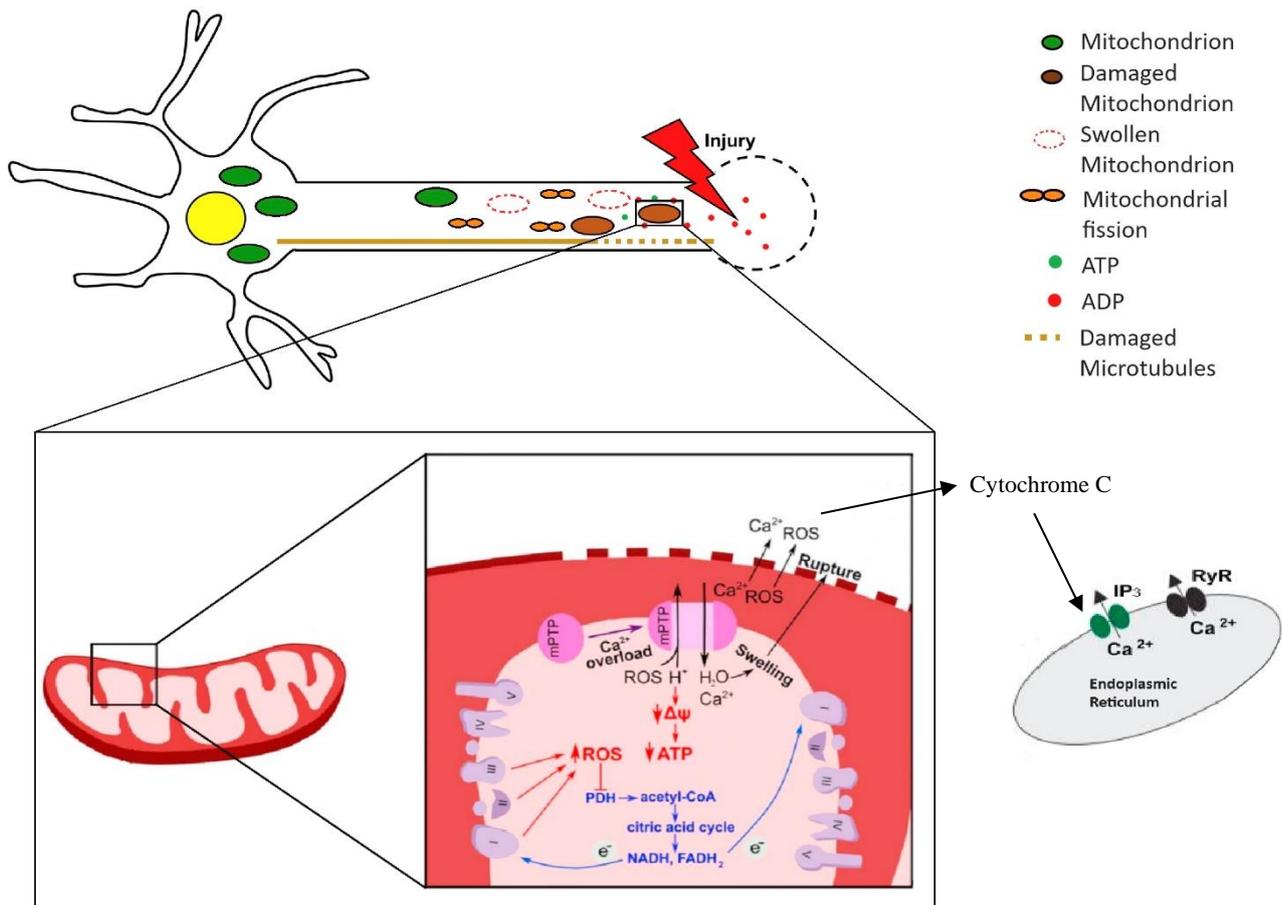


Figure 27 – Schéma décrivant le comportement mitochondrial après lésion dans le système nerveux central.

Après une lésion médullaire, les mitochondries dans le segment distal sont principalement stationnaires et la fission est augmentée, entraînant une accumulation de mitochondries endommagées sur le site de la blessure. Au niveau cellulaire, le niveau de Ca^{2+} intra-axonal augmente avec un gradient maximal au site de lésion, ce qui conduit à une altération de la chaîne de transport des électrons (e^-) avec une diminution de la production d'ATP et une augmentation de la génération de ROS. L'afflux de Ca^{2+} entraîne l'ouverture du mPTP et la perte du gradient électrochimique ($\Delta\psi$) nécessaire à la synthèse de l'ATP. L'ouverture du mPTP provoque également un gonflement de la matrice et la rupture de la membrane externe, libérant des ROS, du Ca^{2+} et des protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome *c*, dans le cytosol. Enfin, le cytochrome *c* libéré des mitochondries peut déclencher la libération de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique. D'autre part, il existe des interactions entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique de sorte que le Ca^{2+} libéré par les récepteurs IP_3 et les récepteurs de la ryanodine (RyR) est rapidement transféré dans les mitochondries. Adapté de Mattson et al., 2008; Patrón and Zinsmaier, 2016; Scholpa and Schnellmann, 2017.

IV. Modèles expérimentaux

L'étude approfondie de la physiologie et de la physiopathologie des réseaux neuronaux, notamment en ce qui concerne les lésions du SNC, nécessite des modèles expérimentaux à la fois précis et pertinents.

Les modèles traditionnels englobent les approches *in vivo* de mammifères (murins notamment). Ceux-ci permettent d'examiner le tissu dans son environnement et d'analyser le comportement en réponse à des interventions, par exemple thérapeutiques (Chedly et al., 2017; Cheriyan, 2014). On retrouve également des modèles *in vitro*, dans lesquels des neurones sont maintenus en culture dans des boîtes de Pétri, permettant l'étude d'évènements cellulaires et moléculaires, tels que les conséquences d'une lésion (Slovinska et al., 2012). Ces cultures offrent un moyen d'examiner la fonction neuronale et synaptique sous conditions pathologiques ou en réponse à des traitements pharmacologiques, avec une capacité d'analyse souvent plus rapide et simplifiée que les méthodes *in vivo*. Ce type de modèle permet également des études sur de longues périodes.

Un processus intermédiaire entre les modèles *in vivo* et *in vitro*, sont les modèles *ex vivo*, qui consistent à utiliser des tranches de tissus — par exemple de cerveaux pour l'étude du SNC — pour étudier des réseaux intacts dans un paradigme *in vitro*, tout en préservant les connexions structurelles existantes *in vivo*. Les tranches de cerveau adulte, qui ne restent viables que quelques heures, sont notamment utilisées pour des études électrophysiologiques à court terme des neurones, car les réseaux commencent à se dégrader après quelques heures *ex vivo*. À l'inverse, les coupes embryonnaires (voire post-natal dans certains cas) peuvent être maintenues *in vitro* pendant plusieurs semaines dans des systèmes adaptés, permettant de préserver certains circuits anatomiques et d'étudier les processus biologiques à long terme (Lossi et al., 2009; Schizas et al., 2014). Néanmoins, ces approches présentent des limitations significatives. Les modèles *ex vivo* nécessitent des manipulations délicates, et le maintien des tranches dans des conditions riches en oxygène peut conduire à l'hyperoxie, entraînant une mort cellulaire progressive et un stress oxydatif. Les modèles *in vitro* classiques ont une connectivité aléatoire et complexe à analyser, en plus d'une difficulté à reproduire des pathologies ou des lésions précises. Quant aux modèles murins, leur mise en œuvre est chronophage et ils constituent un système complexe dont les mécanismes cellulaires et subcellulaires sont difficilement individualisables.

Ces défis soulignent l'importance de développer de nouveaux modèles qui permettraient une compréhension plus détaillée des structures et fonctions des réseaux neuronaux, ainsi que de leurs pathologies.

1. Culture de neurones *in vitro*

Depuis la découverte en 1907 que des cellules, y compris des neurones, pouvaient être cultivées hors de l'organisme (Harrison et al., 1907), les techniques de culture neuronales se sont considérablement perfectionnées. Les milieux de culture artificiels ont également rapidement émergé pour permettre une meilleure reproductibilité (Carrel, 1910). Parmi les techniques développées, ont émergées les flasques de Carrel (Carrel, 1923) ou la culture dans des tubes à essai. L'objectif de ces améliorations était de réaliser des cultures sur le long terme et de permettre l'observation au microscope (Millet and Gillette, 2012).

Grâce à ces développements, les cultures *in vitro* de neurones embryonnaires, dits primaires, sous forme dissociés et adhérant à un substrat solide transparent sont les plus communes. Elles permettent d'observer avec une grande précision la morphologie des cellules et d'avoir un accès facile aux échantillons par imagerie, pour décrypter les voies de signalisation cellulaires et moléculaires, autonome ou impliquées en cas de dysfonction. Ces cultures de neurones isolés permettent la génération d'auto-synapses — dites autapses — et ont conduit à de nombreuses avancées (Bekkers and Stevens, 1991; Fenske et al., 2019).

Cependant, les études dans des boîtes de Petri présentent certaines limitations. Premièrement, le cerveau est constitué de neurones interconnectés, rarement autaptiques. Les neurones cultivés dans des boîtes de culture traditionnelles forment un réseau semi-aléatoire avec un état de connectivité complexe qui ne mime pas les voies cérébrales ordonnées ni le connectome cérébral (figure 28A). De plus, ces cultures traditionnelles ne permettent pas d'isoler les processus cellulaires et moléculaires à un niveau subcellulaire et sont uniquement utilisées pour étudier des processus autonomes où tous les neurones d'une même boîte sont considérés comme équivalents. Les techniques traditionnelles de culture en boîte de Petri ont donc donné naissance à de nouvelles technologies, notamment la création de réseaux neuronaux sur des puces microfluidiques.

2. Systèmes microfluidiques

La microfluidique est l'ensemble des techniques permettant de contrôler finement l'écoulement de liquides dans des réseaux de tubulures de dimensions micrométriques. Dans des conduits de cette taille, les solutions aqueuses s'écoulent selon des modalités laminaires et non turbulentes, en raison du faible nombre de Reynolds (Weibel and Whitesides, 2006). Les technologies microfluidiques ont trouvé un grand nombre d'applications dans tous les domaines de la science expérimentale où l'on manipule des fluides (chimie, physique, biologie). Le principe des applications consiste à remplacer les contenants (tubes, boîtes de pétri...) par des réseaux de tubulures micrométriques.

Dans le cas de la biologie cellulaire, les limites des systèmes *in vitro* conventionnels, montrent la nécessité de créer une organisation spatiale. D'autre part, les neurones présentent une architecture particulière où les extensions dendritiques et notamment axonales sont nettement plus longues par rapport au diamètre du soma. L'axone et le compartiment somatodendritique se retrouvent donc souvent dans des environnements très différents et parfois extrêmement éloignés. Ces caractéristiques rendent complexe l'étude des neurones *in vitro* et nécessitent que l'environnement recréé soit le plus proche possible des conditions habituelles dans lesquelles le compartiment neuronal ciblé exerce sa fonction. Dans ce contexte, il apparaît pertinent d'intervenir séparément sur les deux compartiments subcellulaires. L'approche microfluidique est un bon candidat puisqu'elle permet le développement de cultures compartimentées dans des environnements micrométriques, dont les avantages incluent la miniaturisation des supports de culture cellulaire, un contrôle précis des fluides et leur écoulement (Millet and Gillette, 2012). Par ailleurs, la quantité de réactifs nécessaire est considérablement réduite par rapport aux dispositifs de culture classique.

2.1. Évolution des systèmes microfluidiques

Le premier système à réaliser ce défi en utilisant le principe des dispositifs microfluidiques est la chambre de Campenot en 1977 (figure 28B). Il consiste en un morceau de téflon dans lequel des rainures ont été gravées, recouvert d'une fine couche de graisse et déposé face rainurée vers le bas. Il permet ainsi la croissance des prolongements de neurones en culture d'un côté de l'insert en téflon vers l'autre. L'isolation fluidique des deux compartiments est permise par la graisse, ce qui permet de traiter sélectivement l'un ou

l'autre des deux compartiments. Avec ce système, Campenot a mis en évidence l'effet local d'un facteur de croissance neuronal sur la pousse des neurites de cultures de ganglion spinal (Campenot, 1977). Inspirée par ces travaux, l'équipe de Taylor a reproduit en 2003 le design de cette chambre dans un nouveau matériau siliconé — voir section Procédé de fabrication — (Taylor et al., 2003) (figure 28). L'isolation fluïdique dans ce système ne repose pas sur la présence de graisse, mais sur l'écoulement très lent des liquides dans des conduits de taille microscopique. La résistance fluïdique de ces derniers étant inversement proportionnelle à leur diamètre, cela assure l'isolation fluïdique. Ce dernier développement a permis de démocratiser l'utilisation de ce type de systèmes, ouvrant la voie à la culture compartimentée de nombreux types de neurones. Ce système consiste en deux chambres de culture allongées, de quelques centaines de microns de large et quelques dizaines de microns de haut, accessibles par deux puits situés à leurs extrémités. Ces deux chambres sont reliées par des microcanaux dont les dimensions ne permettent pas le passage des somas, mais permettent aux axones de les traverser. L'un des deux compartiments peut être traité sélectivement si une surpression est maintenue dans l'autre. La description du système a par la suite été affinée, avec la démonstration de ses applications pour la coculture de cellules dans les chambres, isolées fluïdiquement mais liées par les axones poussant dans les microcanaux permettant de cocultiver deux populations neuronales connectées synaptiquement (Taylor et al., 2010, 2005; Virlogeux et al., 2018). Une chambre centrale située au milieu des microcanaux permet d'observer sélectivement les synapses, et de perfuser celles-ci avec une grande précision spatiale et temporelle.

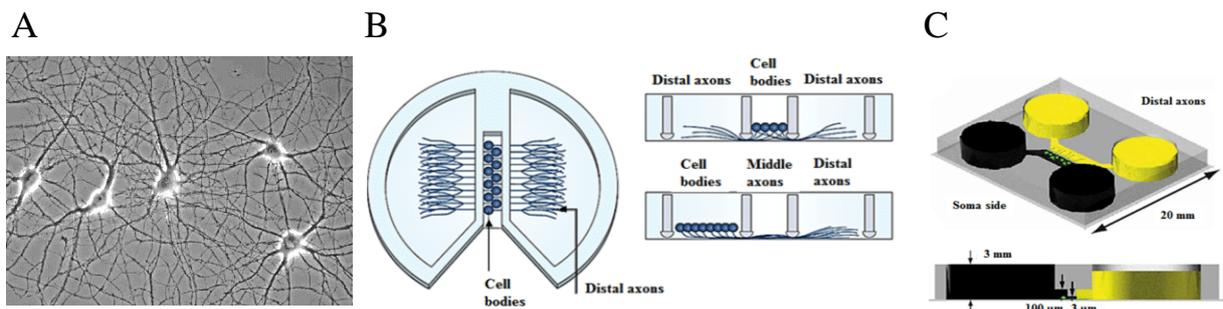


Figure 28 – Vue d'ensemble des différents systèmes de cultures cellulaires. (A) Cultures de neurones hippocampiques en contraste de phase sur lamelles de verre conventionnelles, ne permettant pas d'agir spécifiquement sur les compartiments subcellulaires. À partir de Kaech et Banker 2007. (B) Chambre de Campenot, premier système de compartimentalisation microfluidique, puis modifié par Taylor (C). À partir de Jadhav et al., 2016.

Les chambres microfluidiques permettent de guider certains axones et dendrites issus d'une culture neuronale primaire vers une seconde chambre, compartimentant ainsi les axones distaux des compartiments somatodendritiques. C'est la longueur des micro-canaux qui détermine alors si les dendrites, compte tenu de leurs longueurs, atteindront ou non les seconds compartiments avec les axones, qui s'étendent, eux, sur des distances plus importantes. Un des principaux avantages est que les axones ne peuvent pas échapper aux structures micro-canaux en forme de tunnel. De plus l'isolation fluide entre les chambres permet de contrôler l'environnement micro-neuronal. Sur cette base, de nombreux laboratoires ont cloné et optimisé ce principe pour démontrer que les micro-canaux de guidage permettent de compartimenter les axones de tous types de neurones et que l'ensemencement de différents types cellulaires permet la création de modèles minimalistes tels que les jonctions neuromusculaires.

Ce type de dispositif est idéalement adapté pour contrôler les connexions entre différents types de neurones et devrait donc permettre de reconstruire des réseaux fonctionnels. C'est ainsi que différentes tentatives visant à reconstruire des réseaux ont été faites, en semant deux populations neuronales différentes dans des chambres indépendantes. Utilisant leur conception initiale, le groupe de Taylor a construit un dispositif hippocampo-hippocampal pour étudier sa connectivité. Cela a été progressivement suivi par les travaux de nombreux autres groupes qui ont créé une variété de réseaux composés de différentes identités neuronales. Cependant, bien que cela constitue un premier pas vers la construction de réseaux ordonnés, ce système présente un désavantage majeur : en permettant la sélection des axones, les microcanaux de guidage permettent des connexions bidirectionnelles entre les deux populations neuronales, puisqu'ils laissent les axones pousser dans les deux directions. D'une part cette propriété ne reflète pas l'organisation qui est observée dans le cerveau, où l'innervation entre deux structures est le plus souvent asymétrique. D'autre part, elle complique l'interprétation des expériences. Si un traitement est appliqué dans une chambre et un effet est observé dans l'autre chambre, en raison de l'isolation fluide le vecteur responsable est le transport axonal. Cependant, le sens de ce dernier est incertain : il pourrait tout aussi bien s'agir d'un transport antérograde des neurones A vers les neurones B, que d'un transport rétrograde via les axones que les neurones B envoient vers le compartiment A.

Il est donc nécessaire de pouvoir contrôler la direction de la projection des neurones pour reconstruire des réseaux neuronaux unidirectionnels et étudier plus rigoureusement le dialogue trans-neuronal et plus largement, les mécanismes cérébraux *in vitro*.

Une stratégie pour pallier ce problème repose sur des microcanaux axonaux, tels que ceux décrits par Taylor et al en 2003, mais de forme non rectiligne. Une forme asymétrique des microcanaux permet d'orienter la pousse des axones. La première tentative d'influencer la pousse axonale suivant cette stratégie a été proposée en 2011 par le groupe de J.M. Peyrin (Peyrin et al., 2011), et reposait sur l'utilisation de microcanaux axonaux en entonnoir. La partie la plus large permet de récolter des axones d'une chambre et se rétrécit progressivement jusqu'à atteindre la seconde chambre. Ainsi, les axones ne rencontrent pas d'obstacles abrupts à leur croissance, tandis que les axones de la chambre distale migrent plus difficilement vers la chambre proximale. Ce dispositif, permet une filtration axonale de l'ordre de 95% (Peyrin et al., 2011). Par la suite de nouveaux développements ont été faits par le groupe de J.M. Peyrin dans l'équipe, introduisant des microcanaux dits "arches" (Courte et al., 2018). Ces microcanaux ajoutent aux canaux asymétriques des motifs spécifiques en forme de demi-lune (figure 29). Ce dernier type de filtration repose d'une part sur les propriétés mécaniques des axones — leur résistance à la flexion qui les empêche de se courber au-delà d'un seuil donné — et d'autre part à leur adhésion sélective aux coins des microcanaux rectangulaires, riches en signaux adhésifs (Renault et al., 2016). Ainsi, les axones peuvent adhérer aux demi-lunes et suivre leur orientation. Basé sur ces travaux, un nouveau système de reconstruction de réseaux de neurones *in vitro* a été développé, permettant pour la première fois de reconstruire des réseaux de neurones connectés synaptiquement et orientés à 100%, c'est-à-dire sans axones poussant en sens rétrograde (Courte et al., 2023, 2018).

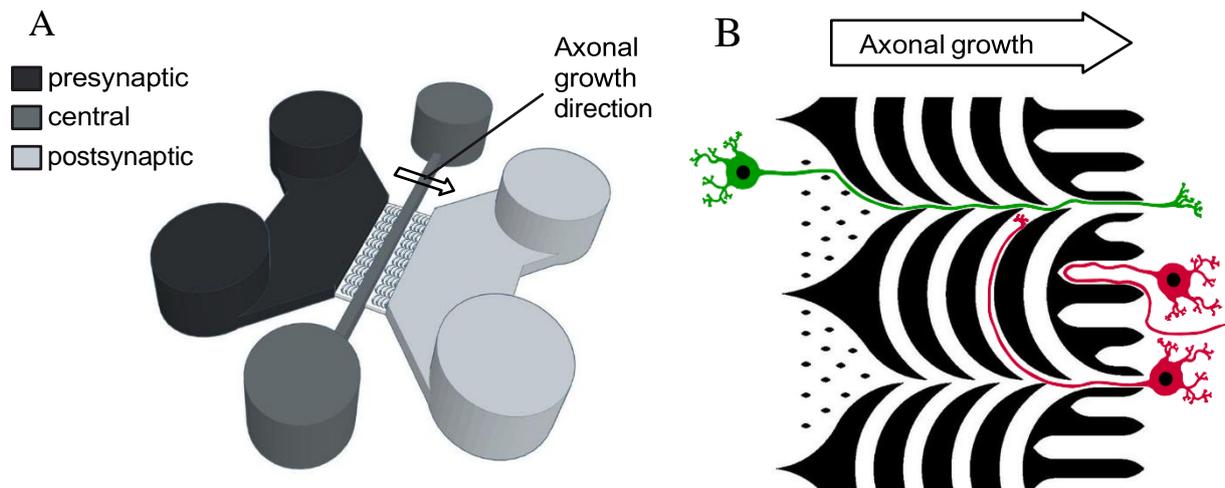


Figure 29 – Représentation schématique du dispositif de culture microfluidique pour la reconstruction de réseaux neuronaux orientés (A). Trois compartiments principaux (présynaptique ; central et postsynaptique) sont accessibles par des entrées/sorties fluidiques et reliés par des microcanaux. (B) Schéma des microcanaux « Arches », permettant la filtration axonale unidirectionnelle. D'après Courte et al., 2023.

2.2. Procédés de fabrication

Pour parvenir à la fabrication de ces systèmes, de nombreuses techniques de microfabrication existent, telles que le micro-fraisage de moules en métal ou la gravure. Cependant, l'une des améliorations les plus notables est la fabrication de moules par microphotolithographie ou « soft lithography » (Taylor et al., 2003), puis la génération de systèmes en polymères coulés dans ces moules. C'est une des techniques les plus répandues, et qui permet de produire en grande quantité et à faible coût des dispositifs contenant des motifs de taille millimétrique à micrométrique. La photolithographie est le processus de création de microstructures sur un substrat, tel que le silicium ou le verre, en utilisant l'exposition à la lumière et les réactions chimiques d'une résine photosensible (photorésine). Après l'exposition à la lumière, la photorésine peut subir des réactions de réticulation et polymérisation, le processus de base en microfluidique utilise une photorésine négative SU-8 — dans notre cas SU8-2002 (figure 30). Cette étape nécessite que l'environnement soit soigneusement contrôlé durant le processus de préparation, notamment au niveau de la température, de l'humidité, ainsi que la densité de l'air. Ces exigences environnementales élevées pour la fabrication nécessitent généralement une salle blanche.

Différents matériaux peuvent être utilisés pour les puces microfluidiques à usage biologique, dans la mesure qu'ils soient biocompatibles, possèdent de bonnes propriétés d'isolation électrique, et une perméabilité à l'oxygène et au dioxyde de carbone. La large gamme de polymères, leur facilité de traitement et de moulage, ainsi que le faible coût des matières premières les rendent idéaux pour une production à grand volume. Ainsi, le matériel le plus souvent utilisé pour produire ces dispositifs est le polydiméthylsiloxane (PDMS), un élastomère de silicone. Le PDMS combine une série d'avantages pour cet usage : il est peu coûteux, reste longtemps liquide à température ambiante et sa réticulation s'effectue à une température peu élevée, de l'ordre de 70°C. Une fois réticulé, le PDMS est un matériau flexible restant stable sous des déformations répétées, il présente une inertie thermique, transparent pour l'observation il transmet la lumière violette, imperméable aux solutions aqueuses, mais perméable aux gaz et parfaitement biocompatible. Cela en fait un matériau optimal pour générer des systèmes de culture cellulaire. Il existe toutefois certaines limitations, comme la déformation due à la rétraction de 1% du PDMS après durcissement. Cela rend difficile l'obtention d'une haute

précision, notamment lors de soft lithography dans la microfabrication multifacette, mais ne suffit pas à empêcher l'utilisation généralisée du PDMS compte tenu de ses avantages

Une fois fabriqués, les systèmes microfluidiques sont assemblés avec un support pour permettre la culture des cellules. Les méthodes de liaison sont également variées, dont les plus courantes sont la liaison par oxydation au plasma ou l'irradiation UV (figure 30). Le PDMS est relativement adhérent et peut être lié de manière réversible ou irréversible au même matériel ou à une variété de matériaux différents, tel que le verre. Si la surface du substrat PDMS et de la lamelle de verre sont d'abord traitées par oxydation au plasma ou irradiation UV, la puce PDMS peut être liée de manière irréversible, permettant une liaison plus forte et plus durable.

Les systèmes de culture fabriqués de cette façon sont aisés à produire : tous les motifs structuraux (chambres de culture + micro-canaux) sont situés sur le même bloc de PDMS, et une fois des ouvertures pratiquées aux extrémités de chaque chambre, ce bloc peut être attaché à une lamelle de verre compatible avec des objectifs de microscopie à courte distance focale et stérilisés pour permettre différentes expérimentations *in vitro*.

Toutefois, le PDMS réticulé rejette des oligomères non polymérisés dans le milieu de culture, qui peuvent s'incorporer dans la membrane plasmique des cellules en culture (Regehr et al., 2009). Ce phénomène pourrait avoir un impact sur les propriétés membranaires des cellules, ainsi que sur le métabolisme de celles-ci. Il a également la propriété d'adsorber les petites molécules hydrophobes, telles que certains facteurs de croissance, depuis le milieu de culture. Les systèmes microfluidiques de culture présentent donc des avantages certains sur leurs prédécesseurs, mais certaines caractéristiques propres aux matériaux dont ils sont constitués doivent être prises en compte dans l'interprétation des résultats expérimentaux.

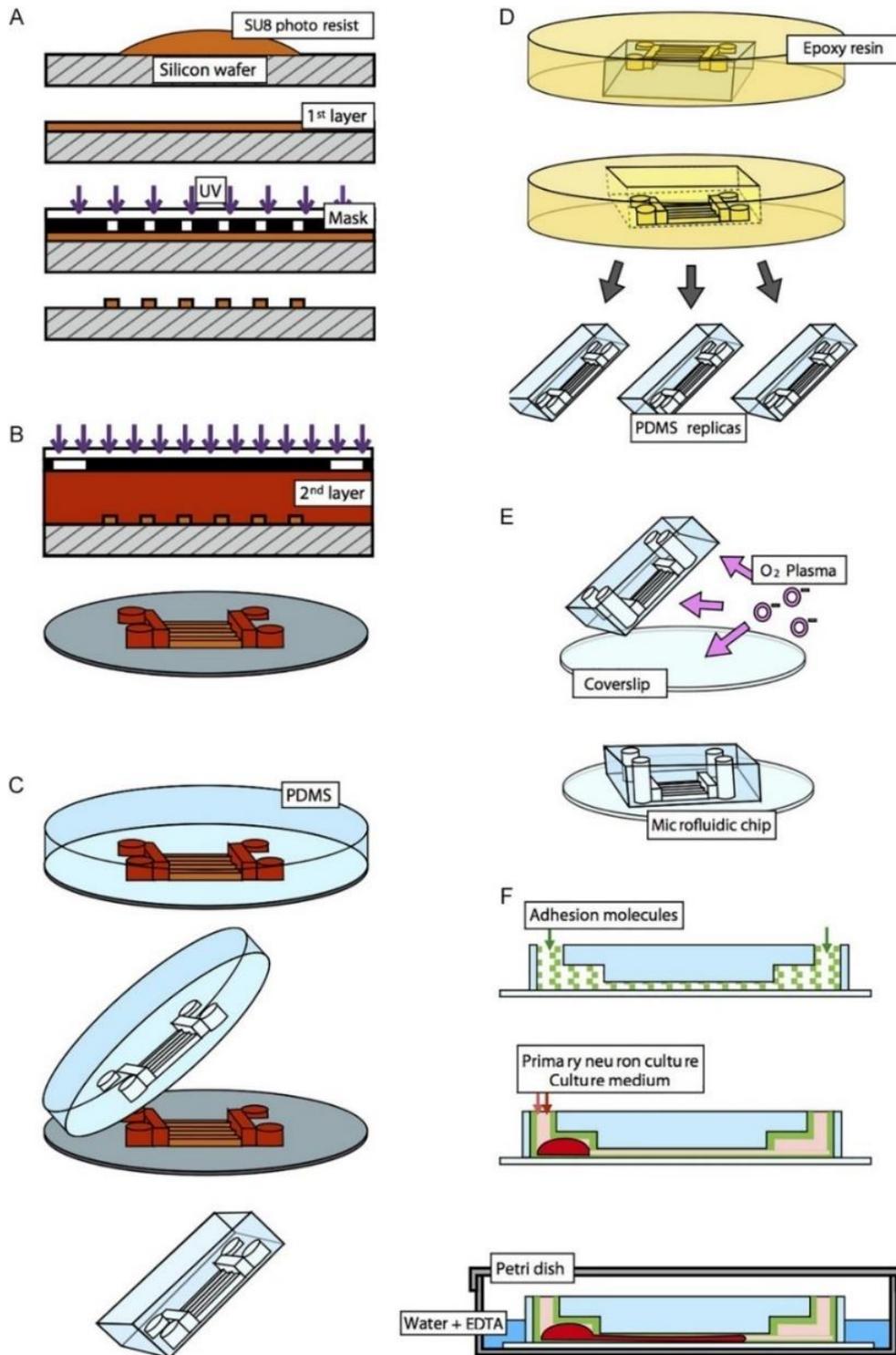


Figure 30 – *Protocole de fabrication des puces microfluidiques. (A et B) Photolithographie des microcanaux et des chambres de culture pour la fabrication du master, avec une résine photosensible sur disque de silicium. (C) Réticulation du PDMS sur le disque de silicium pour la fabrication d'un réplica en PDMS. (D) Préparation du moule en résine et préparation de nombreux réplicas de puces à partir du moule. (E) Assemblage de la puce en PDMS et de la lamelle en verre. (F) Préparation de la puce microfluidique pour la culture, ensemencement des neurones et milieu de culture dans une boîtes de pétri. D'après Courte et al., 2018.*

3. Modèle de lésion *in vitro*

En parallèle du développement de systèmes adaptés, l'adressage des aspects physiopathologiques a nécessité de pouvoir reproduire sur ces systèmes et cultures des pathologies d'intérêts de manière semblable ou comparable à celles observées *in vivo*.

Pour l'étude des lésions du système nerveux, compte tenu de la complexité de ces lésions et afin de cibler les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu, il est nécessaire de développer des modèles simplifiés. Les modèles microfluidiques permettent de modéliser des réseaux de neurones connectés afin d'étudier spécifiquement le développement et la repousse de l'axone, la traduction et la signalisation locale ou encore la synaptogénèse, dans des conditions physiologiques et pathologiques (Millet and Gillette, 2012). Il est également possible d'agir pharmacologiquement sur les cultures, via des drogues et molécules, de manière contrôlée. De plus, bien que simplifiés, certains de ces modèles *in vitro*, tels que les traumatismes crâniens, peuvent être prédictifs des résultats retrouvés *in vivo* (Shrirao et al., 2018). Ces modèles trouvent donc des applications dans la modélisation de traumatismes comme l'axotomie, qui représente le trauma de la moelle épinière.

À ce jour, plusieurs types de systèmes permettant d'appliquer une lésion existent en fonction de la lésion à reproduire. Le système le plus simple représente la lésion chimique, en perfusant un détergeant dans l'un des compartiments cellulaires. Cela a pour avantage de mimer les aspects biochimiques et l'excitotoxicité induite, toutefois cela ne reproduit pas les aspects physiques d'une lésion. Face à cette problématique, la lésion par aspiration permet d'appliquer de manière simple une axotomie (figure 31). Elle consiste en l'aspiration du milieu de culture et du matériel axonal présent dans le compartiment axonal d'un dispositif microfluidique. Toutefois, elle nécessite une calibration à chaque installation et ne convient pas à tous les types de cultures, en particulier les cocultures où la lésion ne serait alors pas limitée à une axotomie. En parallèle, les axotomies assistées par laser sont bien plus précises et applicables individuellement à un axone unique (figure 31). Cet avantage pour le ciblage précis des événements mis en place en réponse à une lésion en fait également un inconvénient, n'étant pas représentatif des lésions du système nerveux central. De plus, ce système nécessite des composants optiques complexes et coûteux. Pour répondre à ces défis, les lésions mécaniques pouvant récapituler les aspects physiques d'une lésion et de manière spécifique aux régions subcellulaires possèdent un fort potentiel dans la modélisation de lésion *in vitro*. Ces forces appliquées, soit par

étirement soit par compression, miment *in vitro* les forces appliquées lors d'un trauma (figure 31). Toutefois, à ce jour ces systèmes nécessitent des processus de fabrication complexes, une calibration ainsi que l'utilisation d'un système pneumatique complexe.

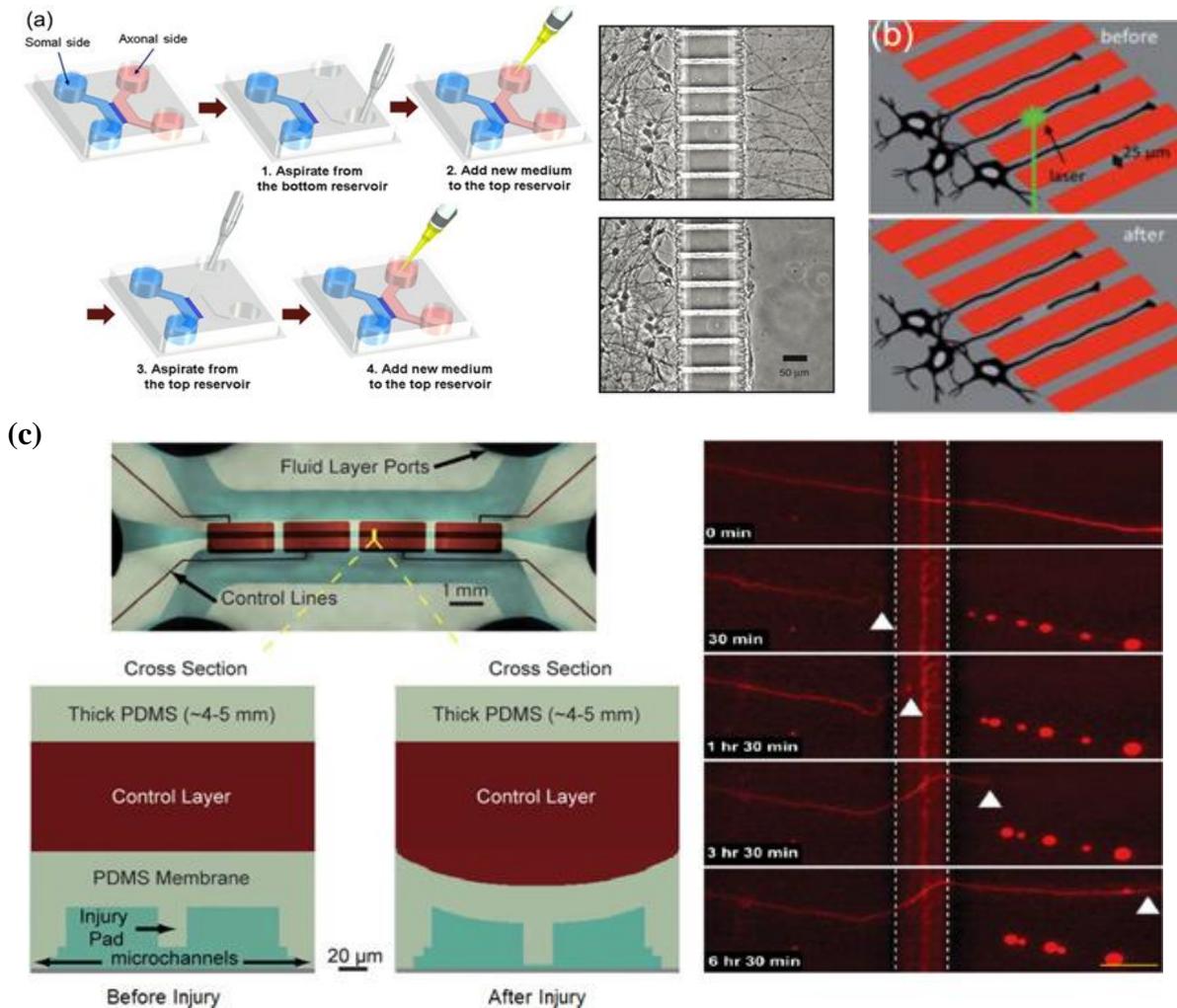


Figure 31 – Différents systèmes de lésion en microfluidique pour appliquer une axotomie par aspiration (a), assistée par laser (b) ou via un pad de compression (c). D'après Shirao et al., 2018

Dans le contexte des lésions de la moelle épinière (LME) entraînant l'interruption des axones corticaux reliant la moelle épinière, le faisceau cortico-spinal est spécifiquement affecté et montre une faible capacité de régénération (Courtine and Sofroniew, 2019; Geoffroy, 2015). La régénération des neurones du SNC a été principalement étudiée dans des axones de neurones en culture dans des conditions qui ne reproduisaient pas les propriétés physiques d'une lésion de la moelle épinière et sans considérer les réseaux neuronaux. Évaluer la régénération dans des conditions équivalentes reste une tâche

difficile et cruciale pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par conséquent, il est essentiel de développer un nouveau modèle de lésion du SNC.

C'est ce qui a constitué la première approche de mon travail de thèse rapporté dans ce manuscrit, par la mise au point d'une lésion mécanique appliquée à un réseau de neurones, afin de reproduire une lésion de moelle épinière d'origine traumatique. Pour cela, j'ai pu utiliser les microcanaux asymétriques aux motifs dits « arches », mis au point par l'équipe (Courte et al., 2018), afin de créer des réseaux neuronaux avec une connectivité unidirectionnelle, similaire à celle observée *in vivo*. D'autre part j'ai adapté ce système pour permettre un écrasement physique et traumatique par compression via l'utilisation d'aimant.

| **Projet de recherche et** **Objectifs**

Au cours de ce travail, je me suis intéressé aux lésions du système nerveux central, et plus particulièrement au modèle du traumatisme de la moelle épinière. Ce modèle représente la thématique de notre équipe, qui s'investit dans l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la régénération et la dégénérescence axonale, ainsi que dans le développement de stratégies thérapeutiques.

Dans ce contexte, nous ciblons spécifiquement les axones des neurones cortico-spinaux qui se connectent à la moelle épinière et contrôlent les mouvements volontaires. Ces axones, particulièrement vulnérables après un traumatisme, présentent une très faible capacité de régénération. Nous avons détaillé dans l'introduction de ce manuscrit les perturbations du réseau de microtubules et de la fonction mitochondriale induites par une telle lésion. Ainsi, **mon objectif est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent la régénération et la dégénérescence axonale dans un contexte de lésion de la moelle épinière, avec un intérêt particulier pour l'influence de l'interaction microtubule-mitochondrie sur le devenir des axones après une lésion d'origine traumatique.**

S'il est clair que ces deux entités jouent un rôle dans la régénération axonale et qu'une interaction moléculaire existe entre elles, l'impact des modifications post-traductionnelles de la tubuline sur ce processus est par ailleurs documenté. Toutefois, le lien direct entre ces modifications et l'état des microtubules n'est pas complètement élucidé. **Nous nous interrogeons donc sur la manière dont les modifications de la tubuline affectent le fonctionnement mitochondrial dans un contexte post-lésionnel.**

Pour répondre à cette question, l'objectif premier a été de développer un système *in vitro* simple et reproductible pour reproduire un réseau fonctionnel et appliquer une lésion mécanique, récapitulant les aspects d'une lésion de moelle. Cela afin d'observer le phénotype axonal pré et post lésionnel. Une fois le système caractérisé nous avons pu impacter l'état de la tubuline directement ou au travers des modifications post-traductionnelles, via des agents pharmacologiques, de manière à évaluer l'effet sur la régénération axonale ainsi que sur la dynamique des microtubules et le transport des mitochondries.

| Matériel & Méthodes

Le détail des procédures approfondies et des références utilisées est disponible dans l'article en résultat. Ainsi seuls les éléments de méthodes complémentaires sont mentionnés ici.

Système microfluidique

La réalisation des disques de silicium initiaux par microphotolithographie, tel que présenté en introduction, a été réalisée par Teng Pan (doctorante de J.M. Peyrin), à la plateforme de microfluidique de l'institut Pierre Gilles de Gennes (IPGG). À partir de ceux-ci, des systèmes microfluidiques en PDMS ont pu être réalisés en se basant sur les travaux précédents de l'équipe (Lassus, 2018, Courte 2018) et tel que détaillés dans la section « Matériel & Méthodes » de l'article inclut en résultat.

Culture neuronale primaire et transduction virale

La préparation des cultures primaires de neurones murins corticaux et spinaux et la transduction virale GFP ont été réalisées à partir de *Deleglise et al., 2013 et Beaudet et al., 2015*.

Le protocole détaillé est disponible dans la partie "Matériel & Méthodes" de l'article en résultat.

Lésion mécanique et Traitement pharmacologique

Le protocole détaillé permettant d'appliquer une lésion mécanique tel que mis au point dans ce travail, ainsi que celui des traitements pharmacologiques utilisés, est disponible dans la partie "Matériel & Méthodes" de l'article en résultat.

Imagerie calcique non-ratiométrique

Le protocole détaillé et le matériel utilisé pour l'enregistrement des signaux calcique, est disponible dans la partie "Matériel & Méthodes" de l'article en résultat.

Immunomarquage et anticorps

Le protocole d'immunomarquage et de fixation des cultures est décrit dans la partie "Matériel & Méthodes" de l'article en résultat.

Les anticorps primaires utilisés dans ce manuscrit sont indiqués dans le tableau suivant:

Cible	Espèce / Isotype	Fournisseur / Référence	Dilution
B3-tubulin	Mouse IgG 2a	Covance MMS-435P	1/1000
MAP2	Mouse IgG 1	Sigma M9942	1/500
GFAP	Rabbit	Euromedex 1050	1/2000
Synaptophysine	Mouse IgG 1	Sigma S5768	1/200
Vglut2	Guinea Pig	Synaptic system 135404	1/500
PSD95	Mouse IgG 2a	Abcam ab2723	1/1000
GAD67	Mouse IgG 2a	Millipore MAB5406	1/1000
CTIP2	Rat	Abcam ab18465	1/500
ChAT	Goat	Chemicon AB144P	1/200
Tubuline Acétylée	Mouse IgG 2b	Sigma 6793	1/2000
Tubuline Tyrosinée	Mouse IgG 3	Sigma 9028	1/2000
Tubuline Alpha	Mouse IgG 1	Sigma T6074	1/2000
TOM20	Rabbit	Proteintech 11802-1-AP	1/500
GFP	Chicken	Abcam ab13970	1/1000
Mitofusine 1+2	Mouse IgG 2a	Abcam 57602	1/1000
Drp1	Mouse IgG1	SantaCruz Sc271583	1/1000
H3K27ac	Rabbit	Invitrogen MA5-24671	1/500

Acquisition des images et quantification

Les microscopes utilisés, les méthodes d'analyses d'images ainsi que les protocoles détaillés des quantifications réalisées sont disponibles dans la partie "Matériel & Méthodes" de l'article en résultat.

La plupart des images capturées en mosaïque ont été analysées après stitching sur le logiciel ImageJ, grâce à la macro suivante, développée par Elias Kanaïe-Atrian (stagiaire de M1 avec moi) :

```

run("Bio-Formats Macro Extensions");
path = getDirectory("Sélectionnez le dossier contenant les images");
list = getFileList(path);
folder2 = "C:/Users/Lab/Desktop/CtxSp-mosaic";           //Choisir le repertoire//
File.makeDirectory(folder2);
if (list.length==0) {
    print("No image windows are open");
}
else {
for (i = 0; i < list.length; i++) {
    run("Bio-Formats Importer", "open=[" + path + list[i] + "] autoscale color_mode=Default
    rois_import=[ROI manager] view=Hyperstack stack_order=XYCZT series_1 series_2 series_3 series_4
    series_5 series_6 series_7 series_8 series_9 series_10 series_11 series_12 series_13 series_14 series_15
    series_16 series_17 series_18 series_19 series_20 series_21 series_22 series_23 series_24 series_25
    series_26 series_27 series_28 series_29 series_30 series_31 series_32 series_33 series_34 series_35
    series_36 series_37 series_38 series_39 series_40 series_41 series_42 series_43 series_44 series_45
    series_46 series_47 series_48 series_49 series_50");
n=nImages;
for(a=0; a<n; a++) {
//showMessage(list[a]);
//for (i=1; i<n ; i++) {
    b=a+1;
    //showMessage(n);
//for (i=0; i<list.length; i++) {
    selectWindow(list[i]+" - Tile #" +b);
    //selectWindow("C_0703_ctxsp_comp24_tax25-dist_tuj.zvi - Tile #49");

    saveAs("Tiff", "C:/Users/Lab /Desktop/CtxSp-mosaic/Tile #" +a);    //Choisir le repertoire//
    close();
}
    run("Grid/Collection stitching", "type=[Grid: snake by rows] order=[Right & Down
    grid_size_x=2 grid_size_y=8 tile_overlap=5 first_file_index_i=0
    directory=[C:/Users/Lab_Nothias/Desktop/CtxSp-mosaic] file_names=[Tile #{}].tif
    output_textfile_name=TileConfiguration.txt fusion_method=[Linear Blending]
    regression_threshold=0.30 max/avg_displacement_threshold=2.50
    absolute_displacement_threshold=3.50 computation_parameters=[Save memory (but be slower)]
    image_output=[Fuse and display]");
//showMessage(path);
    saveAs("Tiff",path + list[i]);
// showMessage("message");
    if (isOpen("Log")) {
        selectWindow("Log");
        run("Close");
    }
    run("Close All");
}}
if (isOpen("Log")) {
    selectWindow("Log");
    run("Close");
}
//File.delete(folder2) ;
//waitForUser;
// Fermer les images ouvertes

```

Enregistrement des mitochondries en live

Le protocole détaillé et le matériel utilisé pour l'enregistrement en live des mitochondries est disponible dans la partie "Matériel & Méthodes" de l'article en résultat.

Enregistrement en direct

Pour l'approfondissement des résultats (voir section résultat), des enregistrements en live des axones corticaux, exprimant de la GFP en régénération dans le compartiment distal ont été réalisés sept heures après la lésion. Ces enregistrements ont été réalisés via un microscope confocal ZEISS LSM 980 inversé avec un module Airyscan 2, équipé d'une chambre pour le contrôle de la température à 37°C et du CO₂ à 5%. Les images ont été capturées avec un objectif 20X sec toutes les dix minutes pendant au moins quatre heures, et jusqu'à sept heures, et analysées à l'aide du logiciel ImageJ pour déterminer la vitesse de croissance.

Statistiques

L'ensemble des conditions et des tests statistiques utilisés dans l'analyse des données de ce travail est disponible dans la partie "Matériel & Méthodes" de l'article en résultat. Les résultats de ce manuscrit sont présentés en moyenne +/- SEM et chaque test est mentionné en légende.

| Résultats

I. Mise au point d'un système de lésion microfluidique

Les résultats principaux de ce travail sont présentés dans l'article en préparation de cette section résultats. Toutefois, ceux-ci ont été obtenus à la suite d'un travail préliminaire de développement, de mise au point et caractérisation à différents niveaux, et complétés par des résultats supplémentaires.

Pour satisfaire les besoins de notre étude et cibler les éléments permettant de répondre aux objectifs, il était primordial de réunir deux conditions. Tout d'abord, nous souhaitons obtenir un réseau de neurones orientés, connectés à un second type de neurones de façon unidirectionnelle. Le second objectif a été d'appliquer un trauma à ce réseau pouvant reproduire une lésion du système nerveux central

1- Lésion chimique

La microfluidique avec des microstructures telles que les microcanaux et leur conformation en arches développée au laboratoire, permet de répondre à notre première problématique.

Afin de modéliser un trauma, nous avons d'abord utilisé un modèle de lésion chimique sur des cultures de neurones corticaux en puce microfluidique. Ce modèle est déjà en place dans le laboratoire pour l'étude de la dégénérescence wallérienne et du rôle des mitochondries dans la vulnérabilité axonale (Deleglise et al., 2013; Lassus et al., 2016). Cela est réalisé par l'application d'un détergent, le Triton X-100 0.3% pendant 30 secondes dans le canal central donnant accès aux axones, ce qui induit une axotomie. Bien qu'elle soit correctement réalisée et observable au cours du temps (figure 32), de nombreux débris persistent, compliquant l'observation et les analyses futures de repousse axonale, au niveau du canal central ou dans la chambre distale.

Des tests ont alors été réalisés en utilisant des traitements enzymatiques via l'utilisation de trypsine ou de DNase. L'objectif étant d'induire l'hydrolyse de liaisons peptidiques pour décoller les débris du support et pouvoir les éliminer plus facilement. Cela n'a toutefois pas donné de résultats probants.

Face à ces résultats et considérant que les lésions chimiques ne reproduisent pas fidèlement les caractéristiques physiques d'une lésion traumatique, je me suis orienté vers l'utilisation d'un système de lésion physique par aspiration, couramment utilisé dans la littérature pour sa simplicité, son coût modéré et sa reproductibilité. Pour cela, via l'utilisation d'une pipette ou d'une pompe, le milieu de culture est aspiré, entraînant le matériel axonal qui sera finalement arraché (voir introduction figure 31). Dans cette condition, la problématique liée aux débris n'est pas retrouvée. Toutefois l'axotomie par aspiration ne semble pas adaptée à notre système ni à notre modèle. En effet, l'aspiration au niveau du canal central n'est pas envisageable compte tenu des dimensions de celui-ci, de l'ordre de 50 μm de large. Les forces ainsi appliquées pourraient ne pas être restreintes au canal central et se répercuteraient dans l'un ou l'autre des compartiments et pourraient affecter les somas des neurones corticaux relativement proches. Par ailleurs, le canal central dans notre système pourrait s'avérer trop étroit pour observer une réponse post-lésionnelle de type régénération. En parallèle, les lésions chimiques ou par aspiration au niveau de la chambre distale ne sont pas envisageables, puisque incompatibles avec notre objectif final de reproduire un réseau où des cellules sontensemencées dans les deux compartiments.

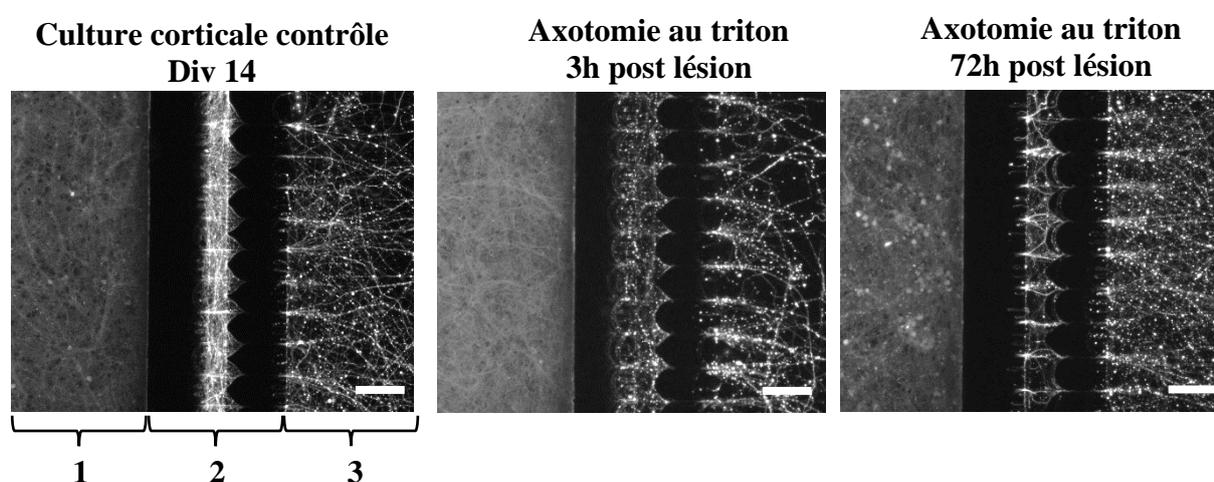


Figure 32 – Premier test de lésion chimique au triton. Immunomarkage B3-tubuline de culture de neurones corticaux d'embryons de souris E14 à Div14, en condition contrôle (gauche ; **1** : chambre proximale, **2** : microcanaux, canaux et canal central, **3** : chambre distale), 3h (milieu) ou 72h (droite) après l'application de triton 0.3% dans le canal central. À la suite de l'axotomie, de nombreux débris sont présents, ce qui rend difficile l'observation de la régénération à 72heures. De plus une dégénérescence wallérienne est observée dans le compartiment distal. Échelle 200 μm .

2- Lésion mécanique par étirement

J'ai alors étudié les systèmes de lésion mécanique déjà décrits dans la littérature. Le premier système correspondant à nos exigences semble être celui de Yap et al., 2014 (figure 33 A-B).

Dans ce système, la puce microfluidique n'est pas assemblée directement sur une lamelle de verre, mais sur un bloc de PDMS contenant un canal pneumatique creusé dans ce bloc à un positionnement précis et recouvert d'une membrane de PDMS de quelques microns d'épaisseur (15 à 60 μm). Les neurones sont alorsensemencés sur cette membrane de PDMS. Ici, la lésion est appliquée par étirement de cisaillement. La contrainte de cisaillement est définie comme la contrainte créée lorsqu'une force tangentielle agit sur une surface (Lewis, 1996). Dans le contexte de la biologie et de la microfluidique, cela se réfère à la force de friction d'un flux de fluide biologique agissant sur des cellules ou des tissus.

Au moment de la lésion, un tuyau est inséré dans le canal pneumatique et permet d'augmenter la pression dans ce canal, ce qui produit une déformation par gonflement de la membrane qui le recouvre (figure 33A). Les neurones poussant sur cette membrane sont alors étirés, induisant un fractionnement axonal. Yap a expérimenté et caractérisé différentes épaisseurs de membrane et forces de pression pour appliquer des lésions de différentes intensités, « très légères / very mild » et « légères / mild ». Bien que ce système nécessite certains éléments techniques tels qu'un actionneur et un contrôleur pour la gestion des vannes et de la pression, il était adaptable aux équipements disponibles au laboratoire. J'ai donc entrepris de reproduire ce système.

Trois éléments sont nécessaires : une puce microfluidique, une membrane idéalement de 30 μm d'épaisseur, et un bloc de PDMS comprenant un canal pneumatique. La réalisation de la puce était déjà maîtrisée dans l'équipe. Pour créer un canal pneumatique, j'ai découpé des morceaux de scotch de la largeur souhaitée (c'est-à-dire inférieure à la largeur d'une chambre microfluidique, pour créer une déformation locale), que j'ai disposés au fond d'une boîte de Pétri de 60 mm, servant alors de moule. Le scotch ayant une épaisseur d'environ 200 μm , il est possible de superposer plusieurs couches pour augmenter la profondeur du canal, si besoin. Après avoir recouvert de PDMS et à la suite de la polymérisation, j'obtiens un bloc de PDMS dans lequel un canal à usage pneumatique est creusé (figure 33C).

Enfin, une des étapes délicates de ce système est la réalisation d'une membrane de PDMS suffisamment fine. D'après la littérature (Kim et al., 2019), il est possible de réaliser des

membranes sans matériel élaboré, en déposant quelques gouttes de PDMS sur de l'eau. Différents tests m'ont conduit à conserver un protocole de 13 gouttes via une pipette P1000 sur une quantité de 10 mL d'eau, à incuber 20 minutes à température ambiante pour permettre au PDMS de s'étaler sur toute la surface, avant polymérisation à 70°C pendant une heure. En théorie, il est ensuite aisé de manipuler les membranes. Toutefois, l'épaisseur n'est ni contrôlée ni reproductible, variant de 50 à 250 μm . De plus, les tests effectués avec une quantité réduite de PDMS produisent des membranes trop fines pour être manipulées.

L'utilisation d'un spin coater est plus adaptée pour réaliser des membranes de manière contrôlée et reproductible sur des disques de silicium. Après avoir identifié les paramètres optimaux, soit 500 μL de PDMS sur disque de silicium salinisé, à 2500 rpm pendant 35 s avec une accélération de 1000 rpm/s, nous obtenons les membranes souhaitées de 35 μm .

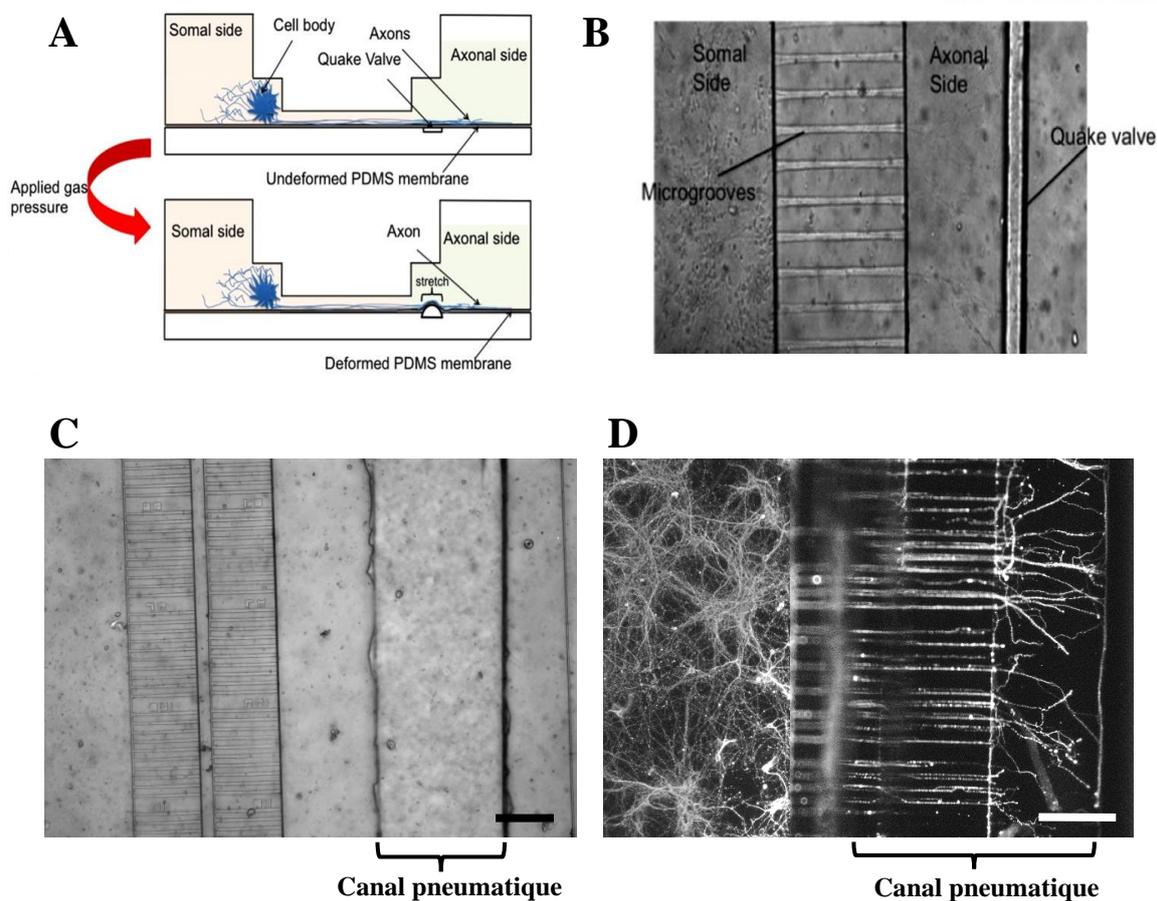


Figure 33 – *Système de lésion par déformation de membrane. (A-B) Système réalisé par Yap et al. : un canal pneumatique permet la déformation d'une membrane pour induire l'étirement des axones. (C) Image en microscopie par fond clair du système reproduit dans notre laboratoire. Le canal pneumatique est positionné dans la chambre distale comme le modèle original. (D) Immunomarquage B3-tubuline de culture de neurones corticaux 24 heures après lésion par*

étirement, réalisée à Div8. L'effet induit par l'étirement est difficilement observable, de plus les axones ne s'étendent pas au-delà de la limite de la membrane (D). Échelle 200 μ m.

Une fois les trois éléments produits, il est nécessaire de les assembler pour la mise en culture des cellules. Les propriétés du PDMS le rendent compatible avec l'adhésion sur lui-même, ce qui permet l'assemblage des différents éléments, tous produits en PDMS, mais nécessite un enchaînement précis.

Après nettoyage avec du scotch double face, diverses tentatives d'assemblage par traitement au plasma ont souvent conduit à l'écrasement ou au collapse des chambres et canaux microfluidiques, ou à un manque d'efficacité de liaison entre les composants. Toutefois, je suis finalement parvenu à la mise au point d'un protocole permettant d'obtenir un système complet et utilisable :

1. Un premier traitement au plasma à oxygène pendant deux minutes est réalisé pour l'assemblage de la puce sur la membrane.
2. Après ce cycle, l'ensemble est incubé à 70°C pendant cinq minutes (afin de renforcer les liaisons créées par le plasma et ainsi assurer l'assemblage des éléments et éviter toute fuite). Puis les réservoirs sont remplis avec de l'eau (pour éviter que la membrane ne colle à l'intérieur des puces en épousant les motifs microfluidiques, compte tenu de sa fine épaisseur et pour maintenir l'hydrophilicité).
3. Un second cycle de plasma est réalisé pour assembler l'ensemble puce + membrane avec le canal pneumatique. La difficulté principale est d'aligner le canal pneumatique dans la chambre microfluidique, à la sortie des micro-canaux dans le compartiment distal (figure 33C).
4. Enfin, l'ensemble peut être assemblé sur une lamelle de verre, pour permettre la manipulation du système ainsi que son observation en microscopie. Une fois le cycle terminé et avant l'assemblage sur la lamelle, il est nécessaire de percer l'extrémité du canal pneumatique pour y accéder.

Une fois le système stérilisé et recouvert de substrat — Poly-D-lysine et laminine — il peut être utilisé pour la culture des neurones. Nous avons d'abord procédé à un premier test de déformation de la membrane. Pour cela, des billes de polyester d'un diamètre de 10 μ m ont été introduites dans le compartiment distal. Une canule est insérée au niveau du canal pneumatique, connectée à une seringue positionnée sur un pousse-seringue. Cela permet d'introduire de l'air de manière contrôlée dans le canal pneumatique, et ainsi

d'augmenter la pression, sans induire de mouvement de la puce afin de l'observer simultanément au microscope. Il est alors possible d'observer en microscopie l'effet du mouvement de la membrane sur les fluides de la puce, entraînant le mouvement des billes de polyester.

Nous avons ensuite procédé à l'ensemencement de neurones corticaux de souris E14. Après huit jours de culture, nous avons déformé la membrane comme décrit précédemment. Après fixation et immunomarquage, plusieurs conclusions et problématiques se posent. Tout d'abord, le positionnement exact du canal pneumatique s'avère délicat voire aléatoire et peu reproductible, pouvant parfois déborder sur les microcanaux (figure 33D). Les différentes étapes d'assemblage ainsi que l'épaisseur de la puce peuvent facilement entraîner un collapse de la membrane dans la chambre distale, empêchant la pousse des axones (figure 33D). De plus, les différentes épaisseurs de PDMS rendent l'observation en microscopie difficile.

Enfin, un marquage B3-tubuline (figure 33D) suppose une fragmentation axonale toutefois difficilement observable. Il reste par ailleurs difficile d'attribuer ce résultat à un réel effet mécanique contrôlé du système ou à un effet non désiré et de ce fait non reproductible, lié aux paramètres variables du système.

Par ailleurs, il est à noter qu'à ce stade nous ne disposons pas d'un système précis de déformation de la membrane type « quake valve ». Bien que théoriquement adapté à notre objectif, l'assemblage et l'utilisation de ce système semble complexe et a donc été écarté. Il a donc été nécessaire de mettre au point un système de lésion mécanique plus fiable et reproductible.

3- Lésion mécanique par compression

Lors d'une réunion de laboratoire, des discussions sur les systèmes utilisés *in vivo* pour appliquer une lésion traumatique ont suscité une réflexion. À l'instar des modèles de lésion médullaire, lors desquelles, après laminectomie pour accéder au tissu nerveux, une compression est appliquée par un impact localisé et contrôlé, serait-il possible d'appliquer une déformation par compression localisée du système microfluidique pour produire un écrasement des neurones, comparable à un impact *in vivo* ?

Compte tenu de l'architecture d'un système microfluidique qui empêche l'accès direct aux cellules, il serait nécessaire de pouvoir déformer une zone précise de la puce sans affecter le reste du système. Il s'avère que des systèmes de compression existent dans la

littérature (Hosmane et al., 2011). Toutefois, ceux-ci incluent de nombreux aspects techniques et procédés d'assemblage complexes, notamment plusieurs canaux pneumatiques (voir introduction figure 31). Cela présente des défis similaires à ceux rencontrés lors de l'assemblage de la puce par déformation de membrane, et ce système a donc été rapidement écarté. Cependant, le concept de compression en lui-même a été approfondi.

Des discussions avec des collègues du laboratoire Physique des Matériaux et Milieux Hétérogène de l'ESPCI, ont conduit à l'hypothèse d'aimants positionnés avec précision pour permettre la déformation locale d'une portion de la puce en PDMS, sans provoquer une déformation complète. Le premier schéma de cette nouvelle puce est alors né (figure 34).

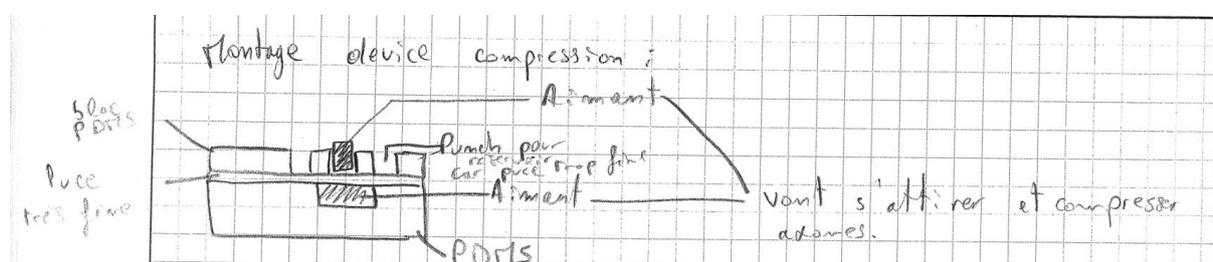


Figure 34 – Premier schéma du 18 janvier 2021 d'une puce microfluidique pour compression via des aimants. La puce réalisée est suffisamment fine pour être déformée par des aimants positionnés de part et d'autre.

Ce système repose sur l'existence d'une puce microfluidique beaucoup plus fine qu'à l'accoutumée. Cela afin d'être déformée comme une membrane, tout en conservant ses caractéristiques microfluidiques, à savoir des compartiments isolés fluidiquement par des microcanaux. Cela implique donc une épaisseur suffisante pour inclure ces motifs. Cependant, une telle épaisseur réduite ne serait pas compatible avec le maintien des cultures sur plusieurs jours, car les neurones ont besoin de nutriments apportés par le milieu de culture. Il est donc nécessaire d'avoir un volume suffisant de milieu pour assurer la viabilité des cellules.

La composition et l'assemblage de cette puce va donc impliquer deux parties : une puce de fine épaisseur, recouverte par-dessus d'un bloc de PDMS plus épais pour assurer un volume de milieu suffisant, avec un trou supplémentaire pour positionner un aimant sur la puce à déformer. Dans cette configuration, l'assemblage pour que l'emplacement des réservoirs du bloc de PDMS supérieur coïncide avec ceux de la puce est délicat. Par rapport au schéma initial, le bloc de PDMS inférieur contenant un aimant, celui-ci étant

incompatible avec l'observation au microscope, il a été abandonné. La puce est assemblée à une lamelle de verre servant de support pour les neurones (figure 35A).

D'un point de vue théorique, pour appliquer une lésion, il suffit de déposer des aimants de part et d'autre de l'emplacement de la lésion, soit dans les encoches prévues sur le bloc de PDMS supérieur, ainsi que sous la lamelle de verre. Une fois positionnés, les aimants s'attirent et écrasent la fine puce, déformant localement l'emplacement des aimants et causant un écrasement des cellules au niveau du compartiment distal (figure 35 B-E).

Les premiers essais de culture cellulaire dans ce système révèlent, après fixation et immunomarquage, que l'assemblage est réalisable et qu'une action mécanique induit effectivement une axotomie des axones (figure 36). Cependant, plusieurs difficultés et questions se posent :

- L'étape de positionnement du bloc de PDMS supérieur contenant l'encoche pour l'aimant est délicate et aléatoire ; ces deux éléments devant être parfaitement alignés.
- Lorsque la puce de fine épaisseur et le bloc de PDMS sont assemblés, les deux éléments doivent être parfaitement plats pour assurer leur liaison après traitement au plasma, sinon ils pourraient se détacher et des fuites du milieu de culture pourraient survenir.
- Enfin, aucune étape n'assure que l'épaisseur de la puce soit uniforme entre chaque système, compromettant ainsi la reproductibilité de la déformation et de la lésion.

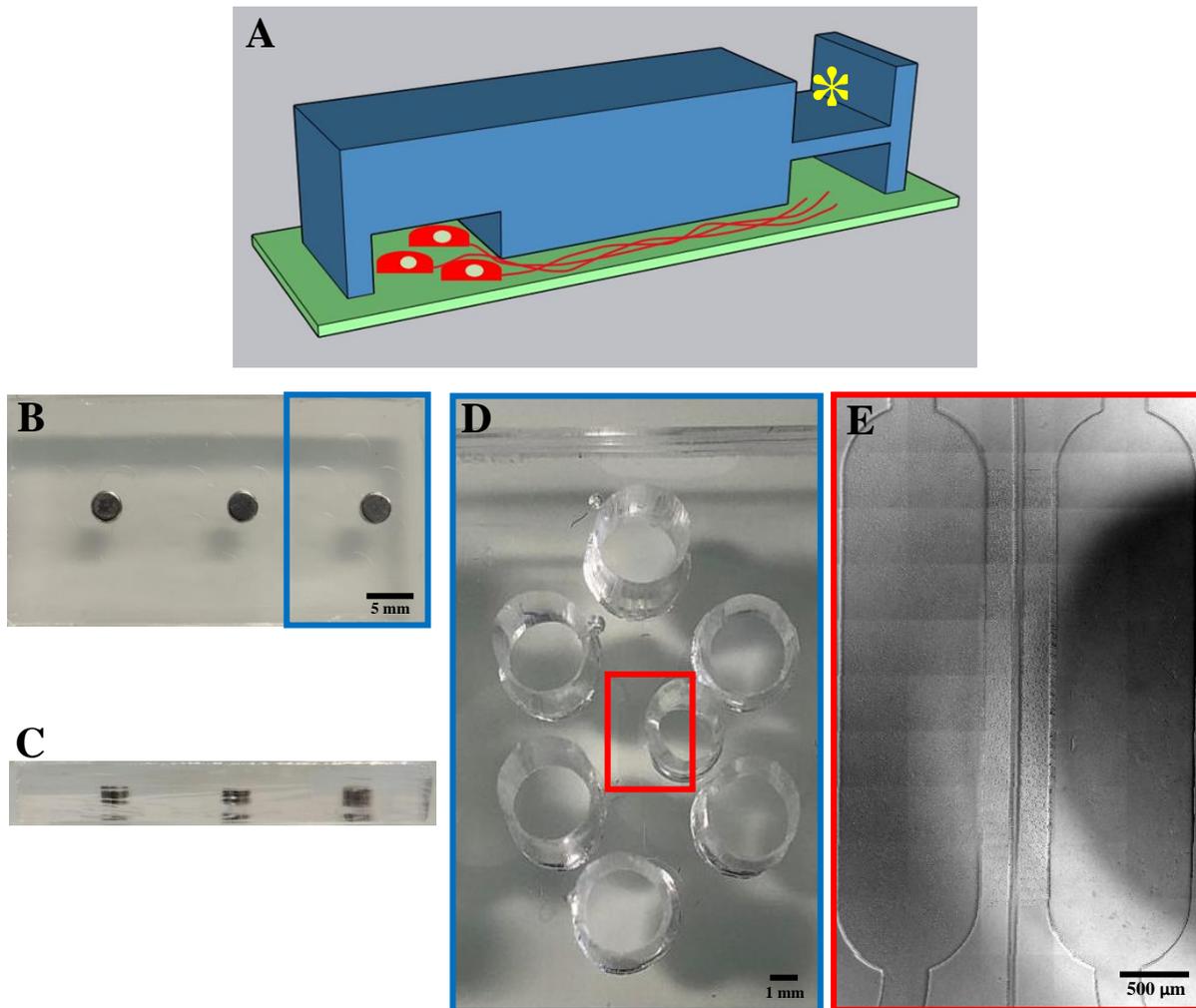


Figure 35 – Représentation schématique et photos d'une puce microfluidique pour compression. (A) Schéma de profil d'une puce microfluidique dans laquelle un punch supplémentaire est réalisé au niveau du compartiment distal pour introduire un aimant (étoile jaune). Des neurones (en rouge) sont ensemencés dans la chambre proximale et projettent leurs axones dans la chambre distale, où l'épaisseur est suffisamment fine pour être déformée par les aimants. Bleu= PDMS ; Vert= lamelle en verre. Photographie d'une puce vue de dessus (B) et de profil (C) contenant les aimants qui servent de moule pour l'emplacement de la lésion. Les aimants sont ensuite retirés et les réservoirs percés (D). On observe en microscopie par fond clair (E) l'emplacement de l'aimant localisé uniquement dans la chambre distale sans impacter les autres compartiments (zone sombre).

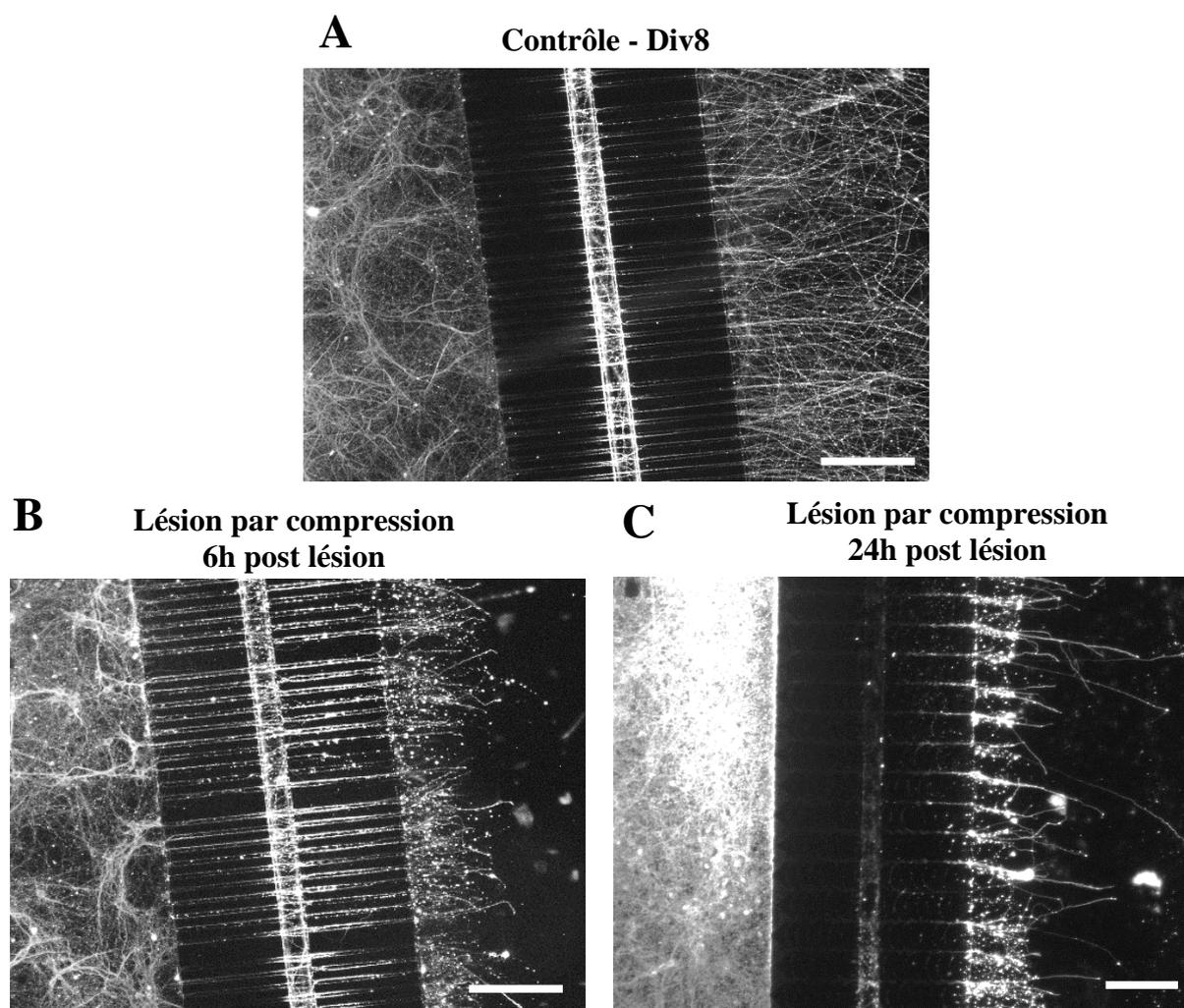


Figure 36 – Premier test de lésion par compression. Marquage B3-tubuline sur des cultures de neurones corticaux d'embryons de souris E14, contrôles à DIV8 (**A**), 6 heures post lésion (**B**) et 24 heures post lésion (**C**). Les premiers tests sont réalisés sur des puces avec des microcanaux droits (**B**) pour vérifier la faisabilité, avant que le système ne soit transposé à des canaux plus complexes en arches (**C**). Échelle 200 μ m.

Bien que ces résultats soient encore aléatoires, ils démontrent que l'action de compression par des aimants est techniquement réalisable, correspondant à nos objectifs, et que les problèmes rencontrés sont principalement liés à la conception. Pour les résoudre, plusieurs solutions ont été envisagées, notamment l'assemblage en un seul bloc de PDMS (figure 35A). Pour ce faire, une faible quantité de PDMS est versée dans un moule puis polymérisée pour produire une puce de faible épaisseur facilement déformable. Afin de mouler l'emplacement de l'aimant, la puce n'est pas démoulée et un aimant est ajouté à l'emplacement souhaité — à ce stade, il est possible d'observer les réseaux microfluidiques par transparence et de positionner l'aimant. Pour assurer un système reproductible, il est nécessaire que l'épaisseur déformable soit la même pour chaque système. Après différents tests, nous avons déterminé par rapport à nos moules, qui contiennent trois réseaux par puces, qu'une quantité de 0,6 g de PDMS produit une puce uniforme de 450 μm d'épaisseur, qui se déforme facilement lorsque des aimants sont appliqués. De plus, il a été déterminé que la première étape de polymérisation de cette couche doit être de 42 minutes. Cela permet une polymérisation suffisante pour que les aimants puissent être déposés dessus sans s'enfoncer ou traverser la puce, tout en conservant une viscosité suffisante pour maintenir les aimants des trois réseaux en place sans qu'ils ne bougent ou ne s'attirent entre eux (Figure 35B-C). Enfin, le moule en résine est complété avec du PDMS et remis au four à 70°C pour polymérisation. Une fois cette étape terminée, les aimants sont retirés (figure 35D).

Cependant, des questions demeurent sur la déformation locale réelle. Pour s'assurer que la déformation soit effectivement induite et qu'elle soit localisée précisément à l'endroit de l'aimant sans se généraliser à l'ensemble du système, une variable supplémentaire est ajoutée. L'aimant utilisé lors du moulage est de 3 mm de diamètre, tandis que celui utilisé lors de la lésion est de 2 mm. De cette manière, l'aimant positionné pour la lésion peut être introduit sans entraîner un enfoncement des parois. De plus, la différence de diamètre ne génère pas de variabilité significative dans la localisation de la lésion.

On obtient alors une puce d'un seul bloc de PDMS contenant une encoche où l'épaisseur de PDMS est réduite pour y introduire un aimant (figure 35). Lorsqu'un second aimant est positionné à l'opposé, cela induit la déformation de cette zone. Il est alors possible d'obtenir un système facile à réaliser de manière reproductible.

Toutefois le diamètre de l'aimant étant supérieur à la largeur de la chambre, l'aimant se positionne à la fois au-dessus de la chambre microfluidique et sur le bloc de PDMS en contact avec la lamelle de verre. Lors de la lésion, pour assurer le rapprochement des aimants et la déformation de la chambre, une légère pression est appliquée afin de permettre aux portions des aimants situées au niveau du compartiment distal de le

déformer par compression. Cela induit la mise en contact du toit supérieur de la chambre avec la lamelle de verre, provoquant ainsi une axotomie par compression.

Pour observer cette déformation, étant donné qu'il n'est pas possible d'observer directement le phénomène de déformation (les aimants rendent l'observation du site impossible une fois positionnés), deux tests ont été réalisés : un marquage de la laminine après compression et la diffusion d'une encre. Pour s'assurer que la compression entraîne une réelle modification mécanique à l'origine de l'axotomie, les compartiments sont recouverts de laminine, une lésion est ensuite appliquée, et la laminine est observée par immunomarquage.

Par rapport à un contrôle, dans lequel la laminine recouvre l'ensemble de la chambre de manière homogène, le compartiment lésé montre un marquage de laminine non-homogène, suggérant que cet emplacement a été écrasé par l'extrémité supérieure de la chambre sur la lamelle de verre (figure 37 A-B). Par ailleurs, de l'encre est introduite dans le compartiment distal — où se trouvent normalement les axones à léser — et l'aimant est introduit pour simuler la lésion, les autres compartiments étant remplis d'eau. Il est alors possible d'observer les micro-canaux, le canal central et le compartiment proximal. Nous avons observé que l'écrasement n'induit pas de diffusion de l'encre dans ces structures (figure 37C). En cas de compression trop forte, la diffusion de l'encre serait limitée au canal central et n'atteindrait pas les corps cellulaires du compartiment proximal.

En conclusion, nous avons mis au point une méthode de production et d'assemblage optimale pour un système microfluidique, ne nécessitant ni procédés complexes ni matériel spécifique pour la réalisation de lésions mécaniques localisées de manière reproductible et observable en microscopie. Cela permettra de répondre à nos questions biologiques dans un contexte post-lésionnel pertinent.

La réalisation et le développement de ces différents tests de lésion en système microfluidique — chimique, mécanique par étirement et par compression — ont fait l'objet d'une présentation de poster au congrès NeuroFrance 2021.

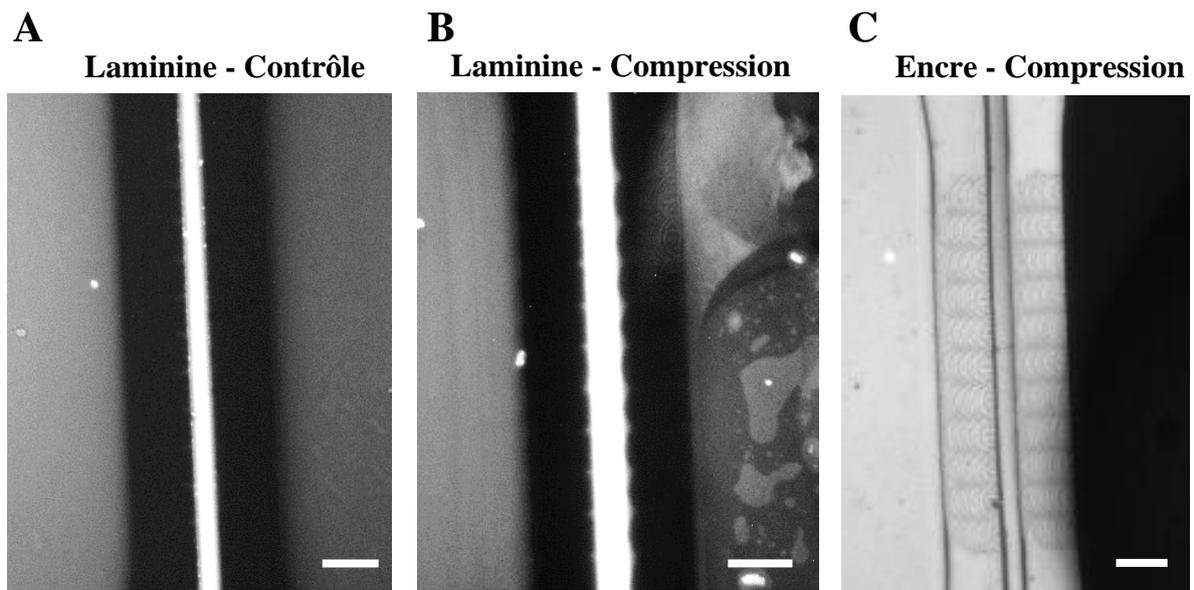


Figure 37 – Observation de la déformation induite par la compression. (A-B) Immunomarquage de la laminine avant (A) et après (B) compression dans la chambre distale. On observe qu'une action mécanique est visible dans le compartiment distal. Pour observer si la compression induit un flux rétrograde dans le compartiment proximal, de l'encre est introduite dans le compartiment distal et une lésion est appliquée (C). La compression (donc l'encre) ne se propage pas dans les autres compartiments de la puce. Échelle 200µm.

II. Effet de l'état de la tubuline sur la dynamique mitochondriale et la régénération axonale

1. Article en préparation

L'ensemble du travail de développement et d'optimisation réalisé jusqu'à présent a permis d'identifier les paramètres optimaux pour tester différentes molécules affectant les MT, soit directement, soit en agissant sur les modifications post-traductionnelles de la tubuline. L'objectif étant de mettre en évidence une interaction des MT avec la dynamique mitochondriale, et finalement un effet sur le devenir post-lésionnel et la régénération axonale. Les résultats sont présentés dans cet article en cours de préparation pour publication.

Ces résultats ont par ailleurs fait l'objet d'une présentation de poster au congrès de la FENS 2022, ainsi que celui de la Société des Neurosciences SfN 2023.

Effects of tubulin state and mitochondrial transport on axonal regeneration

Théo Andriot,¹ Elias Kanaïe-Atrian,¹ Chloé Dupuis,^{1,2} Teng Pan,³ Jean-Michel Peyrin,¹ Fatiha Nothias,¹ Sylvia Soares¹

Author affiliations:

¹ Institut de Biologie Paris Seine, Neurosciences Paris Seine, Inserm U1130, CNRS UMR8246, Sorbonne Université, Paris, France

² Laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes, CNRS UMR 7636, École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris, Paris Sciences et Lettres Université, Sorbonne Université, Université Paris 1, Paris, France

³ Institut de Biologie Paris Seine, Biological adaptation and ageing, Inserm U1164, CNRS UMR8256, Sorbonne Université, Paris, France

Correspondence to: Sylvia Soares

Full address : Institut de Biologie Paris Seine, Neurosciences Paris Seine, Inserm U1130, CNRS UMR8246, Sorbonne Université, 7 Quai St Bernard, 75005 Paris, France

E-mail : sylvia.soares@upmc.fr

Running title: MT-mitochondria role in regeneration

Keywords: oriented in vitro network; microfluidic chips; corticospinal axons; mechanical injury; Microtubule modification; Mitochondrial dynamic

Introduction

A lesion in the central nervous system (CNS) disrupt axons and lead to irreversible dysfunction. Axonal regeneration following injury remains a formidable challenge in neuroscience, necessitating a deeper understanding of cellular mechanisms that govern this intricate process. The ability of neurons to repair and restore axonal connections is crucial for functional recovery after spinal cord injuries (SCI) and other traumatic insults to the nervous system. It is now well accepted that neurons fail to regenerate their axons due to loss of neuron-intrinsic growth capacity and the presence of inhibitory molecules in the environment (Anderson et al., 2018; Sofroniew, 2018). Recent investigation has been made to achieve robust CNS axons regeneration for the development of effective therapeutic strategies, including genetic manipulation, cell-based therapies and wound healing matrices (Chedly et al., 2017; Liu et al., 2010; Schwab et al., 2006). However, the biological mechanisms of axonal regeneration are still not fully elucidated.

Among the various factors influencing axonal regeneration, mitochondrial function plays a pivotal role due to its energy-demanding nature (Conde and Cáceres, 2009). Dysregulation of mitochondrial dynamics, including disruptions in transport and morphology, has been implicated in compromised neuronal recovery post-injury (McEwen et al., 2011; Szelechowski et al., 2014). In parallel in the mature neuron, microtubule (MT) dynamics regulate key processes in the cytoarchitecture and regulation of the intracellular trafficking (Fletcher and Mullins, 2010). This dynamic is made possible by regulation of microtubule states and function, which are impacted by a variety of posttranslational modification (PTM) (Gadadhar et al., 2017; Magiera et al., 2018). Specifically, acetylation, is known to be associated with a more stable network found in old and long microtubule; while Tyrosination, is associated with unstable dynamic microtubules found in young and shorter microtubule (Hanson et al., 2018; Yuyu Song and Brady, 2015). In addition, the distribution of these modifications rely on the location within the cell and maturity. In mature neurons, acetylated tubulin is predominant in the axon, while tyrosinated tubulin is more important in the distal growth cone.

It has been reported that a traumatic injury lead to perturbation in the microtubule network. Following injury stabilize the network and the conversion in the distal axon of locally stable MT into more dynamic is important for the formation of an active growth cone and axon regeneration (Bradke et al., 2012; Hellal et al., 2011). These events require high energy

consumption which can be provided by mitochondria. Mitochondria are dynamic organelles whose traffic is especially important in neurons whose axons extend over considerable distance (Patrón and Zinsmaier, 2016; Zhou et al., 2016; Lin et Sheng, 2015). Nevertheless, in injured axons we found mitochondrial dysfunction with depolarized mitochondria that express docking protein (Chen and Sheng, 2013; Patrón and Zinsmaier, 2016). Mitochondria undergoes microtubule-based axonal transport, mediated by molecular motors such as dynein and kinesin (Melkov and Abdu, 2018; Smith and Gallo, 2018), the relationship between Microtubule and Mitochondria could be a key element in the axon fate after injury. But it is still unclear how microtubule states impact the mitochondrial functioning after injury. We hypothesized that targeting modifications of MT, would affect MT dynamic and mitochondrial transport to facilitate axonal regeneration.

Recent studies have underscored the critical interplay between microtubule dynamics and mitochondrial transport in axonal regeneration. Microtubules (MTs) serve as tracks for intracellular transport, and their stability is tightly regulated by post-translational modifications such as acetylation and tyrosination (Hammond et al., 2010; Rovini et al., 2011). Enhanced acetylation of MTs has been shown to facilitate the recruitment of molecular motors necessary for efficient mitochondrial trafficking along axons (Dompierre et al., 2007). Conversely, destabilization of MTs can impede organelle transport, thereby hindering neuronal repair processes (Cho et al., 2013). In this context, the use of pharmacological agents targeting MT dynamics and mitochondrial function has emerged as a promising therapeutic strategy for promoting axonal regeneration. Compounds like Paclitaxel and TSA (Trichostatin A) have been investigated for their ability to stabilize MTs and enhance mitochondrial motility, respectively (Bollag et al., 1995; Rivieccio et al., 2009). However, the precise mechanisms underlying their effects on neuronal recovery remain incompletely understood.

Spinal cord injury (SCI) resulting in the interruption of cortical axons connecting the spinal cord, the cortico-spinal tract is specifically affected and show poor regeneration capacity (Courtine and Sofroniew, 2019; Geoffroy et al., 2015). However, regeneration in CNS neurons has been mostly studied in axons of cultured neurons in condition that did not recapitulate physical properties of spinal cord injury and without considering neuronal networks. Assessing regeneration in equivalent conditions remains a challenging task, critical for the development of new therapeutics. In parallel, in vitro conventional model is not well suited and need spatial

organization, as it is not possible to decipher sub-cellular compartments. Therefore, there is a strong need to develop new model of CNS injury.

This paper aims to elucidate the intricate relationship between microtubule states, mitochondrial dynamics, and axonal regeneration. We present findings from in vitro studies using a novel microfluidic device to simulate mechanical axonal injuries and investigate the therapeutic potential of pharmacological interventions targeting MT acetylation and mitochondrial transport. By examining the effects of TSA, Tubacin, Paclitaxel, Epothilone, and Parthenolid on MT stability and mitochondrial transport in cortical-spinal neuronal network, we provide insights into their role in enhancing neuronal repair mechanisms. We report that although stabilize microtubules network did not correlates with changes in tubulin acetylation, and overstabilization tend to be neurotoxic. Increased acetylation correlates with increased stabilization, that is necessary in the axon shaft, but not in distal axons extremities, to stimulates mitochondrial transport and axonal regeneration.

Materials and method

Microfluidic device production

To fabricate the microfluidic chips, standard photolithography process was used, based on previous work (Lassus et al., 2018). Briefly, microfluidic silicon wafers were generated through the spin coating of photosensitive resist SU8-2002, then baked at 65 °C for 30 s and at 95 °C for 2 min, followed by exposure to UV light through a mask for photopolymerization of the resist. The resulting silicon wafers encode 3 microfluidic chips, each composed of two cell culture macro chambers, connected to an inlet and outlet reservoir. Silicon wafers (or epoxy replicated molds) were used to produce the cell culture PolyDiMethylSiloxane (PDMS, Sylgard 184) chips.

A mixture of PDMS elastomer and curing agent in a 10:1 ratio were degassed under vacuum to remove air bubbles. To create a PDMS layer with a thickness of 450µm, a portion of the resulting preparation was poured onto the polyester resin replicate and reticulated at 70 °C for 42 minutes, followed by the placement of a N42 neodymium magnet with a 3 mm diameter above the distal chamber. The resin replicate was then filled with the remaining PDMS preparation and reticulated for 2 hours at 70°C. The elastomeric polymer print was then detached and the magnet removed with a biopsy punch of 3 mm, as along with the 2 reservoirs of 4 mm diameter for each macro-channel. The resulting PDMS device was then cleaned with adhesive tape, as a glass coverslip of 60 mm diameter with isopropanol. Both device and coverslip were treated in an air plasma generator for 4 minutes (97% power, 300 mTor, 0.6mBar in O₂, Diener Electronic), before bonding. To irreversibly seal the device, the chips were incubated at 70°C for 5 minutes, and hydrophilicity of the glass and the PDMS was maintained by adding distilled water to the reservoirs. Assembled chips were then sterilized under UV light for 30 minutes and coated with poly D-lysine (10 µg/ml, Sigma P7280) overnight. Devices were washed with PBS 1X (Life Technology), before coating with laminin (2.5-5µg/mL, Sigma L2020) for 2 hours and washed again with PBS 1X (Life Technology). The devices were then filled with Neurobasal medium (Life Technology) before cell seeding.

Primary neuronal cultures

All experiments using mice were performed in accordance to the French and European Community Council Directive of September 22 (2010/63/UE). Pregnant Swiss females (Janvier

lab, France) were euthanized after sedation with isoflurane and decerebration. Cortices and spinal cord were micro-dissected from E14 embryos in cold HBSS (Life Technologies). Cortical cultures were performed as described by Deleglise et al., 2013, and spinal cultures following the procedures described in Beaudet et al., 2015. Briefly, dissected structures were digested with papain (>3U/mg, Sigma 76220) in DMEM, then incubated in FBS to inactivate papain (100U/mL, heath inactivated, GE Healthcare). Structures were mechanically dissociated with a glass pipette in medium containing-DNAse type IV (20 U/mL, Sigma D5025). Motoneurons were enriched using 12,4% Optiprep gradient density (60% iodixanol, Sigma D1556) diluted in tricine buffer and centrifuge at 2600 rpm for 20 minutes. After several rinses in DMEM-Glutamax medium (Life Technology) for cortical cells and L15 medium (Life Technology) for spinal cord cells, the cells were resuspended in DMEM. Approximately 80 000 cortical cells were seeded in the somatic (proximal) compartment and 60 000 spinal cells in the distal compartment, then incubated for 15 minutes at 37°C to allow adhesion. The cell culture medium was then added equally to the six reservoirs.

Cortical medium was composed of Neurobasal (Life Technology) supplemented with 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technology), 1% L-Glutamine (Life Technology), 2% B27 (Gibco) and 10% FBS (Life Technology). Spinal medium was composed of a mix of 50% DH complete medium (DMEM glutamax 1% Penicillin/Streptomycin - F12 Hams, 3 : 1 ratio) and 50% Neurobasal (Life Technology), supplemented with 2% B27, 10% FBS, GDNF (10ng/mL, Sigma G1777), BDNF (10ng/mL, Sigma SRP3014), CNTF (25ng/mL, Sigma C3710), NT3 (10ng/mL, Sigma SRP3128), Insulin (2,5µg/mL, Sigma 91077C) and hydrocortisone (0,2µg/mL, Sigma H6909). After 3 days in vitro (DIV), medium was replaced without FBS. The spinal medium was then changed every 3 days and cultures were kept for 9 DIV, at 37°C and 5% CO₂, before the compression injury.

To discriminate cortical axons from spinal neurites in the spinal compartment, AAV10 infection was performed at DIV 3 in the cortical compartment to express GFP protein under the actin promoter (pssAAV-CBA-GFP-WPRE; 10⁹ viral genomes / 80.000 cells). At DIV 6, medium containing the virus was removed and fresh medium was added.

Mechanical injury and pharmacological treatment

To perform an injury on the spinal compartment, a 0.11kg pull neodymium N42 magnet of 2 mm diameter and 1 mm thickness was placed at DIV9 in the hole above the distal chamber, with an identical magnet positioned below the glass coverslip. A slight pressure was applied to

ensure chamber deformation. After 30 seconds, magnets were removed, the distal compartment was washed once in PBS1X (Life Technology), and replaced with Neurobasal-B27 without trophic factors, with or without the following drugs : Paclitaxel 2.5nM or 25nM (Sigma T1912), Epothilone D 100nM, 10nM or 0.1nM (MedChemExpress KOS862), Nocodazole 300nM, Tubacin 10 μ M or 50 μ M (Sigma SML0065), Trichostatin A 50nM or 300nM (Sigma T8552), Parthenolid 5nM (Sigma P0667). We also assess the effect of Nocodazole 300nM (Sigma M1404), applied 30 minutes before fixation. For some experiments, drugs were added in the proximal/cortical compartment in Neurobasal-B27 medium. Treatments remained until the fixation.

Non-ratiometric calcium analysis

After 9 DIV, cortical and spinal chambers were rinsed once with loading buffer (NaCl 116mM, KCl 5.4mM, MgCl₂ 0.8mM, CaCl₂ 1.8 mM, HCO₃ 25mM, NH₂PO₄ 1.3mM, Glucose 5.5mM, Hepes 12mM, Glycine 0.01mM in sterile water), and then incubated with loading buffer containing 2 μ M fluo4AM calcium probe (Invitrogen) and 20 μ M Pluronic acid for 25 min at 37°C. To perform the calcium imaging, cells were then incubated with BrainPhys Imaging Optimized medium (Stemcell technologies) without red phenol and recorded at room temperature using Zeiss 200M inverted microscope with Hamamatsu orca fusion camera. 600 frames per culture were acquired every 250 milliseconds. Calcium traces analysis of each compartment independently was performed using CALIMA software. The oscillation of the corrected fluorescent intensity of individual cells, $\Delta F/F_0$, was averaged and plotted using MatLab. The number of peak activity was considered for calculation of the frequency activity. In some experiments, 50 μ M bicuculine (Tocris) + 2.5mM 4AP (Tocris) were added during the acquisition in the cortical compartment.

Mitochondria Live imaging

Mitochondria were analyzed with the MitoTracker orange CMTMRos (100nM, Thermofisher M7510), in Neurobasal-B27 medium. The dye was incubated in the distal chamber for 30 minutes at 37°C, in cultures with cortical-expressing GFP neurons. The medium of the entire chip was then renewed with Neurobasal red phenol free B27 and HEPES (0.01M, Gibco). Before live imaging, a snapshot of the GFP-labelled cortical axons was taken to further correlated with the mitochondria location.

Time-lapse movies were acquired using a confocal ZEISS LSM 980 inverted microscope with Airyscan 2 module, equipped with a temperature and gas-controlled chamber at 37°C, 5% CO₂, and a 63X oil-objective. Images were captured every 3 seconds over 2 minutes. Kymograph-based motility analysis was performed with ImageJ plugin KymoAnalyzer V1.01, as previously described (Neumann et al. 2017), after image deconvolution.

Immunocytochemistry, image acquisition and quantification

At Div 9 for controls and selected time post-injury (Div 9 + 24h, 48h and 96h), neurons were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) with 4% sucrose for 10 minutes at room temperature by removing the medium and adding the fixing solution in each microfluidic chambers inlets. Cells were then washed twice with PBS for 5 min and permeabilized for 30 min with 0.2% Triton X-100- 1% BSA-PBS. Primary antibodies were then added and incubated at 4°C overnight in BSA10%-PBS. The following primary antibodies were used: b3-tubulin (Tuj1 1/1000, Covance MMS-435P) ; MAP-2 (1/500, Sigma M9942) ; GFAP (1/2000, Agilent Z0334) ; Synaptophysin (1/200, Sigma S5768) ; VGLUT2 (1/500, Synaptic system 135404) ; PSD95 (1/1000, Abcam ab2723) ; GAD67 (1/1000, Millipore MAB5406) ; CTIP2 (1/500, Abcam ab18465) ; ChAT (1/200, Chemicon AB144P) ; Acetylated Tubulin (1/2000, Sigma 6793) ; Tyrosinated Tubulin (1/2000, Sigma 9028) ; Alpha-Tubulin (1/2000, Sigma T6074) ; TOM20 (1/500, Proteintech 11802-1-AP) ; GFP (1/1000, Abcam ab13970) ; Mitofusin 1+2 (1/1000, Abcam 57602) ; Drp1 (1/1000, Sigma) ; H3K27 (1/500, Invitrogen MA5-24671) ; Doublecortin (DCX 1/1500, Milipore Ab2253) ; Nestin (1/500, Sigma N5413). After two rinses with PBS for 5 minutes, neurons were incubated with the corresponding secondary antibodies (AlexaFluor 488, 555 or 647 at 1/1000, Invitrogen) and DAPI (0.5µg/mL, Euromedex 1050) for 2 hours at room temperature in 10% BSA-PBS. The microfluidic chips were then rinsed once and maintained with PBS at 4°C.

Mosaic images were acquired with a ZEISS Axiovert 200M inverted microscope with AxioCam Mrm, followed by stitching processing with ImageJ. For pre-/post- synaptic vesicles and mitochondrial elements (mitofusin, Drp and TOM20) localized on GFP-positive axons, images were acquired in the distal compartment with a confocal ZEISS LSM 980 inverted microscope and a Airyscan 2 module, controlled with Zen 3.3 software. At least 3 individual experiments were performed for each quantification, with ImageJ software.

To quantify axon regeneration, the injury area was delineated after the injury (note that this area remained constant along time post-injury). After thresholding, the number of b3-tubulin pixels

was quantified and normalized to the number of β -tubulin pixels on same area in the control chip and expressed as a percentage of regrowth area.

To quantify tubulin posttranslational modifications, at least 3 individual regenerating axons (100 μ m long) per experiment were imaged. After the background subtraction, the integrated density of acetylated or tyrosinated tubulin was ratioed against the alpha-tubulin.

Quantification of Mfn1/2 and Drp1 number on GFP-positive regenerating axons was performed after deconvolution and thresholding, followed by an automatic analyzed particles plugging under ImageJ. Using the same procedure, we also quantify the mitochondrial viability via the number of active mitochondria (labelled with the mitochondrial probe CMTMRos) among the total number of mitochondria TOM20 positive.

Statistical analysis

Statistics were conducted using GraphPad Prism 9, with a probability of type I error (α) = 0.05. Results are presented as mean +/- standard error of the mean. Each test is mentioned in the legend.

Data Availability statement

All information necessary to evaluate the findings of the paper are included in the manuscript. Additional relevant data can be provided from the authors upon reasonable request.

Results

***In vitro* reconstruction and characterization of a mouse cortico-spinal network on a microfluidic device**

We have reconstructed *in vitro* a cortico-spinal network from E14 mouse fetuses in a PDMS multi-dimensional microfluidic culture platform (**Fig. 1**). Cortical and spinal neurons were seeded on the proximal and distal compartment, respectively. Cortical neurons extend their axons through microgrooves, whose entrance is facilitated by the large openings, fasciculate and grow in bundles, guided by the channel's walls. After 8 days *in vitro*, the distal/spinal compartment is massively invaded by cortical axons, where they de-fasciculate and branch. Our design is a fully oriented device, as previously demonstrated (Courte et al, 2023), since no spinal axons are able to reach the cortical/proximal chamber. Characterization of our network is performed at DIV 9. Neuronal soma are well compartmentalized in their respective chamber, as revealed with MAP2 immunostaining (**Fig. 1A**), while only axons (tuj1-positive) are able to grow through the grooves and reach the distal/spinal compartment (**Fig. 1A, 2B**). GFAP-positive astrocytes are also observed in both compartments (**Fig. 1A**), but no microglial cells are detected (data not shown). Characterization of the neuronal population reveals that 20% of cortical cells are CTIP2 positive neurons, a marker of cortical layer 5 pyramidal neurons (forming the cortico-spinal tract *in vivo*) and 46 % of spinal cells are ChAT positive neurons, a specific marker for spinal motor neurons (**Fig. 1B-C**). GAD67-positive (GABAergic) and Vglut2-positive (Glutamatergic) neurons are detected in both compartment : among cortical neurons, the distribution of both population is 15% and 45%, and similarly among spinal neurons, this distribution is 18% and 35%, respectively (**Fig. 1C**).

To attest the cortico-spinal connectivity within in the spinal/distal compartment, indicative of a network maturity, we performed a double immunofluorescence of synaptophysin (presynaptic marker) and PSD 95 (post-synaptic resident protein), together with a GFP labelling of cortical axons. Cortical neurons were transduced in the proximal compartment at DIV3, with an AAV10 expressing GFP (**Fig. S1A**). Confocal analysis clearly shows a PSD95 punctate juxtaposition on synaptophysin-GFP positive neurons (**Fig. 1D**). To further confirm cortico-spinal connectivity, we also performed a non-ratiometric calcium imaging with fluo-4AM probe. We have previously reported that cortical neurons progressively show spontaneous slow calcium

oscillation, reminiscent of intrinsic cortical connectivity. In contrast, when connected, fibers acquire spontaneous slow calcium oscillation in synchrony (Peyrin et al., 2011). We thus carried out calcium analysis at 9 DIV. When co-cultured, activity between cortical and spinal neurons is synchronized and rhythmic, with a frequency of 0.05Hz (**Fig. 1E-F**), whereas no spontaneous oscillation of spinal neurons is observed when cortical innervation is not provided (data not shown). The connection was further evidenced by stimulating cortical/proximal compartment with bicuculline, leading to accelerated spinal rhythmicity, and reaching a frequency of 0.10Hz (**Fig. 1E-F**). Thus, the calcium oscillation in the cortical population is transferred to the spinal population, confirming that our cortico-spinal network is connected and mature by 9 DIV.

Traumatic injury *in vitro* in a microfluidic device to study axonal regeneration

In order to study axonal regeneration following a traumatic injury *in vitro*, we have adapted our previously developed multi-dimensional microfluidic device, with a PDMS reduction of the thickness at the injury location to 450 μ m, in the distal compartment. This adaptation allows a mechanical and localized compressive injury with two neodymium magnets of 0,11kg pull, placed on both side (top and bottom) of the chips (**Fig. 2A**). Attraction of the magnets leads to a compression of the PDMS bellow and thus a crush of the underlying cells. The central channel is used to buffer the medium's retrograde flux induced by the deformation of the device, restraining the injury in one compartment with no impact on the other. To mimic mechanical trauma of a spinal cord, the injury is performed on the distal/spinal compartment beyond the micro-channels, thus on cortical axons connecting spinal cells (**Fig. 2B**). The compression leads to a total and reproducible injury of one-quarter of total surface in the distal/spinal compartment (0.8mm²), and remains invariant at all time post-injury analyzed. Immediately after the injury, the lesion site is completely devoid of axons and the border is delimited by debris (**Fig. 2C**). 24 hours after the injury, beta3-tubulin positive axons regenerate into the lesion site, occupying an average of 10% of the area, and reaching 61% at 96h post-injury (**Fig. 2C, D**). Regenerative axons originate from the cortical (distal) and spinal (local) compartment. Thus, our model enables us to study post-traumatic regeneration.

Interestingly, some spares cells are detected in the injury site immediately after the lesion (**Fig. S2A**). At 24h post-injury, half of them acquire a MAP2 neuronal identity and there number increase with time. At 96h, they maintain an immature state as they also express the

intermediate filament Nestin and the microtubule-associated protein Doublecortin (**Fig. S2C**), a marker of migratory neuroblast. Thus, our system maintains a certain degree of immaturity, since new neuroblasts are able to migrate into the injury.

Network connectivity analysis show an impairment at all time post-injury analyzed (**Fig. 3**). Immediately after the injury, cortical and spinal cells are desynchronized, with no rhythmic activity (not shown). From 24 hours post-lesion, cortical compartment regains a rhythmicity but unstable, with increasing frequency that appears significantly higher at 96h post-injury (0.08Hz) (**Fig. 3B**). The spinal compartment shows unstable rhythmicity, and remains completely desynchronized from cortical projections at all time points (**video supp**). However, our analysis does not allow us to determine if a change in rhythmicity concerns spared neurons or those who have regenerate. Nevertheless, the massive axonal regeneration observed 96h post-injury (**Fig. 2C, D**) is not correlated with a restored connectivity.

We wanted to better decipher early mechanisms involved of axonal initiation of regeneration, within the first 24 hours. Therefore, we have analyzed the motility of healthy mitochondria. In intact axons, 80% of total mitochondria are healthy (not shown), of which 58% are motile (**Fig. 4B**). For these motile mitochondria, 37% move anterogradely and 21% retrogradely (**Fig. 4C**). Three hours after the injury, only 27% of mitochondria are still motile (not shown). Twenty-four hours post-injury, 62% mitochondria are still healthy (not shown) and 44% of them are motile (**Fig. 4B**), which is statistically decreased from control/not injured axons. No statistical differences in the directionality is observed when compared to control/intact axons (**Fig. 4C**). Interestingly, using specific markers of mitochondria fusion (mitofusin) and fission (Drp), we demonstrate a reversed phenomenon : in control/intact cortical axons, mitochondria show more fusion than fission and at 24h post-lesion, this ratio reverses.

Pharmacological modulation of microtubules on their stability, axonal regeneration and mitochondrial dynamics after injury

According to the literature, microtubules are key players in post-injury axon fate. Thus, using a pharmacological approach, we wanted to determine how microtubules stability can influence axon regeneration. Paclitaxel, a stabilizing agent that bind the beta-tubulin has been shown to promote axon extension at low dose (Liu et al., 2023). However, in our device, immediate application of 2.5nM of paclitaxel on the distal/spinal compartment has no effect on axonal

regeneration, 24 hours after the injury (**Fig. 5**). Moreover, with 25nM (Gornstein and Schwarz, 2017; Yang et al., 2009), axonal regeneration is completely abolished, as well as neuronal soma detection in the injury site (**Fig. S2B**). No effect is observed when the drug is applied in the proximal/cortical compartment (**Fig. S3A**). We also tested a less neurotoxic stabilizer drug, Epothilone D (Bollag et al., 1995). Although the precise mechanism is not known, Epothilone D prevents regenerating axons from nocodazole-depolymerizing effect (**Fig. 6**), confirming its capacity to stabilize microtubules. When Epothilone D is added at 0,1nM, 20% of the lesion site is filled with regenerative axons (**Fig. 5**), 24 hours after the injury, which is significantly increased from untreated (lesion) condition. As for paclitaxel, no effect on axonal regeneration is observed when the drug is added on the proximal/cortical compartment (**Fig. S3**). At higher doses as reported in (Mariana Brizuela et al., 2015), axonal regeneration is inhibited (**Fig. 5**).

Alpha-tubulin acetylation occurs on the MT polymer and it is commonly associated with stable MT. Inhibition of deacetylation with HDAC inhibitors is known to indirectly increase MT acetylation. When tubacin (a specific HDAC6 inhibitor) is added to the distal/spinal compartment, axon regeneration into the lesioned compartment is comparable to the untreated condition (**Fig. 5**), whereas TSA (trichostatin A, a non-specific inhibitor affecting class I/II of HDAC) significantly increases axonal regeneration (**Fig. 5**). Interestingly, application of TSA on the proximal compartment also increases axonal regeneration (**Fig. S3A**). Tubacin and TSA are able to increase global acetylated-tubulin in the lesion site (**Fig. 7A**), with no effect on the global level of tyrosinated-tubulin (**Fig. 7B**). By analyzing their distribution along the axons, from the border of the lesion toward the growth cone, we clearly show that tubacin increases tubulin acetylation on the distal part of the axon, i.e. the growth cone, while TSA increases tubulin acetylation levels along the axon shaft, but not in the growth cone (**Fig. 7CD**). Moreover, TSA is also able to prevent nocodazole-depolymerization (**Fig. 6**), but not tubacin (data not shown). Altogether, these data clearly demonstrate that axonal regeneration can be enhanced by stabilizing the axon shaft, with the growth cone devoided of acetylated-tubulin. We also tested parthenolid, a carboxypeptidase inhibitor known to inhibit tubulin deacetylation. Parthenolid addition in the distal compartment increases tubulin-tyrosination of the growth cone when compared to not-treated axons (**Fig 7E**), but its application doesn't modify the global tyrosinated-tubulin level in the injury site (**Fig. 7B**). Analysis of the global level of tubulin post-translational modifications with paclitaxel shows a significant reduction of tyrosination but no change in acetylation, while no effect of epothilone D is detected (**Fig 7AB**).

Cinetic analysis of the effect of TSA reveals a time-dependent increase in axonal regeneration, with the lesion site being filled to 76% with tuJ1-positive axons at 96h post injury, while only 51% in lesion only (**Fig. S3B**). Despite an increase and stabilization of cortical rhythmicity from 48h post lesion (**Fig. 3A, B**), TSA treatment do not lead to a connectivity restoration.

Interestingly, TSA also modify mitochondrial transport. When applied in the distal/spinal compartment, TSA leads to a reestablishment of mitochondria motility, 24 hours after the injury (**Fig. 4A, B**), while tubacin and epothilone D have no effect. Moreover, TSA also restores mitochondria fusion and fission (**Fig 4D**), as observed in control/not injured axons.

Figures

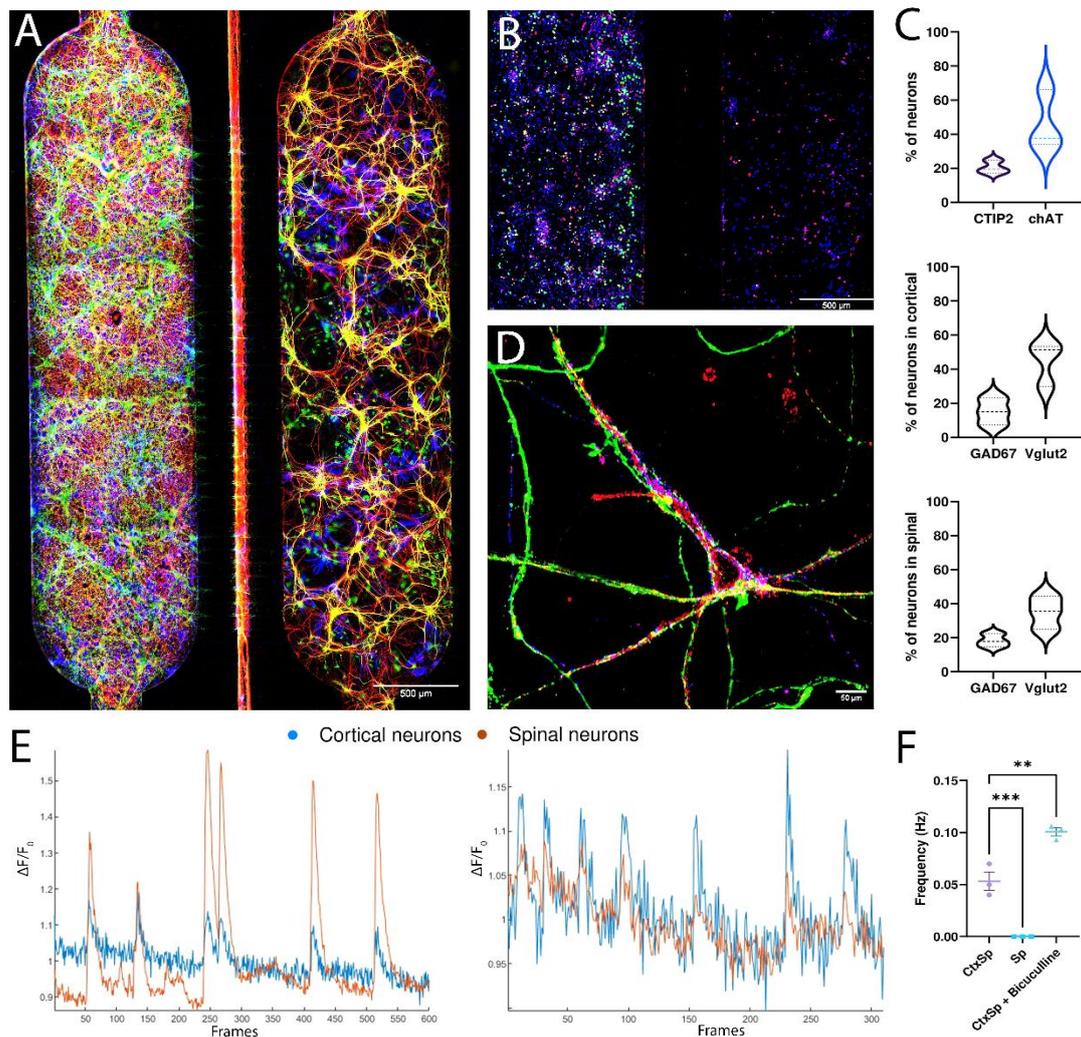


Figure 1. Establishment and characterization of an oriented and functional mouse cortico-spinal network on microfluidic device, at DIV9. (A) Triple immunofluorescence of a cortico-spinal network, on a microfluidic chip, for MAP2 (green), beta-III tubulin (red) and GFAP (blue), showing cortico-spinal axons seeded in the proximal chamber (left) crossing the central channel to reach the distal chamber (right) containing spinal neurons. (B) Double immunofluorescence of CTIP2 (layer 5 cortical neurons, green) and ChAT (acetylcholine transferase in spinal motor neuron, red), with DAPI staining (blue). (C) Quantification represented by a violin plot distribution of CTIP2 neurons (in the cortical compartment) and ChAT neurons (in the spinal compartment), as well as GAD67-positive and VGLUT2-positive neurons in the both compartments, reported on the total DAPI staining. (D) Confocal double immunofluorescence in the spinal compartment of synaptophysin (pre-synaptic, blue) and PSD95 (post-synaptic, red) staining on GFP-positive cortical axons, revealing synaptic contacts between cortical axons and spinal neurons. (E) **Left** : Representative calcium layouts of cortical neurons (blue) connected to spinal neurons (orange), after 9 days of culture, showing synchronous and rhythmic activity between neurons of the two compartments. **Right** : Effect of bicuculline treatment on cortical neurons on the rhythmic activity of both cortical and spinal neurons. (F) Quantification of the discharge frequency of spinal neurons in the presence (CtxSp) or absence (Sp) of cortical fibers and after bicuculline injection. Data are presented as mean \pm SEM. $n = 3$ individual experiments per group; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. One-way ANOVA analysis followed by the Dunnett post-hoc test.

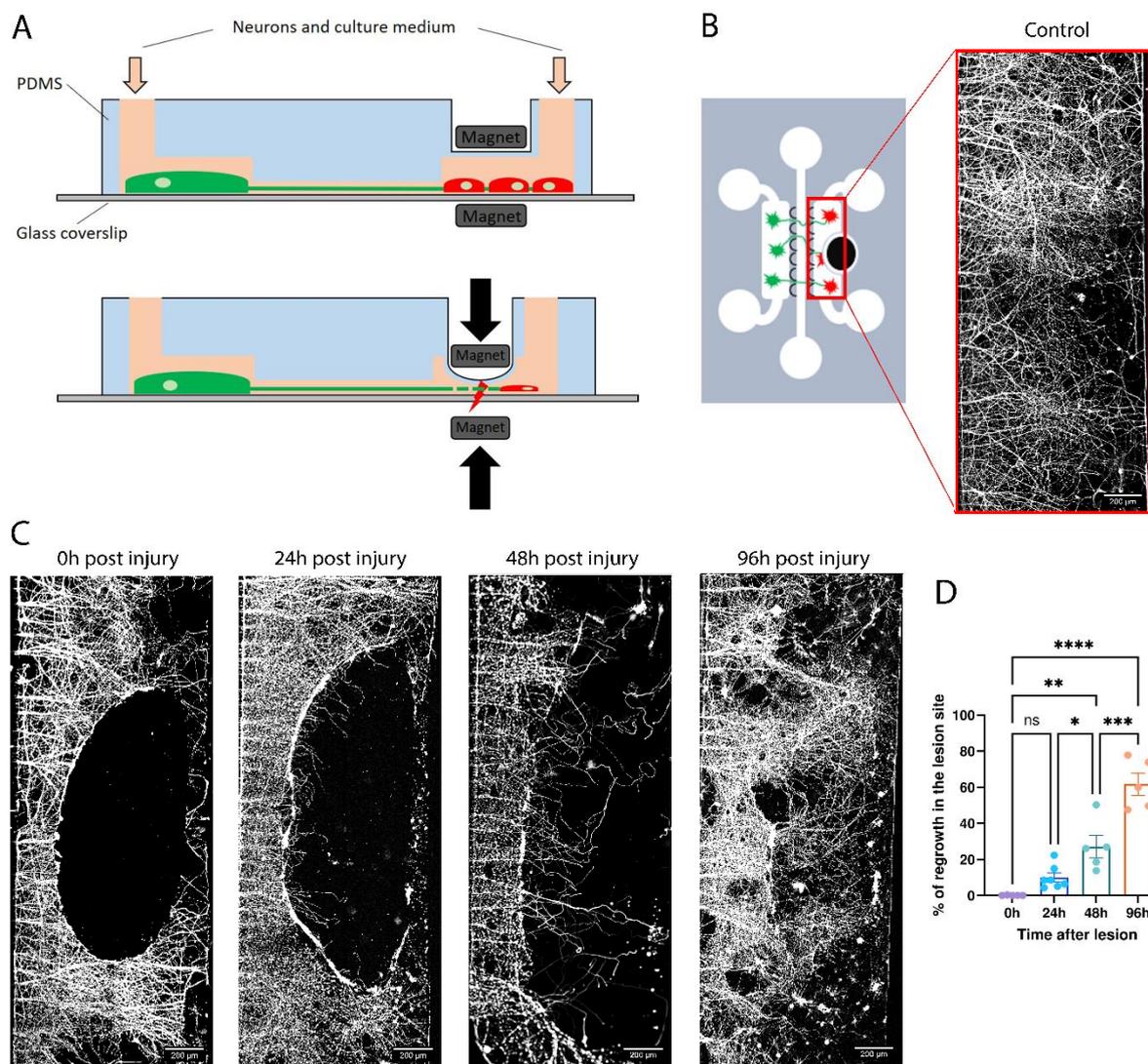


Figure 2. Development of a new microfluidic device for local mechanical injury by compression. (A) Cross-sectional schema of the microfluidic device. For the injury, two neodymium magnets are positioned above and below the distal chamber (right), which contains the axons of the cortical neurons seeded in the proximal chamber (left, green), as well as spinal neurons (red). The compression applied causes a distal compartment deformation, crushing the cells below. (B) Top schematic view of the microfluidic device, with cortical neurons (left, green) connecting to spinal neurons (right, red) in the distal compartment where the magnet is located (black hole). Red box: immunostaining of beta-III tubulin of cortico-spinal fibers in the distal compartment after 9DIV. (C) Time-course immunostaining and (D) quantification of beta-III tubulin staining at the lesion site immediately after compression (0h), at 24h, 48h, and 96h post-lesion. The compression results in the destruction of axons at the lesion site, delineated by debris. Beta-III tubulin positive axons progressively regenerate, filling the lesion site. Data are presented as mean \pm SEM. $n = 4-5$ individual experiments per group; *ns* = not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. One-way ANOVA analysis followed by the Tukey post-hoc test.

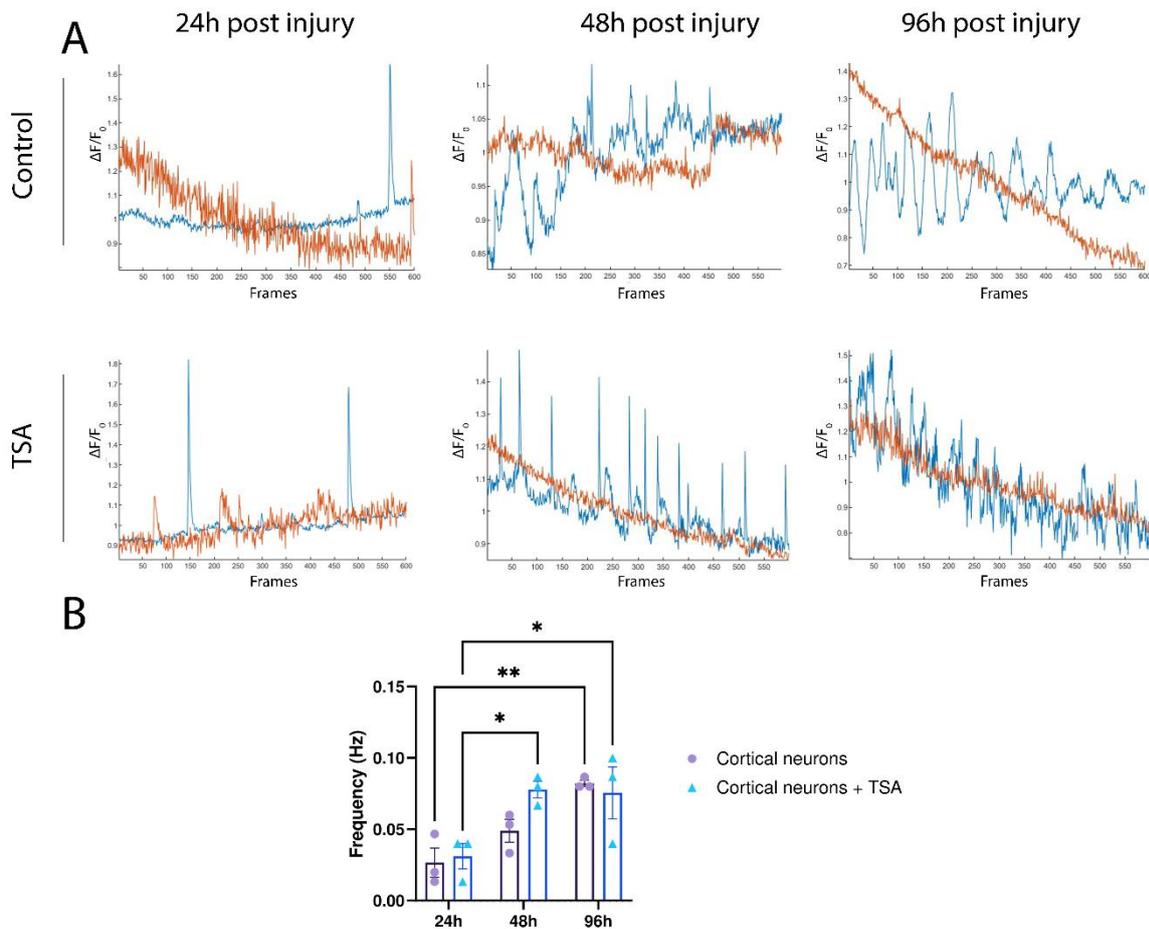


Figure 3. Calcium activity after compressive injury (A) Representative calcium traces analysis, marked by Fluo-4, in cortical (blue) and spinal (orange) neuronal populations at 24h, 48h, and 96h following injury. Without treatment (**top**) and with trichostatin A treatment (**bottom**). (B) Quantification of the discharge frequency of cortical neurons after injury, in treated or untreated conditions. The lesion leads to an interruption in synchronization between cortical and spinal neurons. Over time, cortical population develop random frequencies that increase post-lesion, without influencing spinal neurons which remain desynchronized. Trichostatin A causes a faster increase and stabilization of cortical frequencies, however, it does not restore connectivity. Data are presented as mean \pm SEM. $n = 3$ individual experiments per group; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Two-way ANOVA analysis followed by the Tukey post-hoc test.

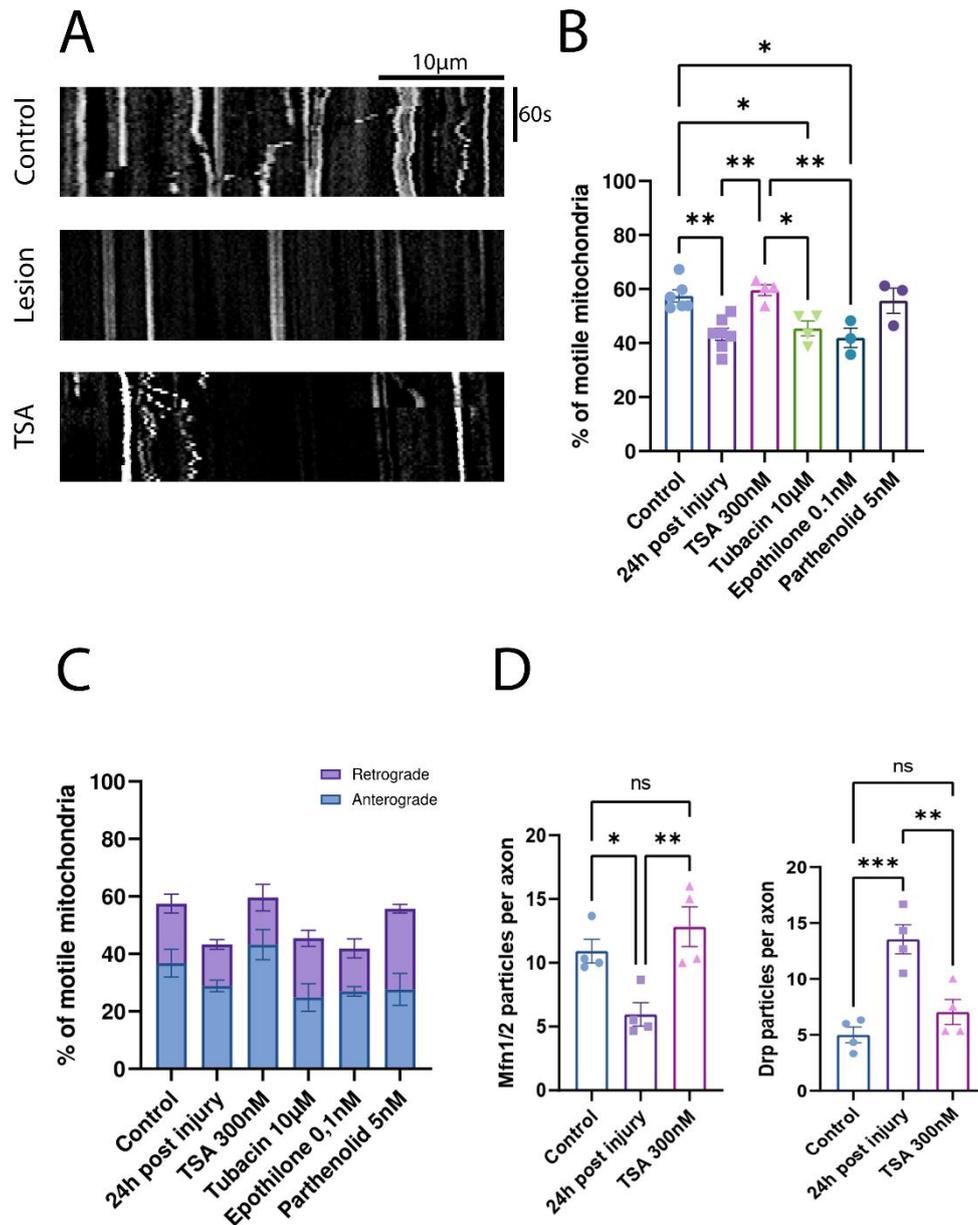


Figure 4. Mitochondrial transport after compressive injury. (A) Representative kymograph of mitochondria motility under control conditions, 24h after the lesion, and in TSA treated lesion, captured by live imaging. Consecutive line scans of the axon were arrayed top to bottom so that the y-axis of the kymograph represents the time and the x axis the position of the object studied. Stationary objects therefore appear as vertical lines and motile ones as diagonals. (B) Quantification of mitochondria motility related to total healthy mitochondria in control/non injured axons or in regenerating axons 24h after the injury, treated or not with TSA, tubacin, epothilone D, or parthenolid. Only TSA restores mitochondrial motility after the lesion. Note that parthenolid treatment effect on mitochondria motility is not statistically different from control and 24h post-injury-axons. (C) Directionality of motile mitochondria in different conditions, related to total healthy mitochondria. (D) Quantification of mitochondria fusion (Mfn1/2, left) and fission (Drp, right) along the axons, in the control/non injured axons, 24h after the injury treated or not with TSA. Note that in regenerating axons, the ratio fusion/fission is reversed compare to non-injured axons and TSA restores the ratio. Data are presented as mean \pm SEM. $n = 3-6$ individual experiments per group; *ns* = not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. One-way ANOVA analysis followed by the Tukey post-hoc test.

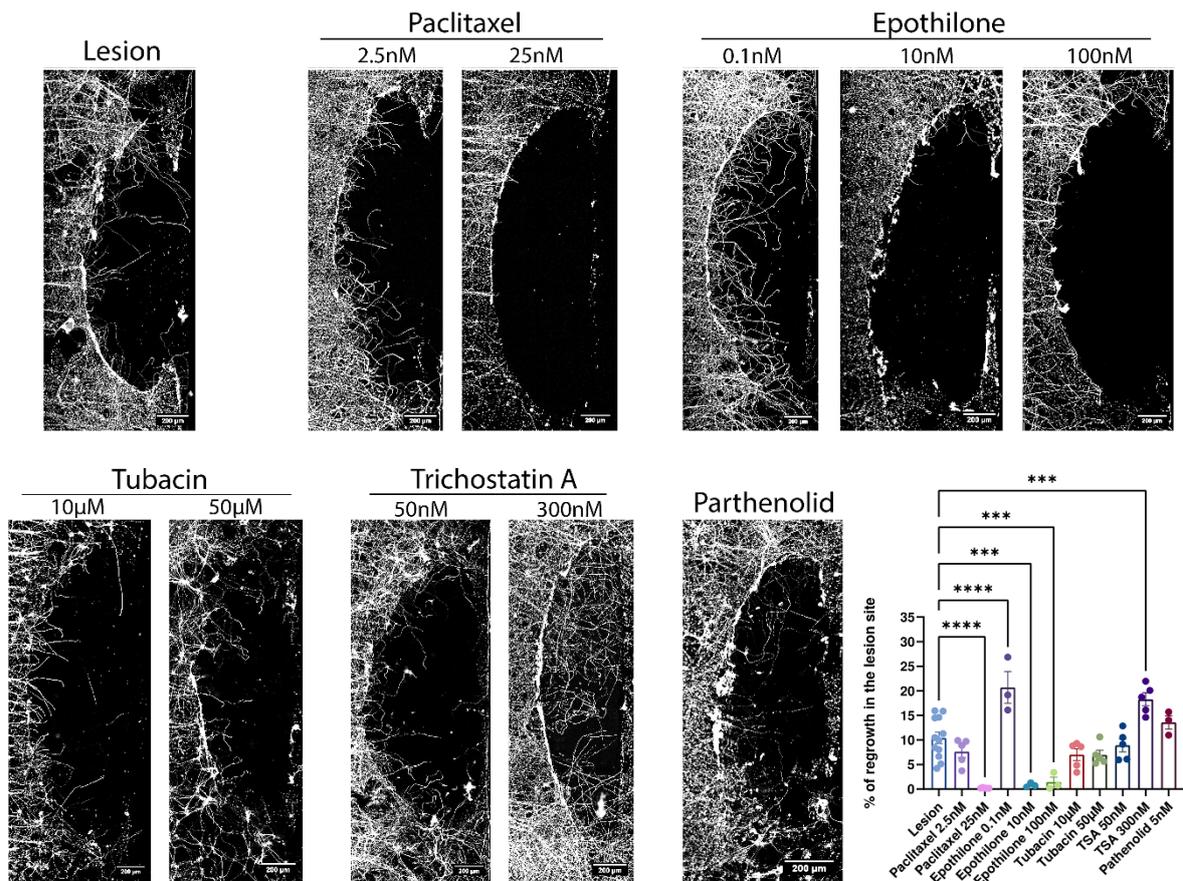


Figure 5. Microtubules targeting drugs effect on axonal regeneration. Immunostaining and quantification of beta-III tubulin at the lesion site, 24 hours after the compression, without treatment (lesion) and after adding paclitaxel, epothilone, tubacin, TSA, or parthenolid in the distal compartment. Data are presented as mean \pm SEM. $n = 3-11$ individual experiments per group; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. One-way ANOVA analysis followed by the Dunnett post-hoc test.

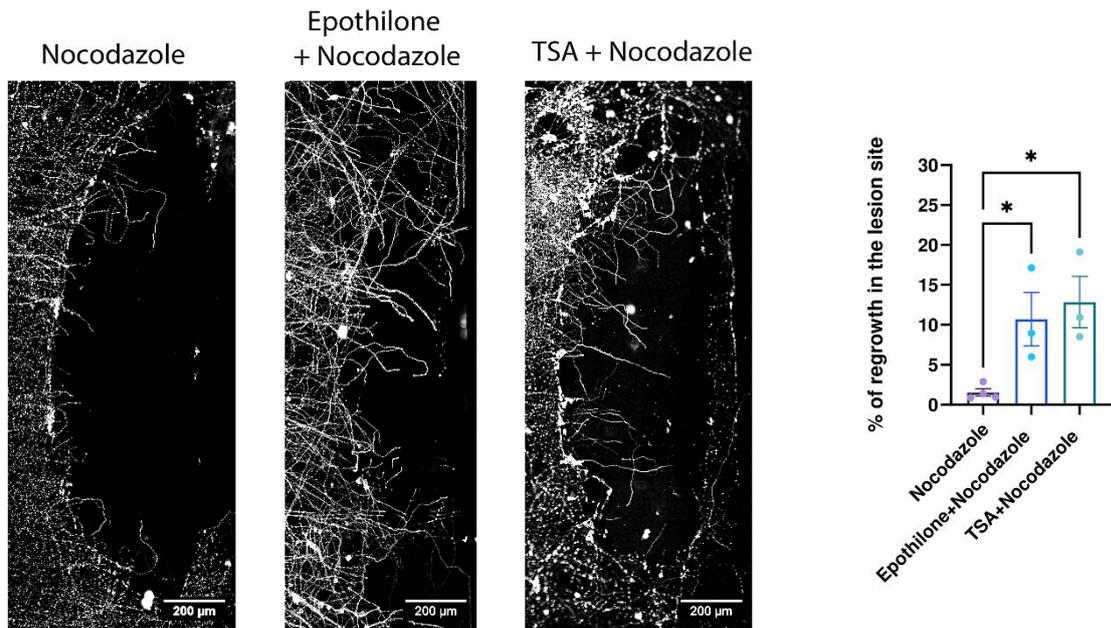


Figure 6. Stabilizing effect of epothilone and TSA on axon regeneration toward nocodazole-depolymerizing drug. Immunostaining and quantification of beta-III tubulin positive axons at the lesion site after treatment with nocodazole alone or in combination with epothilone or TSA. Microtubule depolymerization by nocodazole is prevented by treating axons with TSA or epothilone. Data are presented as mean \pm SEM. $n = 3$ individual experiments per group; $*p < 0.05$. One-way ANOVA analysis followed by the Dunnett post-hoc test.

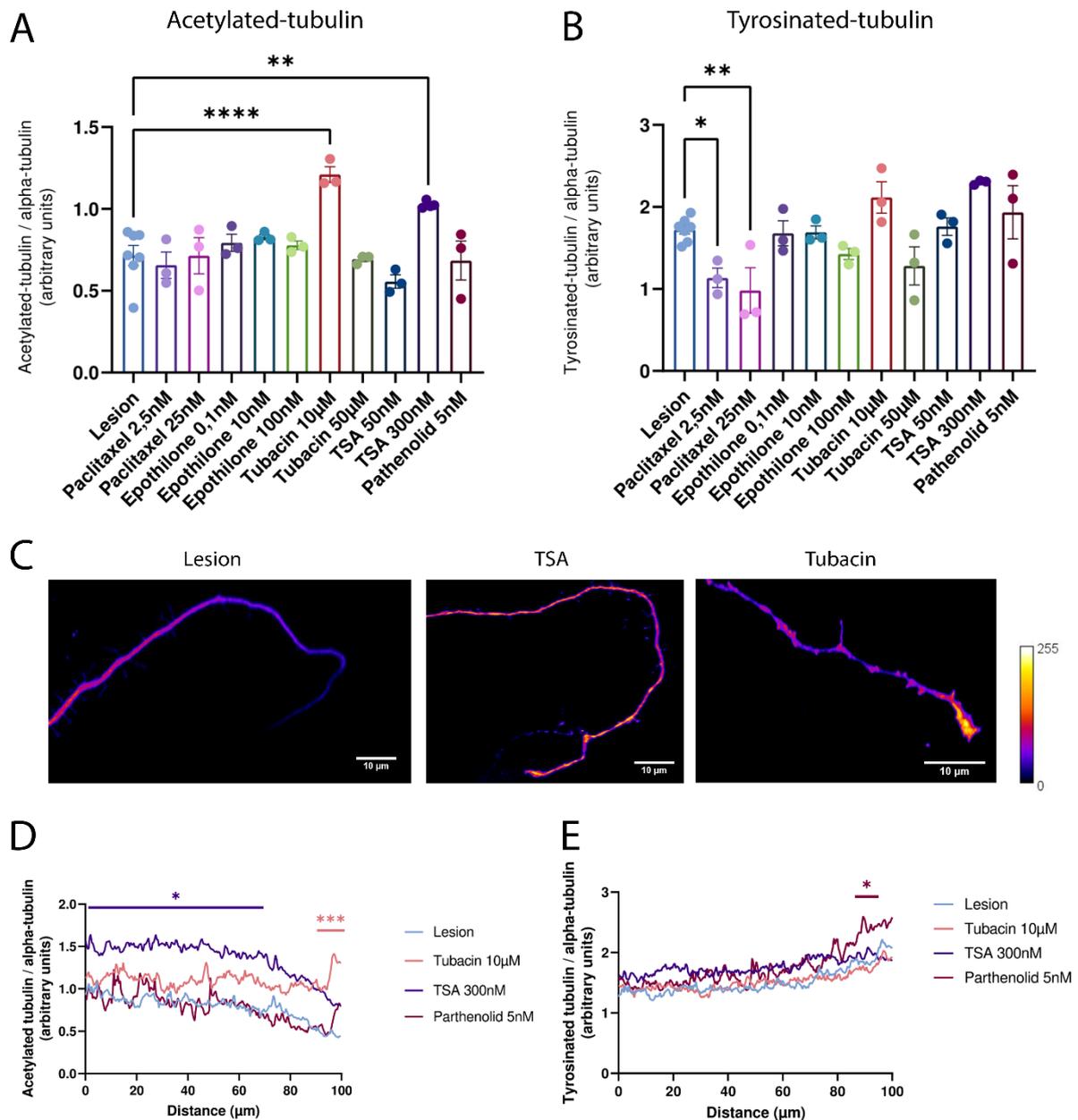
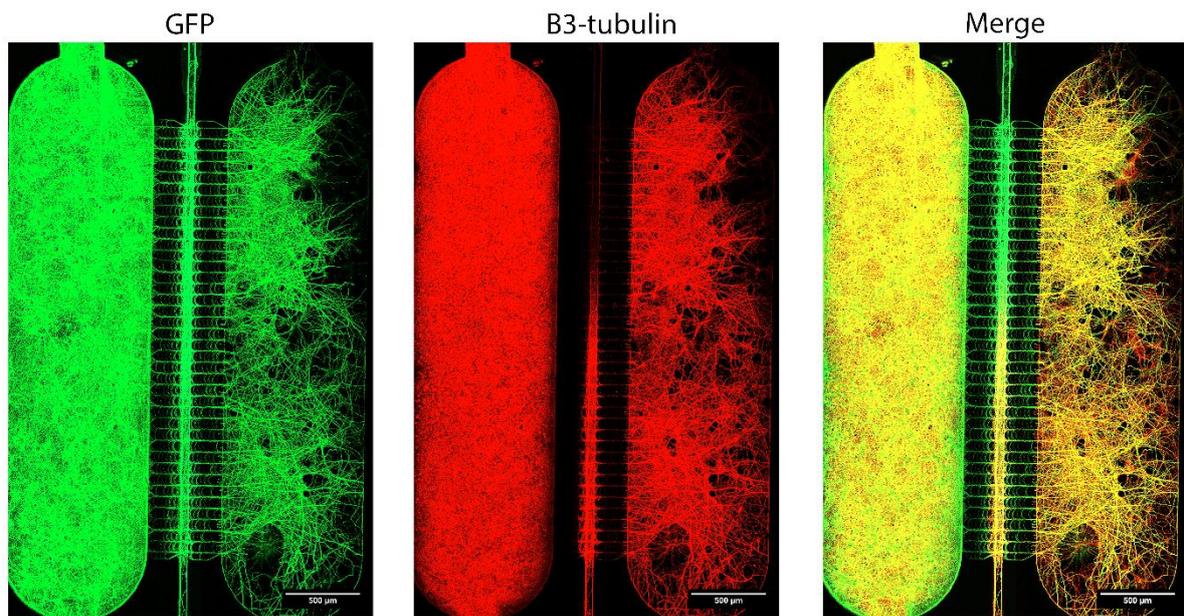
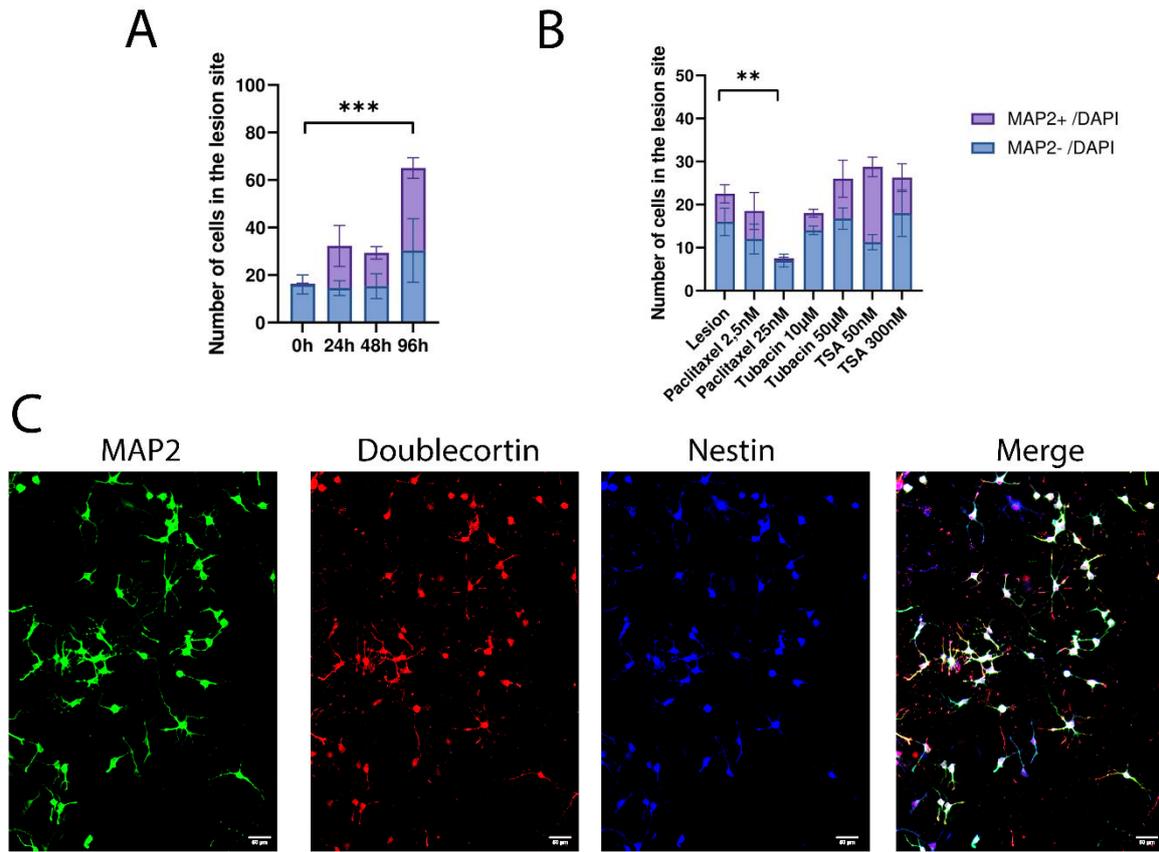


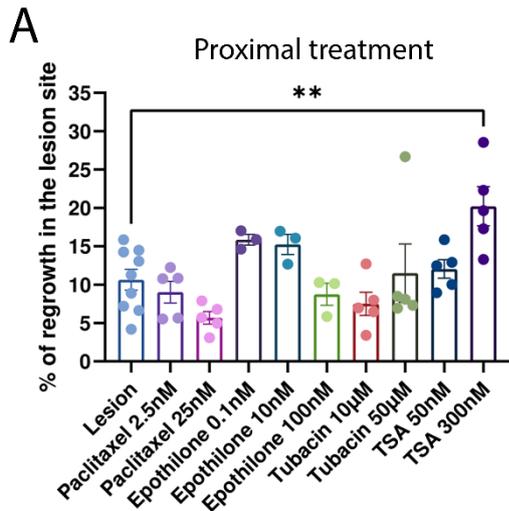
Figure 7. Pharmacological post-translational tubulin modifications in regenerating axons. (A, B) Quantification of acetylated tubulin (A) and tyrosinated tubulin (B) within the lesion site. (C) Immunostaining of acetylated tubulin along regenerating axon shaft, 24h after the lesion or after TSA or tubacin treatment. Color codes indicate pixel intensity, from 0 least intense to 255 most intense. (D, E) Quantification along axon shaft of acetylated or tyrosinated tubulin fluorescence intensity related to total alpha tubulin, 24 hours after the lesion, or after treatment with tubacin, TSA, or parthenolid. Note that TSA increases tubulin acetylation along the axon shaft but not in the growth cone, whereas tubacin increases tubulin acetylation in the more distal part of the axon, and parthenolid increases tubulin tyrosination in the distal extremity of axons. Data are presented as mean \pm SEM. $n = 3-7$ individual experiments per group; $*p < 0.05$; $***p < 0.001$. One-way ANOVA analysis for (A, B) and two-way ANOVA analysis for (D, E) followed by the Dunnett post-hoc test.



Supplementary Figure 1. Cortical GFP infection. Double immunofluorescence for GFP (green) of infected cortical neurons, and Beta III-tubulin (red) of the entire network. The merge (right) shows the invasion of cortical fibers into the distal chamber cohabiting with non-transfected spinal cells.



Supplementary Figure 2. Cell migration after injury. (A) Quantification of the number of neuronal (MAP2+/DAPI) and non-neural (MAP2-/DAPI) cells invaded the lesion site after injury. (B) Quantification of the number of neuronal (MAP2+/DAPI) and non-neural (MAP2-/DAPI) cells invaded the lesion site 24h after injury in treated conditions (C) Immunostaining of MAP2 (green), Doublecortin (red) and Nestin (blue) of cells within the lesion site 96h post injury. Data are presented as mean \pm SEM. $n= 3-4$ individual experiments per group; * $**p<0.01$; *** $p<0.001$. Two-way ANOVA analysis followed by the Dunnett post-hoc test.



B

	Time post-injury		
	24h	48h	96h
Lesion	10.48%	21.90%	51.13%
Lesion + TSA 300nM	18.28%	54.97%	76%
p value	* ; p= 0.017	* ; p= 0.035	* ; p= 0.019

Supplementary Figure 3. Effect of TSA treatment on regeneration. (A) Percentage of axon regrowth within the lesion site, 24h after compression, in non-treated (lesion) or treated neurons. Drugs were applied on the cortical (proximal) chamber. Note that when TSA is applied on cortical soma, axonal regeneration is enhanced. (B) Quantification of axonal regeneration up to 96h post-lesion, with Trichostatin A treatment. Data are presented as mean \pm SEM. $n = 3-8$ individual experiments per group; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$. One-way ANOVA analysis followed by the Dunnett post-hoc test (A) and unpaired t-test for (B).

Discussion

The observation of the results presented in this study partly relies on the relevance of the model used. The corticospinal tract (CST) is particularly affected by spinal cord injuries, making its study essential for understanding the pathophysiology of this trauma.

Using E14 embryonic mouse neurons allows us to obtain the cells of interest that form the CST from the same embryo, namely the layer 5 cortical pyramidal neurons (CTIP2+) and the spinal motor neurons (ChAT+) onto which they project (Arlotta et al., 2005; Ballout et al., 2016; Hevner, 2007; Molyneaux et al., 2007). The other cell populations, including the presence of interneurons found in each compartment (GAD67+ neurons, VGLUT+ neurons, non-neuronal GFAP+ cells) are consistent with those observed in corticospinal projections in vivo (Côté et al., 2018; Gu et al., 2017; Hughes and Todd, 2020; Markram et al., 2004; Paixão et al., 2019; Pedroni and Ampatzis, 2019; Takuma et al., 2002), as well as with the general organization of the corticospinal tract in vivo in mice (Gu et al., 2017; Paixão et al., 2019; Ueno et al., 2018). Our system allowed for the reconstruction of a simplified, unidirectional corticospinal network in which postsynaptic neurons are functionally connected to cortical fibers.

Our results highlight several advances and challenges in reproducing a network of neurons and applying mechanical injuries. Our novel method using magnets to locally crush the microfluidic chip represents a tool not only for studies on spinal cord injuries but also for other pathologies characterized by axotomy. For our study, the injury was performed on the distal chamber, at the exit of the micro-channels, containing both cortical axons connected to spinal cells. Observations at the injury site suggest axonal rearrangement, with axonal regeneration beginning as early as 24 hours post-injury and continuing up to 96 hours, compared to the control. The GFP transduction of cortical neurons highlights the presence of regenerating cortical axons at the injury site. Concurrently, the injury is associated with impaired network connectivity and mitochondrial dysfunction, replicating the perturbations induced by a spinal cord injury in vivo (Biyao Wang et al., 2021).

This model is therefore relevant for addressing cellular and molecular phenomena such as microtubule dynamics related to mitochondrial transport after an injury. During development and growth, microtubules play a crucial role in maintaining cellular architecture and

intracellular trafficking. These functions are enabled by a constantly evolving network, described as dynamic instability, where the axonal shaft remains stable while the axonal tip, containing the growth cone, must be dynamic to navigate the environment and reach its target (Lowery and Vactor, 2009). Following an injury, previous studies have reported that stabilizing microtubules could help restore the network and promote axonal regeneration (Blanquie and Bradke, 2018; Bradke et al., 2012; Hellal et al., 2011; Ruschel et al., 2015). We therefore impacted the MT network to observe the post-injury response.

We first studied the effect of Paclitaxel, a molecule that stabilizes the MT cytoskeleton, on axonal regeneration. Recently, Paclitaxel has been successfully used *in vivo* to promote axonal extension by stabilizing microtubule assembly (Liu et al., 2023). After a spinal cord injury, damaged axons quickly form a growth cone at the distal end, and tubulin stability decreases, hindering axonal regeneration. Liu et al. reversed this process by adding Paclitaxel, thereby increasing axonal regeneration. They examined the effects of low-dose Paclitaxel on neural stem cell (NSC) differentiation *in vitro* and functional recovery *in vivo* in injured rats. Their results show that low-dose Paclitaxel promotes NSC differentiation into neurons and significantly extends axons *in vitro*. *In vivo*, Paclitaxel promoted β III-tubulin expression in injured areas and improved motor recovery after spinal cord injury. While low-dose Paclitaxel is considered safe for clinical use, it is important to note that higher doses can lead to undesirable side effects such as peripheral neuropathies, a neurotoxic and hyper-stabilizing effect on the microtubule network (Gornstein and Schwarz, 2017; Klein and Lehmann, 2021). In our model, applied immediately after injury in the distal compartment, Paclitaxel has a negative effect on axonal regeneration. This agent may act by stabilizing microtubules directly at the distal axonal end, preventing their depolymerization (Klein and Lehmann, 2021), thereby making axonal regrowth impossible: the growth cone is unable to properly extend with hyper-stable microtubules.

However, Paclitaxel does not solely affect microtubule stabilization. According to Rovini et al., 2011, Paclitaxel administration disrupts intracellular trafficking by reducing retrograde mitochondrial velocity in peripheral nerves and blocking mitochondrial transport in dorsal root ganglion neurons, both anterogradely and retrogradely. This suggests that microtubule stabilization plays a key role in organelle transport. Rovini et al. primarily studied the hypothesis that post-translational modifications of tubulin influence the interaction between molecular motors and microtubules. Depolymerized and acetylated microtubules would favor

the binding of the molecular motor protein kinesin-1, responsible for anterograde transport of mitochondria along axons. These findings are controversial, as research has shown that Paclitaxel on tumor cells and peripheral nerves can compromise intracellular trafficking by preventing kinesin-1 translocation in polarized neurons, thereby increasing global levels of tubulin acetylation, depolymerization, and polyglutamylated (Hammond et al., 2010). This suggests that over-stabilization compromises intracellular trafficking, although some stabilization is necessary for mitochondrial transport.

These results align with trends observed in the literature and underscore the importance of microtubule stabilization in intracellular transport, while demonstrating that over-stabilization of microtubules by Paclitaxel is not beneficial for axonal regeneration. Other studies using Epopothilone, a structurally analogous and less toxic derivative of Paclitaxel, indicate that microtubule stabilization enhances regeneration (Bollag et al., 1995; M. Brizuela et al., 2015; Ruschel et al., 2015). Epopothilone B has already been studied to improve locomotor function after spinal cord injury, but adverse effects have been reported. Therefore, we selected Epopothilone D (Ruschel et al., 2015). Compared to Paclitaxel, Epopothilone D improves regeneration after injury according to our observations, reinforcing the idea that network stabilization is necessary but over-stabilization is not.

Since tubulin acetylation is commonly associated with stable microtubules and tyrosination with dynamic microtubules, we tested agents specifically affecting these modifications. In particular, we used HDAC inhibitors known for their effects on axonal regeneration (Cho et al., 2013; Cho and Cavalli, 2014; Gaub et al., 2010; Riviaccio et al., 2009). We found that specific inhibition of HDAC6 by tubacin does not affect regeneration, while inhibition of multiple HDAC classes by TSA significantly increases axonal regeneration.

To explore the potential link between acetylation, microtubule stabilization, and axonal regeneration, our samples were marked for acetylated tubulin, tyrosinated tubulin, and alpha-tubulin. Quantification revealed that neither Paclitaxel nor Epopothilone affects acetylation levels. This result suggests that tubulin acetylation could be a cause rather than a consequence of stabilization. At the axonal level, tubacin increases acetylation at the distal end, while TSA increases acetylation levels in the axonal body without affecting tyrosination levels. It is interesting to note that Epopothilone and TSA, but not tubacin, protect against nocodazole-induced depolymerization, supporting the association between tubulin stability and acetylation.

However, stabilization of the axonal end alone is not sufficient to protect against destabilization. Taken together, these results suggest a complex post-translational regulation of the cytoskeleton, where tubulin acetylation induces microtubule stabilization, beneficial for axonal regeneration after injury.

However, it is important to consider that these effects result from stabilizing the microtubule network while maintaining a developmental and growth pattern, where the distal end must remain dynamic to reform a growth cone and navigate the environment (Chen and Rolls, 2012; Yuyu Song and Brady, 2015). To validate this hypothesis, we used parthenolid, responsible for tubulin depolymerization (Diekmann and Fischer, 2016; Gobrecht et al., 2016). After 24 hours of treatment, we observed an increase in tubulin tyrosination at the distal end, without impacting acetylation levels. We did not observe changes in regeneration but an increase in branching was noted. These results support the association between tubulin dynamics and tyrosination, and that a balance between stability and dynamism is necessary for axonal regeneration.

Axonal regeneration is a highly energy-demanding process (Conde and Cáceres, 2009), making mitochondrial function particularly crucial (McEwen et al., 2011; Szelechowski et al., 2014). Following injury, studies report disruptions in membrane potential, ROS production, SNPH anchoring protein expression, decreased motility, and increased fission (Brooks, 2007; Han et al., 2016; Lassus et al., 2016; Magnifico, 2013; Steketee et al., 2012; Biyao Wang et al., 2021; Bing Zhou et al., 2016). However, it is described in the conditioned injury paradigm that regenerating axons restore vesicular trafficking. Moreover, in CNS neurons, axonal regeneration is characterized by a high rate of mitochondrial transport (Cartoni et al., 2017; Mar et al., 2014). This transport relies on microtubules and increased MT acetylation facilitates recruitment of molecular motors necessary for mitochondrial transport, such as kinesins (Dompierre et al., 2007; Hammond et al., 2010; Reed et al., 2006; Rovini et al., 2011).

In line with these studies, we observed that TSA restores mitochondrial motility, while Tubacin, Epothilone, and Parthenolid do not affect this transport. This suggests that microtubule stabilization is necessary for organelle trafficking and that mitochondrial motility is enhanced by tubulin acetylation along axons. We also observe restoration of fusion and fission processes. These results suggest that TSA enhances mitochondrial dynamic towards critical areas to compensate for the energy deficit required for regeneration.

Our results using Tubacin do not align with previous observations showing that HDAC6 inhibition is beneficial for axonal regeneration through interaction with mitochondria (Chen et al., 2010; Riviaccio et al., 2009). Inhibition of this HDAC induces acetylation of dynein molecular motors, necessary for transport (English and Barton, 2021). However, our specific HDAC6 inhibition results show no changes in mitochondrial dynamics or regeneration. Thus, other class I HDACs: 1, 2, 3, 8 (for which TSA has a higher affinity (Fleiss et al., 2012)), are likely involved. Indeed, on fibroblasts, 100 nM of TSA is insufficient to inhibit HDAC6 and induce acetylation (Matsuyama, 2002; Ptacek et al., 2023). Finally, it is noteworthy that Tubacin has reduced bioavailability compared to TSA. These results are supported by studies indicating that on lymphocytes, Tubacin does not affect MT stabilization (Haggarty et al., 2003).

It is not excluded that the observed effect by TSA results from other interactions, since this molecule targets multiple HDAC classes, including nuclear and mitochondrial targets (Haggarty et al., 2003; Shukla and Tekwani, 2020). Indeed, injury disrupts membranes, causing calcium release which, through retrograde signaling, activates PKC. This activation subsequently allows translocation of nuclear histones, such as HDAC5. This histone is specifically expressed post-injury and transported to the injury site, leading to increased deacetylation (Chen and Rolls, 2012; Tang, 2014). Chen and Rolls, 2012 conclude that moderate microtubule stabilization would enable regeneration. This coincides with our results, suggesting that inhibition of this HDAC could increase acetylation in axons and promote regeneration. The observed TSA effect is therefore likely due to its action on different HDACs, either directly at the cytoplasmic level or indirectly through retrograde signal transport at the nuclear level. This also explains our results when applying TSA on cortical neuron cell bodies, which produce similar beneficial effects on axonal regeneration at the injury site. Moreover, numerous literature works present epigenetic effects of TSA, notably through activation of RAGs in response to H3 acetylation on K9 and K14 residues (Delcuve et al., 2012; Gupta et al., 2023; Koriyama et al., 2014; Shin and Cho, 2017; Weng et al., 2016; Wood et al., 2018; Zhao et al., 2021). Although our results do not demonstrate changes in H3K27 acetylation, this does not exclude acetylation on other residues.

Considering the beneficial effect of TSA treatment on axonal regeneration also found at 48 and 96 hours post-injury, we wondered if this regeneration could also restore network connectivity. The addition of TSA could show potentiation of cortical neuron response more rapidly, with a more stable frequency closer to controls at 48 hours post-injury, compared to untreated injuries

where frequencies still vary up to 96 hours post-injury. These results are consistent with findings showing increased calcium flux during network stabilization with Paclitaxel (Mironov et al., 2005). However, no synchronization is found. It is important to consider that the calcium signals observed globally in the chambers reflect several calcium signatures (injured and non-injured neurons, interneurons, glial cells...), difficult to individualize in non-ratiometric imaging. Concurrently, axonal regeneration alone does not imply reconnection of axons with their initial targets (Squair et al., 2023).

In summary, in this study, we have developed a new, simple, and reproducible in vitro microfluidic device for performing mechanical lesions by compression in a synaptically functional cortico-spinal neuron network, to replicate CST bundles and mimic spinal cord injuries in vitro. This device addresses the spatial organization shortcomings of conventional in vitro cultures and offers a valuable tool to study mechanisms of axonal regeneration and degeneration and to develop new therapeutic approaches for spinal cord injuries, as well as other axonal injury pathologies such as traumatic brain injuries (TBI). The described results indicate significant discoveries regarding MT status and its relationship with mitochondrial dynamics in axonal regeneration. We demonstrate that acetylation induces MT network stabilization and supports mitochondrial for axonal regeneration. These findings highlight the potential of certain molecules to promote neural regeneration and repair after injury, providing promising avenues for the development of regenerative therapies.

Acknowledgements

The authors wish to thank the IBPS imaging platform for their support during the research.

Funding

This work was supported by Sorbonne University, the Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM), the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), and “Fondation des Gueules Cassées” which specifically provide additional individual PhD funding to TA.

Competing interests

The authors report no competing interests.

References

- Anderson, M.A., O’Shea, T.M., Burda, J.E., Ao, Y., Barlately, S.L., Bernstein, A.M., Kim, J.H., James, N.D., Rogers, A., Kato, B., Wollenberg, A.L., Kawaguchi, R., Coppola, G., Wang, C., Deming, T.J., He, Z., Courtine, G., Sofroniew, M.V., 2018. Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury. *Nature* 561, 396–400. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0467-6>
- Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., Macklis, J.D., 2005. Neuronal Subtype-Specific Genes that Control Corticospinal Motor Neuron Development In Vivo. *Neuron* 45, 207–221. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.036>
- Ballout, N., Frappé, I., Péron, S., Jaber, M., Zibara, K., Gaillard, A., 2016. Development and Maturation of Embryonic Cortical Neurons Grafted into the Damaged Adult Motor Cortex. *Front. Neural Circuits* 10. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00055>
- Beaudet, M.-J., Yang, Q., Cadau, S., Blais, M., Bellenfant, S., Gros-Louis, F., Berthod, F., 2015. High yield extraction of pure spinal motor neurons, astrocytes and microglia from single embryo and adult mouse spinal cord. *Sci Rep* 5, 16763. <https://doi.org/10.1038/srep16763>
- Blanquie, O., Bradke, F., 2018. Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology* 51, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.024>
- Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., Woods, C.M., 1995. Epopthilones, a New Class of Microtubule-stabilizing Agents with a Taxol-like Mechanism of Action.
- Bradke, F., Fawcett, J.W., Spira, M.E., 2012. Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 13, 183–193. <https://doi.org/10.1038/nrn3176>
- Brizuela, Mariana, Blizzard, C.A., Chuckowree, J.A., Dawkins, E., Gasperini, R.J., Young, K.M., Dickson, T.C., 2015. The microtubule-stabilizing drug Epopthilone D increases axonal sprouting following transection injury in vitro. *Molecular and Cellular Neuroscience* 66, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.02.006>
- Brizuela, M., Blizzard, C.A., Chuckowree, J.A., Dawkins, E., Gasperini, R.J., Young, K.M., Dickson, T.C., 2015. The microtubule-stabilizing drug Epopthilone D increases axonal sprouting following transection injury in vitro. *Molecular and Cellular Neuroscience* 66, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.02.006>
- Brooks, C., 2007. Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 11649–11654.
- Cartoni, R., Pekkurnaz, G., Wang, C., Schwarz, T.L., He, Z., 2017. A high mitochondrial transport rate characterizes CNS neurons with high axonal regeneration capacity. *PLoS ONE* 12, e0184672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184672>
- Chedly, J., Soares, S., Montembault, A., Von Boxberg, Y., Veron-Ravaille, M., Mouffle, C., Benassy, M.-N., Taxi, J., David, L., Nothias, F., 2017. Physical chitosan microhydrogels as scaffolds for spinal cord injury restoration and axon regeneration. *Biomaterials* 138, 91–107. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.05.024>
- Chen, L., Rolls, M.M., 2012. Microtubule deacetylation sets the stage for successful axon regeneration: HDAC5 in axon regeneration. *The EMBO Journal* 31, 3033–3035. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.175>

- Chen, S., Owens, G.C., Makarenkova, H., Edelman, D.B., 2010. HDAC6 Regulates Mitochondrial Transport in Hippocampal Neurons. *PLoS ONE* 5, e10848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010848>
- Chen, Y., Sheng, Z.-H., 2013. Kinesin-1–syntrophin coupling mediates activity-dependent regulation of axonal mitochondrial transport. *Journal of Cell Biology* 202, 351–364. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302040>
- Cho, Y., Cavalli, V., 2014. HDAC signaling in neuronal development and axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology* 27, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.03.008>
- Cho, Y., Sloutsky, R., Naegle, K.M., Cavalli, V., 2013. Injury-Induced HDAC5 Nuclear Export Is Essential for Axon Regeneration. *Cell* 155, 894–908. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.004>
- Conde, C., Cáceres, A., 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10, 319–332. <https://doi.org/10.1038/nrn2631>
- Côté, M.-P., Murray, L.M., Knikou, M., 2018. Spinal Control of Locomotion: Individual Neurons, Their Circuits and Functions. *Front. Physiol.* 9, 784. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00784>
- Courtine, G., Sofroniew, M.V., 2019. Spinal cord repair: advances in biology and technology. *Nat Med* 25, 898–908. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0475-6>
- Delcuve, G.P., Khan, D.H., Davie, J.R., 2012. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors.
- Deleglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Alleaume-Butaux, A., Hjorth, J.J., Vignes, M., Schneider, B., Brugg, B., Viovy, J.-L., Peyrin, J.-M., 2013. Synapto-Protective Drugs Evaluation in Reconstructed Neuronal Network. *PLoS ONE* 8, e71103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071103>
- Diekmann, H., Fischer, D., 2016. Parthenolide: a novel pharmacological approach to promote nerve regeneration. *Neural Regen Res* 11, 1566. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.193228>
- Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelières, F.P., King, S.J., Humbert, S., Saudou, F., 2007. Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington’s Disease by Increasing Tubulin Acetylation. *J. Neurosci.* 27, 3571–3583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0037-07.2007>
- English, K., Barton, M.C., 2021. HDAC6: A Key Link Between Mitochondria and Development of Peripheral Neuropathy. *Front. Mol. Neurosci.* 14, 684714. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.684714>
- Fleiss, B., Nilsson, M.K., Blomgren, K., Mallard, C., 2012. Neuroprotection by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in a model of lipopolysaccharide-sensitised neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *J Neuroinflammation* 9, 652. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-70>
- Fletcher, D.A., Mullins, R.D., 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485–492. <https://doi.org/10.1038/nature08908>
- Gadadhar, Bodakuntla, Natarajan, Janke, 2017. The tubulin code at a glance. *J Cell Sci* 2017;130(8):1347–1353. <https://doi.org/10.1242/jcs.199471>
- Gaub, P., Tedeschi, A., Puttagunta, R., Nguyen, T., Schmandke, A., Di Giovanni, S., 2010. HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation. *Cell Death Differ* 17, 1392–1408. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.216>
- Geoffroy, C.G., Lorenzana, A.O., Kwan, J.P., Lin, K., Ghassemi, O., Ma, A., Xu, N., Creger, D., Liu, K., He, Z., Zheng, B., 2015. Effects of PTEN and Nogo Codeletion on

- Corticospinal Axon Sprouting and Regeneration in Mice. *J. Neurosci.* 35, 6413–6428. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4013-14.2015>
- Gobrecht, P., Andreadaki, A., Diekmann, H., Heskamp, A., Leibinger, M., Fischer, D., 2016. Promotion of Functional Nerve Regeneration by Inhibition of Microtubule Detyrosination. *J. Neurosci.* 36, 3890–3902. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-15.2016>
- Gornstein, E.L., Schwarz, T.L., 2017. Neurotoxic mechanisms of paclitaxel are local to the distal axon and independent of transport defects. *Experimental Neurology* 288, 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.11.015>
- Gu, Z., Kalambovias, J., Yoshioka, S., Han, W., Li, Zhuo, Kawasawa, Y.I., Pochareddy, S., Li, Zhen, Liu, F., Xu, X., Wijeratne, H.R.S., Ueno, M., Blatz, E., Salomone, J., Kumanogoh, A., Rasin, M.-R., Gebelein, B., Weirauch, M.T., Sestan, N., Martin, J.H., Yoshida, Y., 2017. Control of species-dependent cortico-motoneuronal connections underlying manual dexterity. *Science* 357, 400–404. <https://doi.org/10.1126/science.aan3721>
- Gupta, S., Dutta, S., Hui, S.P., 2023. Regenerative Potential of Injured Spinal Cord in the Light of Epigenetic Regulation and Modulation. *Cells* 12, 1694. <https://doi.org/10.3390/cells12131694>
- Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M., Schreiber, S.L., 2003. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4389–4394. <https://doi.org/10.1073/pnas.0430973100>
- Hammond, J.W., Huang, C.-F., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G., Verhey, K.J., 2010. Posttranslational Modifications of Tubulin and the Polarized Transport of Kinesin-1 in Neurons. *MBoC* 21, 572–583. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-01-0044>
- Han, S.M., Baig, H.S., Hammarlund, M., 2016. Mitochondria Localize to Injured Axons to Support Regeneration. *Neuron* 92, 1308–1323. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.025>
- Hanson, K., Tian, N., Vickers, J.C., King, A.E., 2018. The HDAC6 Inhibitor Trichostatin A Acetylates Microtubules and Protects Axons From Excitotoxin-Induced Degeneration in a Compartmented Culture Model. *Front. Neurosci.* 12, 872. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00872>
- Hellal, F., Hurtado, A., Ruschel, J., Flynn, K.C., Laskowski, C.J., Umlauf, M., Kapitein, L.C., Strikis, D., Lemmon, V., Bixby, J., Hoogenraad, C.C., Bradke, F., 2011. Microtubule Stabilization Reduces Scarring and Causes Axon Regeneration After Spinal Cord Injury. *Science* 331, 928–931. <https://doi.org/10.1126/science.1201148>
- Hevner, R.F., 2007. Layer-Specific Markers as Probes for Neuron Type Identity in Human Neocortex and Malformations of Cortical Development: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66, 101–109. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3180301c06>
- Hughes, D.I., Todd, A.J., 2020. Central Nervous System Targets: Inhibitory Interneurons in the Spinal Cord. *Neurotherapeutics* 17, 874–885. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00936-0>
- Klein, I., Lehmann, H., 2021. Pathomechanisms of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Toxics* 9, 229. <https://doi.org/10.3390/toxics9100229>
- Koriyama, Y., Sugitani, K., Ogai, K., Kato, S., 2014. Neuritogenic Activity of Trichostatin A in Adult Rat Retinal Ganglion Cells Through Acetylation of Histone H3 Lysine 9 and RAR β Induction. *J Pharmacol Sci* 124, 112–116. <https://doi.org/10.1254/jphs.13171SC>
- Lassus, B., Magnifico, S., Pignon, S., Belenguer, P., Miquel, M.-C., Peyrin, J.-M., 2016. Alterations of mitochondrial dynamics allow retrograde propagation of locally initiated axonal insults. *Sci Rep* 6, 32777. <https://doi.org/10.1038/srep32777>

- Lassus, B., Naudé, J., Faure, P., Guedin, D., Von Boxberg, Y., Mannoury La Cour, C., Millan, M.J., Peyrin, J.-M., 2018. Glutamatergic and dopaminergic modulation of cortico-striatal circuits probed by dynamic calcium imaging of networks reconstructed in microfluidic chips. *Sci Rep* 8, 17461. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35802-9>
- Liu, B., Liu, S., Sun, D., 2023. Low-Dose Taxol Promotes Neuronal Axons Extension and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Mediators of Inflammation* 2023, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2023/5604103>
- Liu, K., Lu, Y., Lee, J.K., Samara, R., Willenberg, R., Sears-Kraxberger, I., Tedeschi, A., Park, K.K., Jin, D., Cai, B., Xu, B., Connolly, L., Steward, O., Zheng, B., He, Z., 2010. PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. *Nat Neurosci* 13, 1075–1081. <https://doi.org/10.1038/nn.2603>
- Lowery, L.A., Vactor, D.V., 2009. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 332–343. <https://doi.org/10.1038/nrm2679>
- Magiera, M.M., Singh, P., Gadadhar, S., Janke, C., 2018. Tubulin Posttranslational Modifications and Emerging Links to Human Disease. *Cell* 173, 1323–1327. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.018>
- Magnifico, S., 2013. NAD⁺ acts on mitochondrial SirT3 to prevent axonal caspase activation and axonal degeneration. *FASEB J* 27, 4712–22.
- Mar, F.M., Simões, A.R., Leite, S., Morgado, M.M., Santos, T.E., Rodrigo, I.S., Teixeira, C.A., Misgeld, T., Sousa, M.M., 2014. CNS Axons Globally Increase Axonal Transport after Peripheral Conditioning. *J. Neurosci.* 34, 5965–5970. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4680-13.2014>
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., Wu, C., 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5, 793–807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>
- Matsuyama, A., 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO Journal* 21, 6820–6831. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf682>
- McEwen, M.L., Sullivan, P.G., Rabchevsky, A.G., Springer, J.E., 2011. Targeting Mitochondrial Function for the Treatment of Acute Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics* 8, 168–179. <https://doi.org/10.1007/s13311-011-0031-7>
- Melkov, A., Abdu, U., 2018. Regulation of long-distance transport of mitochondria along microtubules. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 163–176. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2590-1>
- Mironov, S.L., Ivannikov, M.V., Johansson, M., 2005. [Ca²⁺] Signaling between Mitochondria and Endoplasmic Reticulum in Neurons Is Regulated by Microtubules. *Journal of Biological Chemistry* 280, 715–721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409819200>
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., Macklis, J.D., 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8, 427–437. <https://doi.org/10.1038/nrn2151>
- Paixão, S., Loschek, L., Gaitanos, L., Alcalà Morales, P., Goulding, M., Klein, R., 2019. Identification of Spinal Neurons Contributing to the Dorsal Column Projection Mediating Fine Touch and Corrective Motor Movements. *Neuron* 104, 749–764.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.08.029>
- Patrón, L.A., Zinsmaier, K.E., 2016. Mitochondria on the Road to Power Axonal Regeneration. *Neuron* 92, 1152–1154. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.007>
- Pedroni, A., Ampatzis, K., 2019. Large-Scale Analysis of the Diversity and Complexity of the Adult Spinal Cord Neurotransmitter Typology. *iScience* 19, 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.09.010>

- Peyrin, J.-M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., Betuing, S., Pietri, M., Caboche, J., Vanhoutte, P., Viovy, J.-L., Brugg, B., 2011. Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab Chip* 11, 3663. <https://doi.org/10.1039/c1lc20014c>
- Ptacek, J., Snajdr, I., Schimer, J., Kutil, Z., Mikesova, J., Baranova, P., Havlinova, B., Tueckmantel, W., Majer, P., Kozikowski, A., Barinka, C., 2023. Selectivity of Hydroxamate- and Difluoromethyloxadiazole-Based Inhibitors of Histone Deacetylase 6 In Vitro and in Cells. *IJMS* 24, 4720. <https://doi.org/10.3390/ijms24054720>
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., Verhey, K.J., 2006. Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Current Biology* 16, 2166–2172. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.014>
- Rivieccio, M.A., Brochier, C., Willis, D.E., Walker, B.A., D’Annibale, M.A., McLaughlin, K., Siddiq, A., Kozikowski, A.P., Jaffrey, S.R., Twiss, J.L., Ratan, R.R., Langley, B., 2009. HDAC6 is a target for protection and regeneration following injury in the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19599–19604. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907935106>
- Rovini, A., Savry, A., Braguer, D., Carré, M., 2011. Microtubule-targeted agents: When mitochondria become essential to chemotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807, 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.01.001>
- Ruschel, J., Hellal, F., Flynn, K.C., Dupraz, S., Elliott, D.A., Tedeschi, A., Bates, M., Sliwinski, C., Brook, G., Dobrindt, K., Peitz, M., Brüstle, O., Norenberg, M.D., Blesch, A., Weidner, N., Bunge, M.B., Bixby, J.L., Bradke, F., 2015. Systemic administration of epothilone B promotes axon regeneration after spinal cord injury. *Science* 348, 347–352. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2958>
- Schwab, J.M., Breghtel, K., Mueller, C.-A., Failli, V., Kaps, H.-P., Tuli, S.K., Schluesener, H.J., 2006. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration—an integrative perspective. *Progress in Neurobiology* 78, 91–116. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.12.004>
- Shin, J.E., Cho, Y., 2017. Epigenetic Regulation of Axon Regeneration after Neural Injury. *Molecules and Cells* 40, 10–16. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2311>
- Shukla, S., Tekwani, B.L., 2020. Histone Deacetylases Inhibitors in Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection and Neuronal Differentiation. *Front. Pharmacol.* 11, 537. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00537>
- Smith, G.M., Gallo, G., 2018. The role of mitochondria in axon development and regeneration. *Devel Neurobio* 78, 221–237. <https://doi.org/10.1002/dneu.22546>
- Sofroniew, M.V., 2018. Dissecting spinal cord regeneration. *Nature* 557, 343–350. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0068-4>
- Song, Y., Brady, S.T., 2015. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends in Cell Biology* 25, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.004>
- Squair, J.W., Milano, M., De Coucy, A., Gautier, M., Skinnider, M.A., James, N.D., Cho, N., Lasne, A., Kathe, C., Hutson, T.H., Ceto, S., Baud, L., Galan, K., Aureli, V., Laskaratos, A., Barraud, Q., Deming, T.J., Kohman, R.E., Schneider, B.L., He, Z., Bloch, J., Sofroniew, M.V., Courtine, G., Anderson, M.A., 2023. Recovery of walking after paralysis by regenerating characterized neurons to their natural target region. *Science* 381, 1338–1345. <https://doi.org/10.1126/science.adi6412>
- Steketee, M.B., Moysidis, S.N., Weinstein, J.E., Kreymerman, A., Silva, J.P., Iqbal, S., Goldberg, J.L., 2012. Mitochondrial Dynamics Regulate Growth Cone Motility, Guidance, and Neurite Growth Rate in Perinatal Retinal Ganglion Cells In Vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 7402. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10298>

- Szelechowski, M., Bétourné, A., Monnet, Y., Ferré, C.A., Thouard, A., Foret, C., Peyrin, J.-M., Hunot, S., Gonzalez-Dunia, D., 2014. A viral peptide that targets mitochondria protects against neuronal degeneration in models of Parkinson's disease. *Nat Commun* 5, 5181. <https://doi.org/10.1038/ncomms6181>
- Takuma, H., Sakurai, M., Kanazawa, I., 2002. In vitro formation of corticospinal synapses in an organotypic slice co-culture. *Neuroscience* 109, 359–370. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00472-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00472-9)
- Tang, B.L., 2014. Class II HDACs and Neuronal Regeneration. *J of Cellular Biochemistry* 115, 1225–1233. <https://doi.org/10.1002/jcb.24802>
- Ueno, M., Nakamura, Y., Li, J., Gu, Z., Niehaus, J., Maezawa, M., Crone, S.A., Goulding, M., Baccei, M.L., Yoshida, Y., 2018. Corticospinal Circuits from the Sensory and Motor Cortices Differentially Regulate Skilled Movements through Distinct Spinal Interneurons. *Cell Reports* 23, 1286-1300.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.137>
- Wang, B., Huang, M., Shang, D., Yan, X., Zhao, B., Zhang, X., 2021. Mitochondrial Behavior in Axon Degeneration and Regeneration. *Front. Aging Neurosci.* 13, 650038. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.650038>
- Weng, Y.-L., Joseph, J., An, R., Song, H., Ming, G., 2016. Epigenetic Regulation of Axonal Regenerative Capacity. *Epigenomics* 8, 1429–1442. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0058>
- Wood, M., Rymarchyk, S., Zheng, S., Cen, Y., 2018. Trichostatin A inhibits deacetylation of histone H3 and p53 by SIRT6. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 638, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.12.009>
- Yang, I.H., Siddique, R., Hosmane, S., Thakor, N., Höke, A., 2009. Compartmentalized microfluidic culture platform to study mechanism of paclitaxel-induced axonal degeneration. *Experimental Neurology* 218, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.04.017>
- Zhao, W., Xu, Ying, Wang, Y., Gao, D., King, J., Xu, Yajie, Liang, F.-S., 2021. Investigating crosstalk between H3K27 acetylation and H3K4 trimethylation in CRISPR/dCas-based epigenome editing and gene activation. *Sci Rep* 11, 15912. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95398-5>
- Zhou, B., Yu, P., Lin, M.-Y., Sun, T., Chen, Y., Sheng, Z.-H., 2016. Facilitation of axon regeneration by enhancing mitochondrial transport and rescuing energy deficits. *Journal of Cell Biology* 214, 103–119. <https://doi.org/10.1083/jcb.201605101>

2. Résultats supplémentaires

2.1. Effets des drogues du cytosquelette

La transduction par de la GFP des neurones corticaux m'a permis de réaliser des enregistrements en live et de quantifier leur vitesse de croissance. Ces données ont été obtenues sur un faible nombre d'échantillons et n'ont donc pas été insérées dans l'article. Nous avons observé que les axones en régénération deviennent visibles sur le site de la lésion à partir de 6 heures après la lésion et qu'au-delà, ils progressent à une vitesse de $0,23 \mu\text{m}/\text{min}$. Cette vitesse augmente à $0,70 \mu\text{m}/\text{min}$ après un traitement à la TSA appliquée immédiatement après la lésion. La transfection GFP permet également d'observer le nombre de ramifications sur les axones. En moyenne, à 24 heures post-lésion, les axones possèdent 16 branches sur une distance de $100\mu\text{m}$. Ce nombre augmente à 23 lorsque de la tubacine est appliquée et jusqu'à 50 après l'application de parthénolide (figure 38).

Ces résultats suggèrent que l'acétylation du corps de l'axone par la TSA (voir article) induit une stabilisation, alors que l'acétylation distale par la tubacine ne suffit pas à stabiliser le réseau qui reste toutefois dynamique, avec la formation de branchements. La tyrosination distale induite par la parthénolide serait en faveur de la formation de nombreux prolongements. De plus, les axones en régénération arrivant sur le site de la lésion 6 heures après le trauma suggèrent qu'avant cela les axones sont dans un état métastable pendant plusieurs heures. Toutefois, notre système ne permet pas de distinguer l'extrémité des axones à la bordure de la lésion. Cette zone contient également de nombreux débris. Il est donc difficile de savoir si les axones, immédiatement après la lésion, sont dynamiques ou en pause.

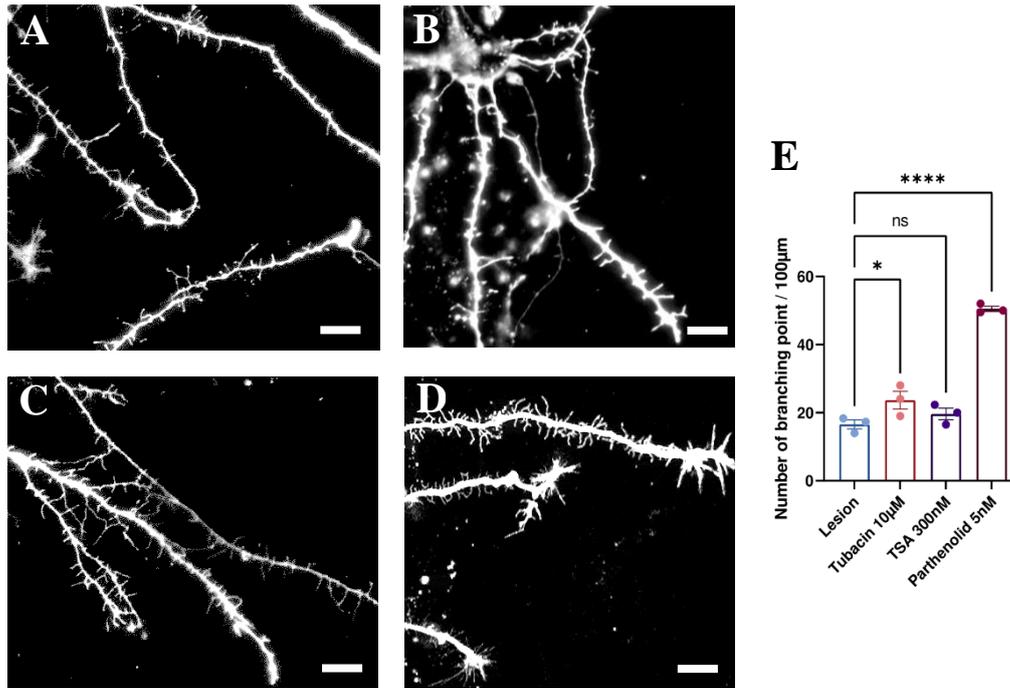


Figure 38 – Évaluation du « sprouting » 24 heures après la lésion. Immunomarquage GFP de neurones corticaux d'embryons de souris E14, en régénération dans le site lésionnel, en condition contrôle non-traitée (A) ou traitée avec de la TSA (B), de la tubacine (C) ou de la parthénolide (D). Échelle 20µm. (E) Quantification du nombre de point de branchement le long des axones, sur une distance de 100µm. La tubacine induit une légère augmentation du nombre de branchement, alors que la parthénolide l'augmente fortement. $N=3$; ns= non-significatif; * $p=0.0479$ **** $p<0.0001$, analyse Anova à un facteur avec test post-hoc de Dunnett.

Par la suite, afin d'identifier si la TSA possède une fenêtre temporelle d'efficacité, nous avons testé son application retardée de 4 heures ou 6 heures après la lésion. Les cultures ont été ensuite fixées 24 heures post-lésion, comme pour l'ensemble des autres résultats. Nous avons observé une mort neuronale lorsque la TSA est ajoutée 4 heures après la lésion. La quasi-totalité des corps cellulaires et des axones présents dans le compartiment distal est fragmentée. Toutefois, lorsque la TSA est ajoutée 6 heures après la lésion, le réseau se maintient et la régénération axonale est de 28 % à 24 heures (figure 39A), contre 18% lorsqu'elle est appliquée immédiatement post-lésion (voir article). Par ailleurs, cette régénération est associée aux mêmes observations que précédemment, l'acétylation de la tubuline est augmentée le long de l'axone mais pas la tyrosination (figure 39B-E). Il apparaît donc que dans les 4 heures après la lésion, une acétylation des MT n'est pas favorable à la régénération et induit au contraire une mort axonale. Cela soulève l'importance de définir une fenêtre temporelle d'application de drogues pour favoriser la repousse axonale. En revanche, lorsque les axones ont rejoint le site de lésion et sont dans un état de croissance (6 heures après la lésion), l'acétylation le long de l'axone est bénéfique.

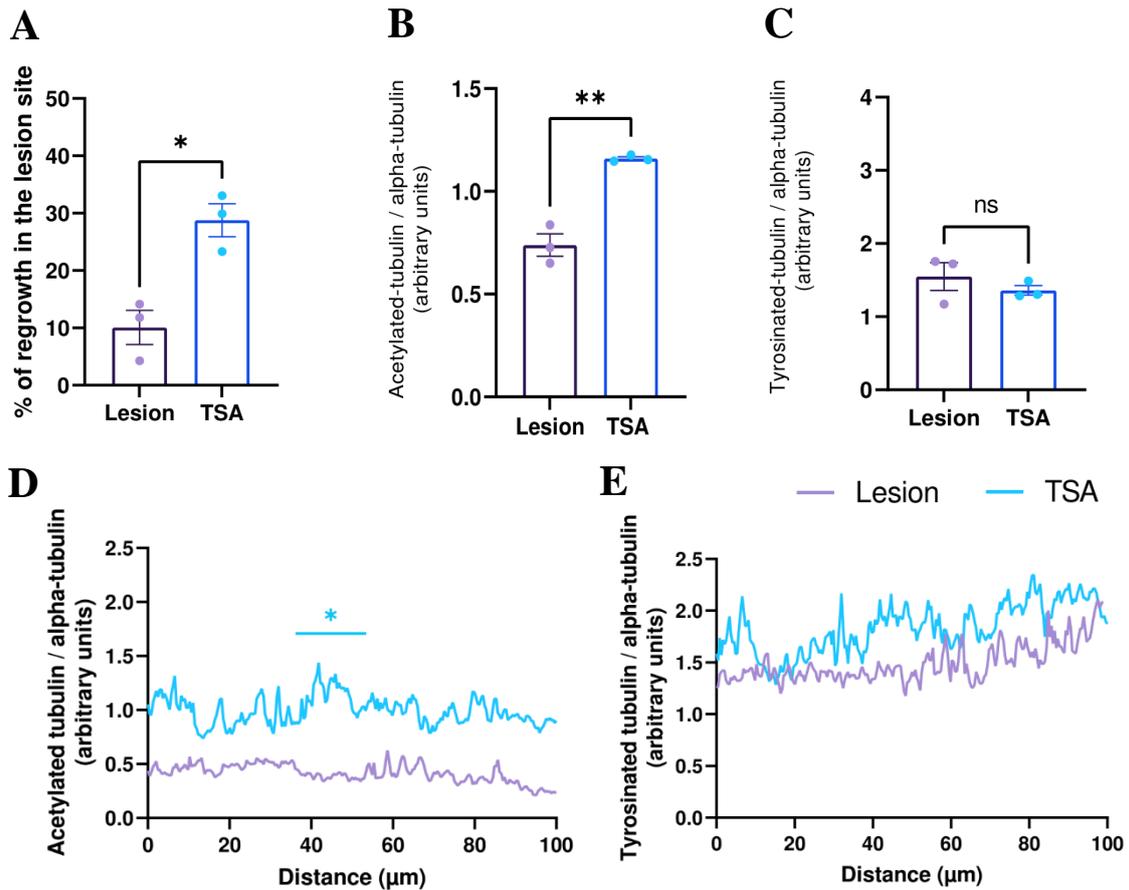


Figure 39 – Quantification de l'effet de l'application de TSA 6 heures après la lésion observée sur le site lésionnel 24 heures après la lésion, sur la régénération (A), l'acétylation et la tyrosination de la tubuline globale (B-C) ou au niveau axonal (D-E). La TSA induit une augmentation de la régénération ainsi qu'une augmentation de l'acétylation de la tubuline, notamment au niveau du corps axonal, sans affecter le niveau de tyrosination de la tubuline. $N=3$; ns= non significatif ; $*p<0.05$ $**p<0.005$; test t de student (A-C) et analyse Anova à deux facteurs avec test post hoc de Sidak.

Compte tenu de l'augmentation de la régénération observée à 48 heures et 96 heures post-lésion en présence de TSA, j'ai analysé les modifications post-traductionnelles des MT associées.

Sans traitement, les rapports de tubuline acétylée par rapport à l'alpha tubuline à 24h et 48h sont similaires (environ 0.7). Ce rapport augmente à 0.9, 96 heures après la lésion. Cela suggère que les axones qui régénèrent acquièrent spontanément un état stable et plus mature. Les rapports de tubuline tyrosinée montrent, eux, des valeurs proches de 2 à 24 heures et 96 heures. En revanche une forte chute, avec un rapport de 0.84, est observée à 48 heures. Il serait attendu des variations de la tyrosination en lien avec celles de l'acétylation selon une balance entre stabilité et dynamique. Un état plus dynamique pourrait également être attendu à 48 heures, en lien avec une amélioration de la

régénération. Toutefois il faut noter qu'à 48 heures après la lésion, les cultures ont tendance à être plus sensibles et à mourir plus facilement, ce qui n'est pas le cas à 96 heures. Cela soutiendrait une stabilisation spontanée et expliquerait ces variations décorréliées à 48h post lésion.

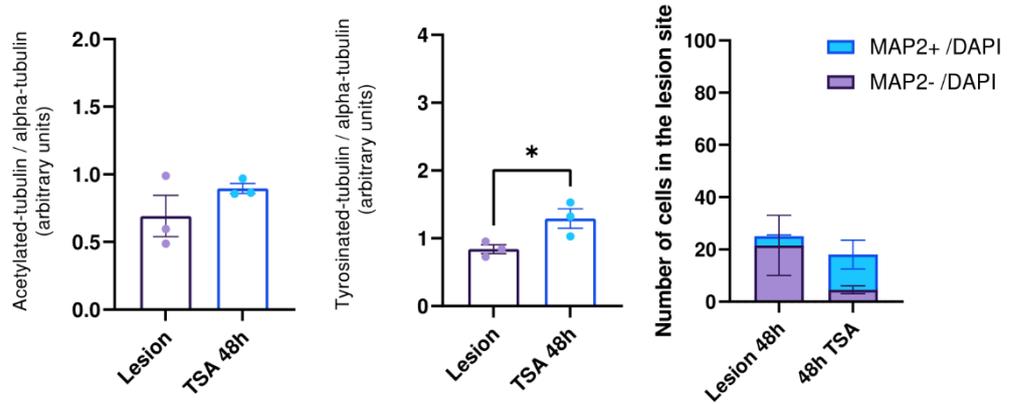
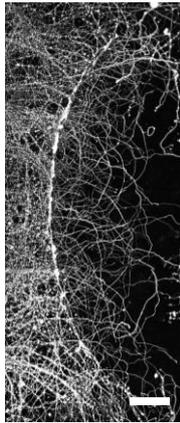
Lorsque de la TSA est appliquée, les résultats montrent qu'à partir de 48 heures après la lésion, l'acétylation ne varie plus par rapport aux contrôles (figure 40). Il est possible que la TSA soit dégradée. Le niveau de tyrosination de la tubuline montre une augmentation transitoire, à 1.29, par rapport au contrôle, à 48 heures après la lésion (figure 40). Puisque la TSA n'affecte pas directement la tyrosination, l'augmentation de l'acétylation du corps de l'axone par le traitement pourrait alors favoriser la polymérisation – puisque les MT tyrosinés sont principalement retrouvés dans des polymères nouvellement formés. Cela coïnciderait avec l'amélioration de la régénération. Toutefois ce niveau est inférieur à ceux retrouvés à 24 heures et 96 heures sans traitement (1.72 et 2.05 respectivement). Toutefois cette analyse est globale, sur l'ensemble du site de lésion, ce qui ne reflète peut-être pas leurs distributions le long de l'axone. Afin de clarifier ces résultats, l'analyse axonale permettrait d'obtenir plus d'informations. Cela est toutefois plus complexe à 48 heures et 96 heures puisque les axones sont moins facilement individualisables.

Par ailleurs, le nombre de cellules totales ayant migrées dans le site lésionnel n'est pas modifié par l'ajout de TSA, ni à 48 heures ni à 96 heures après la lésion (figure 40). En revanche à 48 heures, le nombre de cellules MAP2+ est augmenté par la TSA (14 cellules MAP2+, contre 4 en contrôle). L'effet de la TSA sur la différenciation n'a toutefois pas été analysé. De plus des résultats précédents montrent également la présence de 14 cellules MAP2+ à 48 heures, sans traitement (voir article). Cela renforce l'idée qu'à 48 heures une forte variabilité peut être observée.

Toutefois cela met en avant que les modifications induites dans les premiers stades post-lésionnels permettent d'induire une régénération robuste.

A

48h après lésion



B

96h après lésion

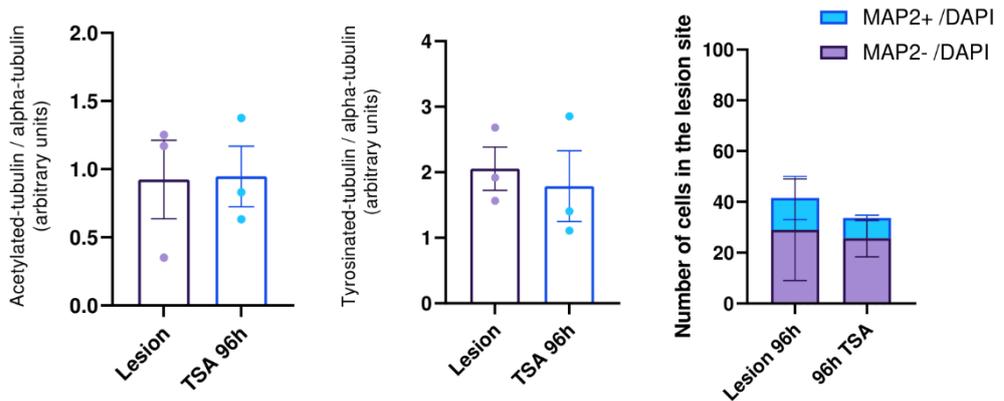
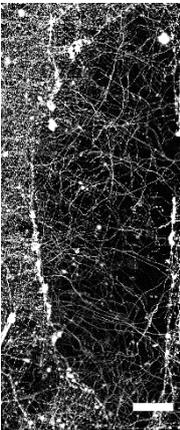


Figure 40 – Effet de la TSA 48 heures et 96 heures après la lésion. Immunomarquage B3-tubuline et quantification sur le site de lésion, de l'effet de la TSA sur l'acétylation et la tyrosination de la tubuline ainsi que sur la migration cellulaire 48 heures après la lésion (**A**) et 96 heures après la lésion (**B**). Au-delà de 24 heures, la TSA ne semble plus affecter l'état de la tubuline, seule une variation transitoire de la tubuline tyrosinée est observée 48 heures post-lésion. Echelle 200µm. N=3 ; * $p=0.046$; test t de student.

Grâce à la compartimentalisation subcellulaire de nos réseaux dans les puces microfluidiques, nous avons testé si les traitements pouvaient avoir une influence en fonction de leur lieu d'application. Aucun effet n'a été observé ni sur les modifications post-traductionnelles de la tubuline des axones en régénération dans le site lésionnel, ni sur la migration des cellules (figure 41A-C). L'action des drogues utilisées serait alors limitée au compartiment axonal. Une autre possibilité est que les modifications post-traductionnelles du compartiment somatique n'induisent pas de changement au niveau axonale.

En revanche, lors de son application proximale, la TSA est la seule à avoir un effet positif sur la régénération (voir article). Puisqu'elle inhibe également les HDAC1 et 2 qui modulent les acétylations des histones, j'ai évalué les variations de l'acétylation de H3 dans les somas des neurones corticaux. Une légère augmentation du degré d'acétylation des histones H3 sur la lysine 27 (H3K27) est observée, passant de 57 % dans les contrôles à 67 % après application de TSA. Cependant, cette augmentation n'est pas significative (figure 41D). Ainsi, bien que l'histone H3 puisse être acétylée et décondensée par la TSA, cela passerait par l'acétylation d'autres acides aminés qui n'ont pas été analysés dans ce travail.

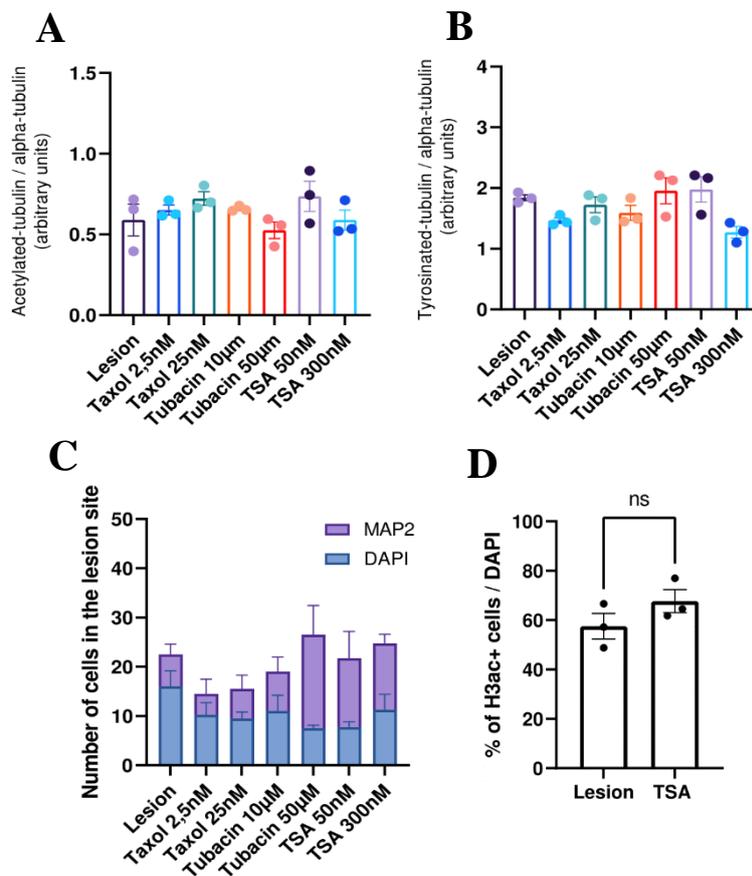


Figure 41 – Quantification de l'effet des traitements appliqués dans la chambre proximale sur l'acétylation (A) et la tyrosination (B) de la tubuline, ou la migration cellulaire (C) au niveau du site de lésion distal. Aucune différence n'est observée lorsque les traitements sont appliqués dans le compartiment proximal. $N=3$; analyse Anova à un facteur (A-B) et deux facteurs (C), avec tests post-hoc de Dunnett. (D) Quantification de l'application de trichostatine A dans la chambre proximale sur le niveau d'acétylation des histones nucléaires H3 des cellules corticales de la chambre proximale. $N=3$; ns= non-significatif ; test t de student.

De manière intéressante, l'application bilatérale de TSA inhibe totalement la régénération, voire même entraîne une fragmentation axonale (figure 42). Ces résultats pourraient cependant être attribués dans notre système à un stress cellulaire, indépendant de la TSA, mais dû au changement de milieu des deux compartiments, induisant la dégénérescence.

Aussi, l'application conjointe de parthénolide et de TSA dans le compartiment distal ne montre pas d'effet positif (figure 42). Bien qu'individuellement, la stabilisation du corps axonal augmente la régénération et que la dynamique de l'extrémité distale augmente le branching, le couplage de ces drogues ne résultent pas en un effet synergique.

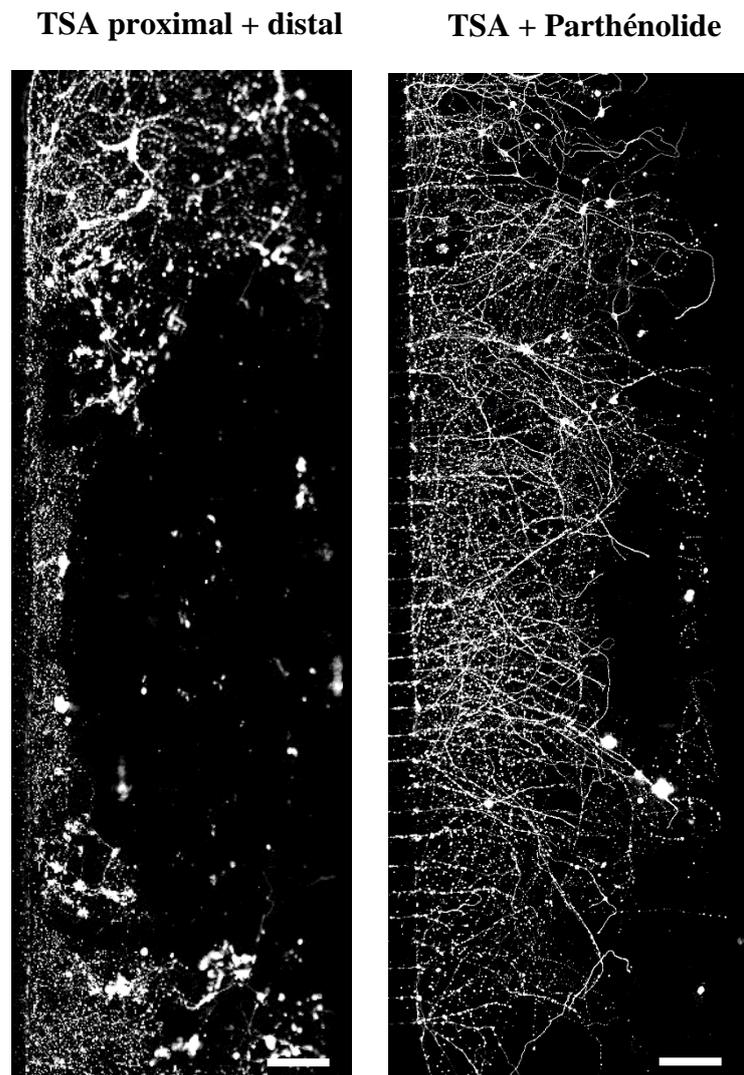


Figure 42 – *Effet de la combinaison de traitements sur la régénération. Immunomarkage B3-tubuline du compartiment distal d'un réseau cortico-spinal 24 heures après une lésion par compression, traitée avec de la TSA appliquée dans les compartiments proximaux et distaux en même temps (gauche), ou de la TSA et de la Parthénolide appliquées en combinaison dans le compartiment distal (droite). La combinaison de traitements ne semble pas améliorer la régénération. N= 1 ; Échelle 200 μ m.*

2.2. Effet du milieu de culture post-lésionnel

Immédiatement après la lésion, la chambre distale est rincée et le milieu de culture remplacé par du Neurobasal supplémenté avec 2% de B27, seul ou contenant les drogues agissant sur les microtubules (voir méthode). Ainsi, ce milieu post-lésionnel ne contient pas les facteurs trophiques (tel que BDNF, GDNF, CNTF, NT3) présents initialement dans le compartiment distal. J'ai donc vérifié si un milieu de culture post-lésionnel enrichi en facteurs trophiques pouvait influencer la régénération axonale. Les résultats préliminaires montrent que sans drogue, la régénération semble améliorée 24 heures après la lésion. Toutefois lorsque la TSA est ajoutée dans ce milieu enrichi, l'envahissement du site lésionnel ne semble pas massivement amélioré (figure 43). L'effet des facteurs trophiques sur la régénération reste donc incertain, bien que ces résultats n'aient été réalisés que sur un faible nombre d'échantillons.

De manière intéressante, l'ajout de TSA dans les deux compartiments simultanés ainsi que l'addition conjointe de TSA et parthénolide dans ce milieu enrichi entraîne une régénération axonale (figure 43). Bien qu'elle ne soit pas améliorée, l'observation d'une régénération dans des conditions où aucune régénération n'était initialement observée semble indiquer que la présence de facteurs trophiques empêche la dégénérescence et facilite la régénération (figure 43).

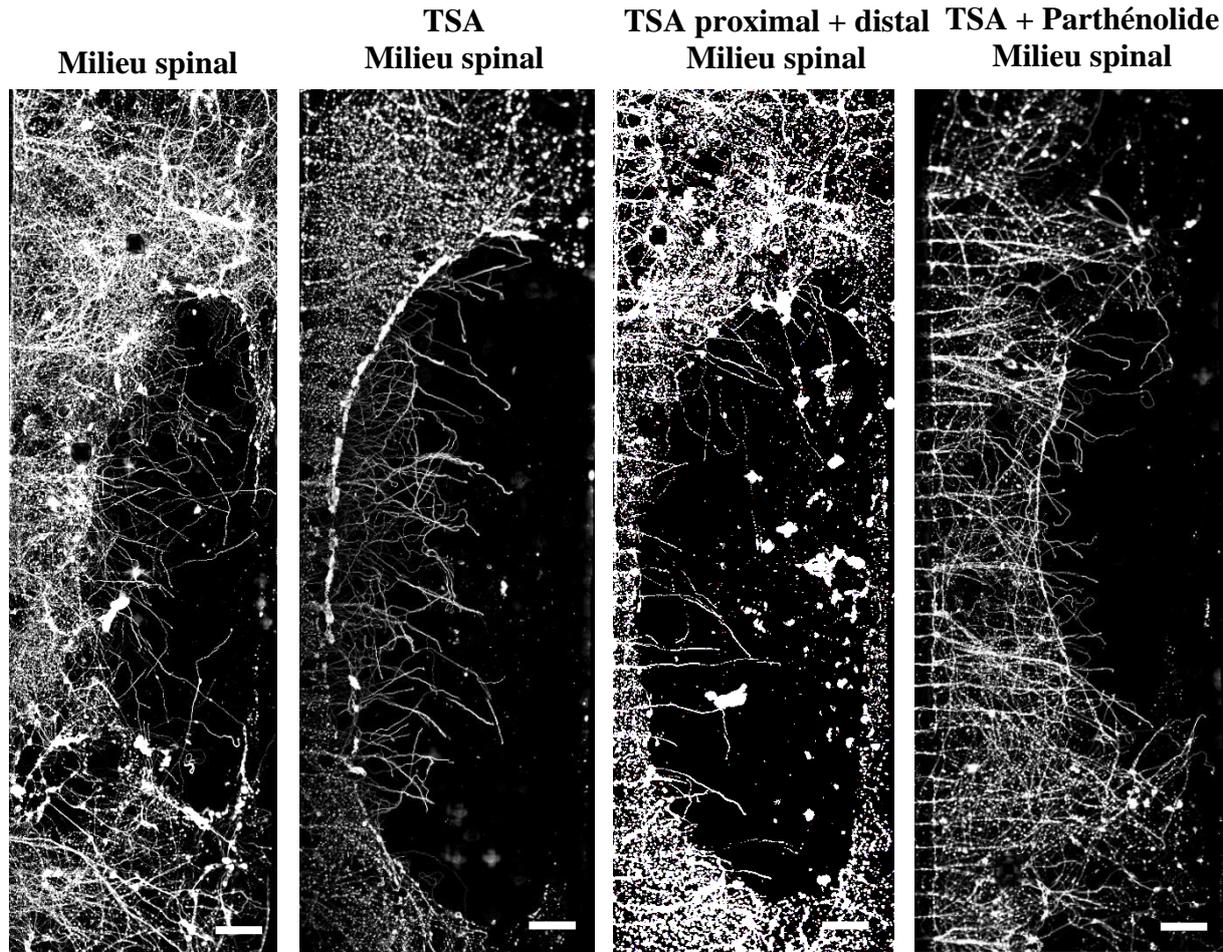


Figure 43 - *Effet des facteurs trophiques sur la régénération. Immunomarquage B3-tubuline du compartiment distal d'un réseau cortico-spinal, 24 heures après une lésion par compression sans traitement mais avec du milieu contenant des facteurs trophiques (milieu spinal), traité avec de la TSA dans un milieu enrichi et appliquée dans le compartiment distal et/ou proximal en même temps, ainsi qu'en combinaison avec de la Parthénolide appliquée dans le compartiment distal. Les facteurs trophiques contenus dans le milieu des neurones spinaux pourraient améliorer la régénération. N= 1 ; Échelle 200 μ m.*

Enfin, au vu des résultats avec l'utilisation d'un milieu enrichi, en parallèle d'observer l'effet morphologique de la régénération, j'ai souhaité analyser la dynamique calcique post-lésionnelle. Dans un premier temps, il est important de noter que les neurones corticaux et spinaux restent désynchronisés et ne retrouvent pas de synchronisation. En revanche, les neurones corticaux en régénération semblent impactés par ce milieu, et montrent une fréquence de décharge particulièrement élevée. Lorsque de la TSA est ajoutée dans ce milieu, la stabilisation de la réponse calcique par la TSA précédemment observée est retrouvée (voir article), et la fréquence corticale est particulièrement élevée (figure 44).

L'augmentation de la fréquence calcique par les facteurs trophiques pourrait être un support à la régénération pour assurer le guidage et à terme la reconnexion des axones en régénération avec leurs cibles.

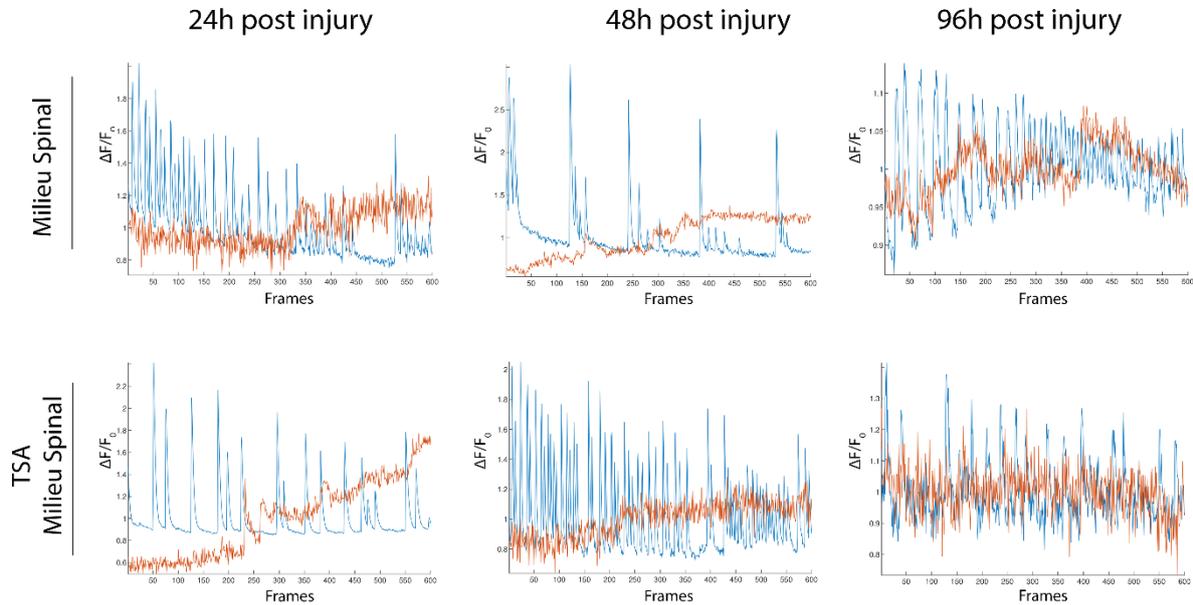


Figure 44 - Effet des facteurs trophiques sur l'activité calcique post-lésionnelle. Analyse représentative des traces calciques des neurones corticaux (bleu) et spinaux (orange) après lésion, obtenu via la sonde Fluo-4AM. Sans traitement dans un milieu spinal enrichi (**haut**) et avec un traitement à la trichostatine A, dans le même milieu enrichi (**bas**). La lésion entraîne une interruption de la synchronisation entre les neurones corticaux et spinaux. Au fil du temps, la population corticale développe des fréquences très élevées aléatoires qui augmentent, sans influencer les neurones spinaux qui restent désynchronisés. La TSA ne semble pas affecter les fréquences d'activités. $N=1$.

3. Optimisation des protocoles

3.1. Système microfluidique

Indépendamment de la mise au point de ce nouveau système, des problématiques liées aux caractéristiques et à l'utilisation de la microfluidique ont été rencontrées, ce qui a conduit à l'optimisation des méthodes de fabrication.

3.1.1. Fabrication des moules en résine polyglass

Les disques de silicium sur lequel les motifs microfluidiques sont fabriqués par photolithographie (voir procédé de fabrication en introduction) sont fragiles et ne sont donc utilisés que pour la production d'un nombre limité de répliques. C'est pourquoi à partir de ces répliques initialement produits, des moules en résine polyglass réutilisables sont réalisés pour la fabrication de nombreuses puces microfluidiques en PDMS (voir introduction figure 30). Cette étape est délicate et nécessite le mélange de résine polyglass 26/71 avec un catalyseur. Ce mélange est coulé dans un moule en silicone contenant des répliques (figure 45) pour reproduire leurs motifs en négatif (voir figure 30 en introduction).

Afin d'éviter que la réaction de polymérisation entre la résine et son catalyseur ne se fasse trop tôt, le mélange s'effectue à température ambiante (20-22°C, correspondant à la température de travail de la résine). De plus, les vapeurs émises étant toxiques, l'ensemble du procédé est réalisé sous une sorbonne. Le catalyseur est déposé sur la surface de la résine (2% v/v), délicatement pour éviter la formation de bulles, puis le mélange est rapidement versé dans les moules en silicone. En raison des motifs microfluidiques étroits, notamment au niveau des microcanaux, des microbulles peuvent apparaître, ce qui provoquera des fissures dans la résine. L'utilisation d'un cône de pipette P200 permet de les retirer. Le moule est ensuite placé dans un four préchauffé à 25°C. La réaction de catalysation étant extrêmement exothermique, la température du four augmentera jusqu'à environ 40°C.

Lorsque cette température est atteinte, le four peut être réglé à 30°C une nuit durant. De cette manière, une fois la réaction de catalyse terminée, la température sera maintenue pour assurer la polymérisation complète de la résine. Le lendemain, le four doit être éteint et la porte maintenue fermée, pour permettre un refroidissement progressif jusqu'à température ambiante. Le moule en résine peut ensuite être retiré du moule en silicone ainsi que les répliques en PDMS. L'ensemble est ensuite enveloppé dans du papier aluminium et remis au four pour une cuisson à haute température avec une augmentation progressive jusqu'à 110°C sur une nuit complète (30°C, 50°C, 70°C, 90°C). Cette étape rend la résine résistante à la chaleur pour la réalisation future des puces microfluidiques qui se fait à 70°C. Il est primordial de *réaliser les montées en température et les refroidissements de manière lente et progressive afin d'éviter des fissures de la résine*. Une fois le four refroidi à température ambiante, le moule est terminé. Il n'est toutefois

pas utilisable, il est d'abord nécessaire de le recouvrir de PDMS qui sera polymérisé à 70°C pendant 3 heures pour éliminer les éventuels débris de résine.

Ainsi pour la réalisation de ces moules, il est nécessaire de prévoir la mobilisation d'une sorbonne sur plusieurs jours, puisqu'après fabrication, le matériel utilisé doit rester sous la hotte, pendant une journée, pour s'assurer que la réaction est complètement terminée avant d'éliminer la résine dans les déchets ménagers (recommandations du fabricant).

Par ailleurs, bien que de nombreux protocoles utilisant ce type de résine utilisent des températures plus élevées (70°C au lieu de 40°C) pour réduire les temps de polymérisation, cela n'est pas recommandé dans le cas de la microfluidique car cela pourrait entraîner des fissures dans les moules contenant des détails fins et précis.

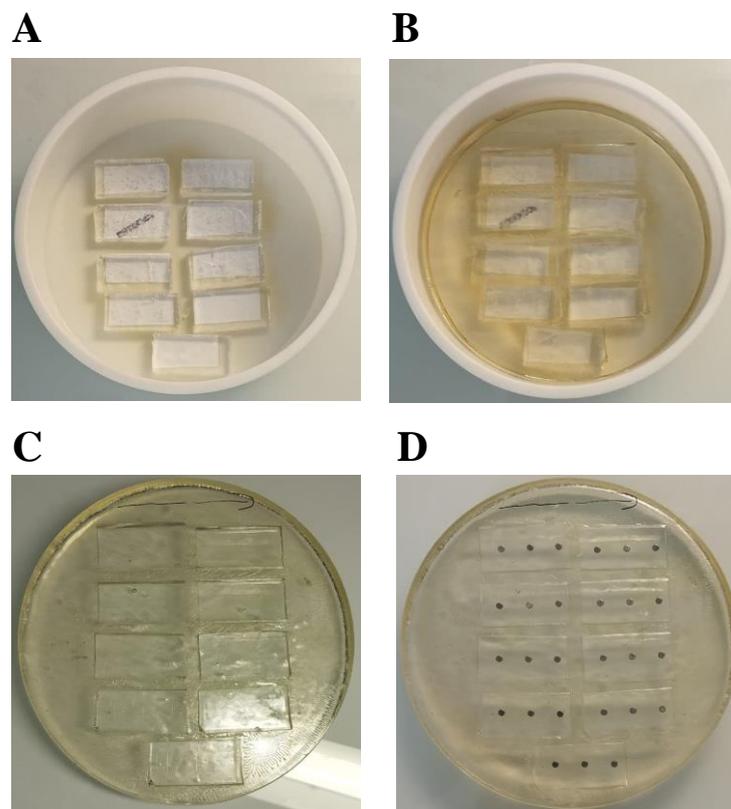


Figure 45 – *Étape de fabrication des moules en résine polyglass. Les répliques en PDMS (rectangles jaunes et blancs) réalisés à partir du disque de silicium sont disposés dans un moule en silicone (ici pot blanc) (A). Le mélange de résine polyglass 26/71 est versé dans le moule en silicone et polymérisé au four en suivant le protocole (B). Après refroidissement le moule en résine est démoulé (C). Une fois nettoyé il peut être utilisé pour la production de nombreux répliques (D) ici un moule permet de réaliser neuf puces en PDMS dans lesquelles des aimants ont été disposés pour permettre une compression.*

3.1.2. Assemblage des puces microfluidiques

Lors de l'étape d'assemblage des puces en PDMS sur des lamelles de verres, il apparaît que le traitement avec un générateur de plasma à air doit se faire dans des conditions bien contrôlées pour assurer son efficacité. En effet, celle-ci dépend de divers paramètres environnementaux, tels que la température, la pression et, surtout, l'humidité de l'air environnant (Chau et al., 2011; Yu et al., 2021). Ainsi, pour assurer une utilisation optimale dans la plupart des conditions météorologiques du laboratoire, notre générateur (Diener, model Atto) est réglé à une puissance de 97 % de sa capacité (puissance maximale de 200 W) et à une durée équivalente à 25 % de la minuterie initialement programmée de 1000 secondes, soit 4,16 minutes. Ces paramètres permettent un fonctionnement quasi quotidien dans un environnement avec une humidité variant de 50 à 80 %. En cas de variations extrêmes de l'humidité (au-delà de 80 % ou en dessous de 50 %), l'efficacité du plasma est moindre. Dans ce cas, les paramètres peuvent être ajustés, mais il est crucial de noter que le traitement au plasma repose sur la création de liaisons covalentes de type -OH en surface. En cas de traitement trop intense ou prolongé, ces liaisons pourraient être compromises (Chau et al., 2011). Ainsi, pour limiter les variations du plasma et assurer un assemblage des systèmes microfluidiques, il est recommandé de ne pas utiliser le générateur en cas de variations environnementales importantes.

3.2. Réalisation des co-cultures cortico-spinales

Notre objectif, qui s'inscrit dans le contexte des lésions du système nerveux central, et plus spécifiquement des lésions de la moelle épinière, porte un intérêt particulier sur le faisceau cortico-spinal. Ce faisceau est le principal relais cortical de l'information motrice volontaire et est particulièrement affecté par ce type de trauma, avec une capacité de régénération limitée. C'est pourquoi nous avons souhaité le reproduire dans nos systèmes microfluidiques, en réalisant des cocultures de neurones corticaux et spinaux d'embryons de souris E14.

Les cultures corticales, déjà mises en place et réalisées en routine au laboratoire, ont pu être reproduites sans difficulté. De plus, des cocultures étaient déjà effectuées dans le laboratoire afin de reproduire, sur système microfluidique, la mise en place de réseaux neuronaux de type cortex-striatum ou cortex-hippocampe (Deleglise et al., 2013; Lassus

et al., 2016; Magnifico, 2013; Peyrin et al., 2011). Les spécificités induites par les cocultures, telles que l'isolation fluide du système ou les densités cellulaires différentielles, sont donc maîtrisées. En effet, pour assurer qu'une proportion suffisante d'axones du compartiment proximal rejoint le compartiment distal, la densité cellulaire doit être adéquate. Une densité trop élevée ou trop faible pourrait induire la mort des cellules. En revanche, j'ai dû optimiser le protocole de culture de neurones spinaux, car elle n'était pas en routine dans le laboratoire.

Pour respecter au mieux la règle des 3R, nous avons décidé de prélever les neurones corticaux et spinaux à partir des mêmes embryons. L'âge embryonnaire E14 chez la souris est à la fois compatible avec le développement des neurones corticaux pyramidaux de la couche 5, ainsi qu'avec celui des motoneurones spinaux, sur lesquels projettent les corticaux. Toutefois pour favoriser la survie des deux populations cellulaires — les neurones spinaux étant particulièrement sensibles — la plupart des préparations ont été faites avec deux expérimentateurs.

3.2.1. Troubleshooting

Pour éviter une mortalité des neurones spinaux 24 heures après l'ensemencement, j'ai identifié de nombreux points critiques à respecter, dans les étapes précoces de la culture:

- a) Lors de la préparation des système microfluidique, il est crucial de réaliser au moins un rinçage au PBS après le coating à la PDL ainsi qu'après le coating à la laminine. Ces traitements, utilisés pour favoriser l'adhésion et le développement des neurones, peuvent laisser des cristaux non dissous particulièrement toxiques pour les neurones spinaux, alors même que les neurones corticaux ne sont pas spécifiquement affectés.
- b) Ensuite, il est recommandé de remplir les chambres microfluidiques avec du milieu Neurobasal pendant au moins 30 minutes pour permettre leur conditionnement (Southam et al., 2013). En effet, si les chambres sont remplies avec du PBS, une mort des cellules spinales est observée, ce qui n'est pas le cas après le conditionnement au Neurobasal.
- c) Une fois les cellules dissociées, les neurones corticaux sont d'abord ensemencés, suivis rapidement après par les neurones spinaux. Les puces microfluidiques sont ensuite incubées à 37° pendant 15 minutes afin d'assurer l'adhésion des cellules

corticales et spinales, avant de compléter l'ensemble des réservoirs avec du milieu.

- d) Afin de maintenir la viabilité des neurones spinaux, il est nécessaire d'utiliser du milieu conditionné par des astrocytes ou de supplémenter le milieu de culture avec du sérum de vœu foetal (SVF) durant les premiers jours de culture. Bien que la littérature rapporte une utilisation de 15% de SVF, 10% sont suffisants, mais 5% sont insuffisants (Stoklund Dittlau et al., 2021a, 2021b).
- e) Les deux milieux de culture doivent être changés, d'après la littérature, 24 heures après l'ensemencement pour retirer le SVF (afin d'éviter un effet toxique) (Schepici et al., 2022; Urzì et al., 2022). Par ailleurs, pour maintenir les cultures sur plusieurs jours, le milieu doit être renouvelé : tous les trois jours pour le milieu spinal (afin assurer la disponibilité des facteurs trophiques), alors que le milieu cortical est renouvelé tous les six jours. En tenant compte de ces exigences, des renouvellements de milieu seraient à réaliser à DIV 1, 4, 6, 7 et 10. Ces manipulations trop rapprochées et récurrentes induiraient un stress répété aux neurones, qu'il est préférable d'éviter. Un compromis compatible avec le maintien des cultures est un renouvellement à :
 - DIV3 : retrait du SVF cortico-spinal et renouvellement du milieu spinal
 - DIV6 : changement du milieu cortical et renouvellement spinal
 - DIV9 : renouvellement du milieu spinal

3.2.2. Viabilité des cultures

Des travaux précédents de l'équipe ont mis en évidence que les axones des neurones corticaux atteignent le canal central à DIV3, rejoignent la chambre distale à DIV5, qui est massivement envahie à DIV8. Cependant, en cas de cultures simples au-delà de DIV10, les axones n'ayant pas de cibles dans le compartiment distal ont tendance à dégénérer spontanément (figure 46A). En présence de cocultures cortico-striataux dans des réseaux microfluidiques, une connectivité fonctionnelle est établie à partir de DIV14, marquée par un nombre croissant de prolongements synaptiques (Peyrin et al., 2011).

Ainsi, les cocultures cortico-spinales ont été maintenues initialement pendant 14 jours, afin d'assurer une connectivité fonctionnelle du réseau. Cependant, un marquage B3-tubuline montre de nombreux fractionnements et le tapis cellulaire présente des trous indiquant une mort cellulaire partielle (figure 46B). Notre objectif étant d'observer le

devenir post-lésionnel des axones, il serait difficile de distinguer l'effet de la lésion d'un vieillissement de la culture. Nous avons donc observé l'état des cultures plus tôt. A Div9, aucun signe de fragmentation axonale n'est observé (figure 46C). Cette durée de culture a donc été caractérisée et conservée pour les expériences de lésion sur les cocultures cortico-spinales (voir article).

Différents marquages réalisés à Div9 (figure 47A) montrent dans les cocultures la présence de neurones et astrocytes morphologiquement intacts (figure 47 A et C). À DIV13, bien que le réseau reste développé de manière similaire (figure 47B), la B3-tubuline commence à présenter un marquage irrégulier et ponctiforme (figure 47D). Nous avons donc réalisé une quantification de la survie des neurones via un marquage « Live/Dead ». Nous observons que le taux de survie des neurones corticaux et spinaux est initialement de 80 à 90% respectivement à Div9, chute jusqu'à 50% pour les neurones corticaux et à 75% pour les neurones spinaux à Div13 (figure 47E). Les cultures peuvent donc être maintenues jusqu'à 13 jours avant de se dégrader, ce qui pourrait être attribué à une sensibilité des neurones spinaux ainsi qu'à une dégénérescence des neurones corticaux non connectés.

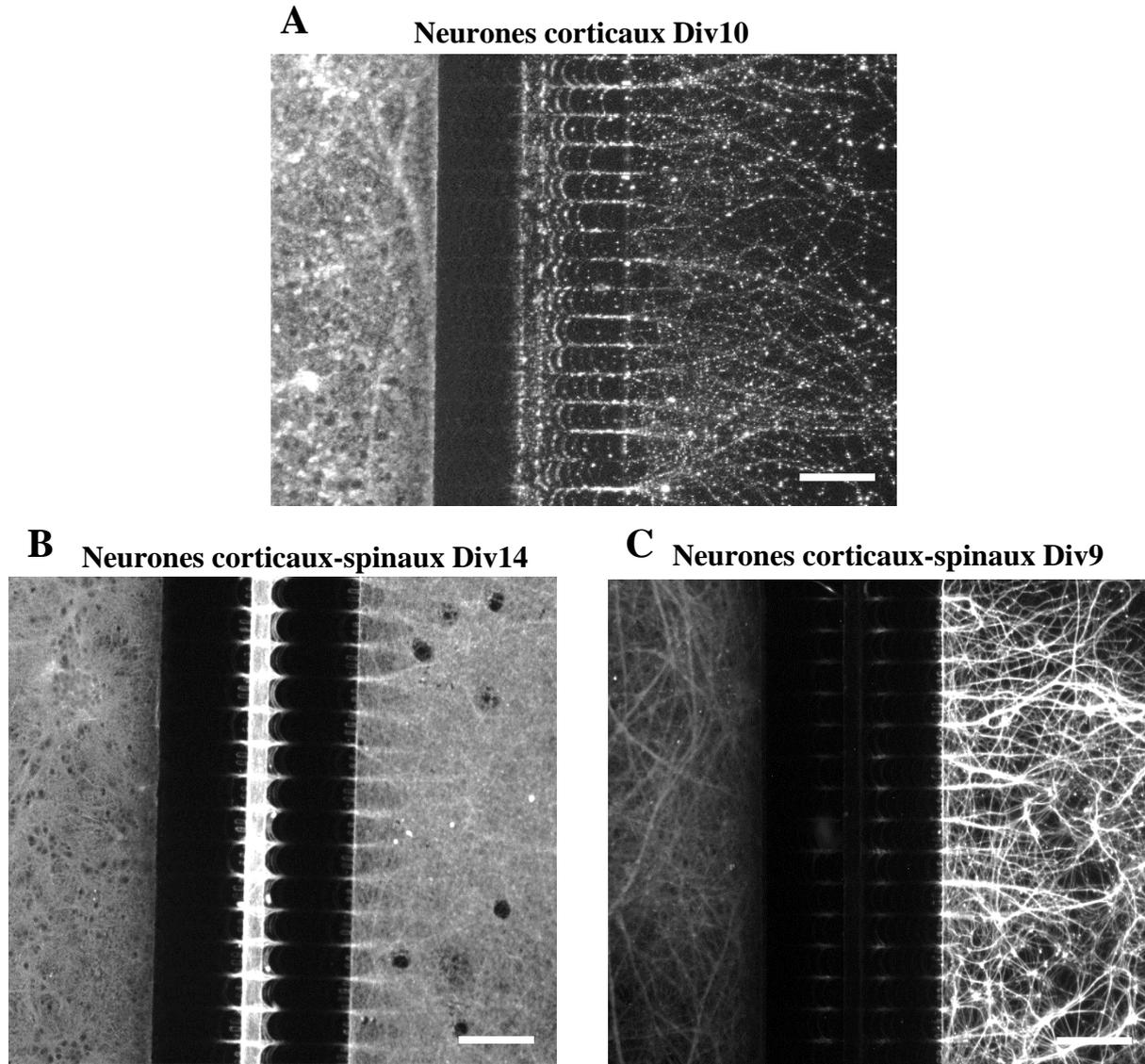


Figure 46 – *Survie des cultures au cours du temps. Marquage B3-tubuline de cultures de neurones corticaux d'embryons de souris E14 à Div10 (A), de neurones cortico-spinaux à Div14 (B) et à Div9 (C). Les cultures corticales dégénèrent dès Div10, alors qu'en coculture, les réseaux peuvent être maintenus jusqu'à DIV13 où les premiers signes de dégénérescence apparaissent. Échelle 200µm.*

Une fois la lésion appliquée, la zone d'impact est parfaitement délimitée à la zone ciblée par les aimants et ne varie pas dans le temps (figure 48 A-C). Compte tenu de la fragilité du réseau et afin de confirmer que les cultures peuvent être suivies jusqu'à 96 heures après la lésion, nous avons réalisé les mêmes tests de survie que précédemment. Immédiatement après la lésion, le taux de survie des neurones corticaux et spinaux reste d'environ 80 %. Bien que non significatif, 24 heures après la lésion le taux de survie des neurones corticaux diminue à 48%. Au cours du temps, la survie des neurones spinaux

n'est pas affectée, alors que les neurones corticaux ont un taux de survie de 43 % à 96 heures post-lésion (figure 48D). Le suivi post-lésion a donc été réalisé jusqu'à 96 heures après la lésion réalisée à Div9, soit Div13.

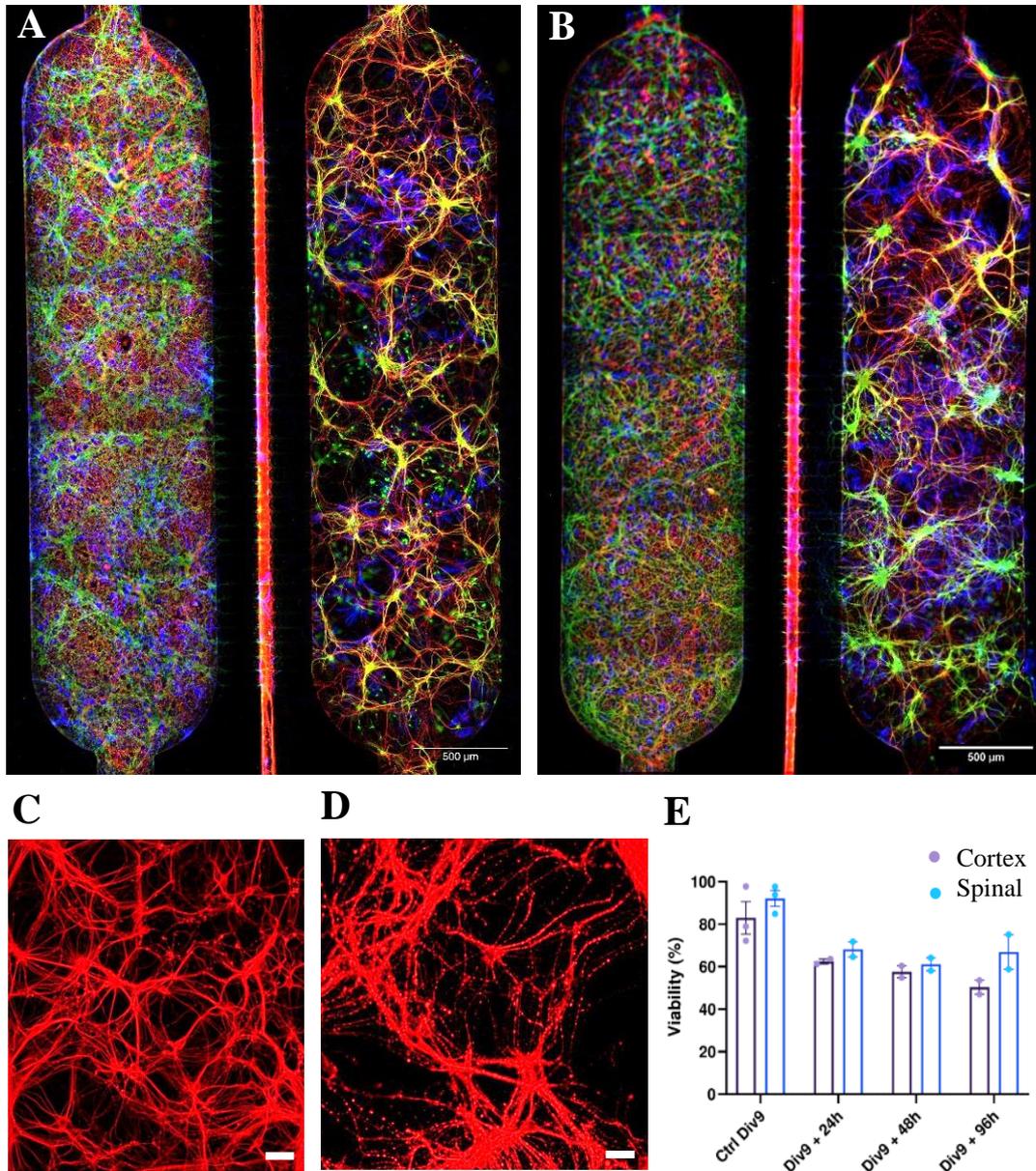


Figure 47 – Viabilité des cocultures cortico-spinales au cours du temps. (A-B) Triple immunomarquage B3-tubuline (rouge), MAP2 (vert), GFAP (bleu) de cultures cortico-spinales à Div9 (A) et Div13 (B). Échelle 500µm. À 9 jours, les axones corticaux ont envahi le compartiment distal, les corps cellulaires sont maintenus dans chacune des chambres microfluidiques et les populations neuronales s'accompagnent de cellules gliales. (C-D) Immunomarquage B3-tubuline dans le compartiment distal à Div 9 (C) et Div 13 (D). Échelle 20µm. Avec le temps, les axones se fragmentent. (E) Quantification de la viabilité des neurones corticaux (violet) et spinaux (bleu) au cours du temps. N=2-3. Avec l'âge, les neurones corticaux et spinaux ont tendance à mourir, tout en maintenant une viabilité d'environ 50% à Div13 (soit Div9 + 96h).

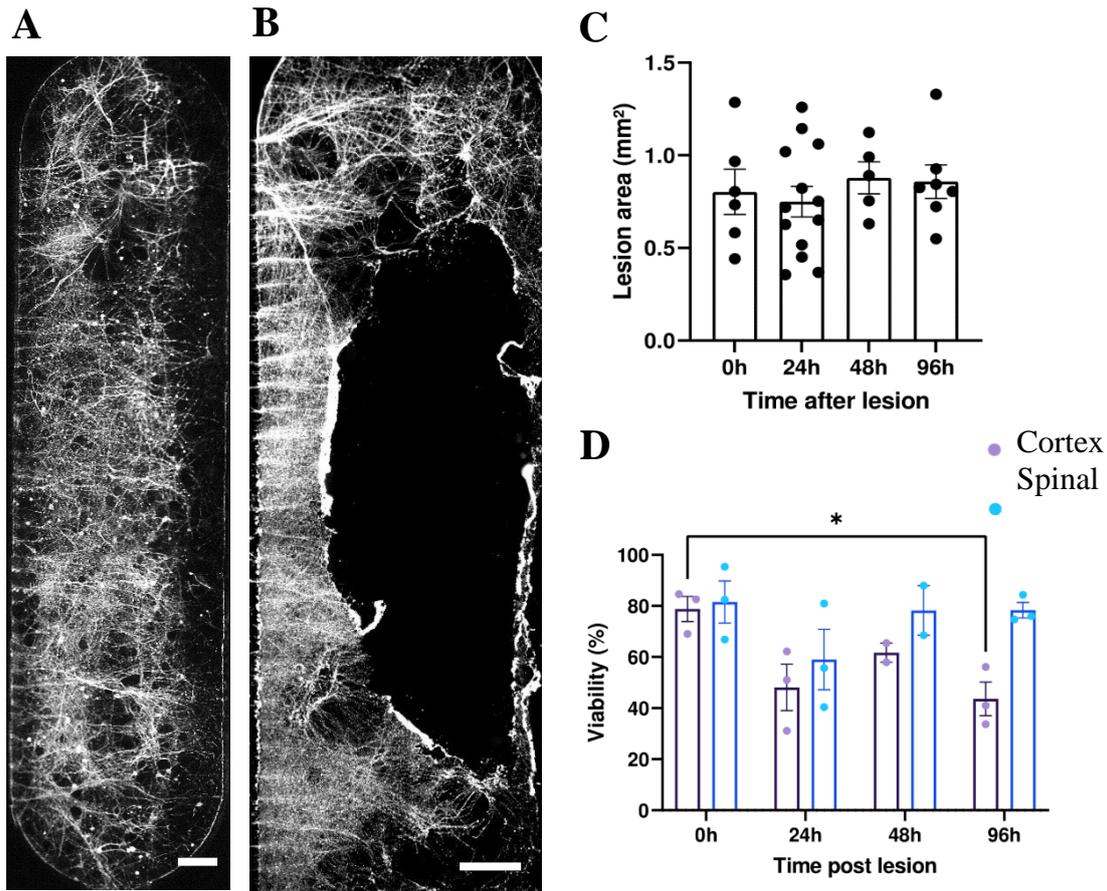


Figure 48 – Lésion mécanique par compression appliquée à un réseau cortico-spinal de neurones de souris E14. Marquage B3-tubuline, avant lésion, à Div9 (**A**) et immédiatement après la lésion (**B**). Échelle 200µm. On observe un site lésionnel clairement délimité et dépourvu d'axones. La quantification de la taille du site de lésion à différents temps après la lésion montre une aire de lésion constante et reproductible (**C**), sans différence significative, $N= 5-6$, analyse Anova à un facteur avec test post-hoc de tukey. (**D**) Quantification de la viabilité des cellules corticales (violet) et spinales (bleu) après la lésion. La viabilité cellulaire diminue 24 heures post-lésion et est accentuée à 96 heures post-lésion pour les cellules corticales ; $N= 2-3$; $*p<0.05$; analyse Anova à deux facteurs avec test post-hoc de Sidak.

III. Expérimentations annexes

En parallèle, l'une des approches abordées par l'équipe concerne la mise au point de stratégies thérapeutiques pour la réparation du trauma dans le système nerveux. Un intérêt particulier a notamment été porté à l'utilisation d'un agent neuroprotecteur (NP) ciblant la mitochondrie. J'ai eu l'opportunité de m'impliquer dans cette étude en cours. J'y ai contribué, d'une part, dans l'étude de son effet *in vivo* sur deux modèles de lésion (hémisection et contusion). J'ai réalisé l'analyse comparative de l'étendue de la lésion sur des animaux traités et non-traités ; un paramètre permettant d'évaluer un éventuel effet neuroprotecteur. D'autre part, après la mise au point de mon système de lésion *in vitro* en microfluidique et afin de valider l'intérêt du modèle, j'ai initié l'étude de l'effet de cette molécule *in vitro* sur des cocultures cortico-spinales. Les résultats préliminaires suggèrent que son application pendant 24 heures permet une augmentation significative de la régénération axonale (Figure 49A-B). De plus, l'utilisation de cette molécule après une lésion permet de restaurer le transport des mitochondries à un niveau contrôle (Figure 49C).

Ces résultats confirment l'importance des mitochondries dans le devenir post-lésionnel des axones et la neuroprotection après un trauma. Ils suggèrent également l'intérêt d'approfondir les mécanismes d'action de la molécule neuroprotectrice sur la fonction mitochondriale (viabilité, phénomène de fusion/fission). Compte tenu du lien entre le transport mitochondrial et les microtubules précédemment observé avec la trichostatine A, il pourrait également être envisagé de les combiner.

L'utilisation de cette molécule neuroprotectrice fait partie du travail de thèse en cours d'Alice Gaussoit dans l'équipe. Les données issues de mon implication seront incluses dans la publication liée à ce travail.

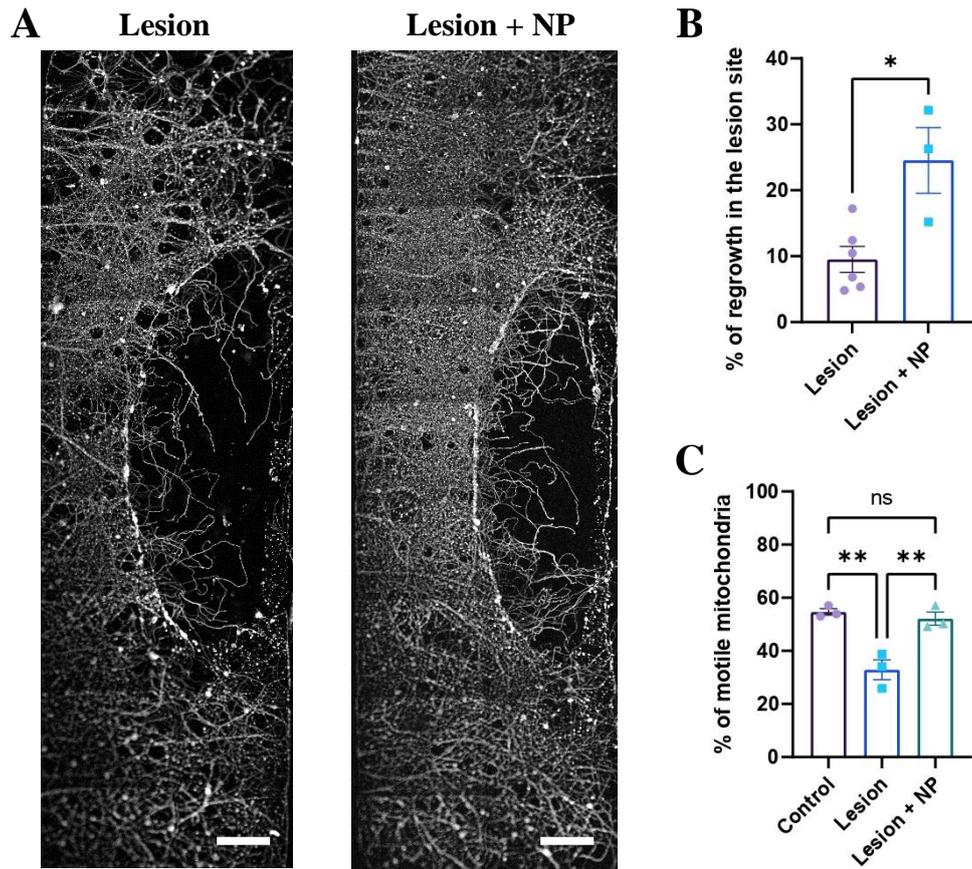


Figure 49 – Effet du traitement neuroprotecteur sur la régénération axonale. Immunomarquage B3-tubuline du compartiment distal d'un réseau cortico-spinal 24 heures après lésion par compression, sans traitement (Lesion) et après traitement avec une molécule neuroprotectrice (NP) dans le compartiment distal (A) et quantification de la régénération axonale dans le site lésionnel (B). Échelle 200 μ m. N= 3-4 ; $p = 0,0105$; test t de student. (C) Quantification de la motilité mitochondriales par rapport au nombre total de mitochondries viables, dans des axones contrôles/non lésés, ou en régénération 24 heures après la lésion, traités ou non avec une molécule neuroprotectrice. Celle-ci permet une amélioration de la régénération axonale, qui est également associée à une augmentation de la dynamique mitochondriale. N=3 ; ns= non significatif ; ** $p < 0.005$; analyse Anova à un facteur avec test post hoc de tukey.

| **Discussion**

Dans cette étude, nous avons pu mettre en place un modèle de cocultures de neurones corticaux-spinaux connectés dans un système de lésion microfluidique par compression, pertinent pour l'étude du rôle des MT dans la régénération axonale. J'ai ainsi pu mettre en évidence une amélioration de la régénération sous l'effet de l'acétylation par la TSA, à court et plus long terme, ainsi qu'une restauration du transport des mitochondries post-lésionnel. Cependant, malgré les bénéfices observés une restauration de la connectivité fonctionnelle n'a pas été obtenue.

Pour nos cultures, l'utilisation de neurones embryonnaires de souris E14 permet d'obtenir les cellules d'intérêt formant le faisceau CST simultanément à partir des mêmes embryons. À savoir les neurones pyramidaux de la couche corticale V et les motoneurones spinaux sur lesquels ils projettent (Arlotta et al., 2005; Ballout et al., 2016; Hevner, 2007; Molyneaux et al., 2007). Les types cellulaires présents dans nos cultures ont été identifiés grâce aux marqueurs corticaux CTIP2 et spinaux ChAT. Au niveau de la moelle épinière, le marqueur ISL1 couramment utilisé dans la littérature est surtout exprimé chez les motoneurones immatures et les interneurones dl3 (Avraham et al., 2009; Hernandez-Miranda et al., 2017; Ueno et al., 2018), alors que ChAT est préférentiellement retrouvé dans les motoneurones matures (Gotts et al., 2016; Johns and Maragakis, 2022; Rigamonti et al., 2016; Sances et al., 2016; Steinbeck et al., 2016). Ainsi, bien que nous utilisions des neurones embryonnaires, l'utilisation de ChAT permet de mettre en évidence la présence de cellules d'intérêt matures.

Nous avons également retrouvé dans chacun des compartiments d'autres populations cellulaires et interneurones (neurones glutamatergiques et gabaergiques, cellules non-neuronales GFAP positives) également présents dans les populations cortico-spinales *in vivo*, sans pour autant faire une caractérisation exhaustive (Côté et al., 2018; Gu et al., 2017; Hughes and Todd, 2020; Markram et al., 2004; Paixão et al., 2019; Pedroni and Ampatzis, 2019; Takuma et al., 2002). *In vivo* chez la souris les axones des neurones corticospinaux de la couche V projettent sur les interneurones spinaux avant de se connecter aux motoneurones (Gu et al., 2017; Paixão et al., 2019; Ueno et al., 2018). Malheureusement, dans mon système, nous n'avons d'une part pas pu identifier sur quels types cellulaires les neurones corticaux projettent dans le compartiment spinal et dans quelles proportions, ni quels types de neurones corticaux projettent réellement dans le compartiment distal. D'autre part nous n'observons pas la présence de microglie. Ces cellules apparaissent dans le SNC à partir de E12, il serait donc attendu de les observer. Cela indique que notre modèle est un réseau assimilable à un faisceau cortico-spinal, mais simplifié.

Compte tenu de l'âge embryonnaire des neurones utilisés, notre réseau peut être considéré comme immature. Cela dépend néanmoins de la définition attendue de la maturité (connectivité, nombres de synapses, âge des neurones...). Pour répondre à ce critère, l'utilisation de neurones adultes *in vitro* n'est pas possible — à l'exception des DRG, qui possèdent des propriétés différentes. Les cultures de neurones postnataux quant à elles, ne peuvent pas être maintenues à long terme. D'autre part, bien que les systèmes *in vitro* peuvent être prédictifs (Morrison et al., 2011), ils ne reflètent pas fidèlement la complexité *in vivo*. Nous avons donc fait le choix d'un système répondant à nos attentes afin d'adresser nos objectifs. Notre souhait était de réaliser un système viable, mature et reproductible afin d'étudier la régénération et non la croissance. Nous avons pour cela évalué plusieurs paramètres, tel que le développement des neurones, la connectivité et la survie des cellules.

Dans ce contexte, maintenir nos réseaux pendant neuf jours de culture semblait idéal et correspondait à nos attentes. En effet, l'activité synaptique étant un préalable essentiel pour valider la formation de réseau (Peyrin et al., 2011), et pour s'assurer de l'établissement d'une connectivité entre les neurones du cortex et de la moelle épinière, nous avons réalisé des imageries calciques non-ratiométriques. Dans notre système, des neurones spinaux en culture seuls ne présentent pas d'oscillation spontanée. En revanche, lorsque connectés à des fibres corticales, les deux populations acquièrent des oscillations calciques synchrones dès Div9. De plus, la stimulation des neurones corticaux par de la bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA, affecte la dynamique spinale. Bien qu'il soit déjà rapporté que des neurones corticaux en culture seuls montrent des oscillations calciques spontanées, provenant d'une connectivité intra-corticale (Lassus et al., 2016; Peyrin et al., 2011), l'activation des neurones spinaux en réponse à une stimulation des neurones corticaux traduit un transfert des oscillations. Cette connectivité est confirmée par des marquages des protéines pré- et post-synaptiques.

Bien que les axones corticaux sont présents dans la chambre spinale, et que dans un tel modèle *in vitro*, un nombre limité d'axones connectés est suffisant pour établir une synchronisation globale, des résultats précédents de l'équipe montrent une connectivité fonctionnelle à partir de 14 jours de culture, pour des réseaux cortico-striataux (Deleglise et al., 2013; Peyrin et al., 2011). Les neurones corticaux-striataux et striataux *in vivo* chez la souris se développent dès E12.5 mais n'établissent de synapses qu'à P3-P4 (Mesías et al., 2023). Les neurones corticospinaux et spinaux se développent également à partir de E12,5 et font des synapses vers P0-P2 (Welniarz et al., 2017). Ainsi par rapport aux résultats de l'équipe, la connectivité obtenue à Div9 est inattendue pour un système in

vitro. Cela pourrait s'expliquer par les milieux de culture utilisés. La littérature comparant un milieu enrichi tel que le « Brainphys » ou un milieu « Neurobasal » enrichi en facteurs trophiques, par rapport à d'autres milieux non enrichis (Neurobasal seul), démontre que l'enrichissement du milieu permet une maturation axonale et synaptique (Satir et al., 2020). Dans nos cultures, lorsque des neurones corticaux sont ensemencés avec un milieu neurobasal-B27 contenant les mêmes facteurs trophiques que ceux du milieu spinal (GDNF, BDNF, CNTF, NT-3), leurs axones atteignent la chambre distale en trois jours, contre cinq dans un milieu Neurobasal-B27 sans facteur. Ainsi, dans nos cocultures et par rapport à d'autres résultats, l'effet des facteurs trophiques du milieu de culture de la chambre spinale pourrait être à l'origine d'une maturité synaptique accélérée, puisque les neurones spinaux connectés montrent des signaux calciques de motoneurones matures, avec une dépolarisation et une repolarisation rapide et nette par rapport à un signal plus lent dans un état immature (Sances et al., 2016).

En résumé, notre système permet la reconstruction d'un réseau cortico-spinal, simplifié, unidirectionnel dans lequel les neurones post-synaptiques sont fonctionnellement connectés aux fibres corticales. La mise en place de ces cultures représente un défi, mais peut être réalisée avec succès en tenant compte des spécificités des différentes populations neuronales.

Le développement fiable et reproductible de lésion mécanique dans un contexte microfluidique étant crucial pour avancer dans l'étude des réponses neuronales aux lésions et pour simuler plus précisément les conditions physiologiques et pathologiques, nos résultats montrent plusieurs avancées et défis.

Les méthodes chimiques de lésion, bien qu'efficaces pour réaliser une axotomie, ne sont pas toujours pertinentes selon les objectifs, comme dans notre étude. Les méthodes mécaniques, plus proches des conditions *in vivo*, nécessitent des systèmes précis et reproductibles pour appliquer des lésions contrôlées. Ainsi, le système de Yap et al., basé sur la déformation d'une membrane de PDMS, offre une méthode prometteuse pour induire des lésions par étirement. Cependant, les défis liés à l'assemblage, l'alignement des canaux et à l'épaisseur de la membrane soulignent la complexité technique de cette approche. Notre nouvelle méthode utilisant des aimants pour écraser localement la puce, dont la caractérisation de la déformation démontre un effet mécanique attendu, représente un outil à la fois pour le domaine des lésions de moelle épinière mais également pour d'autres pathologies dans lesquelles un trauma axonal est observé. Il n'est toutefois pas exclu que, lors de la lésion, des flux de milieu soient induits dans le compartiment,

provoquant en plus d'une axotomie complète, des forces de cisaillement sur l'ensemble du compartiment.

Au vu de nos objectifs, nous avons appliqué la lésion dans la chambre distale réceptrice, à la sortie des microcanaux, contenant des axones corticaux connectés aux cellules spinales. L'observation du site lésionnel suggère un réarrangement axonal, avec une régénération axonale dès 24 heures post-lésion, jusqu'à 96 heures, par rapport au contrôle. Cependant, deux sources d'axones sont retrouvées dans le site lésionnel — corticaux et spinaux. Il est possible de distinguer en partie les neurones corticaux grâce à la transduction GFP, toutefois le vecteur viral utilisé ne transduit que 80% des fibres. Il reste également impossible de différencier les axones corticaux en régénération de ceux qui terminent leur croissance dans le compartiment distal. Cela constitue une limite principale du modèle, c'est pourquoi maintenir les cultures pendant 9 jours permet un développement avancé des axones corticaux dans la chambre distale. De plus, dans nos systèmes, les axones corticaux non connectés après 10 jours commencent à dégénérer spontanément. Ainsi, il est envisageable que s'ils n'avaient pas rejoint le compartiment spinal jusqu'alors, leur survie ne soit pas garantie.

Afin de répondre à ces limites et afin de mieux identifier le devenir des différentes projections, il pourrait être envisagé l'utilisation de modèles transgéniques, tels qu'une souris CTIP2-GFP pour étudier la régénération spécifique du CST, ou la souris ISL1-YFP pour identifier les motoneurones spinaux. Nous n'avons toutefois pas eu l'opportunité de cette mise au point, alors même que nous validions ce nouveau modèle.

Afin de suivre le devenir post-lésionnel, nous avons déterminé les temps de cultures optimaux. Le maintien de nos cultures pendant 14 jours avant lésion, comme des travaux précédents de l'équipe, n'est pas applicable dans notre cas en raison de la fragilité des types cellulaires et une dégénérescence spontanée — lors de la mort spontanée des neurones spinaux particulièrement sensibles, les neurones corticaux alors non connectés vont à leur tour dégénérer. Nous avons observé qu'il est possible de maintenir nos cultures neuf jours avant d'y appliquer une lésion et de suivre le devenir axonal pendant 96 heures post-lésion. Puisqu'à ce stade, l'architecture et la viabilité des cultures restent stables. Au-delà, la dégénérescence spontanée du réseau pourrait impacter nos résultats. En effet, nous observons 96 heures après la lésion une diminution de la viabilité des neurones corticaux. Cela pourrait s'expliquer par une perte de connexion de certains neurones corticaux déconnectés par la lésion, qui dégèrent alors spontanément, comme c'est le cas dès dix jours dans des cultures corticales dépourvues de cibles.

Une fois notre modèle établi et caractérisé, nous avons pu moduler l'état du réseau de MT afin d'observer son effet sur la réponse post-lésionnelle. Pendant le développement et la croissance, les microtubules jouent un rôle crucial pour assurer l'architecture cellulaire et le trafic intracellulaire. Ces fonctions sont permises par un réseau en constante évolution, dans lequel le corps axonal reste stable, tandis que l'extrémité axonale contenant le cône de croissance doit être dynamique pour naviguer dans l'environnement et atteindre sa cible (Lowery and Vactor, 2009). Suite à une lésion, la stabilisation des microtubules pourrait aider à restaurer le réseau et à promouvoir la régénération axonale (Blanquie and Bradke, 2018; Bradke et al., 2012; Hellal et al., 2011; Ruschel et al., 2015).

Toutefois d'autres travaux montrent des résultats contradictoires sur le rôle de la stabilisation et du lien entre la stabilisation et les modifications de la tubuline. En effet, des études montrent que suite à une lésion, le réseau de MT est désorganisé et hyperacétylé, de ce fait sur-exprimer l'enzyme de désacétylation HDAC6 ou inhiber l'alpha-TAT responsable de l'acétylation, permettrait d'induire un réseau plus labile et moins modifié, vers un phénotype développemental (Lin et al., 2015). Par ailleurs, Riviaccio et al. ont montré qu'une lésion induit une surexpression d'HDAC6, et que son inhibition permettrait de promouvoir la survie neuronale et la régénération (Riviaccio et al., 2009). D'autres études sur des lésions du nerf optique révèlent qu'un trauma n'a pas d'effet sur le niveau d'acétylation de la tubuline dans le SNC, alors que le SNP lésé montre un taux de tubuline désacétylée augmenté, nécessaire à la régénération (Cho and Cavalli, 2012). Enfin, il a été démontré que la désorganisation du cytosquelette entraîne la formation d'un bulbe de rétraction et la stabilisation par le Paclitaxel induit une diminution de ce bulbe et une augmentation de la régénération (Ertürk et al., 2007). Afin de clarifier ces interactions, nous avons souhaité tester des drogues qui stabilisent les MT (tel que le Paclitaxel ou l'épothilone) et des drogues qui affectent les modifications de la tubuline, afin d'observer leur effet sur la capacité des axones à régénérer. Cette approche novatrice permettra de mieux comprendre, voire combler certaines lacunes actuelles, des mécanismes de la régénération axonale après une lésion de la moelle épinière, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Nous avons étudié dans un premier temps l'effet du Paclitaxel, une molécule stabilisant le cytosquelette de MT, sur la régénération axonale. Récemment, le Paclitaxel a été utilisé *in vivo* avec succès pour promouvoir l'extension axonale en stabilisant l'assemblage des microtubules (Liu et al., 2023). Après une lésion de la moelle épinière, les axones endommagés forment rapidement un cône de rétractation à l'extrémité distale et la stabilité de la tubuline diminue, ce qui entrave la régénération axonale. Liu et al. ont

inversé ce processus *in vitro* par l'ajout de Paclitaxel, augmentant ainsi la régénération axonale. Ils ont, en parallèle, examiné les effets du Paclitaxel à faible dose sur la différenciation des cellules souches neurales (CSN) *in vitro* et sur la récupération fonctionnelle *in vivo* chez des rats lésés. Leurs résultats *in vitro* montrent que le Paclitaxel à faible dose favorise la différenciation des CSN en neurones et l'extension de leurs axones. *In vivo*, le Paclitaxel favorise l'expression de β III-tubuline dans la lésion de la moelle épinière et améliore la récupération motrice. En revanche, l'étude *in vitro* de Liu et al. utilise des types de neurones différents des nôtres, dont des DRG adultes. Des travaux utilisant également la microfluidique ont montré que le Paclitaxel appliqué à l'extrémité distale des axones induit une toxicité et une dégénérescence, même sur des neurones de DRG (Gornstein and Schwarz, 2017). Cet effet n'est pas retrouvé lorsque le Paclitaxel est appliqué dans le compartiment somatique (Gornstein and Schwarz, 2017; Yang et al., 2009). Dans mon système, appliqué immédiatement après la lésion dans le compartiment distal, le Paclitaxel a un effet négatif sur la régénération des axones, en nombre et en longueur. Lorsque appliqué dans le compartiment proximal nous n'observons pas d'effet significatif du Paclitaxel sur la régénération. Cela rejoint les résultats de la littérature en microfluidique.

Bien que le Paclitaxel à faible dose soit considéré sans danger pour une utilisation clinique, il est important de noter que des doses plus élevées peuvent entraîner des effets secondaires indésirables, tels que des neuropathies périphériques, un effet neurotoxique et hyper-stabilisateur du réseau de microtubules (Bollag et al., 1995; Gornstein and Schwarz, 2017; Klein and Lehmann, 2021; Mitra and Sept, 2008). Ainsi, cet agent pourrait agir en stabilisant les microtubules directement au niveau de l'extrémité axonale distale, empêchant leur polymérisation (Klein and Lehmann, 2021), ce qui rend la repousse axonale impossible : le cône de croissance n'est alors plus capable de croître avec des MT hyperstables.

Il a été démontré que le Paclitaxel impacte également le trafic intracellulaire lié aux microtubules. En effet, le Paclitaxel réduit la vitesse rétrograde des mitochondries dans les nerfs périphériques et bloque le transport antérograde et rétrograde des mitochondries dans les neurones des DRG (Rovini et al., 2011)). Cela suggère que la stabilisation des microtubules joue un rôle clé dans le transport des organites cellulaires. Rovini et al. ont principalement étudié l'hypothèse selon laquelle les modifications post-traductionnelles de la tubuline influencent l'interaction entre les moteurs moléculaires et les microtubules. Les microtubules détyrosinés et acétylés favoriseraient la liaison de la protéine motrice kinésine-1, responsable du transport antérograde des mitochondries le long des axones. Le Paclitaxel appliqué sur des nerfs périphériques compromet le trafic intracellulaire en

empêchant la translocation de cette kinésine-1 dans les neurones polarisés (Hammond et al., 2010). Ces résultats mettent en évidence la complexité des interactions entre les microtubules et le transport axonal, pouvant impacter la régénération axonale. Cela souligne la nécessité d'approfondir notre compréhension des mécanismes sous-jacents. Ces résultats soulignent également que la sur-stabilisation des microtubules par le Paclitaxel n'est pas bénéfique ni au transport cellulaire, ni à la régénération axonale.

D'autres études utilisant de l'épothilone, un analogue structurel du Paclitaxel démontrant moins de risque de neurotoxicité et d'hypersensibilité cellulaire, indiquent que la stabilisation des microtubules améliore la régénération axonale, à la fois *in vitro* sur des cultures de neurones corticaux de souris, et *in vivo* sur des modèles de lésion de moelle épinière de rat adulte (Bollag et al., 1995; M. Brizuela et al., 2015; Ruschel et al., 2015). De plus, le principal inconvénient du Paclitaxel est qu'il ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, alors que les épothilones peuvent pénétrer dans le SNC (M. Brizuela et al., 2015).

L'épothilone B a déjà été étudié et elle améliore la fonction locomotrice après une lésion de la moelle épinière, mais des effets indésirables de toxicité ont été mis en avant lors de l'application quotidienne sur des souris-immunodéprimées (Ruschel et al., 2015). L'épothilone D (un analogue de l'épothilone B) ne présente pas ce problème de tolérance (Chou et al., 1998). Il a été montré que l'administration d'épothilone D améliore la régénération et la récupération fonctionnelle (Ruschel and Bradke, 2018). Nos résultats coïncident avec ceux-ci, et montrent que par rapport au Paclitaxel, l'épothilone D améliore la régénération axonale (voir article). À ce jour, aucune donnée n'existe concernant un effet hyperstabilisateur des épothilones. Ainsi, l'effet positif de l'épothilone D pourrait suggérer un pouvoir stabilisant moins fort et indiquer que la stabilisation du réseau est nécessaire, mais que la sur-stabilisation ne l'est pas.

Étant donné que l'acétylation de la tubuline est couramment associée aux microtubules stables, tandis que la tyrosination est associée aux microtubules dynamiques, nous avons testé des agents affectant ces modifications. En particulier, nous avons examiné des inhibiteurs d'HDAC, qui ont déjà montré des effets dans la régénération axonale sur des neurones corticaux et DRG de rats (Cho et al., 2013; Cho and Cavalli, 2014; Gaub et al., 2010; Rivieccio et al., 2009). Nous avons observé que dans notre modèle, l'inhibition spécifique de l'HDAC6 par la tubacine, n'améliore pas la régénération tandis que l'action de la TSA augmente significativement la régénération axonale. D'autres résultats

préliminaires de notre système montrent que l'utilisation de TSA induit également une accélération de la vitesse de croissance des axones en régénération.

Afin de déchiffrer le lien, entre l'acétylation et la stabilisation, ainsi qu'avec la régénération axonale, j'ai analysé le rapport tubuline acétylée ou tyrosinée sur l'alpha tubuline. La quantification montre que ni le Paclitaxel, ni l'épothilone n'affectent le niveau d'acétylation. En revanche l'effet sur la régénération des inhibiteurs de HDAC passe par une action sur l'acétylation des MT, qui n'est toutefois pas du même ordre. En effet, la tubacine induit une augmentation de l'acétylation de la partie axonale distale, et la TSA augmente l'acétylation le long de l'axone. Les niveaux de tyrosination ne sont pas affectés. En parallèle, on observe que l'épothilone D et la TSA protègent de la dépolymérisation induite par le nocodazole, indiquant une certaine stabilité des MT. En revanche, l'acétylation de l'extrémité distale induite par la tubacine ne suffit pas à conférer une résistance à la dépolymérisation induite par le nocodazole. La résistance au nocodazole à la suite d'une stabilisation par l'épothilone D, corrélée avec les résultats de la TSA, suggèrent un lien entre acétylation et stabilité. Il n'est toutefois pas impossible qu'avec la TSA, l'extrémité distale dans laquelle l'acétylation n'est pas augmentée soit dépolymérisée. En revanche, les résultats de la tubacine montrent qu'une stabilisation distale n'est pas suffisante pour maintenir l'axone.

Alors que la tubacine et la TSA ciblent l'HDAC6 cytoplasmique, il reste incertain si elles ont la même action sur celle-ci. En effet, sur des fibroblastes, 100 nM de TSA ne sont pas suffisants pour inhiber HDAC6 et induire une augmentation de la tubuline acétylée (Matsuyama, 2002; Ptacek et al., 2023). Dans d'autres études sur des lymphocytes, la tubacine n'affecte pas la stabilisation des MT (Haggarty et al., 2003). Leurs affinités pourraient également être différentes puisque la TSA affecte différentes HDAC de classe I (HDAC1, 2, 3, 8) et II (HDAC4, 5, 6, 7, 9, 10) incluant des cibles nucléaires et mitochondriales (Haggarty et al., 2003; Shukla and Tekwani, 2020). Il est cependant décrit des affinités plus fortes avec les HDAC de classe I (Fleiss et al., 2012).

En parallèle, dans des cultures de DRG, une axotomie entraîne une perturbation des membranes, provoquant une libération de calcium qui, par un signal rétrograde, active la PKC (Cho and Cavalli, 2012). Cette activation permet ensuite la translocation d'histones désacétylases nucléaires, notamment HDAC5. Il est alors suggéré par Chen and Rolls, qu'à la fois les HDAC5 ou 6 (ou les deux) seraient responsables des changements dans l'acétylation des MT. Selon leur hypothèse, HDAC6 contrôlerait les niveaux normaux de tubuline acétylée dans l'axone, alors que HDAC5 interviendrait

spécifiquement après une lésion. Cette histone désacétylase exprimée après une lésion est transportée jusqu'au site de la lésion, ce qui entraîne une augmentation de la désacétylation (Chen and Rolls, 2012; Cho and Cavalli, 2012; Tang, 2014). Les auteurs Cho et Cavalli concluent que l'augmentation de la désacétylation à l'extrémité (+) des MT prépare la régénération par un état plus dynamique des MT, et donc qu'une stabilisation modérée, notamment par une balance d'un état stable/dynamique des MT, permettrait une régénération. Dans notre système, et en se basant sur ces travaux qui indiquent un rôle de HDAC 5 et 6, l'augmentation de l'acétylation uniquement distale par la tubacine pourrait suggérer que HDAC6 se trouve préférentiellement dans cette zone. En effet, la tubacine est spécifique de cette HDAC, pour laquelle la TSA dispose de moins d'affinité (Fleiss et al., 2012). L'effet de la TSA sur l'augmentation de l'acétylation, dans le corps de l'axone uniquement, pourrait alors être dû à la présence de HDAC5 dans cette zone. Toutefois pour confirmer cela, il serait nécessaire de localiser ces différentes HDAC. Une autre possibilité est la présence de ces deux HDAC à la fois dans le corps et l'extrémité de l'axone dans des proportions différentes.

L'effet de la TSA sur différentes HDAC expliquerait nos résultats lorsque la TSA est appliquée sur les corps cellulaires des neurones corticaux. Dans ces conditions, nous observons une amélioration de la repousse distale des axones corticaux. Plusieurs travaux de la littérature ont présenté des effets épigénétiques de la TSA. L'acétylation des histones H3 sur les résidus K9 et K14, et des histones H4 sur le résidu K16 permettrait une décondensation et un remodelage de la chromatine responsable de l'activation des facteurs de transcription de gènes associés à la régénération (RAG) (Delcuve et al., 2012; Gupta et al., 2023; Koriyama et al., 2014; Shin and Cho, 2017; Shogren-Knaak et al., 2006; Weng et al., 2016; Wood et al., 2018; Zhao et al., 2021). Il est en effet démontré que l'hyperacétylation est généralement un marqueur de gènes transcriptionnellement actifs (Kadauke and Blobel, 2013; Tse et al., 1998; Wang et al., 2001). Bien que nos résultats ne démontrent pas de changement dans l'acétylation de l'histone H3K27, cela n'exclut pas une acétylation sur les autres résidus, à l'origine de cette régulation épigénétique. Ces résultats ouvrent donc la voie à d'autres axes de recherche.

L'effet de localisation de l'acétylation des MT permet de retrouver un motif décrit dans les neurones en développement, dans lesquels le corps axonal est plus acétylé que l'extrémité distale, ce qui conférerait un état plus dynamique à cette extrémité pour reformer un cône de croissance et naviguer dans l'environnement (Chen and Rolls, 2012; Yuyu Song and Brady, 2015). Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisé la parthénolide, un inhibiteur d'une carboxypeptidase responsable de la détyrosination de

la tubuline (Diekmann and Fischer, 2016; Gobrecht et al., 2016). Après 24h de traitement, nous observons bien une augmentation du niveau de tyrosination de la tubuline à l'extrémité distale contenant le cône de croissance, accompagnée d'une augmentation du branching. Les niveaux d'acétylation ne sont pas impactés et nous n'observons pas de changement dans la régénération. Une étude récente a analysé des cultures de neurones d'hippocampe de souris SVBP-déficiente (SVBP est une enzyme avec une activité tubuline carboxypeptidase, responsable de la détyrosination). Ces neurones présentent une morphologie axonale anormale avec un nombre excessif de branches axonales et dendritiques (Sanyal et al., 2023). En parallèle, des cultures de neurones d'hippocampe de souris TTL-déficiente montrent une organisation neuronale altérée, avec une réduction du nombre d'épines (Hosseini et al., 2022). Ces auteurs établissent un lien entre la tyrosination de la tubuline et la dynamique des MT. L'augmentation du branching dans nos résultats pourrait soutenir ce lien. Toutefois, nos analyses sur les axones restent globales et il serait nécessaire d'approfondir l'état des MT aux points de branchement. L'absence d'effet par la parthénolide sur l'acétylation et la régénération suggère qu'un équilibre entre stabilité et dynamisme est nécessaire dans la régénération axonale, comme cela est suggérée dans la littérature (Chen and Rolls, 2012). Toutefois, l'association de TSA et parthénolide dans nos expériences n'améliore pas, voire empêche, la régénération, ce qui suggère qu'une augmentation trop importante de la tyrosination dans le cône de croissance n'est pas favorable et soutient la nécessité d'un équilibre entre un état stable et dynamique.

Compte tenu des effets de la TSA sur la régénération, associé à des modifications de la tubuline, nous avons également observé ces effets dans le temps. La TSA induit une amélioration de la régénération à 48 et 96 heures post-lésion (voir article). Toutefois l'absence de modification des MT dès 48 heures post-lésion lors de l'application de la TSA peut majoritairement s'expliquer par l'absence de biodisponibilité du composé, compte tenu de sa demi-vie, qui est de 10 minutes dans le plasma de souris. Il est également rapporté que la TSA serait complètement éliminée à 24h (Sanderson et al., 2004). Cela mettrait en évidence la nécessité de stabiliser le réseau de MT dans les stades précoces de la lésion. Toutefois, afin de valider cette hypothèse, il faudrait observer l'état des MT au niveau axonal, leur résistance aux drogues dépolymérisantes ainsi que le phénotype et la fonction mitochondriale aux mêmes temps, ce qui n'a pas été approfondi dans ce travail. Enfin, les résultats variables obtenus à 48 heures associés à des cultures sensibles à ce stade pourrait mettre en évidence une modulation du réseau et de ses connexions, semblable à une plasticité, afin d'assurer un réseau plus stable par la suite.

L'effet positif de la TSA sur la régénération axonale jusqu'à 96 heures post-lésion et sa demi-vie restreinte, nous ont poussés à analyser l'existence d'une fenêtre temporelle pour son application. Nous avons déterminé lors de nos enregistrements que les axones en régénération commencent à envahir le site de la lésion 6 heures après le traumatisme. Cela suggère qu'après la lésion, les axones passent par un état métastable pendant plusieurs heures. En effet, les mécanismes de réparation axonale et de régénération incluent un scellement de l'axone, la création d'un centre organisateur du cône de croissance et finalement la formation du cône de croissance. Ces remaniements ont été identifiés sur une durée particulièrement courte, de quelques minutes à une heure, dans des DRG de poulet ou des neurones d'aplysie (Bloom and Morgan, 2011). Chez les mammifères, ces remaniements ainsi que le maintien des axones dans un état métastable pouvant régénérer ou dégénérer ont été observés dans les premières heures et jusqu'à 4 heures après la lésion (Filous and Schwab, 2018; Williams et al., 2014).

La mort cellulaire observée dans nos résultats lorsqu'un traitement est appliqué 4 heures après la lésion renforce cette hypothèse. À moins que cela ne résulte d'un stress cellulaire du changement de milieu. En revanche, lorsque l'on attend 6 heures après la lésion avant d'administrer la TSA, les événements nécessaires à la réparation axonale identifiés par Bloom et Morgan ont probablement été mis en place dans nos cultures, puisque la régénération axonale est de 28%, contre 18% lorsque la TSA est appliquée immédiatement après la lésion. Cela est associé aux mêmes changements sur les niveaux d'acétylation et de tyrosination de la tubuline. Ces résultats renforcent la notion de l'existence d'une fenêtre temporelle pour agir sur l'état des MT après une axotomie.

La régénération axonale étant un processus très énergivore (Conde and Cáceres, 2009), la fonction mitochondriale est donc d'un intérêt particulier (McEwen et al., 2011; Szelechowski et al., 2014). Dans différents modèles de lésions du système nerveux central *in vitro* (cultures neuronales primaires embryonnaires et postnatales) et *in vivo*, les études rapportent des perturbations du potentiel de membrane, de la production de ROS, de l'expression de la protéine d'ancrage SNPH, ainsi qu'une diminution de la motilité et une augmentation de la fission (Brooks, 2007; Han et al., 2016; Lassus et al., 2016; Magnifico, 2013; Steketee et al., 2012; Biyao Wang et al., 2021; Bing Zhou et al., 2016). Le transport mitochondrial a donc été étudié dans des modèles où la régénération est possible. Ainsi, il est décrit dans le paradigme de la lésion conditionnée, que les axones en régénération augmentent leur trafic vésiculaire (Mar et al., 2014). En parallèle, dans des modèles de neurones du SNC avec une capacité de régénération (PTEN^{-/-} ; SOC3^{-/-}), les axones en régénération présentent un taux de transport mitochondrial antérograde élevé, sans que

le transport d'autres vésicules (synaptiques et endosomes tardifs) ne soit modifié (Cartoni et al., 2017). Enfin, un KO de la protéine d'ancrage SNPH dans des neurones corticaux *in vitro* et dans des modèles *in vivo*, permet, après lésion, une augmentation du transport mitochondrial antérograde pour soutenir la demande énergétique au site de lésion (Bing Zhou et al., 2016). Ce transport se fait le long des microtubules, et dépend des moteurs moléculaires tels que les kinésines. Il a été montré qu'une augmentation de l'acétylation des MT permet le recrutement de ces protéines motrices (Dompierre et al., 2007; Hammond et al., 2010; Reed et al., 2006; Rovini et al., 2011). Dans mon travail, j'ai observé que la TSA restaure la motilité mitochondriale, tandis que la Tubacine, l'épothilone D et la Parthénolide n'affectent pas ce transport. Cela suggère que la stabilisation des microtubules est nécessaire pour le trafic des organelles et que la motilité mitochondriale est améliorée par l'acétylation de la tubuline le long des axones.

Chez la drosophile, les mitochondries communiquent leur état bioénergétique et celui de leur potentiel Redox à la cellule, pour le maintien de l'homéostasie, par un signal mitochondrial rétrograde. Des contacts au niveau nucléaire permettent alors d'induire la transcription de gènes nucléaires de pro-survie (tels que ceux contrôlés par la voie NF- κ B), ou de gènes permettant l'approvisionnement des mitochondries en précurseur nécessaire au cycle TCA (oxaloacétate, Acétyl-CoA, glutamate...) (Cagin et al., 2015; Desai et al., 2020). Ainsi, des dysfonctions des mitochondries neuronales induisent une réponse rétrograde de survie des mitochondries. Ces mécanismes sont également retrouvés dans des lignées humaines de cancer du sein (Desai et al., 2020). Ainsi, dans nos résultats, la restauration du transport mitochondrial pourrait soutenir la régénération par un effet à la fois rétrograde et antérograde.

Nous observons également une restauration des processus de fusion et de fission. Ces résultats pourraient suggérer que la TSA augmente la dynamique mitochondriale vers des zones cruciales pour compenser le déficit énergétique nécessaire à la régénération, soit par un lien direct de l'état des microtubules, soit indirect. Pour mieux identifier ces phénomènes impliqués, il pourrait être pertinent de réaliser des observations similaires dans un modèle présentant un défaut de transport mitochondrial, par la surexpression de Parkin ou SNPH, ou un défaut de dynamique mitochondriale en agissant sur la surexpression d'OPA1 ou l'inhibition de Drp1. En effet, il est déjà rapporté que l'inhibition de la fission prévient les dommages axonaux (Lassus et al., 2016). En parallèle, des observations similaires pourraient être réalisées sur des modèles présentant un défaut de l'acétylation des MT. Cette modification étant caractéristique des microtubules qui résistent à la dépolymérisation induite pharmacologiquement, elle

permettrait après une lésion de préparer l'axone à supporter la dynamique et la croissance, tout en maintenant un équilibre entre stabilité et dynamique (Bouquet et al., 2004).

En considérant l'effet bénéfique du traitement à la TSA sur la régénération axonale jusqu'à 96 heures, nous nous sommes demandé si cette régénération pourrait également restaurer la connectivité du réseau. Sur les enregistrements calciques, l'ajout de TSA est associée à une stabilisation du signal de la réponse des neurones corticaux et la mise en place d'une fréquence corticale, dès 48 heures post-lésion. Dans des lésions non traitées, les variations de signal continuent jusqu'à 96 heures après la lésion, sans la mise en place de motif d'oscillations rythmiques. Toutefois, aucune synchronisation n'est retrouvée. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'à 96 heures, de nouvelles synapses ne sont probablement pas encore formées. Cependant, compte tenu de l'âge total de la culture et de la fragilité du réseau, il reste délicat d'envisager des enregistrements similaires au-delà de 96 heures post-lésion, compatibles avec la formation de nouvelles synapses potentielles. Dans les travaux de Mironov et al., il est établi que la stabilisation du réseau de MT par le Paclitaxel permet de maintenir, via une interaction avec la dynéine et la kynésine, la structure et le positionnement d'organelles telle que les mitochondries ou le réticulum endoplasmique (RE) à proximité. Le Paclitaxel induirait également une dépolarisation de la membrane des mitochondries, libérant un efflux de Ca^{2+} . Ce calcium active la libération de Ca^{2+} du RE, ce qui conduit à des pics calciques spontanés (Mironov et al., 2005). Ces signaux ressemblent à ceux observés dans nos expériences avec de la TSA à 96 heures. Pour vérifier cette hypothèse de l'effet de la TSA sur les flux calciques, il serait nécessaire de vérifier si la TSA après 96 heures induit réellement une stabilisation des MT.

Il est également important de considérer que les signaux calciques observés de manière globale dans les chambres sont le reflet de plusieurs signatures calciques (neurones lésés et non lésés, interneurones, cellules gliales...) qu'il est difficile d'individualiser en imagerie non-ratiométrique. En parallèle, la régénération axonale à elle seule ne signifie pas la reconnexion des axones avec leurs cibles initiales (Squair et al., 2023).

Pour conclure cette étude, compte tenu de l'ensemble des résultats observés jusqu'ici, nous avons envisagé la combinaison de certaines conditions. Toutefois, l'administration conjointe de TSA dans les compartiments proximaux et distaux, ou de TSA et de parthénolide empêche la régénération. Cela pourrait résulter d'une instabilité du réseau post-lésionnel face à des changements trop excessifs. Il est toutefois possible de considérer

que l'ajout simultané n'a pas d'effet synergique. En l'absence de résultat satisfaisant, ces expérimentations n'ont pas été approfondies.

En parallèle, considérant l'effet des facteurs trophiques présents dans le milieu spinal sur le développement des neurones spinaux et sur la maturité synaptique du réseau, afin d'éviter que les effets sur la régénération observés ne soient attribués à ces facteurs, le milieu post-lésionnel de nos expériences est uniquement composé de Neurobasal-B27. Toutefois, l'effet bénéfique déjà rapporté dans la littérature (Stoklund Dittlau et al., 2021a; Zahavi et al., 2015) et l'effet supposé sur notre connectivité, ont conduit à évaluer l'utilisation d'un milieu post-lésion supplémenté en facteurs trophiques (GDNF, BDNF, CNTF, NT-3). Dans des conditions où aucune régénération n'est observée — application conjointe de TSA dans les compartiments proximaux et distaux ou de TSA et de Parthénolide simultanément — l'utilisation d'un milieu enrichi en facteurs de trophiques permet d'observer une régénération. L'enrichissement de ce milieu pourrait donc avoir un effet bénéfique en empêchant la dégénérescence et en stimulant la régénération. Toutefois, ces expériences préliminaires n'ont pas été approfondies. Avant de pouvoir conclure à un effet, il serait nécessaire de reproduire les expériences de lésion sans drogue, afin d'approfondir les analyses de régénération pour valider si ce milieu enrichi favorise effectivement la régénération.

Enfin, les résultats concernant l'activité du réseau enregistré par imagerie calcique avec ce milieu supplémenté ne montrent pas de différence sur une resynchronisation cortico-spinale. En revanche, on observe une fréquence d'activité des neurones corticaux particulièrement élevée. Une hypothèse pourrait être l'existence d'un lien entre l'amélioration de la régénération axonale et ce profil d'activité. De plus, étant donné l'effet potentiel de ce milieu sur la maturité synaptique, un effet pourrait être plus visible à 96 heures après lésion. Toutefois ces expériences étant complémentaires, elles n'ont pas été pas pu être approfondies dans ce travail, mais gagnerait à l'être dans un contexte thérapeutique afin de cibler différentes composantes d'une lésion, et induire un effet chemoattractif sur le guidage axonal, déjà abordé dans la littérature (Anderson et al., 2018; Blesch and Tuszynski, 2007; Squair et al., 2023). Ce modèle se prête particulièrement à ce type de criblage et la validation *in vitro* de thérapeutiques, tel que le démontre les derniers résultats de ce travail sur l'utilisation d'un agent neuroprotecteur sur les mêmes lésions.

| Conclusion & Perspectives

En résumé, dans cette étude, j'ai développé un nouveau dispositif microfluidique *in vitro* simple et reproductible pour effectuer des lésions mécaniques par compression, applicable à de nombreux traumatismes observés *in vivo*. Ce dispositif est déjà utilisé par d'autres doctorants de l'équipe. J'ai également pu développer un réseau de neurones cortico-spinaux synaptiquement fonctionnel, afin de reproduire un faisceau CST et mimer des lésions de la moelle épinière *in vitro*. Ce dispositif, qui comble le manque d'organisation spatiale des cultures *in vitro* conventionnelles, offre un outil précieux pour étudier les mécanismes de régénération et de dégénérescence axonale et pour développer de nouvelles approches thérapeutiques pour les lésions de la moelle épinière. Il ouvre également la voix aux investigations des mécanismes régissant d'autres pathologies de lésions axonales telles que les traumatismes crâniens (TBI), ainsi que sur différents réseaux neuronaux.

Les résultats décrits indiquent des découvertes importantes concernant l'état des MT et sa relation avec la dynamique des mitochondries dans la régénération axonale. Nous montrons que l'acétylation induit la stabilisation des réseaux de MT et soutient le transport des mitochondries pour la régénération axonale. Il a été démontré que la TSA a également des effets à d'autres niveaux : réduction de l'inflammation, différenciation des OPC, récupération fonctionnelle chez des souris dystrophiques, neuroprotection des motoneurones spinaux dans des modèles d'amyotrophie (Liu et al., 2014; Minetti et al., 2006; Moreira et al., 2003; Zare et al., 2019). De plus, la stabilisation des microtubules, notamment par le Paclitaxel, ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC auraient un effet sur la cicatrice gliale (Gao et al., 2022; Hellal et al., 2011; Hendrix et al., 2020; Sengottuvel et al., 2011; Zare et al., 2023).

Ces résultats mettent en lumière le potentiel de certaines molécules pour favoriser la régénération et la réparation neuronale après une lésion, offrant des pistes prometteuses pour le développement de thérapies régénératives. Ils soulignent également la complexité des réponses cellulaires à la lésion et la nécessité de cibler plusieurs aspects de ces réponses pour atteindre une réparation efficace du système nerveux. Bien que les résultats soient prometteurs, il reste toutefois à élucider les mécanismes moléculaires précis par lesquels ces traitements exercent leurs effets, ainsi que leur applicabilité dans des modèles de lésions plus complexes et dans des contextes *in vivo*. Les effets sur la synchronisation neuronale et la fonction synaptique suggèrent également l'importance d'une approche holistique pour restaurer la fonctionnalité du système nerveux après lésion.

| Bibliographie

A

- Aguayo, A.J., 1985. Axonal regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system, in: *Synaptic Plasticity*. pp. 457–484.
- Akella, J.S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N.G., Lyons-Abbott, S., Morrisette, N.S., Dougan, S.T., Kipreos, E.T., Gaertig, J., 2010. MEC-17 is an α -tubulin acetyltransferase. *Nature* 467, 218–222. <https://doi.org/10.1038/nature09324>
- Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2015. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 711–726. <https://doi.org/10.1038/nrm4084>
- Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2010. Microtubule +TIPs at a glance. *Journal of Cell Science* 123, 3415–3419. <https://doi.org/10.1242/jcs.062414>
- Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 309–322. <https://doi.org/10.1038/nrm2369>
- Allen, A.R., 1911. SURGERY OF EXPERIMENTAL LESION OF SPINAL CORD EQUIVALENT TO CRUSH INJURY OF FRACTURE DISLOCATION OF SPINAL COLUMN: A PRELIMINARY REPORT. *JAMA* LVII, 878. <https://doi.org/10.1001/jama.1911.04260090100008>
- Amos, L.A., 2011. What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22, 916–926. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.09.014>
- Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O’Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., Sofroniew, M.V., 2016. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532, 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Anderson, M.A., O’Shea, T.M., Burda, J.E., Ao, Y., Barlatey, S.L., Bernstein, A.M., Kim, J.H., James, N.D., Rogers, A., Kato, B., Wollenberg, A.L., Kawaguchi, R., Coppola, G., Wang, C., Deming, T.J., He, Z., Courtine, G., Sofroniew, M.V., 2018. Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury. *Nature* 561, 396–400. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0467-6>
- Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., Macklis, J.D., 2005. Neuronal Subtype-Specific Genes that Control Corticospinal Motor Neuron Development In Vivo. *Neuron* 45, 207–221. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.036>

- Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y.-J., Estaquier, J., Blackstone, C., 2005. Release of OPA1 during Apoptosis Participates in the Rapid and Complete Release of Cytochrome c and Subsequent Mitochondrial Fragmentation. *Journal of Biological Chemistry* 280, 35742–35750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505970200>
- Arrázola, M.S., Andraini, T., Szelechowski, M., Mouledous, L., Arnauné-Pelloquin, L., Davezac, N., Belenguer, P., Rampon, C., Miquel, M.-C., 2019. Mitochondria in Developmental and Adult Neurogenesis. *Neurotox Res* 36, 257–267. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9942-y>
- Ashrafi, G., Schlehe, J.S., LaVoie, M.J., Schwarz, T.L., 2014. Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin. *Journal of Cell Biology* 206, 655–670. <https://doi.org/10.1083/jcb.201401070>
- Avraham, O., Hadas, Y., Vald, L., Zisman, S., Schejter, A., Visel, A., Klar, A., 2009. Transcriptional control of axonal guidance and sorting in dorsal interneurons by the Lim-HD proteins Lhx9 and Lhx1. *Neural Dev* 4, 21. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-21>

B

- Backes, S., Herrmann, J.M., 2017. Protein Translocation into the Intermembrane Space and Matrix of Mitochondria: Mechanisms and Driving Forces. *Front. Mol. Biosci.* 4, 83. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00083>
- Badhiwala, J.H., Ahuja, C.S., Fehlings, M.G., 2019. Time is spine: a review of translational advances in spinal cord injury: JNSPG 75th Anniversary Invited Review Article. *Journal of Neurosurgery: Spine* 30, 1–18. <https://doi.org/10.3171/2018.9.SPINE18682>
- Bailey, Jiang, Dima, Ross, 2016. Invited review: Microtubule severing enzymes couple atpase activity with tubulin GTPase spring loading. *Biopolymers* 105, 547–56.
- Ballout, N., Frappé, I., Péron, S., Jaber, M., Zibara, K., Gaillard, A., 2016. Development and Maturation of Embryonic Cortical Neurons Grafted into the Damaged Adult Motor Cortex. *Front. Neural Circuits* 10. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00055>

- Bates, D., Eastman, A., 2017. Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs. *Brit J Clinical Pharma* 83, 255–268. <https://doi.org/10.1111/bcp.13126>
- Baubérot, J., 1975. *Ivan Illich, Némésis Médicale, l'expropriation de la santé*. Paris, Seuil, 1975.
- Beaudet, M.-J., Yang, Q., Cadau, S., Blais, M., Bellenfant, S., Gros-Louis, F., Berthod, F., 2015. High yield extraction of pure spinal motor neurons, astrocytes and microglia from single embryo and adult mouse spinal cord. *Sci Rep* 5, 16763. <https://doi.org/10.1038/srep16763>
- Bekkers, J.M., Stevens, C.F., 1991. Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7834–7838. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7834>
- Bensley, R.R., Hoerr, N.L., 1934. Studies on cell structure by the freezing-drying method VI. The preparation and properties of mitochondria. *Anat. Rec.* 60, 449–455. <https://doi.org/10.1002/ar.1090600408>
- Bereiter-Hahn, J., 1990. Behavior of Mitochondria in the Living Cell, in: *International Review of Cytology*. Elsevier, pp. 1–63. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61205-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61205-X)
- Bereiter-Hahn, J., Vöth, M., 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy Res & Technique* 27, 198–219. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070270303>
- Berthet, A., Margolis, E.B., Zhang, Jue, Hsieh, I., Zhang, Jiasheng, Hnasko, T.S., Ahmad, J., Edwards, R.H., Sesaki, H., Huang, E.J., Nakamura, K., 2014. Loss of Mitochondrial Fission Depletes Axonal Mitochondria in Midbrain Dopamine Neurons. *J. Neurosci.* 34, 14304–14317. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0930-14.2014>
- Bertholet, A.M., Delerue, T., Millet, A.M., Moulis, M.F., David, C., Daloyau, M., Arnauné-Pelloquin, L., Davezac, N., Mils, V., Miquel, M.C., Rojo, M., Belenguer, P., 2016. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. *Neurobiology of Disease* 90, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.011>
- Bertholet, A.M., Millet, A.M.E., Guillermin, O., Daloyau, M., Davezac, N., Miquel, M.-C., Belenguer, P., 2013. OPA1 loss of function affects in vitro neuronal maturation. *Brain* 136, 1518–1533. <https://doi.org/10.1093/brain/awt060>

- Birsa, N., Norkett, R., Higgs, N., Lopez-Domenech, G., Kittler, J.T., 2013. Mitochondrial trafficking in neurons and the role of the Miro family of GTPase proteins. *Biochem Soc Trans* 41, 24256248.
- Blanquie, O., Bradke, F., 2018. Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology* 51, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.024>
- Blesch, A., Tuszynski, M.H., 2009. Spinal cord injury: plasticity, regeneration and the challenge of translational drug development. *Trends Neurosci* 32, 41–47.
- Blesch, A., Tuszynski, M.H., 2007. Transient Growth Factor Delivery Sustains Regenerated Axons after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 27, 10535–10545. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1903-07.2007>
- Bloom, O.E., Morgan, J.R., 2011. Membrane trafficking events underlying axon repair, growth, and regeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience* 48, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.04.003>
- Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., Woods, C.M., 1995. Epothilones, a New Class of Microtubule-stabilizing Agents with a Taxol-like Mechanism of Action.
- Bonnet, C., Boucher, D., Lazereg, S., Pedrotti, B., Islam, K., Denoulet, P., Larcher, J.C., 2001. Differential Binding Regulation of Microtubule-associated Proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by Tubulin Polyglutamylation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12839–12848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011380200>
- Borisy, G., Heald, R., Howard, J., Janke, C., Musacchio, A., Nogales, E., 2016. Microtubules: 50 years on from the discovery of tubulin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 322–328. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.45>
- Boucher, D., Larcher, J.-C., Gros, F., Denoulet, P., 1994. Polyglutamylation of Tubulin as a Progressive Regulator of in Vitro Interactions between the Microtubule-Associated Protein Tau and Tubulin. *Biochemistry* 33, 12471–12477. <https://doi.org/10.1021/bi00207a014>
- Bouquet, C., Nothias, F., 2007. Molecular Mechanisms of Axonal Growth, in: Bagnard, D. (Ed.), *Axon Growth and Guidance, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 1–16. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76715-4_1
- Bouquet, C., Soares, S., Von Boxberg, Y., Ravaille-Veron, M., Propst, F., Nothias, F., 2004. Microtubule-Associated Protein 1B Controls Directionality of Growth Cone Migration and Axonal Branching in Regeneration of Adult Dorsal Root Ganglia Neurons. *J. Neurosci.* 24, 7204–7213. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2254-04.2004>

- Bowne-Anderson, H., Hibbel, A., Howard, J., 2015. Regulation of Microtubule Growth and Catastrophe: Unifying Theory and Experiment. *Trends in Cell Biology* 25, 769–779. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.009>
- Bradbury, E.J., Moon, L.D.F., Popat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N., Fawcett, J.W., McMahon, S.B., 2002. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416, 636–640. <https://doi.org/10.1038/416636a>
- Bradke, F., Fawcett, J.W., Spira, M.E., 2012. Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 13, 183–193. <https://doi.org/10.1038/nrn3176>
- Breckenridge, D.G., Stojanovic, M., Marcellus, R.C., Shore, G.C., 2003. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome *c* release to the cytosol. *The Journal of Cell Biology* 160, 1115–1127. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212059>
- Breuss, M.W., Leca, I., Gstrein, T., Hansen, A.H., Keays, D.A., 2017. Tubulins and brain development – The origins of functional specification. *Molecular and Cellular Neuroscience* 84, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.03.002>
- Brizuela, Mariana, Blizzard, C.A., Chuckowree, J.A., Dawkins, E., Gasperini, R.J., Young, K.M., Dickson, T.C., 2015. The microtubule-stabilizing drug Epothilone D increases axonal sprouting following transection injury in vitro. *Molecular and Cellular Neuroscience* 66, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.02.006>
- Brizuela, M., Blizzard, C.A., Chuckowree, J.A., Dawkins, E., Gasperini, R.J., Young, K.M., Dickson, T.C., 2015. The microtubule-stabilizing drug Epothilone D increases axonal sprouting following transection injury in vitro. *Molecular and Cellular Neuroscience* 66, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.02.006>
- Brooks, C., 2007. Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 11649–11654.
- Brouhard, G.J., 2015. Dynamic instability 30 years later: complexities in microtubule growth and catastrophe. *MBoC* 26, 1207–1210. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-10-0594>

C

- Cabrera-Aldana, E.E., Ruelas, F., Aranda, C., Rincon-Heredia, R., Martínez-Cruz, A., Reyes-Sánchez, A., Guizar-Sahagún, G., Tovar-y-Romo, L.B., 2017. Methylprednisolone Administration Following Spinal Cord Injury Reduces Aquaporin 4 Expression and Exacerbates Edema. *Mediators of Inflammation* 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/4792932>
- Cagin, U., Duncan, O.F., Gatt, A.P., Dionne, M.S., Sweeney, S.T., Bateman, J.M., 2015. Mitochondrial retrograde signaling regulates neuronal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505036112>
- Cajal, S.R.Y., May, R.M., 1991. *Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System.* Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195065169.001.0001>
- Calligaris, D., Verdier-Pinard, P., Devred, F., Villard, C., Braguer, D., Lafitte, D., 2010. Microtubule targeting agents: from biophysics to proteomics. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1089–1104. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0245-6>
- Campenot, R.B., 1977. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 4516–4519. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4516>
- Cantile, C., Youssef, S., 2016. Nervous System, in: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 1. Elsevier, pp. 250–406. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5317-7.00004-7>
- Carrel, A., 1923. A METHOD FOR THE PHYSIOLOGICAL STUDY OF TISSUES IN VITRO. *Journal of Experimental Medicine* 38, 407–418. <https://doi.org/10.1084/jem.38.4.407>
- Carrel, A., 1910. CULTIVATION OF ADULT TISSUES AND ORGANS OUTSIDE OF THE BODY. *JAMA* 55, 1379. <https://doi.org/10.1001/jama.1910.04330160047018>
- Carsten, J., Bulinski, J.C., 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 12, 773–786.
- Cartoni, R., Norsworthy, M.W., Bei, F., Wang, C., Li, S., Zhang, Y., Gabel, C.V., Schwarz, T.L., He, Z., 2016. The Mammalian-Specific Protein *Armcx1* Regulates Mitochondrial Transport during Axon Regeneration. *Neuron* 92, 1294–1307. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.060>

- Cartoni, R., Pekkurnaz, G., Wang, C., Schwarz, T.L., He, Z., 2017. A high mitochondrial transport rate characterizes CNS neurons with high axonal regeneration capacity. *PLoS ONE* 12, e0184672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184672>
- Cattin, A.L., Lloyd, A.C., 2016. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol* 39, 38–46.
- Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., De Brito, O.M., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P., Scorrano, L., 2008. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15803–15808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808249105>
- Chaban, Y., Boekema, E.J., Dudkina, N.V., 2014. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837, 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.004>
- Chakraborti, S., Natarajan, K., Curiel, J., Janke, C., Liu, J., 2016. The emerging role of the tubulin code: From the tubulin molecule to neuronal function and disease. *Cytoskeleton* 73, 521–550. <https://doi.org/10.1002/cm.21290>
- Chang, C.-R., Blackstone, C., 2007. Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation of Drp1 Regulates Its GTPase Activity and Mitochondrial Morphology. *Journal of Biological Chemistry* 282, 21583–21587. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700083200>
- Chau, K., Millare, B., Lin, A., Upadhyayula, S., Nuñez, V., Xu, H., Vullev, V.I., 2011. Dependence of the quality of adhesion between poly(dimethylsiloxane) and glass surfaces on the composition of the oxidizing plasma. *Microfluid Nanofluid* 10, 907–917. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0724-y>
- Chaudhry, N., Filbin, M.T., 2007. Myelin—Associated Inhibitory Signaling and Strategies to Overcome Inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1096–1107. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600407>
- Chedly, J., Soares, S., Montembault, A., Von Boxberg, Y., Veron-Ravaille, M., Mouffle, C., Benassy, M.-N., Taxi, J., David, L., Nothias, F., 2017. Physical chitosan microhydrogels as scaffolds for spinal cord injury restoration and axon regeneration. *Biomaterials* 138, 91–107. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.05.024>
- Chen, H., Chomyn, A., Chan, D.C., 2005. Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26185–26192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503062200>

- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., Chan, D.C., 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of Cell Biology* 160, 189–200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>
- Chen, L., Rolls, M.M., 2012. Microtubule deacetylation sets the stage for successful axon regeneration: HDAC5 in axon regeneration. *The EMBO Journal* 31, 3033–3035. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.175>
- Chen, S., Owens, G.C., Makarenkova, H., Edelman, D.B., 2010. HDAC6 Regulates Mitochondrial Transport in Hippocampal Neurons. *PLoS ONE* 5, e10848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010848>
- Chen, Y., Sheng, Z.-H., 2013. Kinesin-1–syntaphilin coupling mediates activity-dependent regulation of axonal mitochondrial transport. *Journal of Cell Biology* 202, 351–364. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302040>
- Chen, Y.M., Gerwin, C., Sheng, Z.H., 2009. Dynein light chain LC8 regulates syntaphilin-mediated mitochondrial docking in axons. *J Neurosci* 29, 9429–38.
- Cheng, X.T., Sheng, Z.H., 2020. Developmental regulation of microtubule-based trafficking and anchoring of axonal mitochondria in health and diseases. *Dev Neurobiol* 10. <https://doi.org/10.1002/dneu.22748>
- Cheriyian, T., 2014. Spinal cord injury models: a review. *Spinal Cord* 52, 588–595.
- Chinopoulos, C., Adam-Vizi, V., 2010. Mitochondrial Ca²⁺ sequestration and precipitation revisited. *The FEBS Journal* 277, 3637–3651. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07755.x>
- Cho, Y., Cavalli, V., 2014. HDAC signaling in neuronal development and axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology* 27, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.03.008>
- Cho, Y., Cavalli, V., 2012. HDAC5 is a novel injury-regulated tubulin deacetylase controlling axon regeneration: HDAC5 controls axon regeneration. *The EMBO Journal* 31, 3063–3078. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.160>
- Cho, Y., Sloutsky, R., Naegle, K.M., Cavalli, V., 2013. Injury-Induced HDAC5 Nuclear Export Is Essential for Axon Regeneration. *Cell* 155, 894–908. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.004>
- Choi, Bertram, Drenan, Carvalho, Zhou, Zheng, 2002. The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO Rep* 3, 988–94.

- Chou, T.-C., Zhang, X.-G., Balog, A., Su, D.-S., Meng, D., Savin, K., Bertino, J.R., Danishefsky, S.J., 1998. Desoxyepothilone B: An efficacious microtubule-targeted antitumor agent with a promising *in vivo* profile relative to epothilone B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9642–9647. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9642>
- Chowdhury, S., Ketcham, S.A., Schroer, T.A., Lander, G.C., 2015. Structural organization of the dynein–dynactin complex bound to microtubules. *Nat Struct Mol Biol* 22, 345–347. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2996>
- Chrétien, Fuller, E, K., 1995. Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol* 129, 1311–28.
- Cianfrocco, M.A., DeSantis, M.E., Leschziner, A.E., Reck-Peterson, S.L., 2015. Mechanism and Regulation of Cytoplasmic Dynein. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31, 83–108. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125438>
- Cipolat, S., De Brito, O.M., Dal Zilio, B., Scorrano, L., 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15927–15932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407043101>
- Cogliati, S., Enriquez, J.A., Scorrano, L., 2016. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences* 41, 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.001>
- Conde, C., Cáceres, A., 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10, 319–332. <https://doi.org/10.1038/nrn2631>
- Côté, M.-P., Murray, L.M., Knikou, M., 2018. Spinal Control of Locomotion: Individual Neurons, Their Circuits and Functions. *Front. Physiol.* 9, 784. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00784>
- Cotman, C.W., Nieto-Sampedro, M., 1984. Cell biology of synaptic plasticity. *Science* 225, 1287–1294.
- Courte, J., Le, N.A., Pan, T., Bousset, L., Melki, R., Villard, C., Peyrin, J.-M., 2023. Synapses do not facilitate prion-like transfer of alpha-synuclein: a quantitative study in reconstructed unidirectional neural networks. *Cell. Mol. Life Sci.* 80, 284. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04915-4>
- Courte, J., Renault, R., Jan, A., Viovy, J.-L., Peyrin, J.-M., Villard, C., 2018. Reconstruction of directed neuronal networks in a microfluidic device with asymmetric microchannels, in: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 71–95. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.07.002>
- Courtine, G., Sofroniew, M.V., 2019. Spinal cord repair: advances in biology and technology. *Nat Med* 25, 898–908. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0475-6>

- Cragg, G.M., 1998. Paclitaxel (Taxol®): A success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Med. Res. Rev.* 18, 315–331. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1128\(199809\)18:5<315::AID-MED3>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1128(199809)18:5<315::AID-MED3>3.0.CO;2-W)
- Cregg, J.M., DePaul, M.A., Filous, A.R., Lang, B.T., Tran, A., Silver, J., 2014. Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp. Neurol* 253, 197–207.
- Cribbs, J.T., Strack, S., 2007. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Reports* 8, 939–944. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401062>
- Crompton, M., Moser, R., Lüdi, H., Carafoli, E., 1978. The Interrelations between the Transport of Sodium and Calcium in Mitochondria of Various Mammalian Tissues. *European Journal of Biochemistry* 82, 25–31. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb11993.x>
- Csordas, G., 1999. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *The EMBO Journal* 18, 96–108. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.96>
- Csordás, G., Weaver, D., Hajnóczky, G., 2018. Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends in Cell Biology* 28, 523–540. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.009>

D

- Delcuve, G.P., Khan, D.H., Davie, J.R., 2012. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors.
- Deleglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Alleaume-Butaux, A., Hjorth, J.J., Vignes, M., Schneider, B., Brugg, B., Viovy, J.-L., Peyrin, J.-M., 2013. Synapto-Protective Drugs Evaluation in Reconstructed Neuronal Network. *PLoS ONE* 8, e71103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071103>
- Desai, Mitchison, 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev* 13, 83–117.
- Desai, R., East, D.A., Hardy, L., Faccenda, D., Rigon, M., Crosby, J., Alvarez, M.S., Singh, A., Mainenti, M., Campanella, M., 2020. Mitochondria form contact sites with the nucleus to couple prosurvival retrograde response. *SCIENCE ADVANCES*. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc9955>

- Detmer, S.A., Chan, D.C., 2007. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *The Journal of Cell Biology* 176, 405–414. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611080>
- Diekmann, H., Fischer, D., 2016. Parthenolide: a novel pharmacological approach to promote nerve regeneration. *Neural Regen Res* 11, 1566. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.193228>
- Dimroth, P., Kaim, G., Matthey, U., 2000. Crucial Role of the Membrane Potential for ATP Synthesis by F1Fo ATP Synthases. *Journal of Experimental Biology* 203, 51–59. <https://doi.org/10.1242/jeb.203.1.51>
- Dodding, M.P., Way, M., 2011. Coupling viruses to dynein and kinesin-1: Coupling viruses to dynein and kinesin-1. *The EMBO Journal* 30, 3527–3539. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.283>
- Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelières, F.P., King, S.J., Humbert, S., Saudou, F., 2007. Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington’s Disease by Increasing Tubulin Acetylation. *J. Neurosci.* 27, 3571–3583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0037-07.2007>
- Duchen, M.R., 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine* 25, 365–451. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.03.001>
- Dumontet, C., Jordan, M.A., 2010. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9, 790–803. <https://doi.org/10.1038/nrd3253>
- Dunn, S., Morrison, E.E., Liverpool, T.B., Molina-París, C., Cross, R.A., Alonso, M.C., Peckham, M., 2008. Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *Journal of Cell Science* 121, 1085–1095. <https://doi.org/10.1242/jcs.026492>
- Dutcher, S.K., 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 49–54. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00173-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00173-3)

E

- El Bejjani, R., Hammarlund, M., 2012. Notch Signaling Inhibits Axon Regeneration. *Neuron* 73, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.017>
- Elie-Caille, C., Severin, F., Helenius, J., Howard, J., Muller, D.J., Hyman, A.A., 2007. Straight GDP-Tubulin Protofilaments Form in the Presence of Taxol. *Current Biology* 17, 1765–1770. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.063>

- English, K., Barton, M.C., 2021. HDAC6: A Key Link Between Mitochondria and Development of Peripheral Neuropathy. *Front. Mol. Neurosci.* 14, 684714. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.684714>
- Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., Salin, P.A., Job, D., Wehland, J., 2005. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7853–7858. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409626102>
- Ernster, L., Schatz, G., 1981. Mitochondria: a historical review. *The Journal of cell biology* 91, 227s–255s. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.227s>
- Ertürk, A., Hellal, F., Enes, J., Bradke, F., 2007. Disorganized Microtubules Underlie the Formation of Retraction Bulbs and the Failure of Axonal Regeneration. *J. Neurosci.* 27, 9169–9180. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0612-07.2007>
- Eshun-Wilson, L., Zhang, R., Portran, D., Nachury, M.V., Toso, D.B., Löhr, T., Vendruscolo, M., Bonomi, M., Fraser, J.S., Nogales, E., 2019. Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 10366–10371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900441116>

F

- Fawcett, J.W., Asher, R.A., 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49, 377–391. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(99\)00072-6](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(99)00072-6)
- Fehlings, M.G., 2017. A clinical practice guideline for the management of acute spinal cord injury: introduction, rationale, and scope. *Global Spine J* 7 Suppl, 84S–94S.
- Fenske, P., Grauel, M.K., Brockmann, M.M., Dorn, A.L., Trimbuch, T., Rosenmund, C., 2019. Autaptic cultures of human induced neurons as a versatile platform for studying synaptic function and neuronal morphology. *Sci Rep* 9, 4890. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41259-1>
- Ferreira, J.G., Pereira, A.L., Maiato, H., 2014. Microtubule Plus-End Tracking Proteins and Their Roles in Cell Division, in: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 59–140. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800255-1.00002-8>
- Filous, A.R., Schwab, J.M., 2018. Determinants of Axon Growth, Plasticity, and Regeneration in the Context of Spinal Cord Injury. *The American Journal of Pathology* 188, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.09.005>

- Fischer, R.S., Fowler, V.M., 2015. Thematic Minireview Series: The State of the Cytoskeleton in 2015. *Journal of Biological Chemistry* 290, 17133–17136. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.663716>
- Fleiss, B., Nilsson, M.K., Blomgren, K., Mallard, C., 2012. Neuroprotection by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in a model of lipopolysaccharide-sensitised neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *J Neuroinflammation* 9, 652. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-70>
- Fletcher, D.A., Mullins, R.D., 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485–492. <https://doi.org/10.1038/nature08908>
- Franker, M.A.M., Hoogenraad, C.C., 2013. Microtubule-based transport – basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. *Journal of Cell Science* jcs.115030. <https://doi.org/10.1242/jcs.115030>
- Fransson, Å., Ruusala, A., Aspenström, P., 2003. Atypical Rho GTPases Have Roles in Mitochondrial Homeostasis and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6495–6502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208609200>
- Fukushima, N.H., Brisch, E., Keegan, B.R., Bleazard, W., Shaw, J.M., 2001. The GTPase Effector Domain Sequence of the Dnm1p GTPase Regulates Self-Assembly and Controls a Rate-limiting Step in Mitochondrial Fission. *MBoC* 12, 2756–2766. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.9.2756>

G

- Gadadhar, Bodakuntla, Natarajan, Janke, 2017. The tubulin code at a glance. *J Cell Sci* 2017;130(8):1347–1353. <https://doi.org/10.1242/jcs.199471>
- Galjart, N., 2005. CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 6, 487–98.
- Gao, X., Zeb, S., He, Y.-Y., Guo, Y., Zhu, Y.-M., Zhou, X.-Y., Zhang, H.-L., 2022. Valproic Acid Inhibits Glial Scar Formation after Ischemic Stroke. *Pharmacology* 107, 263–280. <https://doi.org/10.1159/000514951>
- Gardner, M.K., Zanic, M., Howard, J., 2013. Microtubule catastrophe and rescue. *Current Opinion in Cell Biology* 25, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.09.006>

- Garnham, C.P., Roll-Mecak, A., 2012. The chemical complexity of cellular microtubules: Tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskeleton* 69, 442–463. <https://doi.org/10.1002/cm.21027>
- Gaub, P., Tedeschi, A., Puttagunta, R., Nguyen, T., Schmandke, A., Di Giovanni, S., 2010. HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation. *Cell Death Differ* 17, 1392–1408. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.216>
- Geoffroy, C.G., 2015. Effects of PTEN and Nogo Codeletion on Corticospinal Axon Sprouting and Regeneration in Mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 35,16, 6413–28. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4013-14.2015>
- Geoffroy, C.G., Lorenzana, A.O., Kwan, J.P., Lin, K., Ghassemi, O., Ma, A., Xu, N., Creger, D., Liu, K., He, Z., Zheng, B., 2015. Effects of PTEN and Nogo Codeletion on Corticospinal Axon Sprouting and Regeneration in Mice. *J. Neurosci.* 35, 6413–6428. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4013-14.2015>
- Gilkerson, R.W., Selker, J.M.L., Capaldi, R.A., 2003. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Letters* 546, 355–358. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00633-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00633-1)
- Giustiniani, J., Daire, V., Cantaloube, I., Durand, G., Poüs, C., Perdiz, D., Baillet, A., 2009. Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53. *Cellular Signalling* 21, 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.12.004>
- Gobrecht, P., Andreadaki, A., Diekmann, H., Heskamp, A., Leibinger, M., Fischer, D., 2016. Promotion of Functional Nerve Regeneration by Inhibition of Microtubule Detyrosination. *J. Neurosci.* 36, 3890–3902. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-15.2016>
- Goedeke, L., Shulman, G.I., 2021. Therapeutic potential of mitochondrial uncouplers for the treatment of metabolic associated fatty liver disease and NASH. *Molecular Metabolism* 46, 101178. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101178>
- Gollihue, J.L., Patel, S.P., Eldahan, K.C., Cox, D.H., Donahue, R.R., Taylor, B.K., Sullivan, P.G., Rabchevsky, A.G., 2018. Effects of Mitochondrial Transplantation on Bioenergetics, Cellular Incorporation, and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma* 35, 1800–1818. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5605>

- Goodson, H.V., Jonasson, E.M., 2018. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a022608. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022608>
- Gornstein, E.L., Schwarz, T.L., 2017. Neurotoxic mechanisms of paclitaxel are local to the distal axon and independent of transport defects. *Experimental Neurology* 288, 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.11.015>
- Gotts, J., Atkinson, L., Yanagawa, Y., Deuchars, J., Deuchars, S.A., 2016. Co-expression of GAD67 and choline acetyltransferase in neurons in the mouse spinal cord: A focus on lamina X. *Brain Research* 1646, 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.07.001>
- Grimpe, B., Silver, J., 2002. The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog Brain Res* 137, 333–349. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(02\)37025-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(02)37025-0)
- Griparic, L., Van Der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J., Van Der Blik, A.M., 2004. Loss of the Intermembrane Space Protein Mgm1/OPA1 Induces Swelling and Localized Constrictions along the Lengths of Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 279, 18792–18798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400920200>
- Gu, Z., Kalambogias, J., Yoshioka, S., Han, W., Li, Zhuo, Kawasawa, Y.I., Pochareddy, S., Li, Zhen, Liu, F., Xu, X., Wijeratne, H.R.S., Ueno, M., Blatz, E., Salomone, J., Kumanogoh, A., Rasin, M.-R., Gebelein, B., Weirauch, M.T., Sestan, N., Martin, J.H., Yoshida, Y., 2017. Control of species-dependent cortico-motoneuronal connections underlying manual dexterity. *Science* 357, 400–404. <https://doi.org/10.1126/science.aan3721>
- Guchet, X., 2017. Médecine personnalisée versus médecine de la personne : une fausse alternative. *Lato Sensu* 4, 36–48. <https://doi.org/10.20416/lrsrps.v4i2.813>
- Guillou, E., Bousquet, C., Daloyau, M., Emorine, L.J., Belenguer, P., 2005. Msp1p is an intermembrane space dynamin-related protein that mediates mitochondrial fusion in a Dnm1p-dependent manner in *S. pombe*. *FEBS Letters* 579, 1109–1116. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.083>
- Gundersen, G.G., Cook, T.A., 1999. Microtubules and signal transduction.
- Gunter, T.E., Pfeiffer, D.R., 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 258, C755–C786. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1990.258.5.C755>
- Gunter, T.E., Sheu, S.-S., 2009. Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca²⁺ transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787, 1291–1308. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.12.011>

- Guo, X., Macleod, G.T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., Marin, L., Charlton, M.P., Atwood, H.L., Zinsmaier, K.E., 2005. The GTPase dMiro Is Required for Axonal Transport of Mitochondria to *Drosophila* Synapses. *Neuron* 47, 379–393. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.027>
- Gupta, S., Dutta, S., Hui, S.P., 2023. Regenerative Potential of Injured Spinal Cord in the Light of Epigenetic Regulation and Modulation. *Cells* 12, 1694. <https://doi.org/10.3390/cells12131694>

H

- Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M., Schreiber, S.L., 2003. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4389–4394. <https://doi.org/10.1073/pnas.0430973100>
- Hall, E.D., 1996. Free radicals and lipid peroxidation, in: Narayan, R.K., Wilberger, J.E., Povlishock, J.T. (Eds.), *Neurotrauma*. New York, pp. 1405–1419.
- Halpain, Dehmelt, 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7.
- Hammond, J.W., Huang, C.-F., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G., Verhey, K.J., 2010. Posttranslational Modifications of Tubulin and the Polarized Transport of Kinesin-1 in Neurons. *MBoC* 21, 572–583. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-01-0044>
- Han, S.M., Baig, H.S., Hammarlund, M., 2016. Mitochondria Localize to Injured Axons to Support Regeneration. *Neuron* 92, 1308–1323. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.025>
- Han, X.-J., Lu, Y.-F., Li, S.-A., Kaitsuka, T., Sato, Y., Tomizawa, K., Nairn, A.C., Takei, K., Matsui, H., Matsushita, M., 2008. CaM kinase I α -induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *The Journal of Cell Biology* 182, 573–585. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802164>
- Hanson, K., Tian, N., Vickers, J.C., King, A.E., 2018. The HDAC6 Inhibitor Trichostatin A Acetylates Microtubules and Protects Axons From Excitotoxin-Induced Degeneration in a Compartmented Culture Model. *Front. Neurosci.* 12, 872. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00872>

- Harkcom, W.T., Ghosh, A.K., Sung, M.S., Matov, A., Brown, K.D., Giannakakou, P., Jaffrey, S.R., 2014. NAD⁺ and SIRT3 control microtubule dynamics and reduce susceptibility to antimicrotubule agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404269111>
- Harrison, R.G., Greenman, M.J., Mall, F.P., Jackson, C.M., 1907. Observations of the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.* 1, 116–128. <https://doi.org/10.1002/ar.1090010503>
- Hashimoto, T., 2015. Microtubules in Plants. *The Arabidopsis Book* 13, e0179. <https://doi.org/10.1199/tab.0179>
- Hellal, F., Hurtado, A., Ruschel, J., Flynn, K.C., Laskowski, C.J., Umlauf, M., Kapitein, L.C., Strikis, D., Lemmon, V., Bixby, J., Hoogenraad, C.C., Bradke, F., 2011. Microtubule Stabilization Reduces Scarring and Causes Axon Regeneration After Spinal Cord Injury. *Science* 331, 928–931. <https://doi.org/10.1126/science.1201148>
- Hendrix, S., Sanchez, S., Ventriglia, E., Lemmens, S., 2020. HDAC8 Inhibition Reduces Lesional Iba-1+ Cell Infiltration after Spinal Cord Injury without Effects on Functional Recovery. *IJMS* 21, 4539. <https://doi.org/10.3390/ijms21124539>
- Hernandez-Miranda, L.R., Müller, T., Birchmeier, C., 2017. The dorsal spinal cord and hindbrain: From developmental mechanisms to functional circuits. *Developmental Biology* 432, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.10.008>
- Hevner, R.F., 2007. Layer-Specific Markers as Probes for Neuron Type Identity in Human Neocortex and Malformations of Cortical Development: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66, 101–109. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3180301c06>
- Hirokawa, N., Noda, Y., 2008. Intracellular Transport and Kinesin Superfamily Proteins, KIFs: Structure, Function, and Dynamics. *Physiological Reviews* 88, 1089–1118. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2007>
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., Niwa, S., 2009. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 682–696. <https://doi.org/10.1038/nrm2774>
- Hirose, K., Fan, J., Amos, L.A., 1995. Re-examination of the Polarity of Microtubules and Sheets Decorated with Kinesin Motor Domain. *Journal of Molecular Biology* 251, 329–333. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0437>
- Hollenbeck, P.J., Saxton, W.M., 2006. The axonal transport of mitochondria.

- Höög, J.L., Schwartz, C., Noon, A.T., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., McIntosh, J.R., Antony, C., 2007. Organization of Interphase Microtubules in Fission Yeast Analyzed by Electron Tomography. *Developmental Cell* 12, 349–361. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.020>
- Horton, J.W., 2003. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology* 189, 75–88. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00154-9](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00154-9)
- Horvath, S.E., Daum, G., 2013. Lipids of mitochondria. *Progress in Lipid Research* 52, 590–614. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.002>
- Hosmane, S., Fournier, A., Wright, R., Rajbhandari, L., Siddique, R., Yang, I.H., Ramesh, K.T., Venkatesan, A., Thakor, N., 2011. Valve-based microfluidic compression platform: single axon injury and regrowth. *Lab Chip* 11, 3888. <https://doi.org/10.1039/c1lc20549h>
- Hosseini, S., Van Ham, M., Erck, C., Korte, M., Michaelsen-Preusse, K., 2022. The role of α -tubulin tyrosination in controlling the structure and function of hippocampal neurons. *Front. Mol. Neurosci.* 15, 931859. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.931859>
- Howard, Hyman, 2009. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nat.Rev. Mol. Cell Biol* 10, 569–74.
- Hsu, C.Y., Hu, Z.Y., Doster, S.K., 1996. Cell mediated injury, in: Narayan, R.K., Wilberger, J.E., Povlishock, J.T. (Eds.), *Neurotrauma*. McGraw-Hill, New York, pp. 1433–1444.
- Hu, D.J.-K., Baffet, A.D., Nayak, T., Akhmanova, A., Doye, V., Vallee, R.B., 2013. Dynein Recruitment to Nuclear Pores Activates Apical Nuclear Migration and Mitotic Entry in Brain Progenitor Cells. *Cell* 154, 1300–1313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.024>
- Hu, X., Xu, W., Ren, Y., Wang, Z., He, X., Huang, R., Ma, B., Zhao, J., Zhu, R., Cheng, L., 2023. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Sig Transduct Target Ther* 8, 245. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01477-6>
- Huebner, E. a, Strittmatter, S.M., 2009. Axon Regeneration in the Peripheral and Central Nervous Systems. *Results and Problems in Cell Differentiation* 48, 339–351.
- Hughenoltz, H., Cass, D.E., Dvorak, M.F., 2002. High-dose methylprednisolone for acute closed spinal cord injury—only a treatment option. *Can J Neurol Sci* 29, 227–235. <https://doi.org/10.1017/s0317167100001992>

- Hughes, D.I., Todd, A.J., 2020. Central Nervous System Targets: Inhibitory Interneurons in the Spinal Cord. *Neurotherapeutics* 17, 874–885. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00936-0>
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Roßmanith, T., Michel, H., 2000. Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 8, 669–684. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00152-0)
- Hüttemann, M., Lee, I., Samavati, L., Yu, H., Doan, J.W., 2007. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773, 1701–1720. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.10.001>
- Hyman, A.A., Salsler, S., Drechsel, D.N., Unwin, N., Mitchison, T.J., 1992. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *MBoC* 3, 1155–1167. <https://doi.org/10.1091/mbc.3.10.1155>

I

- Ikegami, K., Heier, R.L., Taruishi, M., Takagi, H., Mukai, M., Shimma, S., Taira, S., Hatanaka, K., Morone, N., Yao, I., Campbell, P.K., Yuasa, S., Janke, C., MacGregor, G.R., Setou, M., 2007. Loss of α -tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3213–3218. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611547104>
- Imamura, K., Kon, T., Ohkura, R., Sutoh, K., 2007. The coordination of cyclic microtubule association/dissociation and tail swing of cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 16134–16139. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702370104>

J

- Jadhav, A., Wei, L., Shi, P., 2016. Compartmentalized Platforms for Neuro-Pharmacological Research. *CN* 14, 72–86. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666150516000957>

- Jakobs, S., 2006. High resolution imaging of live mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763, 561–575. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.004>
- Jakobs, S., Martini, N., Schauss, A.C., Egner, A., Westermann, B., Hell, S.W., 2003. Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *Journal of Cell Science* 116, 2005–2014. <https://doi.org/10.1242/jcs.00423>
- Janke, C., Bulinski, J.C., 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 773–786. <https://doi.org/10.1038/nrm3227>
- Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A.V., Strub, J.-M., Temurak, N., Van Dijk, J., Boucher, D., Van Dorsselaer, A., Suryavanshi, S., Gaertig, J., Eddé, B., 2005. Tubulin Polyglutamylase Enzymes Are Members of the TTL Domain Protein Family. *Science* 308, 1758–1762. <https://doi.org/10.1126/science.1113010>
- Jha, R., Surrey, T., 2015. Regulation of processive motion and microtubule localization of cytoplasmic dynein. *Biochemical Society Transactions* 43, 48–57. <https://doi.org/10.1042/BST20140252>
- Jia, Z., Li, G., Zhang, Z., Li, H., Wang, J., Fan, Z., Lv, G., 2016. Time representation of mitochondrial morphology and function after acute spinal cord injury. *Neural Regen Res* 11, 137. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.175061>
- Jiang, K., Akhmanova, A., 2011. Microtubule tip-interacting proteins: a view from both ends. *Current Opinion in Cell Biology* 23, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.008>
- Johns, A.E., Maragakis, N.J., 2022. Exploring Motor Neuron Diseases Using iPSC Platforms. *Stem Cells* 40, 2–13. <https://doi.org/10.1093/stmcls/sxab006>
- Jones, B.A., Fangman, W.L., 1992. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.* 6, 380–389. <https://doi.org/10.1101/gad.6.3.380>
- Jordan, M.A., Wilson, L., 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4, 253–265. <https://doi.org/10.1038/nrc1317>
- Jouaville, L.S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G.A., Rizzuto, R., 1999. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13807–13812. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13807>

K

- Kadauke, S., Blobel, G.A., 2013. Mitotic bookmarking by transcription factors. *Epigenetics & Chromatin* 6, 6. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-6>
- Kang, J.-S., Tian, J.-H., Pan, P.-Y., Zald, P., Li, C., Deng, C., Sheng, Z.-H., 2008. Docking of Axonal Mitochondria by Syntaphilin Controls Their Mobility and Affects Short-Term Facilitation. *Cell* 132, 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.024>
- Karbowski, M., Jeong, S.-Y., Youle, R.J., 2004. Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *The Journal of Cell Biology* 166, 1027–1039. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407046>
- Kaul, N., Soppina, V., Verhey, K.J., 2014. Effects of α -Tubulin K40 Acetylation and Detyrosination on Kinesin-1 Motility in a Purified System. *Biophysical Journal* 106, 2636–2643. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.008>
- Khawaja, S., Gundersen, G.G., Bulinski, J.C., 1988. Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *The Journal of cell biology* 106, 141–149. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.1.141>
- Kim, D., Kim, S.-H., Park, J.Y., 2019. Floating-on-water Fabrication Method for Thin Polydimethylsiloxane Membranes. *Polymers* 11, 1264. <https://doi.org/10.3390/polym11081264>
- Kingston, D.G.I., 2009. Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents. *J. Nat. Prod.* 72, 507–515. <https://doi.org/10.1021/np800568j>
- Kirshblum, S.C., Burns, S.P., Biering-Sorensen, F., Donovan, W., Graves, D.E., Jha, A., Johansen, M., Jones, L., Krassioukov, A., Mulcahey, M.J., Schmidt-Read, M., Waring, W., 2011. International standards for neurological classification of spinal cord injury (Revised 2011). *The Journal of Spinal Cord Medicine* 34, 535–546. <https://doi.org/10.1179/204577211X13207446293695>
- Kiryu-Seo, S., 2016. Mitochondrial fission is an acute and adaptive response in injured motor neurons. *Scientific reports* 6 28331. <https://doi.org/10.1038/srep28331>
- Klein, I., Lehmann, H., 2021. Pathomechanisms of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Toxics* 9, 229. <https://doi.org/10.3390/toxics9100229>
- Kononova, Kholodov, Theisen, Marx, R.I, F.I, A., E.L., G., V, B., 2015. 52 Tubulin bond energies and microtubule biomechanics determined from nanoindentation in silico. *J. Biomol. Struct. Dyn* 1, 35–36.

- Koriyama, Y., Sugitani, K., Ogai, K., Kato, S., 2014. Neuritogenic Activity of Trichostatin A in Adult Rat Retinal Ganglion Cells Through Acetylation of Histone H3 Lysine 9 and RAR β Induction. *J Pharmacol Sci* 124, 112–116. <https://doi.org/10.1254/jphs.13171SC>
- Korobova, F., Gauvin, T.J., Higgs, H.N., 2014. A Role for Myosin II in Mammalian Mitochondrial Fission. *Current Biology* 24, 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.032>
- Koshiha, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., Chan, D.C., 2004. Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes. *Science* 305, 858–862. <https://doi.org/10.1126/science.1099793>
- Kreitzer, G., Liao, G., Gundersen, G.G., 1999. Detyrosination of Tubulin Regulates the Interaction of Intermediate Filaments with Microtubules In Vivo via a Kinesin-dependent Mechanism. *MBoC* 10, 1105–1118. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.4.1105>
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssière, J., Mignotte, B., 1995. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB j.* 9, 1277–1287. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.13.7557017>
- Kuznetsov, S.A., Langford, G.M., Weiss, D.G., 1992. Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* 356, 722–725. <https://doi.org/10.1038/356722a0>
- Kwok, J.C.F., Warren, P., Fawcett, J.W., 2012. Chondroitin sulfate: A key molecule in the brain matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 44, 582–586.

L

- Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A., Van Der Blik, A.M., 1999. C. elegans Dynamin-Related Protein DRP-1 Controls Severing of the Mitochondrial Outer Membrane. *Molecular Cell* 4, 815–826. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80391-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80391-3)
- Lafanechère, L., Job, D., 2000. The Third Tubulin Pool.
- Landes, T., Leroy, I., Bertholet, A., Diot, A., Khosrobakhsh, F., Daloyau, M., Davezac, N., Miquel, M.-C., Courilleau, D., Guillou, E., 2010. OPA1 (dys)functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21, 593–598. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.12.012>

- Langford, G.M., 2002. Myosin-V, a Versatile Motor for Short-Range Vesicle Transport. *Traffic* 3, 859–865. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.31202.x>
- Larti, F., Kahrizi, K., Musante, L., Hu, H., Papari, E., Fattahi, Z., Bazazzadegan, N., Liu, Z., Banan, M., Garshasbi, M., Wienker, T.F., Ropers, H.H., Galjart, N., Najmabadi, H., 2015. A defect in the CLIP1 gene (CLIP-170) can cause autosomal recessive intellectual disability. *Eur J Hum Genet* 23, 331–336. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.13>
- Lassus, B., Magnifico, S., Pignon, S., Belenguer, P., Miquel, M.-C., Peyrin, J.-M., 2016. Alterations of mitochondrial dynamics allow retrograde propagation of locally initiated axonal insults. *Sci Rep* 6, 32777. <https://doi.org/10.1038/srep32777>
- Lassus, B., Naudé, J., Faure, P., Guedin, D., Von Boxberg, Y., Mannoury La Cour, C., Millan, M.J., Peyrin, J.-M., 2018. Glutamatergic and dopaminergic modulation of cortico-striatal circuits probed by dynamic calcium imaging of networks reconstructed in microfluidic chips. *Sci Rep* 8, 17461. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35802-9>
- Lea, P.J., Hollenberg, M.J., 1989. Mitochondrial structure revealed by high-resolution scanning electron microscopy. *Am. J. Anat.* 184, 245–257. <https://doi.org/10.1002/aja.1001840308>
- Lee, H., Yoon, Y., 2016. Mitochondrial fission and fusion. *Biochemical Society Transactions* 44, 1725–1735. <https://doi.org/10.1042/BST20160129>
- Lee, J.K., Geoffroy, C.G., Chan, A.F., Tolentino, K.E., Crawford, M.J., Leal, M.A., Kang, B., Zheng, B., 2010. Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. *Neuron* 66, 663–670.
- Legesse-Miller, A., Massol, R.H., Kirchhausen, T., 2003. Constriction and Dnm1p Recruitment Are Distinct Processes in Mitochondrial Fission. *Molecular Biology of the Cell* 14.
- Lewis, M.J., 1996. Solid rheology and texture, in: *Physical Properties of Foods and Food Processing Systems*. Elsevier, pp. 137–166. <https://doi.org/10.1533/9781845698423.137>
- Ligon, L.A., Steward, O., 2000. Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J. Comp. Neurol.* 427, 351–361. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001120\)427:3<351::AID-CNE3>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001120)427:3<351::AID-CNE3>3.0.CO;2-R)
- Lin, M.-Y., Sheng, Z.-H., 2015. Regulation of mitochondrial transport in neurons. *Experimental Cell Research* 334, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.01.004>

- Lin, S., Nazif, K., Smith, A., Baas, P.W., Smith, G.M., 2015. Histone acetylation inhibitors promote axon growth in adult dorsal root ganglia neurons: Histone Acetylation Inhibitors Promote Axon Growth in Adult DRG. *Journal of Neuroscience Research* 93, 1215–1228. <https://doi.org/10.1002/jnr.23573>
- Lin, S.X., Gundersen, G.G., Maxfield, F.R., 2002. Export from Pericentriolar Endocytic Recycling Compartment to Cell Surface Depends on Stable, Detyrosinated (Glu) Microtubules and Kinesin. *MBoC* 13, 96–109. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-05-0224>
- Liu, B., Liu, S., Sun, D., 2023. Low-Dose Taxol Promotes Neuronal Axons Extension and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Mediators of Inflammation* 2023, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2023/5604103>
- Liu, H., Yazdani, A., Murray, L.M., Beauvais, A., Kothary, R., 2014. The Smn-Independent Beneficial Effects of Trichostatin A on an Intermediate Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *PLoS ONE* 9, e101225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101225>
- Liu, K., Lu, Y., Lee, J.K., Samara, R., Willenberg, R., Sears-Kraxberger, I., Tedeschi, A., Park, K.K., Jin, D., Cai, B., Xu, B., Connolly, L., Steward, O., Zheng, B., He, Z., 2010. PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. *Nat Neurosci* 13, 1075–1081. <https://doi.org/10.1038/nn.2603>
- Lossi, L., Alasia, S., Salio, C., Merighi, A., 2009. Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Progress in Neurobiology* 88, 221–245. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.01.002>
- Lowery, L.A., Vactor, D.V., 2009. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 332–343. <https://doi.org/10.1038/nrm2679>
- Ludueña, R.F., 2013. A Hypothesis on the Origin and Evolution of Tubulin, in: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 41–185. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407699-0.00002-9>

M

- Ma, T.C., Willis, D.E., 2015. What makes a RAG regeneration associated? *Front. Mol. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00043>

- Mackeh, R., Lorin, S., Ratier, A., Mejdoubi-Charef, N., Baillet, A., Bruneel, A., Hamäi, A., Codogno, P., Poüs, C., Perdiz, D., 2014. Reactive Oxygen Species, AMP-activated Protein Kinase, and the Transcription Cofactor p300 Regulate α -Tubulin Acetyltransferase-1 (α TAT-1/MEC-17)-dependent Microtubule Hyperacetylation during Cell Stress. *Journal of Biological Chemistry* 289, 11816–11828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507400>
- Mackeh, R., Perdiz, D., Lorin, S., Codogno, P., Poüs, C., 2013. Autophagy and microtubules – new story, old players. *Journal of Cell Science* 126, 1071–1080. <https://doi.org/10.1242/jcs.115626>
- Magiera, M.M., Singh, P., Gadadhar, S., Janke, C., 2018. Tubulin Posttranslational Modifications and Emerging Links to Human Disease. *Cell* 173, 1323–1327. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.018>
- Magnifico, S., 2013. NAD⁺ acts on mitochondrial SirT3 to prevent axonal caspase activation and axonal degeneration. *FASEB J* 27, 4712–22.
- Magnifico, S., Saias, L., Deleglise, B., Duplus, E., Kilinc, D., Miquel, M., Viovy, J., Brugg, B., Peyrin, J., 2013. NAD⁺ acts on mitochondrial SirT3 to prevent axonal caspase activation and axonal degeneration. *FASEB j* 27, 4712–4722. <https://doi.org/10.1096/fj.13-229781>
- Mallik, R., Gross, S.P., 2004. Molecular Motors: Strategies to Get Along. *Current Biology* 14, R971–R982. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.046>
- Mar, F.M., Simões, A.R., Leite, S., Morgado, M.M., Santos, T.E., Rodrigo, I.S., Teixeira, C.A., Misgeld, T., Sousa, M.M., 2014. CNS Axons Globally Increase Axonal Transport after Peripheral Conditioning. *J. Neurosci.* 34, 5965–5970. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4680-13.2014>
- Marchisella, F., Coffey, E.T., Hollos, P., 2016. Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease. *Cytoskeleton* 73, 596–611. <https://doi.org/10.1002/cm.21300>
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., Wu, C., 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5, 793–807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>
- Matsuyama, A., 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO Journal* 21, 6820–6831. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf682>
- Mattson, M.P., Gleichmann, M., Cheng, A., 2008. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 60, 748–766. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.010>

- McCarron, J.G., Wilson, C., Sandison, M.E., Olson, M.L., Girkin, J.M., Saunter, C., Chalmers, S., 2013. From Structure to Function: Mitochondrial Morphology, Motion and Shaping in Vascular Smooth Muscle. *J Vasc Res* 50, 357–371. <https://doi.org/10.1159/000353883>
- McCormack, J.G., Denton, R.M., 1980. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Properties of the Ca²⁺-sensitive dehydrogenases within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat. *Biochemical Journal* 190, 95–105. <https://doi.org/10.1042/bj1900095>
- McEwen, M.L., Sullivan, P.G., Rabchevsky, A.G., Springer, J.E., 2011. Targeting Mitochondrial Function for the Treatment of Acute Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics* 8, 168–179. <https://doi.org/10.1007/s13311-011-0031-7>
- McKean, P.G., Vaughan, S., Gull, K., 2001. The extended tubulin superfamily. *Journal of Cell Science* 114, 2723–2733. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.15.2723>
- McKerracher, L., Rosen, K.M., 2015. MAG, myelin and overcoming growth inhibition in the CNS. *Front. Mol. Neurosci* 8, 51.
- Melkov, A., Abdu, U., 2018. Regulation of long-distance transport of mitochondria along microtubules. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 163–176. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2590-1>
- Mesías, R.E., Zaki, Y., Guevara, C.A., Friedman, L.G., Hussein, A., Therrien, K., Magee, A.R., Tzavaras, N., Del Valle, P., Baxter, M.G., Huntley, G.W., Benson, D.L., 2023. Development and cadherin-mediated control of prefrontal corticostriatal projections in mice. *iScience* 26, 108002. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108002>
- Mietto, B.S., Mostacada, K., Martinez, A.M.B., 2015. Neurotrauma and Inflammation: CNS and PNS Responses. *Mediators of Inflammation* 2015, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/251204>
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., Hirokawa, N., 2001. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7004–7011. <https://doi.org/10.1073/pnas.111145398>
- Milbreta, U., Von Boxberg, Y., Maily, P., Nothias, F., Soares, S., 2014. Astrocytic and Vascular Remodeling in the Injured Adult Rat Spinal Cord after Chondroitinase ABC Treatment. *Journal of Neurotrauma* 31, 803–818. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.3143>
- Millet, L.J., Gillette, M.U., 2012. New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. *Trends in Neurosciences* 35, 752–761. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.09.001>

- Mils, V., Bosch, S., Roy, J., Bel-Vialar, S., Belenguer, P., Pituello, F., Miquel, M.-C., 2015. Mitochondrial Reshaping Accompanies Neural Differentiation in the Developing Spinal Cord. *PLoS ONE* 10, e0128130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128130>
- Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galjart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, S., Akhmanova, A., 2005. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *The Journal of Cell Biology* 168, 141–153. <https://doi.org/10.1083/jcb.200405094>
- Minetti, G.C., Colussi, C., Adami, R., Serra, C., Mozzetta, C., Parente, V., Fortuni, S., Straino, S., Sampaolesi, M., Di Padova, M., Illi, B., Gallinari, P., Steinkühler, C., Capogrossi, M.C., Sartorelli, V., Bottinelli, R., Gaetano, C., Puri, P.L., 2006. Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nat Med* 12, 1147–1150. <https://doi.org/10.1038/nm1479>
- Mironov, S.L., Ivannikov, M.V., Johansson, M., 2005. [Ca²⁺] Signaling between Mitochondria and Endoplasmic Reticulum in Neurons Is Regulated by Microtubules. *Journal of Biological Chemistry* 280, 715–721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409819200>
- Misgeld, T., Kerschensteiner, M., Bareyre, F.M., Burgess, R.W., Lichtman, J.W., 2007. Imaging axonal transport of mitochondria in vivo. *Nat Methods* 4, 559–61.
- Mitchison, T., Kirschner, M., 1984a. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* 312, 232–237. <https://doi.org/10.1038/312232a0>
- Mitchison, T., Kirschner, M., 1984b. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242. <https://doi.org/10.1038/312237a0>
- Mitra, A., Sept, D., 2008. Taxol Allosterically Alters the Dynamics of the Tubulin Dimer and Increases the Flexibility of Microtubules. *Biophysical Journal* 95, 3252–3258. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.133884>
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., Macklis, J.D., 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8, 427–437. <https://doi.org/10.1038/nrn2151>
- Moreira, J.M.A., Scheipers, P., Sørensen, P., 2003. The histone deacetylase inhibitor Trichostatin A modulates CD4⁺ T cell responses. *BMC Cancer* 3, 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-3-30>
- Morris, R.L., Hollenbeck, P.J., 1995. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *The Journal of cell biology* 131, 1315–1326. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.5.1315>

- Morrison, B., Elkin, B.S., Dollé, J.-P., Yarmush, M.L., 2011. In Vitro Models of Traumatic Brain Injury. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 13, 91–126. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124706>
- Muroyama, A., Lechler, T., 2017. Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development* 144, 3012–3021. <https://doi.org/10.1242/dev.153171>
- Muto, E., Sakai, H., Kaseda, K., 2005. Long-range cooperative binding of kinesin to a microtubule in the presence of ATP. *The Journal of Cell Biology* 168, 691–696. <https://doi.org/10.1083/jcb.200409035>

N

- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H., Hirokawa, N., 1994. KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 79, 1209–1220. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90012-4)
- Narayanareddy, B.R., Vartiainen, S., Hariri, N., O'Dowd, D.K., Gross, S.P., 2014. A biophysical analysis of mitochondrial movement: differences between transport in neuronal cell bodies versus processes. *Traffic* 15, 24673933.
- Navarro, X., Vivó, M., Valero-Cabré, A., 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress in Neurobiology* 82, 163–201. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.06.005>
- Naylor, K., Ingerman, E., Okreglak, V., Marino, M., Hinshaw, J.E., Nunnari, J., 2006. Mdv1 Interacts with Assembled Dnm1 to Promote Mitochondrial Division. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2177–2183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507943200>
- Nicholls, D.G., 2005. Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* 38, 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.011>
- Nicholls, D.G., Budd, S.L., 2000. Mitochondria and Neuronal Survival. *Physiological Reviews* 80, 315–360. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.315>
- Nogales, E., 2000. STRUCTURAL INSIGHTS INTO MICROTUBULE FUNCTION.
- Nogales, E., Wolf, S.G., Downing, K.H., 1998. Structure of the alpha/beta tubulin dimer by electron crystallography 391.

- Nogales, E., Zhang, R., 2016. Visualizing microtubule structural transitions and interactions with associated proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 37, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.12.009>
- Nogales, Whittaker, Milligan, Downing, 1999. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 8;96(1):79-88.
- Nothias, F., Fischer, I., Murray, M., Mirman, S., Vincent, J.-D., 1996. Expression of a phosphorylated isoform of MAP1B is maintained in adult central nervous system areas that retain capacity for structural plasticity. *J. Comp. Neurol.* 368, 317–334. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960506\)368:3<317::AID-CNE1>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960506)368:3<317::AID-CNE1>3.0.CO;2-8)

O

- Oakley, B.R., 2000. An abundance of tubulins. *Trends in Cell Biology* 10, 537–542. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01857-2](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01857-2)
- Obermair, F.-J., Schröter, A., Thallmair, M., 2008. Endogenous Neural Progenitor Cells as Therapeutic Target After Spinal Cord Injury. *Physiology* 23, 296–304. <https://doi.org/10.1152/physiol.00017.2008>
- Oiwa, K., Sakakibara, H., 2005. Recent progress in dynein structure and mechanism. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.12.006>
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., Lenaers, G., 2003. Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 7743–7746. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200677200>
- Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., Ducommun, B., Lenaers, G., Belenguer, P., 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Letters* 523, 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02985-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02985-X)
- OMS, 2014. Lésions de la moelle épinière: perspectives internationales. Organisation mondiale de la santé; [Recherche suisse pour paraplégiques], Genève], [Nottwil.

- Oropesa Ávila, M., Fernández Vega, A., Garrido Maraver, J., Villanueva Paz, M., De Lavera, I., De La Mata, M., Cordero, M.D., Alcocer Gómez, E., Delgado Pavón, A., Álvarez Córdoba, M., Cotán, D., Sánchez-Alcázar, J.A., 2015. Emerging roles of apoptotic microtubules during the execution phase of apoptosis. *Cytoskeleton* 72, 435–446. <https://doi.org/10.1002/cm.21254>
- O’Shea, T.M., Burda, J.E., Sofroniew, M.V., 2017. Cell biology of spinal cord injury and repair. *J Clin Invest* 127, 3259–3270. <https://doi.org/10.1172/JCI90608>
- Otera, H., Ishihara, N., Mihara, K., 2013. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833, 23434681.

P

- Paixão, S., Loschek, L., Gaitanos, L., Alcalà Morales, P., Goulding, M., Klein, R., 2019. Identification of Spinal Neurons Contributing to the Dorsal Column Projection Mediating Fine Touch and Corrective Motor Movements. *Neuron* 104, 749-764.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.08.029>
- Parker, A.L., Teo, W.S., McCarroll, J.A., Kavallaris, M., 2017. An Emerging Role for Tubulin Isoforms in Modulating Cancer Biology and Chemotherapy Resistance. *IJMS* 18, 1434. <https://doi.org/10.3390/ijms18071434>
- Patrón, L.A., Zinsmaier, K.E., 2016. Mitochondria on the Road to Power Axonal Regeneration. *Neuron* 92, 1152–1154. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.007>
- Pedroni, A., Ampatzis, K., 2019. Large-Scale Analysis of the Diversity and Complexity of the Adult Spinal Cord Neurotransmitter Typology. *iScience* 19, 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.09.010>
- Pelloquin, L., Belenguer, P., Menon, Y., Ducommun, B., 1998. Identification of a Fission Yeast Dynamin-Related Protein Involved in Mitochondrial DNA Maintenance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251, 720–726. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9539>
- Penna, L.S., Henriques, J.A.P., Bonatto, D., 2017. Anti-mitotic agents: Are they emerging molecules for cancer treatment? *Pharmacology & Therapeutics* 173, 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.007>

- Perdiz, D., Lorin, S., Leroy-Gori, I., Poüs, C., 2017. Stress-induced hyperacetylation of microtubule enhances mitochondrial fission and modulates the phosphorylation of Drp1 at 616Ser. *Cellular Signalling* 39, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.07.020>
- Peyrin, J.-M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., Betuing, S., Pietri, M., Caboche, J., Vanhoutte, P., Viovy, J.-L., Brugg, B., 2011. Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab Chip* 11, 3663. <https://doi.org/10.1039/c1lc20014c>
- Pfanner, N., Meijer, M., 1997. Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine. *Current Biology* 7, R100–R103. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00048-0)
- Pinton, P., Leo, S., Wieckowski, M.R., Di Benedetto, G., Rizzuto, R., 2004. Long-term modulation of mitochondrial Ca²⁺ signals by protein kinase C isozymes. *The Journal of Cell Biology* 165, 223–232. <https://doi.org/10.1083/jcb.200311061>
- Pivovarova, N.B., Andrews, S.B., 2010. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *The FEBS Journal* 277, 3622–3636. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07754.x>
- Popovich, P.G., Guan, Z., Wei, P., Huitinga, I., Van Rooijen, N., Stokes, B.T., 1999. Depletion of Hematogenous Macrophages Promotes Partial Hindlimb Recovery and Neuroanatomical Repair after Experimental Spinal Cord Injury. *Experimental Neurology* 158, 351–365. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7118>
- Popovich, P.G., Horner, P.J., Mullin, B.B., Stokes, B.T., 1996. A quantitative spatial analysis of the blood-spinal cord barrier. I. Permeability changes after experimental spinal contusion injury. *Exp. Neurol* 142, 258–275.
- Pozo Devoto, V.M., Onyango, I.G., Stokin, G.B., 2022. Mitochondrial behavior when things go wrong in the axon. *Front. Cell. Neurosci.* 16, 959598. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.959598>
- Praefcke, G.J.K., McMahon, H.T., 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 133–147. <https://doi.org/10.1038/nrm1313>
- Prota, A.E., Bargsten, K., Zurwerra, D., Field, J.J., Díaz, J.F., Altmann, K.-H., Steinmetz, M.O., 2013. Molecular Mechanism of Action of Microtubule-Stabilizing Anticancer Agents. *Science* 339, 587–590. <https://doi.org/10.1126/science.1230582>

- Ptacek, J., Snajdr, I., Schimer, J., Kutil, Z., Mikesova, J., Baranova, P., Havlinova, B., Tueckmantel, W., Majer, P., Kozikowski, A., Barinka, C., 2023. Selectivity of Hydroxamate- and Difluoromethyloxadiazole-Based Inhibitors of Histone Deacetylase 6 In Vitro and in Cells. *IJMS* 24, 4720. <https://doi.org/10.3390/ijms24054720>
- Purves, D. (Ed.), 2004. *Neuroscience*, 3rd ed. ed. Sinauer Associates, Publishers, Sunderland, Mass.

R

- Raineteau, O., Schwab, M.E., 2001. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci* 2, 263–273.
- Raivich, G., Makwana, M., 2007. The making of successful axonal regeneration: Genes, molecules and signal transduction pathways. *Brain Research Reviews* 53, 287–311. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.09.005>
- Rebhi, A., Madoui, M., Ouedraogo, A., Mimouni, L.D., Abdmouleh, R., Otmane, T., Rouainia, T., Abdelali, A., 2007. Construction sociale de la maladie et rapport aux médecines. Une approche dynamique et intégratrice. *insaniyat*. <https://doi.org/10.4000/insaniyat.3239>
- Reck-Peterson, S.L., 2015. Dynactin revealed. *Nat Struct Mol Biol* 22, 359–360. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3022>
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., Verhey, K.J., 2006. Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Current Biology* 16, 2166–2172. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.014>
- Regehr, K.J., Domenech, M., Koepsel, J.T., Carver, K.C., Ellison-Zelski, S.J., Murphy, W.L., Schuler, L.A., Alarid, E.T., Beebe, D.J., 2009. Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. *Lab Chip* 9, 2132. <https://doi.org/10.1039/b903043c>
- Renault, R., Durand, J.-B., Viovy, J.-L., Villard, C., 2016. Asymmetric axonal edge guidance: a new paradigm for building oriented neuronal networks. *Lab Chip* 16, 2188–2191. <https://doi.org/10.1039/C6LC00479B>

- Richetin, K., Moulis, M., Millet, A., Arràzola, M.S., Andraini, T., Hua, J., Davezac, N., Roybon, L., Belenguer, P., Miquel, M.-C., Rampon, C., 2017. Amplifying mitochondrial function rescues adult neurogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 102, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.03.002>
- Rigamonti, A., Repetti, G.G., Sun, C., Price, F.D., Reny, D.C., Rapino, F., Weisinger, K., Benkler, C., Peterson, Q.P., Davidow, L.S., Hansson, E.M., Rubin, L.L., 2016. Large-Scale Production of Mature Neurons from Human Pluripotent Stem Cells in a Three-Dimensional Suspension Culture System. *Stem Cell Reports* 6, 993–1008. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.010>
- Risinger, A.L., Giles, F.J., Mooberry, S.L., 2009. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treatment Reviews* 35, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.11.001>
- Rivieccio, M.A., Brochier, C., Willis, D.E., Walker, B.A., D'Annibale, M.A., McLaughlin, K., Siddiq, A., Kozikowski, A.P., Jaffrey, S.R., Twiss, J.L., Ratan, R.R., Langley, B., 2009. HDAC6 is a target for protection and regeneration following injury in the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19599–19604. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907935106>
- Rizzuto, R., Pinton, P., Brini, M., Chiesa, A., Filippin, L., Pozzan, T., 1999. Mitochondria as biosensors of calcium microdomains. *Cell Calcium* 26, 193–200. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0076>
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., Pozzan, T., 1998. Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses. *Science* 280, 1763–1766. <https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1763>
- Roberts, A.J., Kon, T., Knight, P.J., Sutoh, K., Burgess, S.A., 2013. Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 713–726. <https://doi.org/10.1038/nrm3667>
- Rogowski, K., Juge, F., Van Dijk, J., Wloga, D., Strub, J.-M., Levilliers, N., Thomas, D., Bré, M.-H., Van Dorsselaer, A., Gaertig, J., Janke, C., 2009. Evolutionary Divergence of Enzymatic Mechanisms for Posttranslational Polyglycylation. *Cell* 137, 1076–1087. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.020>
- Rajo, M., Legros, F., Chateau, D., Lombès, A., 2002. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *Journal of Cell Science* 115, 1663–1674. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.8.1663>

- Rolfe, D.F., Brown, G.C., 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews* 77, 731–758. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.731>
- Rovini, A., Savry, A., Braguer, D., Carré, M., 2011. Microtubule-targeted agents: When mitochondria become essential to chemotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807, 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.01.001>
- Ruschel, J., Bradke, F., 2018. Systemic administration of epothilone D improves functional recovery of walking after rat spinal cord contusion injury. *Experimental Neurology* 306, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.12.001>
- Ruschel, J., Hellal, F., Flynn, K.C., Dupraz, S., Elliott, D.A., Tedeschi, A., Bates, M., Sliwinski, C., Brook, G., Dobrindt, K., Peitz, M., Brüstle, O., Norenberg, M.D., Blesch, A., Weidner, N., Bunge, M.B., Bixby, J.L., Bradke, F., 2015. Systemic administration of epothilone B promotes axon regeneration after spinal cord injury. *Science* 348, 347–352. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2958>

S

- Salmela, A.-L., Kallio, M.J., 2013. Mitosis as an anti-cancer drug target. *Chromosoma* 122, 431–449. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0419-8>
- Sances, S., Bruijn, L.I., Chandran, S., Eggan, K., Ho, R., Klim, J.R., Livesey, M.R., Lowry, E., Macklis, J.D., Rushton, D., Sadegh, C., Sareen, D., Wichterle, H., Zhang, S.-C., Svendsen, C.N., 2016. Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Nat Neurosci* 19, 542–553. <https://doi.org/10.1038/nn.4273>
- Sanderson, L., Taylor, G.W., Aboagye, E.O., Alao, J.P., Latigo, J.R., Coombes, R.C., Vigushin, D.M., 2004. PLASMA PHARMACOKINETICS AND METABOLISM OF THE HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR TRICHOSTATIN A AFTER INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION TO MICE. *Drug Metab Dispos* 32, 1132–1138. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000638>
- Santel, A., Fuller, M.T., 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science* 114, 867–874. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.5.867>

- Sanyal, C., Pietsch, N., Ramirez Rios, S., Peris, L., Carrier, L., Moutin, M.-J., 2023. The detyrosination/re-tirosination cycle of tubulin and its role and dysfunction in neurons and cardiomyocytes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 137, 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.12.006>
- Saraste, M., 1999. Oxidative Phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science* 283, 1488–1493. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1488>
- Satir, T.M., Nazir, F.H., Vizlin-Hodzic, D., Hardselius, E., Blennow, K., Wray, S., Zetterberg, H., Agholme, L., Bergström, P., 2020. Accelerated neuronal and synaptic maturation by BrainPhys medium increases A β secretion and alters A β peptide ratios from iPSC-derived cortical neurons. *Sci Rep* 10, 601. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57516-7>
- Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y., Endo, H., 2003. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300, 482–493. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02874-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02874-7)
- Schepici, G., Gugliandolo, A., Mazzon, E., 2022. Serum-Free Cultures: Could They Be a Future Direction to Improve Neuronal Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells? *IJMS* 23, 6391. <https://doi.org/10.3390/ijms23126391>
- Schizas, N., Rojas, R., Kootala, S., Andersson, B., Pettersson, J., Hilborn, J., Hailer, N.P., 2014. Hyaluronic acid-based hydrogel enhances neuronal survival in spinal cord slice cultures from postnatal mice. *J Biomater Appl* 28, 825–836. <https://doi.org/10.1177/0885328213483636>
- Schlame, M., 2021. Protein crowding in the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1862, 148305. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148305>
- Scholpa, N.E., Schnellmann, R.G., 2017. Mitochondrial-Based Therapeutics for the Treatment of Spinal Cord Injury: Mitochondrial Biogenesis as a Potential Pharmacological Target. *J Pharmacol Exp Ther* 363, 303–313. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244806>
- Schroer, T.A., 2004. DYNAMACTIN. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 759–779. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.012103.094623>
- Schuyler, S.C., Pellman, D., 2001. Microtubule “Plus-End-Tracking Proteins.” *Cell* 105, 421–424. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00364-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00364-6)

- Schwab, J.M., Breghtel, K., Mueller, C.-A., Failli, V., Kaps, H.-P., Tuli, S.K., Schluesener, H.J., 2006. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration—an integrative perspective. *Progress in Neurobiology* 78, 91–116. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.12.004>
- Schwab, M.E., 2004. Nogo and axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology* 14, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.01.004>
- Schwab, M.E., Strittmatter, S.M., 2014. Nogo limits neural plasticity and recovery from injury. *Curr. Opin. Neurobiol* 27, 53–60.
- Sengottuvel, V., Leibinger, M., Pfreimer, M., Andreadaki, A., Fischer, D., 2011. Taxol Facilitates Axon Regeneration in the Mature CNS. *J. Neurosci.* 31, 2688–2699. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4885-10.2011>
- Sesaki, H., Jensen, R.E., 1999. Division versus Fusion: Dnm1p and Fzo1p Antagonistically Regulate Mitochondrial Shape. *The Journal of Cell Biology* 147, 699–706. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.4.699>
- Shearer, M.C., Fawcett, J.W., 2001. The astrocyte/meningeal cell interface - A barrier to successful nerve regeneration? *Cell Tissue Res* 305, 267–273.
- Sheng, Z.-H., 2017. The Interplay of Axonal Energy Homeostasis and Mitochondrial Trafficking and Anchoring. *Trends in Cell Biology* 27, 403–416. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.01.005>
- Shin, J.E., Cho, Y., 2017. Epigenetic Regulation of Axon Regeneration after Neural Injury. *Molecules and Cells* 40, 10–16. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2311>
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M.J., Davie, J.R., Peterson, C.L., 2006. Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. *Science* 311, 844–847. <https://doi.org/10.1126/science.1124000>
- Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., Arbel, N., 2010. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular Aspects of Medicine* 31, 227–285. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.03.002>
- Shrirao, A.B., Kung, F.H., Omelchenko, A., Schloss, R.S., Boustany, N.N., Zahn, J.D., Yarmush, M.L., Firestein, B.L., 2018. Microfluidic platforms for the study of neuronal injury in vitro. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 815–830. <https://doi.org/10.1002/bit.26519>
- Shukla, S., Tekwani, B.L., 2020. Histone Deacetylases Inhibitors in Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection and Neuronal Differentiation. *Front. Pharmacol.* 11, 537. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00537>

- Silva, N.A., Sousa, N., Reis, R.L., Salgado, A.J., 2014. From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in Neurobiology* 114, 25–57. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.002>
- Silver, J., Miller, J.H., 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5, 146–156. <https://doi.org/10.1038/nrn1326>
- Slovinska, L., Blasko, J., Nagyova, M., Szekiova, E., Cizkova, D., 2012. In Vitro Models of Spinal Cord Injury, in: *Intech*. pp. 75–100. <https://doi.org/10.5772/711>
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L., Van Der Blik, A.M., 2001. Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *MBoC* 12, 2245–2256. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245>
- Smith, G.M., Gallo, G., 2018. The role of mitochondria in axon development and regeneration. *Devel Neurobio* 78, 221–237. <https://doi.org/10.1002/dneu.22546>
- Soares, S., 2007. Extensive structural remodeling of the injured spinal cord revealed by phosphorylated MAP1B in sprouting axons and degenerating neurons. *Eur. J. Neurosci* 26, 1446–1461.
- Soares, S., 2002. Phosphorylated MAP1B is induced in central sprouting of primary afferents in response to peripheral injury but not in response to rhizotomy. *Eur. J. Neurosci* 16, 593.
- Soares, S., Barnat, M., Salim, C., Von Boxberg, Y., Ravaille-Veron, M., Nothias, F., 2007. Extensive structural remodeling of the injured spinal cord revealed by phosphorylated MAP1B in sprouting axons and degenerating neurons: Remodeling of injured spinal cord via phosphorylated MAP1B. *European Journal of Neuroscience* 26, 1446–1461. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05794.x>
- Sofroniew, M.V., 2018. Dissecting spinal cord regeneration. *Nature* 557, 343–350. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0068-4>
- Sofroniew, M.V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32, 638–647.
- Song, Mandelkow, 1993. Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1;90(5)1671-5.
- Song, Y., Brady, S.T., 2015. Post-translational modifications of tubulin: Pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol* 25, 125–136.
- Song, Yuyu, Brady, S.T., 2015. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends in Cell Biology* 25, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.004>

- Soppina, V., Herbstman, J.F., Skiniotis, G., Verhey, K.J., 2012. Luminal Localization of α -tubulin K40 Acetylation by Cryo-EM Analysis of Fab-Labeled Microtubules. *PLoS ONE* 7, e48204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048204>
- Southam, K.A., King, A.E., Blizzard, C.A., McCormack, G.H., Dickson, T.C., 2013. Microfluidic primary culture model of the lower motor neuron–neuromuscular junction circuit. *Journal of Neuroscience Methods* 218, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.06.002>
- Sperry, R.W., 1963. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 50, 703–710.
- Spillane, M., Ketschek, A., Merianda, T.T., Twiss, J.L., Gallo, G., 2013. Mitochondria Coordinate Sites of Axon Branching through Localized Intra-axonal Protein Synthesis. *Cell Reports* 5, 1564–1575. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.022>
- Squair, J.W., Milano, M., De Coucy, A., Gautier, M., Skinnider, M.A., James, N.D., Cho, N., Lasne, A., Kathe, C., Hutson, T.H., Ceto, S., Baud, L., Galan, K., Aureli, V., Laskaratos, A., Barraud, Q., Deming, T.J., Kohman, R.E., Schneider, B.L., He, Z., Bloch, J., Sofroniew, M.V., Courtine, G., Anderson, M.A., 2023. Recovery of walking after paralysis by regenerating characterized neurons to their natural target region. *Science* 381, 1338–1345. <https://doi.org/10.1126/science.adi6412>
- Stahnisch, F.W., 2022. A Century of Brain Regeneration Phenomena and Neuromorphological Research Advances, 1890s–1990s—Examining the Practical Implications of Theory Dynamics in Modern Biomedicine. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 787632. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.787632>
- Starkov, A.A., 2010. The molecular identity of the mitochondrial Ca^{2+} sequestration system. *The FEBS Journal* 277, 3652–3663. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07756.x>
- Steinbeck, J.A., Jaiswal, M.K., Calder, E.L., Kishinevsky, S., Weishaupt, A., Toyka, K.V., Goldstein, P.A., Studer, L., 2016. Functional Connectivity under Optogenetic Control Allows Modeling of Human Neuromuscular Disease. *Cell Stem Cell* 18, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.10.002>
- Steketee, M.B., Moysidis, S.N., Weinstein, J.E., Kreymerman, A., Silva, J.P., Iqbal, S., Goldberg, J.L., 2012. Mitochondrial Dynamics Regulate Growth Cone Motility, Guidance, and Neurite Growth Rate in Perinatal Retinal Ganglion Cells In Vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 7402. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10298>

- Stoklund Dittlau, K., Krasnow, E.N., Fumagalli, L., Vandoorne, T., Baatsen, P., Kerstens, A., Giacomazzi, G., Pavie, B., Rossaert, E., Beckers, J., Sampaolesi, M., Van Damme, P., Van Den Bosch, L., 2021a. Human motor units in microfluidic devices are impaired by FUS mutations and improved by HDAC6 inhibition. *Stem Cell Reports* 16, 2213–2227. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.03.029>
- Stoklund Dittlau, K., Krasnow, E.N., Fumagalli, L., Vandoorne, T., Baatsen, P., Kerstens, A., Giacomazzi, G., Pavie, B., Rossaert, E., Beckers, J., Sampaolesi, M., Van Damme, P., Van Den Bosch, L., 2021b. Generation of Human Motor Units with Functional Neuromuscular Junctions in Microfluidic Devices. *JoVE* 62959. <https://doi.org/10.3791/62959>
- Stys, P.K., 1998. Anoxic and ischemic injury of myelinated axons in CNS white matter: from mechanistic concepts to therapeutics. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 18, 2–25.
- Szelechowski, M., Bétourné, A., Monnet, Y., Ferré, C.A., Thouard, A., Foret, C., Peyrin, J.-M., Hunot, S., Gonzalez-Dunia, D., 2014. A viral peptide that targets mitochondria protects against neuronal degeneration in models of Parkinson's disease. *Nat Commun* 5, 5181. <https://doi.org/10.1038/ncomms6181>
- Szyk, A., 2011. Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nature structural & molecular biology* 18, 1250–1258.

T

- Takuma, H., Sakurai, M., Kanazawa, I., 2002. In vitro formation of corticospinal synapses in an organotypic slice co-culture. *Neuroscience* 109, 359–370. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00472-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00472-9)
- Tanaka, E.M., Kirschner, M.W., 1991. Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *The Journal of cell biology* 115, 345–363. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.2.345>
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A., Hirokawa, N., 1998. Targeted Disruption of Mouse Conventional Kinesin Heavy Chain kif5B, Results in Abnormal Perinuclear Clustering of Mitochondria. *Cell* 93, 1147–1158. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81459-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81459-2)
- Tang, B.L., 2014. Class II HDACs and Neuronal Regeneration. *J of Cellular Biochemistry* 115, 1225–1233. <https://doi.org/10.1002/jcb.24802>

- Tator, C.H., Fehlings, M.G., 1991. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J* 75,15–26.
- Taylor, A.M., Blurton-Jones, M., Rhee, S.W., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., Jeon, N.L., 2005. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* 2, 599–605. <https://doi.org/10.1038/nmeth777>
- Taylor, A.M., Dieterich, D.C., Ito, H.T., Kim, S.A., Schuman, E.M., 2010. Microfluidic Local Perfusion Chambers for the Visualization and Manipulation of Synapses. *Neuron* 66, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.022>
- Taylor, A.M., Rhee, S.W., Tu, C.H., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., Jeon, N.L., 2003. Microfluidic Multicompartment Device for Neuroscience Research. *Langmuir* 19, 1551–1556. <https://doi.org/10.1021/la026417v>
- Tennyson, V.M., 1970. The fine structure of the axon and growth cone of the dorsal root neuroblast of the rabbit embryo. *J Cell Biol* 44, 62–79.
- Tortosa, Montenegro-Venegas, Benoist, Härtel, González-Billault, Esteban, Avila, 2011. Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *J. Biol. Chem* 25;286(47):40638-48.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P., Hansen, J.C., 1998. Disruption of Higher-Order Folding by Core Histone Acetylation Dramatically Enhances Transcription of Nucleosomal Arrays by RNA Polymerase III. *Molecular and Cellular Biology* 18, 4629–4638. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.8.4629>

U

- Ueno, M., Nakamura, Y., Li, J., Gu, Z., Niehaus, J., Maezawa, M., Crone, S.A., Goulding, M., Bacceti, M.L., Yoshida, Y., 2018. Corticospinal Circuits from the Sensory and Motor Cortices Differentially Regulate Skilled Movements through Distinct Spinal Interneurons. *Cell Reports* 23, 1286-1300.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.137>
- Urzi, O., Olofsson Bagge, R., Crescitelli, R., 2022. The dark side of foetal bovine serum in extracellular vesicle studies. *J of Extracellular Vesicle* 11, e12271. <https://doi.org/10.1002/jev2.12271>

V

- Vaart, B. van der, Akhmanova, A., Straube, A., 2009. Regulation of microtubule dynamic instability. *Biochemical Society Transactions* 37, 1007–1013. <https://doi.org/10.1042/BST0371007>
- Vale, R.D., Fletterick, R.J., 1997. THE DESIGN PLAN OF KINESIN MOTORS. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 745–777. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.745>
- Van Der Vaart, B., Manatschal, C., Grigoriev, I., Olieric, V., Gouveia, S.M., Bjelić, S., Demmers, J., Vorobjev, I., Hoogenraad, C.C., Steinmetz, M.O., Akhmanova, A., 2011. SLAIN2 links microtubule plus end-tracking proteins and controls microtubule growth in interphase. *Journal of Cell Biology* 193, 1083–1099. <https://doi.org/10.1083/jcb.201012179>
- Van Dijk, J., Rogowski, K., Miro, J., Lacroix, B., Eddé, B., Janke, C., 2007. A Targeted Multienzyme Mechanism for Selective Microtubule Polyglutamylation. *Molecular Cell* 26, 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.012>
- Van Middendorp, J.J., Sanchez, G.M., Burrige, A.L., 2010. The Edwin Smith papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries. *Eur Spine J* 19, 1815–1823. <https://doi.org/10.1007/s00586-010-1523-6>
- Varadi, A., Johnson-Cadwell, L.I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V.J., Rutter, G.A., 2004. Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *Journal of Cell Science* 117, 4389–4400. <https://doi.org/10.1242/jcs.01299>
- Verhey, K.J., Gaertig, J., 2007. The Tubulin Code. *Cell Cycle* 6, 2152–2160. <https://doi.org/10.4161/cc.6.17.4633>
- Virlogeux, A., Moutaux, E., Christaller, W., Genoux, A., Bruyère, J., Fino, E., Charlot, B., Cazorla, M., Saudou, F., 2018. Reconstituting Corticostriatal Network on-a-Chip Reveals the Contribution of the Presynaptic Compartment to Huntington's Disease. *Cell Reports* 22, 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.013>

W

- Wade, Hyman, 1997. Microtubule structure and dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9(1):12-17. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80146-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80146-9)

- Wang, B., Huang, M., Shang, D., Yan, X., Zhao, B., Zhang, X., 2021. Mitochondrial Behavior in Axon Degeneration and Regeneration. *Front. Aging Neurosci* 13, 650038. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.650038>
- Wang, Biyao, Huang, M., Shang, D., Yan, X., Zhao, B., Zhang, X., 2021. Mitochondrial Behavior in Axon Degeneration and Regeneration. *Front. Aging Neurosci.* 13, 650038. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.650038>
- Wang, J., He, Z., 2009. NAD and axon degeneration: from the Wlds gene to neurochemistry. *Cell. Adh. Migr* 3, 77–87.
- Wang, Q., Cai, H., Hu, Z., Wu, Y., Guo, X., Li, J., Wang, H., Liu, Yani, Liu, Yanlong, Xie, L., Xu, K., Xu, H., He, H., Zhang, H., Xiao, J., 2019. Loureirin B Promotes Axon Regeneration by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress: Induced Mitochondrial Dysfunction and Regulating the Akt/GSK-3 β Pathway after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma* 36, 1949–1964. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5966>
- Wang, X., He, C., Moore, S.C., Ausió, J., 2001. Effects of Histone Acetylation on the Solubility and Folding of the Chromatin Fiber. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12764–12768. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100501200>
- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y.L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M.J., Schwarz, T.L., 2011. PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 147, 893–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.018>
- Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T., 1971. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325–2327. <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>
- Weibel, D., Whitesides, G., 2006. Applications of microfluidics in chemical biology. *Current Opinion in Chemical Biology* 10, 584–591. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.016>
- Weiss, P., 1934. In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J. Exp. Zool* 68, 393–448.
- Welniarz, Q., Dusart, I., Roze, E., 2017. The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders: Corticospinal Tract Human Disorders. *Devel Neurobio* 77, 810–829. <https://doi.org/10.1002/dneu.22455>
- Weng, Y.-L., Joseph, J., An, R., Song, H., Ming, G., 2016. Epigenetic Regulation of Axonal Regenerative Capacity. *Epigenomics* 8, 1429–1442. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0058>

- Williams, P.R., Marincu, B.-N., Sorbara, C.D., Mahler, C.F., Schumacher, A.-M., Griesbeck, O., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., 2014. A recoverable state of axon injury persists for hours after spinal cord contusion in vivo. *Nat Commun* 5, 5683. <https://doi.org/10.1038/ncomms6683>
- Witiw, C.D., Fehlings, M.G., 2015. Acute Spinal Cord Injury. *J Spinal Disord Tech* 28, 202–210. <https://doi.org/10.1097/BSD.0000000000000287>
- Wloga, Gaertig, 2010. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell Sci* 15;123(Pt20):3447-55.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., Nunnari, J., 2000. The Dynamin-Related Gtpase, Mgm1p, Is an Intermembrane Space Protein Required for Maintenance of Fusion Competent Mitochondria. *The Journal of Cell Biology* 151, 341–352. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.341>
- Wood, M., Rymarchyk, S., Zheng, S., Cen, Y., 2018. Trichostatin A inhibits deacetylation of histone H3 and p53 by SIRT6. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 638, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.12.009>

X

- Xie, S., Zhou, J., 2017. Harnessing Plant Biodiversity for the Discovery of Novel Anticancer Drugs Targeting Microtubules. *Front. Plant Sci.* 8, 720. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00720>
- Xu, J., Long, H., Chen, W., Cheng, X., Yu, H., Huang, Y., Wang, X., Li, F., 2018. Ultrastructural Features of Neurovascular Units in a Rat Model of Chronic Compressive Spinal Cord Injury. *Front. Neuroanat.* 11, 136. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00136>

Y

- Yaffe, M.P., Harata, D., Verde, F., Eddison, M., Toda, T., Nurse, P., 1996. Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11664–11668. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11664>

- Yaffe, M.P., Stuurman, N., Vale, R.D., 2003. Mitochondrial positioning in fission yeast is driven by association with dynamic microtubules and mitotic spindle poles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11424–11428. <https://doi.org/10.1073/pnas.1534703100>
- Yamada, K.M., Spooner, B.S., Wessells, N.K., 1971. Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. *J Cell Biol* 49, 614–35.
- Yang, I.H., Siddique, R., Hosmane, S., Thakor, N., Höke, A., 2009. Compartmentalized microfluidic culture platform to study mechanism of paclitaxel-induced axonal degeneration. *Experimental Neurology* 218, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.04.017>
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.-I., Jones, D.P., Wang, X., 1997. Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science* 275, 1129–1132. <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1129>
- Yap, Y.C., Dickson, T.C., King, A.E., Breadmore, M.C., Guijt, R.M., 2014. Microfluidic culture platform for studying neuronal response to mild to very mild axonal stretch injury. *Biomicrofluidics* 8, 044110. <https://doi.org/10.1063/1.4891098>
- Yiu, G., He, Z., 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 7, 617–627. <https://doi.org/10.1038/nrn1956>
- Yu, J., Zhang, W., Wu, X., Wu, L., Tao, J., Huang, K., 2021. The influence of gas humidity on the discharge properties of a microwave atmospheric-pressure coaxial plasma jet. *AIP Advances* 11, 025131. <https://doi.org/10.1063/5.0033059>

Z

- Zahavi, E.E., Ionescu, A., Gluska, S., Gradus, T., Ben-Yaakov, K., Perlson, E., 2015. A compartmentalized microfluidic neuromuscular co-culture system reveals spatial aspects of GDNF functions. *Journal of Cell Science* jcs.167544. <https://doi.org/10.1242/jcs.167544>
- Zala, D., Hinckelmann, M.-V., Yu, H., Lyra da Cunha, M.M., Liot, G., Cordelières, F.P., Marco, S., Saudou, F., 2013. Vesicular Glycolysis Provides On-Board Energy for Fast Axonal Transport. *Cell* 152, 479–491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.029>

- Zanic, M., Widlund, P.O., Hyman, A.A., Howard, J., 2013. Synergy between XMAP215 and EB1 increases microtubule growth rates to physiological levels. *Nat Cell Biol* 15, 688–693. <https://doi.org/10.1038/ncb2744>
- Zare, L., Baharvand, H., Javan, M., 2019. Trichostatin A Promotes the Conversion of Astrocytes to Oligodendrocyte Progenitors in a Defined Culture Medium.
- Zare, L., Rezaei, S., Esmaili, E., Khajeh, K., Javan, M., 2023. Targeted drug delivery into glial scar using CAQK peptide in a mouse model of multiple sclerosis. *Brain Communications* 5, fcad325. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad325>
- Zhao, R.R., Fawcett, J.W., 2013. Combination treatment with chondroitinase ABC in spinal cord injury—breaking the barrier. *Neurosci Bull* 29, 477–483. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1359-2>
- Zhao, W., Xu, Ying, Wang, Y., Gao, D., King, J., Xu, Yajie, Liang, F.-S., 2021. Investigating crosstalk between H3K27 acetylation and H3K4 trimethylation in CRISPR/dCas-based epigenome editing and gene activation. *Sci Rep* 11, 15912. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95398-5>
- Zhou, B., Yu, P., Lin, M.Y., Sun, T., Chen, Y., Sheng, Z.H., 2016. Facilitation of axon regeneration by enhancing mitochondrial transport and rescuing energy deficits. *J Cell Biol* 214, 103–119. <https://doi.org/10.1083/jcb.201605101>
- Zhou, Bing, Yu, P., Lin, M.-Y., Sun, T., Chen, Y., Sheng, Z.-H., 2016. Facilitation of axon regeneration by enhancing mitochondrial transport and rescuing energy deficits. *Journal of Cell Biology* 214, 103–119. <https://doi.org/10.1083/jcb.201605101>
- Zhou, X., 2014. Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural regeneration research* 9,20, 1787–95. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.143423>
- Zochodne, D.W., 2012. The challenges and beauty of peripheral nerve regrowth. *J. Peripher. Nerv. Syst* 17, 1–18.
- Zoratti, M., Szabb, I., 1995. The mitochondrial permeability transition.

| Annexes

Poster NeuroFrance



In vitro experimental design to study axonal behavior after a traumatic injury

Theo ANDRIOT, Chloé DUJUIS, Josquin COURTE, Teng PAN, Jean-Michel PEYRIN, Fatima NOTHIAS, Sylvie SOARES
Axonal degeneration and regeneration – Neuroscience Paris Seine – UMR8246/U1130, Sorbonne université, Paris, France



Introduction

The objective of this project is to understand cellular and molecular mechanisms governing axonal degeneration and regeneration in a context of spinal cord injury, by a fundamental *in vitro* approach based on reconstructed cortico-spinal tract (CST), with particular emphasis on how post-translational modifications (PTM) of microtubules (MT) impact mitochondria functioning, in response to an injury.

A lesion in the central nervous system induces cellular and molecular events leading to dysfunction, particularly energy drop and cytoskeletal disorganization, and thus axonal degeneration [1]. Mitochondria represents the powerhouse of the cell, and enhancing their transport facilitates axons regeneration [2]. On the other hand, MT dynamic is crucial for axons development and growth: to this end they undergo PTM impacting their dynamic [3]. Therefore, mitochondrial-microtubule relationship plays a crucial role in axon fate.

Thus, my first aim was to develop an *in vitro* experimental design to study axonal behavior after a traumatic injury, within an oriented neuronal network already built, by using a microfluidic chip.

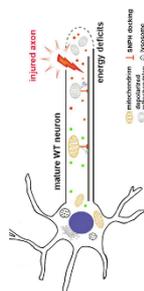


Fig.1 Effect of injury on axonal regenerative capacity [2]
Axonal injury depletes local mitochondria, impairs microtubule dynamics, inhibits restriction of mature axons to regenerate.

Materials and Methods

Microfluidic device. The microfluidic chip bonded on a glass coverslip is made of two chambers separated with microchannel to allow axons filtration and fluidic isolation (Fig.2). After seeding, axons reach the central channel at 2-3 days *in vitro* (DIV) and the distal chamber at 4-5 DIV which is fully invaded at 8 DIV.

Based on this a new model was developed for mechanical injury:

- Stretch injury device using membrane deformation (Fig.3)
- Compression injury, device is made of a thin microfluidic chip separates the coverslip from overlying PDMS polymer bloc punctured above the distal chamber to specifically compress the axonal compartment.

Neurons culture. Cortical neurons were extract from E14-15 mice embryos and plated at a density of 45 millions cell/ml, on a microfluidic device coated with poly-D-lysine and laminin. Neurons are left for 8 or 14 days before performing the injury.

Chemical Axotomy. Performed at DIV14, by adding 20ul of triton 0.3% in the central channel for 30s and washed 3 times with DMEM, according to [4]. Cells were fixed 3h, 72h and 1week post-injury.

Mechanical axotomy. Performed at DIV8 either by application of a gas pressure deforming the membrane (Fig.3), or by compress the axonal compartment with two neodymium magnet of 0.11kg pull during 40s. Neurons were fixed 24h after injury.

Immunostaining. After fixation in 4% paraformaldehyde, cells were permeabilized with 0.2% Triton and 1% BSA in PBS, then incubated with B3-tubulin primary antibody in order to observe neurons. Injury is revealed by discontinuing axons and blebs formation.

Bibliography

- [1] Nishitani et al. (2013). NAD+ acts on mitochondrial SIRT3 to prevent axonal caspase activation and axonal degeneration. *FASEB J*
- [2] Zhou et al. (2015). Facilitation of axon regeneration by enhancing mitochondrial transport and restoring energy deficits. *J Cell Biol*
- [3] Bouquet et al. (2004). Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci*
- [4] Deleglise et al. (2013). Synapse-protective drugs evaluation in reconstructed neuronal network. *PLoS ONE*
- [5] Shirao et al. (2018). Microfluidic platforms for the study of neuronal injury *in vitro*
- [6] Yap et al. (2014). Microfluidic culture platform for studying neuronal response to mild to very mild axonal stretch injury. *Biomicrofluidics*.

Preliminary results

- **Control:** Axons correctly join the central channel in 3days and reach the distal chamber in 5days. After DIV14 blebs formation reveal that axons start to degenerate.
- **Chemical injury:** Simple to perform and precise thanks to the fluidic isolation, injured axons are revealed by blebs formation in distal chamber and central channel 3h post-injury. We observe regeneration in a time dependent-way from the central channel starting from 72h post-injury, despite the presence of axonal debris.
- **Physical injury:** reproduce physical aspects of injury to specific region. Compression injury show local axonal dead and degeneration, while stretching axons show microtubules fragmentation, without impacting soma, 24h post-injury.

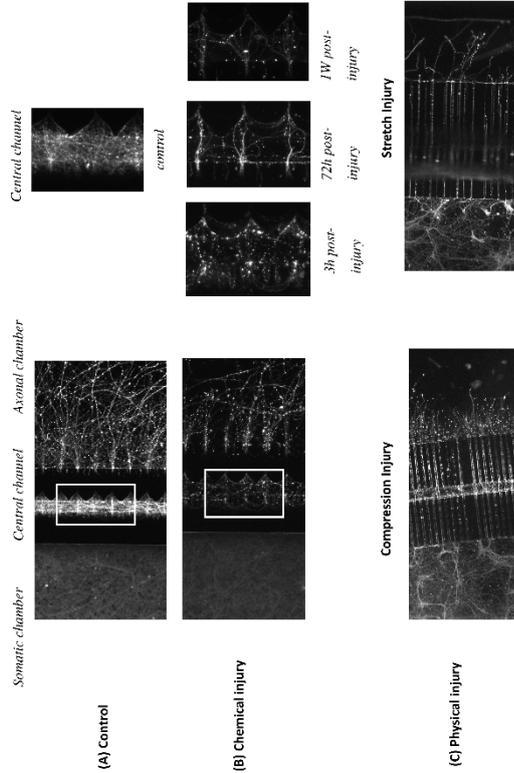


Fig.4. A: B3-tubulin immunostaining of E15 mice cortical neurons in microfluidic device at DIV14 (Left) and central channel (Right).
B: B3-tubulin staining of chemical axotomy 3h post-injury (Left) and central channel at different stage (Right). Axotomy perform on E15 mice cortical neurons at DIV14
C: B3-tubulin staining of compression injury (Left) and stretch injury (Right), perform on E14 mice cortical neurons at DIV8.

Perspective

- **Neurons co-culture.** Cortico-spinal neurons culture from E14 mice will be realize on microfluidic, to recreate a cortico-spinal network **Axotomy.** The microfluidic device is usable but need to be optimized to perform a controlled physical axotomy that will simulate the physical aspects of injury contrary to chemical axotomy [6], and mimic spinal cord injury.
- **PTMs Modulation** of microtubules toward facilitating regeneration

Poster FENS



In vitro microfluidic design to study mitochondria-microtubules interactions after an axonal traumatic injury

Théo ANDRIOT, Chloé DUPUIS, Teng PAN, Jean-Michel PEYRIN, Fatima NOTHIAS, Sylvia SOARES
Axon regeneration and growth – Neuroscience Paris Seine – UMR8246/U1130, Sorbonne université, Paris, France

Introduction

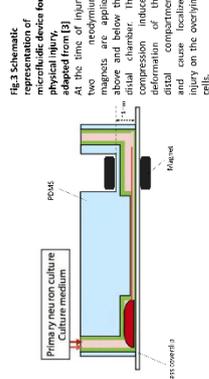
A trauma in the central nervous system is a very complex and evolutive disease. The mechanisms occurring after a lesion lead to permanent dysfunctions. This pathology has social and economic issues and it concerns everyone worldwide and in particular young people [1]. Thus, it is important to develop appropriate strategies. To do so, we need first to understand what are the molecular and cellular events occurring after a trauma. Thus, the aim of my project is to develop an *in vitro* experimental design to study axon fate after a traumatic injury, within an oriented neuronal network.

As the team has a long expertise in deciphering the pathophysiology of the traumatic spinal cord in rodents, we have reconstructed a cortico-spinal "like-tract" in a microfluidic chip. My objective is to characterize the behavior of neurons after a compressive injury, in order to understand what are the mitochondria-microtubule interactions in the future of the axon, toward a regenerative or degenerative state.

Materials and Methods



Microfluidic device. The microfluidic chips are realized in PDMS (Sylgard 184) by photolithography using epoxy resin mold, bonded on a glass coverslip and sterilized with UV as described in [3]. The device is made of two 55µm high chambers, separated with arches micro-channels of 3µm high, narrowing from 60 to 3µm width, allowing axons filtration and fluidic isolation (Fig.2). An additional notch of 3µm is performed on the top of the distal chamber to apply a magnet for the compressive injury.



Primary Neuronal cultures. E14 brain and spinal cord mice were dissected, tissues were dissociated chemically and mechanically with protocol adapted from [2, 3]. After coating with PDL (10µg/mL, Sigma) overnight and laminin (10µg/mL, Sigma) for 3h, cortical neurons were plated on proximal chamber at a density of 50.10⁶ cells/mL. Spinal neurons were plated on the distal chamber at a density of 35.10⁶ cells/mL. After seeding, cortical axons reach the central channel at 2-3 DIV and the distal chamber at 4-5 DIV.

Mechanical injury. At DIV5, a compression of the distal compartment, containing cortical axons and spinal cells, with two neodymium magnets of 0.11kg pull during 30s.

Immunostaining. 24 to 96h after injury, cultures were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 and 1% BSA in PBS, and stained with appropriate antibodies, with or without DAPI, according to [2]. Cultures were observed onto a Zeiss Axiovert 200M microscope with Apotome module and AxioCam M1m.

Results

1- Cortico-Spinal cultures characterization at DIV 9

We recreated a CST-like (Fig. 4a and 4b), containing both cortical (Fig. 5a) and spinal neurons. The co-cultures also show pre- and post-synaptic proteins in the distal compartment, suggesting connectivity (Fig. 5b).

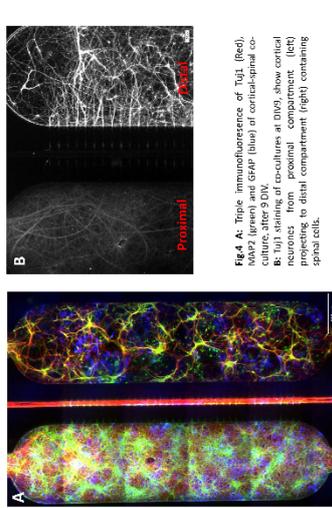


Fig.4 A: Typic immunofluorescence of TuJ1 (red), MAP2 (green) and GAP43 (blue) of cortical-spinal co-culture after 9 DIV. **B:** Typic staining of co-cultures at DIV9, show cortical V-neurons (yellow) pre-synaptic and spinal cells (green) projecting to distal compartment (right) containing spinal cells.

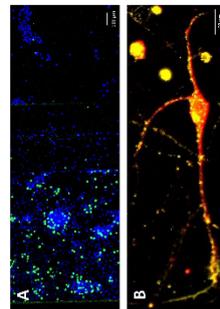


Fig.5 A: DAPI (blue) and Ctip2 (green) staining of a cortical-spinal co-culture. Ctip2, a specific marker for cortical layer V neurons, forming the CST. **B:** Zoom of a spinal neuron with Bassoon (yellow) pre-synaptic and the presence of co-staining, could suggest the establishment of a synapse, if colocalized.

2- Compressive injury is rapidly followed by axonal regeneration

The mechanical injury reproduces the physical aspects of injury to a specific region and show local axonal dead (Fig. 6a). Starting from 24h to 96h after injury, Fig. 6b-d) axons reach the injury site, allowing to study axonal behavior after a traumatic injury. Cells and neurons also migrate into the lesion site 24h after injury (Fig. 7a and b). Those results are gradually observed across time after injury (Fig. 8a-c).

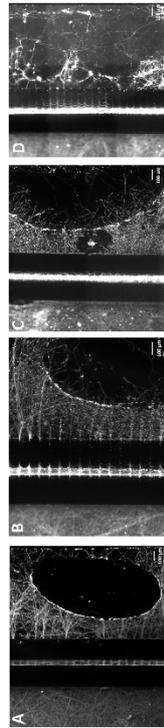


Fig.6: Typic immunostaining of cortico-spinal cultures from E14 mice, immediately (A), 24h (B), 48h (C) and 96h after the injury (D). The compression induce mechanical axotomy, specifically on the lesion site. The B3-tubulin (Tuj1) staining is shown and again in the injury site, progressively staining from 24h up to 96h after injury.

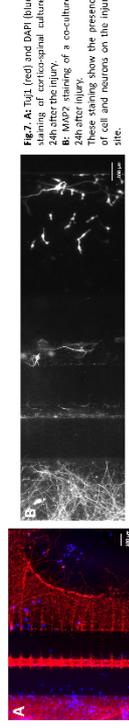


Fig.7 A: Tuj1 (red) and DAPI (blue) staining of cortico-spinal cultures 24h after the injury. **B:** MAP2 (green) staining of a co-culture, 24h after the injury. **C:** DAPI staining of cell and neurons on the injury site.

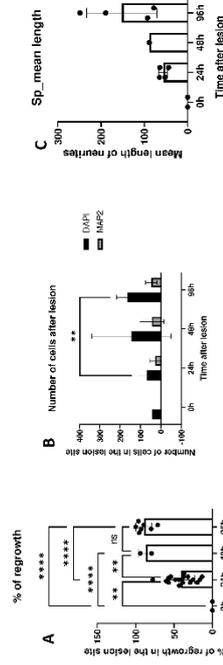


Fig.8. Quantification of regeneration within the lesion site across time, depicting as the ratio of area with B3-tubulin staining among the total area of lesion. (A) Percentage of regrowth across time. (B) Number of DAPI and MAP2 cells on the injury site. (C) Mean length of neurites from MAP2 cells on the injury site across time.

Conclusion and perspectives

- We reconstructed an oriented CST-like and develop device allowing mechanical injury to observe response after injury
- Characterization of the network in term of cellular subtypes and connectivity will be deepen
- Invest tubulin state and Mitochondrial phenotype in response to injury
- Modulation of tubulin state, through pharmacological drugs acting on PTMs of microtubules, toward regenerative state

Bibliography

- [1] *Brain Health Organization*
- [2] *Chen et al., 2013*, Synaptic protective drug-coalition in reconstructed neuronal network. PLoS ONE.
- [3] *Coore et al., 2018*, Reconstitution of directed neuronal network in a microfluidic device with asymmetric microchannels. Methods in cell biology.

Poster SfN



Role of the Mitochondria-Microtubule relationship in the axon fate after traumatic injury: an *in vitro* study
 Théo ANDRIOT, Chloé DUPUIS, Bing PAN, Jean-Michel PEYRIN, Fatih NOTHIAS, Sylvia SOARES
 Neurosci, Paris Saclay, CIRTS-UMR8246, INSERM1130, IFR5, Sorbonne University, Paris, France



INSTITUT DE BIOLOGIE PARIS SEINE



Introduction

Mitochondrial dynamics, modulated by post-translational modifications such as Acetylation and Phosphorylation, is crucial for axons development and growth.

Project's aim: understand cellular and molecular mechanisms governing axonal degeneration and regeneration in a context of spinal cord injury (SCI), with particular emphasis on microtubules-mitochondria relationship and its role in response to injury.

Key findings:

- Microtubule (MT) disorganization.
- Stabilization of MT improve axonal regeneration *in vivo*.
- Pharmacological treatment using on MT to evaluate effect on microtubule state, mitochondrial dynamic and axonal regeneration.

Project's aim: understand cellular and molecular mechanisms governing axonal degeneration and regeneration in a context of spinal cord injury (SCI), with particular emphasis on microtubules-mitochondria relationship and its role in response to injury.

Key findings:

- Microtubule (MT) disorganization.
- Stabilization of MT improve axonal regeneration *in vivo*.
- Pharmacological treatment using on MT to evaluate effect on microtubule state, mitochondrial dynamic and axonal regeneration.

Materials and Methods

Microfluidic device:

Primary Neuronal cultures: Acording to [6]

Quantification is done with ImageJ:

- Area of axonal growth
- Microtubule density
- Microtubule length
- Microtubule orientation
- Microtubule diameter
- Microtubule branching
- Microtubule connectivity
- Microtubule velocity
- Microtubule dynamics
- Microtubule stability
- Microtubule turnover
- Microtubule repair
- Microtubule maintenance
- Microtubule homeostasis
- Microtubule balance
- Microtubule equilibrium
- Microtubule stability
- Microtubule dynamics
- Microtubule velocity
- Microtubule dynamics
- Microtubule stability
- Microtubule turnover
- Microtubule repair
- Microtubule maintenance
- Microtubule homeostasis
- Microtubule balance
- Microtubule equilibrium

1- Cortico-Spinal cultures characterization at DIV9

We have created a CST-like network (Fig. 2A) containing both cortical and spinal motor neurons (Fig. 2B). The network shows synchronous and rhythmic calcium activity, suggesting connectivity (Fig. 2C).

2- Compressive injury is rapidly followed by axonal regeneration

The mechanical injury (rigid, sharp) induces immediate and fast axonal degeneration (Fig. 3A). Axons regrow within the injury site, starting to 24h post injury (Fig. 3B), up to 96h post injury (Fig. 3C-D).

3- Microtubule modifications impact axonal regeneration

Drugs affecting MT state were tested such as paclitaxel, tubulin (TUBES) inhibitor that increases MT acetylation and tubastatin-A (TSA, class I, IV HSPc inhibitor, among which HSPc2), to verify their impact on axonal regeneration (Fig. 4). When applied in distal compartment (Fig. 4A), tubastatin-A (TSA) increases axonal growth (Fig. 4B). Tubastatin-A (TSA) has a same effect (Fig. 4C). MT acetylation and phosphorylation was also evaluated. Although acetylation is increased with tubulin, and tubastatin, apply an axial compartment, no difference was observed on tyrosination on the total tubulin (Fig. 5A). Results are confirmed by looking at axonal level, axonal length is increased by distal treatment and axonal length does not increase (Fig. 5B).

4- Effect on mitochondria

Considering our objective and in line with results on MT modifications, we investigate mitochondrial dynamic with MitoTracker (Mito) and analyzed pre- and post-injury the number of middle mitochondria (strongly decorated compare to the control) and tubulin or TSA effects dynamics (Fig. 6). 24h post injury TSA, but not tubulin, restore mitochondrial motility (Fig. 7). We observe that in control and TSA treated conditions, mitochondrial motility velocity is higher than average velocity (Fig. 8).

Conclusion

Summary

- We have reconstructed an oriented CST-like network and developed a device allowing mechanical injury to analyze axonal fate post-injury.
- Pharmacological of tubulin state, through tubastatin-A (TSA), to support energy demand.
- Investigate effects of treatment on MT and mitochondria across time up to 96h post-injury and treatment effect.

Perspectives

- Ongoing experiment will deepen mitochondrial behavior and morphology, in response to injury.
- Investigate effects of treatment on MT and mitochondria across time up to 96h post-injury and treatment effect.

Bibliography

- 1) Magill et al. (2015). Molecular mechanisms of axonal regeneration. *Neuron*, 86, 1-14.
- 2) Liu et al. (2021). Axonal regeneration: from axonal growth to axonal repair. *Neuron*, 109, 1-14.
- 3) Zhou et al. (2016). Regulation of axonal regeneration by enhancing microtubule transport and reducing energy deficits. *Cell*, 167, 1-14.
- 4) Perron et al. (2016). Mitochondria on the Road to Axonal Regeneration. *Motility*, 1-14.
- 5) Gualini et al. (2017). The role of the axonal cytoskeleton in axonal regeneration. *Neuron*, 94, 1-14.
- 6) Dreyer et al. (2015). Synaptic proteome after axonal injury. *Neuron*, 86, 1-14.
- 7) Guo et al. (2018). Regulation of axonal mitochondrial motility. *Neuron*, 98, 1-14.
- 8) Brundell et al. (2015). High speed motility of axonal spinal motor neurons, axons and axons from single axon myelinated axons. *Neuron*, 86, 1-14.

PSTR 206.04
 theo.andriot@sorbonne-universite.fr



Curriculum Vitae

Théo ANDRIOT

Born: March 29th 1993 – Toulouse, France

Residence: 22 rue des boulangers, 75005, Paris, France

Office: Neuroscience Paris Seine, 7 quai Saint Bernard, Building A-301, 75005, Paris, France

Email: theo.andriot@sorbonne-universite.fr

Cell Phone: +33 617574920

Wheelchair user



Education and Professional experiences

2020-2024	PhD in Neuroscience	Sorbonne University, Paris, France
Thesis subject	Role of the Mitochondria-Microtubule relationship in the axon fate after trauma	
Place	Sorbonne University, CNRS UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, team “Axon regeneration and growth”, Dr F. Nothias	
Supervisor	Prof. Sylvia Soares	
Activities	Teaching assistant, in unit “Physiology of neuronal and hormonal signaling” (Bachelor) and “Experimental approaches in neuroscience” (Master) Students supervision: Highschool, Bachelor, Master President of the institute PhD and Post-Doc association (IDPA)	
2023	Initiation to experimental surgery	Sorbonne University, Paris, France
2020	Animal experimentation training	Sorbonne University, Paris, France
2019-2020	Internship	Sorbonne University, Paris, France
	Neuroscience Paris Seine, CNRS UMR8246 Team “Axon regeneration and growth”, Dr F. Nothias	
2017	Internship – Lab immersion	EPFL Campus Biotech, Geneva, Switzerland
	Spinal cord repair laboratory EPFL SV BMI Prof. Courtine	
2016-2019	Research assistant	University of Geneva, Geneva, Switzerland
	Laboratory for Behavioral Neurology and Imaging of Cognition Prof. Patrik Vuilleumier	
2016-2019	Master of Science, in Neuroscience	University of Geneva, Geneva, Switzerland
Project subject:	Electrophysiological and behavioral correlates of cannabis use disorder	
Place	Department of Basic Neurosciences, University of Geneva, Geneva, Switzerland.	
Supervisor	Dr. Tomas Ros and Prof. Patrik Vuilleumier	
2012-2016	Bachelor of Science, in Life science	University of Limoges, Limoges, France
	Cellular biology and physiology	

Skills

Molecular and cellular biology

Cell culture

Calcium imaging

Confocal microscopy and image analysis

Microfluidic fabrication

Computer skills (Statistical analysis, GraphPad Prism, MATLAB, Zotero)

Languages:

French (Native) ; English (Intermediate)

Honors

Scholarship from the “Fondation des gueules cassées” for final-year PhD student, 2023-2024.

PhD Fellowship for Disabled people, from French ministry of Higher Education and Research, 2020-2023

Others

Interview, “Passage(s)” of Sorbonne university, 2023

MT180 contest, finalist at Sorbonne University, 2023.

PhD students representative, 2020-2024.

Publications

Journal : **Andriot T.**, Ohnmacht P, Vuilleumier P, Thorens G, Khazaaal Y, Ginovart N, Ros T. (2022). *Electrophysiological and behavioral correlates of cannabis use disorder*. **Cogn Affect Behav Neurosci**. doi: 10.3758/s13415-022-01016-w.

Ros T, Kwiek J, **Andriot T.**, Michela A, Vuilleumier P, Garibotto V, Ginovart N. (2021). *PET Imaging of Dopamine Neurotransmission During EEG Neurofeedback*. **Front Physiol**. doi: 10.3389/fphys.2020.590503.

Posters : **Andriot T.**, Dupuis C., Courte J., Pan T., Peyrin JM., Nothias F., Soares S. *Society for Neuroscience, Washington, USA. November 11-15, 2023.*

Andriot T., Dupuis C., Pan T., Peyrin JM., Nothias F., Soares S. *FENS Forum, Paris, France. July 09-13, 2022.*

Andriot T., Dupuis C., Courte J., Pan T., Peyrin JM., Nothias F., Soares S. *Neurofrance, Virtual. May 19-21, 2021.*

References**Prof. Sylvia Soares**

Axon regeneration and growth team, Institute of Biology Paris-Seine, Paris, France.

E-mail: sylvia.soares@upmc.fr

Dr. Fatiha Nothias

Axon regeneration and growth team, Institute of Biology Paris-Seine, Paris, France.

E-mail: fatiha.nothias@upmc.fr

Dr. Tomas Ros

Center for Biomedical Imaging and the Department of Neuroscience at the University of Geneva, Switzerland

E-mail: tomas.ros@unige.ch

Résumé

Une lésion traumatique du système nerveux central (SNC) induit des mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à des dysfonctions irréversibles. En plus d'un environnement post-lésionnel non propice à la régénération axonale, le stress mécanique rend les neurones vulnérables. Au niveau moléculaire, la dégénérescence axonale est associée à des dommages mitochondriaux et une chute d'énergie, à une déstabilisation du cytosquelette notamment des microtubules (MT) et finalement à la dégradation de l'axone. Il est montré que la stabilisation des MT ou le repositionnement des mitochondries, via le réseau de microtubules, stimule la croissance des axones en comblant les déficits énergétiques. Ainsi, les mitochondries et les MT sont essentiels pour déterminer le devenir de l'axone, ce qui souligne l'importance de comprendre leur dynamique et leur régulation. Cependant, les mécanismes précis de l'interaction entre les mitochondries et les microtubules dans les axones post-lésionnels ne sont pas encore totalement élucidés. L'objectif de cette étude est de développer un modèle *in vitro* pour reproduire des réseaux simplifiés du SNC et effectuer un trauma mécanique afin de déchiffrer les processus de repousse axonale, en évaluant la dynamique des microtubules et des mitochondries et son influence sur le devenir des axones. Nous nous sommes particulièrement intéressés au faisceau corticospinal (CST), dont les axones possèdent une faible capacité de régénération. Nous avons reproduit *in vitro* un faisceau orienté et fonctionnellement connecté assimilable au CST, dans un nouveau système microfluidique. Ce dispositif permet l'application d'une lésion mécanique par compression, suivie d'une régénération axonale. En utilisant une approche pharmacologique pour moduler la stabilité des microtubules, la dynamique des mitochondries est analysée, ainsi que le devenir des axones après la lésion. Nos résultats révèlent qu'une acétylation accrue des microtubules dans l'axe des axones en régénération est associée à des MT stabilisés, qui restaurent la motilité des mitochondries, favorisant ainsi les mécanismes de régénération. Ces résultats soulignent le potentiel des médicaments ciblant les MT dans le développement de stratégies thérapeutiques.

Mots clés : réseau in vitro ; microfluidique ; faisceau cortico-spinal ; lésion mécanique ; modification des microtubules ; dynamique mitochondriale ; régénération axonale.

Abstract

A traumatic lesion in the central nervous system (CNS) induces cellular and molecular mechanisms leading to irreversible dysfunctions. In addition to a non-permissive post-injury environment, mechanical stress also renders neurons vulnerable. At molecular level, axonal degeneration is associated with mitochondrial damage and energy drop, cytoskeletal destabilization, particularly microtubules (MT), and finally axonal degradation. It has been shown that stabilizing MTs or mitochondria repositioning via the microtubule network, stimulates axon growth and branching by rescuing energy deficits. Thereby, mitochondria and MT are essential in determining the axon fate, highlighting the importance of understanding their dynamics and regulation. However, the precise mechanism underlying the connection between mitochondria and microtubules in post-injured axons are not well elucidated. The objective of this study is to develop a simple *in vitro* model to reproduce CNS networks and apply mechanical trauma to decipher the processes of axonal regrowth by evaluating the dynamics of microtubules and mitochondria and their influence on axonal fate. We particularly focused on the corticospinal tract connecting to spinal cord neurons, whose axons have a low regenerative capacity after a spinal cord injury. We have successfully developed an *in vitro* set-up of an oriented and functionally connected corticospinal network, within microfluidic system. This device allow the application of mechanical injury by compression, followed by axonal regeneration. Using a pharmacological approach to modulate MT stability, we analyzed mitochondrial dynamic and axon fate after injury. Our findings reveal that enhanced MT acetylation in regenerating axon shaft is associated with stabilized MTs, that restore mitochondrial motility thereby promoting neuronal repair mechanisms. These results underscore the potential of MT-targeting drugs in developing therapeutic strategies after injury.

Keywords: in vitro network; microfluidic; corticospinal tract; mechanical injury; Microtubule modification; Mitochondrial dynamic; axonal regeneration