



**HAL**  
open science

## Stretch-induced axon growth: a universal, yet poorly explored process

Marie Anne Breau, Sylvie Schneider-Maunoury

### ► To cite this version:

Marie Anne Breau, Sylvie Schneider-Maunoury. Stretch-induced axon growth: a universal, yet poorly explored process. *Biologie Aujourd'hui*, 2017, 211 (3), pp.215 - 222. 10.1051/jbio/2017028 . hal-01787275

**HAL Id: hal-01787275**

**<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-01787275>**

Submitted on 7 May 2018

**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.

## **La croissance axonale par étirement, un processus universel encore peu exploré**

Marie Anne Breau\*, Sylvie Schneider-Maunoury

Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS) - Laboratoire de Biologie du Développement, CNRS UMR7622, INSERM U1156, F-75005, Paris, France  
Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, 75005, Paris, France

\*Auteur correspondant: Marie Anne Breau, marie.breau@upmc.fr

### **Résumé**

La croissance des axones est une étape clef dans l'assemblage des circuits neuronaux. L'axone commence par grandir grâce à la migration de son cône de croissance en réponse à des signaux moléculaires présents dans les tissus de l'embryon. Après la formation d'un contact synaptique entre l'axone et la cellule-cible, la distance qui sépare le corps cellulaire de la synapse continue d'augmenter au même rythme que la croissance de l'organisme. Cette seconde phase d'élongation, universelle et cruciale puisqu'elle est responsable d'une part importante de la taille finale des axones, a été historiquement qualifiée de croissance "par étirement". Il est en effet vraisemblable d'imaginer qu'elle résulte d'une tension mécanique générée par la croissance des tissus de l'organisme, mais les mécanismes sous-jacents restent encore mal caractérisés. Dans cette revue nous présentons les études expérimentales de ce processus, analysé principalement sur des neurones en culture. Le développement récent de techniques d'imagerie *in vivo* et d'outils de mesure et de perturbation des forces mécaniques au sein des embryons permettra de mieux comprendre ce mode universel de croissance axonale. Ces connaissances pourraient être exploitées pour développer de nouvelles stratégies d'ingénierie tissulaire dédiées à la réparation des lésions du système nerveux.

**Mots-clés:** Circuits neuronaux, axone, croissance axonale, forces mécaniques, mécanotransduction

### **Abstract : Stretch-induced axon growth : a universal, yet poorly explored process**

The growth of axons is a key step in neuronal circuit assembly. The axon starts elongating with the migration of its growth cone in response to molecular signals present in the surrounding embryonic tissues. Following the formation of a synapse between the axon and the target cell, the distance which separates the cell body from the synapse continues to increase to accommodate the growth of the organism. This second phase of elongation, which is universal and crucial since it contributes to an important proportion of the final axon size, has been historically referred to as "stretch-induced axon growth". It is indeed likely to result from a mechanical tension generated by the growth of the body, but the underlying mechanisms remain poorly characterized. This article reviews the experimental studies of this process, mainly analysed on cultured neurons so far. The recent development of *in vivo* imaging techniques and tools to probe and perturb mechanical forces within embryos will shed new light on this universal mode of axonal growth. This knowledge may inspire the design of novel tissue engineering strategies dedicated to brain and spinal cord repair.

**Key words:** Neuronal circuit, axon, axon growth, mechanical force, mechanotransduction

## Introduction

Les circuits neuronaux sont les briques fonctionnelles du système nerveux. Ils sont constitués de neurones occupant des positions précises dans le tissu nerveux, connectés entre eux par des prolongements cytoplasmiques polarisés, dendrites et axones, qui reçoivent et transmettent l'information au sein du circuit. Dans l'embryon, les connexions entre les différentes régions du système nerveux sont établies par la croissance des axones: l'axone émerge du corps cellulaire et navigue, grâce à l'activité locomotrice de son extrémité, le cône de croissance, en direction de sa cellule cible pour former avec elle une synapse fonctionnelle (Figure 1A). Cette phase initiale de croissance axonale a fait l'objet de nombreuses études, qui ont mis en évidence le rôle de molécules attractives ou répulsives guidant la progression du cône de croissance dans les tissus de l'embryon (Lowery & Van Vactor, 2009; Kolodkin & Teissier-Lavigne, 2011).

Une fois les contacts synaptiques établis, les axones continuent de s'allonger pour s'adapter à la croissance de l'organisme: c'est la croissance axonale dite "par étirement" (Figure 1B) (Harrison, 1935; Weiss, 1941). Sans activité du cône de croissance ni guide moléculaire, la distance entre les corps cellulaires et les synapses augmente progressivement. Les axones peuvent ainsi s'allonger sur plusieurs centimètres ou mètres, à une vitesse atteignant 4 cm/jour pour les animaux géants comme la baleine bleue (Smith, 2009). Les mécanismes qui régulent cette seconde phase d'élongation axonale, pourtant universelle et cruciale, restent jusqu'ici très peu explorés. Cet article de revue a pour objectif de présenter les études expérimentales de ce phénomène, qui suggèrent que l'allongement des axones résulte de contraintes mécaniques exercées par les tissus environnants. Les techniques d'imagerie sur embryon vivant et d'analyse des forces mécaniques à l'œuvre au cours du développement embryonnaire donnent un nouvel essor à l'étude de ce processus essentiel et mal compris d'élongation axonale.

## Etudes *in vitro*

La croissance axonale par étirement a initialement été analysée sur des neurones en culture. Les premières expériences ont consisté à attacher l'extrémité de l'axone d'un neurone à un capillaire en verre, lui-même relié à un micromanipulateur permettant de tirer sur l'axone (Bray, 1984; Lamoureux *et al.*, 1989; Dennerll *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 1991; Heidemann *et al.*, 1995; Chada *et al.*, 1997; Lamoureux *et al.*, 2010). En réponse à cette traction, et lorsque l'application de cette force est lente et progressive, les axones s'allongent à une vitesse proportionnelle à la tension appliquée. Pour rendre compte de ce résultat, deux hypothèses sont envisageables: l'axone peut s'allonger comme un élastique, ou bien l'élongation fait intervenir un apport de matériel au sein de l'axone. Dans le cas d'un comportement élastique, l'axone s'amincit au fur et à mesure qu'il s'allonge, puis finit par se rompre quand le seuil de l'élasticité est dépassé. Or ce n'est pas ce qui est observé expérimentalement *in vitro*: les axones étirés, s'ils peuvent s'amincir dans les premières minutes (Dennerll *et al.*, 1989; Lamoureux *et al.*, 2010), récupèrent ensuite un diamètre normal ou même plus grand que les axones contrôles (Bray, 1984; Lamoureux *et al.*, 2010). Les neurones sont donc capables de détecter une tension mécanique externe et d'y répondre en ajoutant du matériel, membranes et composants du cytosquelette, à l'extrémité ou le long de l'axone, augmentant ainsi le volume cellulaire. Il s'agit donc bien d'un phénomène de croissance axonale en réponse à un étirement. Cette idée est renforcée par le fait que l'élongation en réponse à la traction externe n'a plus lieu en présence de drogues perturbant la polymérisation des microtubules, constituants majeurs du cytosquelette axonal (Bray, 1984; Dennerll *et al.*, 1989).

Plus récemment, le laboratoire de Douglas H. Smith a mis au point un système de culture qui permet d'augmenter la distance corps cellulaire-synapse sur des populations de neurones. Dans une chambre de culture, deux populations de neurones sont cultivées de manière à ce qu'elles se rejoignent par des faisceaux compacts et bidirectionnels d'axones (Figure 2). Dans cette situation, les axones sont dits "intégrés" car ils forment très probablement des synapses avec les corps cellulaires de la population de neurones opposée. Les axones sont ensuite allongés en éloignant progressivement des deux groupes de corps cellulaires (Figure 2). Pendant cet étirement, ils sont libres de tout attachement au substrat (Smith *et al.*, 2001; Pfister *et al.*, 2004, 2006a, 2006b ; pour une version plus récente du système, voir Loverde *et al.*, 2011). Ces axones peuvent s'allonger ainsi jusqu'à 10 cm, à une vitesse de 8 mm/jour, ce qui est bien plus rapide que les vitesses connues d'élongation axonale "classique" par migration du cône de croissance, qui sont de l'ordre de 1 mm/jour (Bray *et al.*, 1991; Lamoureux *et al.*, 1992; Buettner *et al.*, 1994). Ici aussi, le diamètre des axones étirés augmente (de l'ordre de 35%), et l'étirement n'affecte pas la structure du cytosquelette ni la physiologie des neurones qui, bien qu'avec une densité plus forte de canaux Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>, gardent le même potentiel de repos et restent capables de propager des potentiels d'action (Pfister *et al.*, 2004; Pfister *et al.*, 2006a; Loverde *et al.*, 2015). Ainsi, une traction exercée sur des axones "intégrés" *in vitro* stimule également la croissance axonale.

### **Etudes *in vivo***

L'existence du phénomène de croissance axonale par étirement *in vivo* est le plus souvent déduite de la simple observation de la croissance importante des organismes au cours de leur développement (Harrison, 1935; Weiss, 1941). Des observations indirectes de ce processus ont par exemple été réalisées dans le cervelet de souris, par des mesures de distances entre les corps cellulaires et leurs extrémités axonales, sur des échantillons fixés à différents stades de développement (Rossi *et al.*, 2007). Chez le rat, l'élongation de la patte (1 mm/jour) par un dispositif mécanique provoque une augmentation de la distance entre les nœuds de Ranvier du nerf sciatique, qui sont les zones d'interruption de la gaine de myéline le long de l'axone. Cela suggère un étirement de la structure axonale qui aurait lieu là aussi sans amincissement des axones (Abe *et al.*, 2002, 2004), mais ce résultat pourrait aussi provenir de réarrangements des cellules de Schwann formant la gaine de myéline qui entoure les axones.

Récemment, notre laboratoire a découvert que la croissance axonale par étirement peut dans certains contextes avoir lieu dès l'émergence des axones, au cours des phases précoces du développement embryonnaire (Breau *et al.*, 2017). En étudiant la dynamique de formation du circuit olfactif chez le poisson-zèbre par imagerie *in vivo* en temps réel, nous avons découvert que les axones sensoriels olfactifs, qui établissent des connexions avec le cerveau, se forment et s'allongent initialement par un mécanisme original: ce sont les corps cellulaires qui se déplacent et s'éloignent des extrémités de leurs axones qui, elles, restent fixes, ancrées à la surface du cerveau (Figure 1C). Cette stratégie diffère de ce qui est habituellement observé au cours des premiers instants de la vie d'un axone: le plus souvent, le cône de croissance émerge d'un corps cellulaire statique et navigue vers sa cible en réponse à des molécules présentes dans l'environnement (Figure 1A). Ici, c'est le mouvement du corps cellulaire qui déclenche la croissance de l'axone alors que l'extrémité de l'axone est fixée à la surface du cerveau. Dans un second temps, le cône de croissance de l'axone pénètre à l'intérieur du cerveau et navigue vers sa cible finale, le bulbe olfactif, par un mécanisme "classique" de croissance axonale contrôlée par des signaux moléculaires en partie identifiés (Miyasaka *et al.*, 2005, 2007; Lakhina *et al.*, 2012).

Pour comprendre quel est le moteur du mouvement des corps cellulaires qui allonge les axones olfactifs, nous avons étudié le rôle des composants du cytosquelette, microtubules et actomyosine, essentiels à la migration cellulaire dans d'autres contextes. Ces analyses ont abouti à un résultat inattendu: le déplacement des corps cellulaires est indépendant du cytosquelette intracellulaire. Il s'agit donc d'un processus passif, qui ne semble pas requérir de « moteur » interne. Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle des forces mécaniques externes aux neurones olfactifs poussent ou tirent les corps cellulaires, les obligeant ainsi à s'éloigner de leurs terminaisons axonales, une situation qui s'apparente à la croissance par étirement (Figure 1B, 1C). Pour caractériser les forces mécaniques en jeu, nous avons établi une carte des tensions membranaires dans le circuit neuronal en développement, par la technique d'ablation laser de contacts intercellulaires, utilisée chez la *Drosophile* pour mesurer la tension au sein de monocouches de cellules épithéliales (Rauzi *et al.*, 2008, 2010; Bosveld *et al.*, 2012; Sugimura *et al.*, 2016). Nous avons mesuré une tension maximale pour des contacts intercellulaires orientés perpendiculairement à la surface du cerveau, ce qui correspond à la direction des mouvements passifs des corps cellulaires pendant l'élongation axonale (Breau *et al.*, 2017). Cette carte renforce donc l'idée que les corps cellulaires des neurones olfactifs subissent des contraintes de compression ou de traction en provenance de leur environnement, à l'origine de leurs déplacements (Figure 1C). Il faudra à l'avenir déterminer d'où proviennent ces forces mécaniques. Des neurones avoisinants ? Des mouvements de morphogenèse ou de la croissance des tissus adjacents ? L'intérêt de notre système est qu'il permet d'étudier dans un contexte *in vivo* les mécanismes tissulaires, cellulaires et moléculaires de la croissance axonale par étirement.

### **Mécanismes de la croissance par étirement**

La plupart des modèles de croissance axonale classique suggère que l'ajout de matériel, et notamment la polymérisation des microtubules, a lieu préférentiellement derrière le cône de croissance (Bray, 1970; Gallo & Letourneau, 2000; Dent & Gertler, 2003; Conde & Caceres, 2009; Lowery & Van Vactor, 2009; Lamoureux *et al.*, 2010). Où a lieu l'incorporation de matière au cours de la croissance axonale par étirement ? Il est possible de répondre à cette question en suivant au cours du temps des repères internes aux axones, comme les mitochondries ancrées au cytosquelette ou les points de branchement des axones, ou des microbilles de polystyrène collées sur leur membrane. Ces analyses ont été réalisées *in vitro*, et ont montré que la distance qui sépare ces repères augmente pendant l'extension, indiquant que l'addition de matériel se fait par intercalation le long des axones quand ils sont étirés artificiellement (Zheng *et al.*, 1991; O'Toole *et al.*, 2008; Lamoureux *et al.*, 2010; O'Toole *et al.*, 2015). Dans ces expériences, la croissance intercalaire n'est pas uniforme le long de l'axone: c'est surtout la région distale qui s'allonge (Lamoureux *et al.*, 2010). Curieusement, lorsque l'axone est étiré en agissant non pas sur son extrémité mais sur le corps cellulaire, la croissance intercalaire est plus élevée dans la région proximale, près du corps cellulaire (Lamoureux *et al.*, 2010). On a donc, au moins *in vitro*, une croissance intercalaire, mais avec des disparités le long de l'axone, l'élongation étant plus importante dans la région proche de la source de traction.

Comment se fait l'apport de matière le long de l'axone ? L'ajout de membrane pourrait provenir du désassemblage des cavéoles (Purohit & Smith, 2016), des invaginations de la membrane plasmique constituant des réservoirs de membrane et répondant à des variations de la tension membranaire (Echarri *et al.*, 2015; Lo *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2017). Des cellules non neuronales soumises à des forces de traction uniaxiale libèrent ces réservoirs, ramenant la tension membranaire à un état d'équilibre (Sinha *et al.*, 2011). Il serait

intéressant d'analyser si ces structures sont présentes à la surface des axones pendant la croissance par étirement, *in vitro* et *in vivo*, et si elles y jouent également ce rôle mécanoprotecteur de réservoirs de membrane à mobiliser en réponse à une tension exercée sur le neurone.

Quant à l'apport de composants du cytosquelette, implique-t-il le transport de protéines, sous forme de monomères ou de polymères, par des moteurs moléculaires le long de l'axone ? Fait-il intervenir la synthèse (traduction) locale de protéines à partir d'ARNm transportés dans l'axone ? L'élongation par étirement peut atteindre une vitesse de 8 mm/jour, alors que le transport axonal lent, qui est le mode de transport du cytosquelette (notamment la tubuline), se fait à environ 1 mm/jour (Miller & Heideman, 2008). Il est donc possible qu'un autre mode de transport de protéines, encore inconnu, intervienne, ou bien que la traduction locale joue un rôle dans ce mode l'élongation axonale (Love *et al.*, 2017). Une mobilisation des fragments courts et mobiles de microtubules et de neurofilaments, identifiés dans plusieurs études (pour revue, voir Heidemann & Bray, 2015), pourrait être déclenchée sous l'effet d'une traction axiale. Enfin, l'étirement de l'axone pourrait lui-même contribuer, par déplacement passif, au transport de la tubuline, comme le suggèrent des modèles mathématiques (O'Toole & Miller, 2011). Ces hypothèses pourront bientôt être testées directement en mettant en œuvre les techniques récentes de visualisation du transport de protéines et d'ARNm et de la traduction locale (Yamada *et al.*, 2011; Butko *et al.*, 2012; Baraban *et al.*, 2013) dans des axones étirés, *in vitro* ou *in vivo*.

### **Mécanismes de la détection et de la transduction des forces**

Comment les neurones détectent-ils les forces mécaniques externes et comment ces signaux sont-ils transmis à la machinerie intracellulaire régulant la quantité de membrane plasmique, le cytosquelette, le transport de protéines et/ou d'ARNm, la traduction locale ? Il est nécessaire d'envisager un processus de mécanotransduction, permettant la transformation des forces mécaniques en signaux biochimiques à l'intérieur de la cellule (Zhang & Labouesse, 2012). Les voies de mécanotransduction impliquées dans la croissance axonale par étirement sont pour l'instant inconnues, mais plusieurs candidats peuvent être discutés ici (pour revue, Suter & Miller, 2011).

Les canaux sensibles à l'étirement sont connus pour changer de conformation, s'ouvrir et générer un influx de cations lorsque la membrane plasmique est sous tension (Ranade *et al.*, 2015). Ils sont notamment importants pour la réponse au toucher, l'audition, la migration cellulaire (Lee *et al.*, 1999) et la croissance « classique » des axones, orchestrée par le cône de croissance (Jacques-Fricke *et al.*, 2006; Shibasaki *et al.*, 2010; Kerstein *et al.*, 2013). Leur ouverture induit un influx de cations (principalement  $\text{Ca}^{2+}$ ) dans le cytoplasme, activant à son tour des voies de signalisation encore mal caractérisées. La stimulation mécanique du cône de croissance de neurones isolés *in vitro* génère un influx immédiat d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  suivi de la rétraction du neurite, deux réponses impliquant les canaux sensibles à l'étirement (Franze *et al.*, 2009). Enfin, une étude récente a décrit le rôle de ces derniers dans la réponse des axones à des variations de rigidité de leur environnement pendant la navigation des axones du nerf optique dans le cerveau du Xénope (Koser *et al.*, 2016). L'ensemble de ces données suggère qu'une cascade similaire pourrait assurer une fonction de mécanotransduction dans un axone étiré mécaniquement, mais cette hypothèse n'a pas encore été testée.

La détection des forces mécaniques peut aussi impliquer les éléments du cytosquelette eux-mêmes, car ils sont directement déplacés ou réarrangés lors d'une déformation cellulaire

induite par une force externe. De plus, les constituants du cytosquelette, en particulier l'actomyosine et la spectrine, sont suspectés d'être le support physique de la tension interne aux axones, mise en évidence dans de nombreux contextes (par exemple, Dennerll *et al.*, 1988, 1989; Siechen *et al.*, 2009; Rajagopalan *et al.*, 2010; Krieg *et al.*, 2014; Smit *et al.*, 2017). Cette tension intra-axonale constitue un pré-stress mécanique qui sensibilise les neurones à des variations mécaniques résultant de forces externes, en facilitant par exemple la propagation du stimulus d'une région de l'axone à une autre (Krieg *et al.*, 2014, 2015). Ainsi la tension interne aux axones peut-elle être considérée comme un "second messenger" mécanotransducteur, faisant le relais entre force externe et machinerie intracellulaire (Franze *et al.*, 2009). L'utilisation récente de la microscopie à super-résolution sur des neurones en culture a révélé l'existence d'un réseau périodique d'actine et de spectrine situé juste sous la membrane plasmique des axones, formant comme une bobine cylindrique autour des faisceaux de microtubules (Xu *et al.*, 2013; D'Este *et al.*, 2015, 2016; He *et al.*, 2016). Chez *C. elegans*, des mesures par microscopie FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) de la tension au sein de la molécule de spectrine montrent que la spectrine axonale est sous tension, au moins dans certaines populations de neurones (Krieg *et al.*, 2014). De plus, le réseau de spectrine participe au maintien de la tension interne le long des axones, joue un rôle mécanoprotecteur en stabilisant les axones lors des mouvements de locomotion du ver, et est aussi impliqué dans la réponse au toucher (Hammarlund *et al.*, 2007; Krieg *et al.*, 2014, 2017). Toutes ces propriétés font de la spectrine un candidat idéal pour détecter et transmettre le signal mécanique à la machinerie intracellulaire dans un axone étiré. Ce rôle potentiel de mécanotransduction devra être confirmé par des expériences fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*.

## Conclusions et perspectives thérapeutiques

Une tension mécanique externe au neurone, lorsqu'elle est appliquée progressivement et de manière contrôlée, stimule donc la croissance axonale. Dans l'embryon, une fois les contacts synaptiques établis par guidage moléculaire de l'axone, ce mécanisme prend le relais et permet l'ajustement progressif de la longueur de l'axone à la taille de l'organisme en croissance. La tension mécanique pourrait constituer un stimulus universel de la croissance axonale, agissant aussi au cours de la première phase d'élongation des axones en réponse à des stimuli chimiques. En effet, l'activité locomotrice du cône de croissance produit sans doute une tension interne dans la région distale de l'axone, stimulant à son tour l'élongation dans cette région, par des mécanismes proches de ceux de la croissance par étirement discutés ici (Miller & Sheetz, 2006; O'Toole *et al.*, 2008; Lamoureux *et al.*, 2010). En accord avec cette idée, plusieurs études, exploitant notamment la microscopie de force de traction, ont révélé que le cône de croissance exerce une traction sur son substrat et tire l'axone qui est derrière lui, dans des cas de croissance axonale "classique" *in vitro* (Lamoureux *et al.*, 1989; Miller & Sheetz, 2006; O'Toole *et al.*, 2008; Franze *et al.*, 2009; Suter & Miller, 2011; Polackwitch *et al.*, 2015). Pour explorer plus en détail les mécanismes de la croissance axonale par étirement dans un environnement naturel, tridimensionnel, il faudra à l'avenir combiner *in vivo* des techniques d'imagerie de la dynamique de la membrane et du cytosquelette avec des approches physiques de mesure et de perturbation des forces, et des analyses fonctionnelles de protéines candidates.

Comprendre les mécanismes de la croissance axonale par étirement a des implications biomédicales. En effet, il n'existe pas aujourd'hui de méthode permettant de réparer efficacement les lésions des systèmes nerveux central et périphérique. Le but initial de l'équipe de Douglas H. Smith, qui a mis au point le système d'étirement mécanique des axones décrit plus haut (Figure 2), était de créer des cultures de neurones pouvant être directement

transplantées dans l'animal ou chez l'homme au niveau d'une blessure: les faisceaux d'axones greffés constitueraient alors un substrat, un échafaudage sur lequel les axones endommagés pourraient repousser et régénérer. Les préparations de neurones avec faisceaux d'axones étirés peuvent être incorporées dans des gels biocompatibles et déplacées facilement, les neurones survivent à la transplantation dans le tissu hôte, et les axones de l'animal greffé régèrent au moins partiellement le long du faisceau d'axones exogènes (Iwata *et al.* 2006; Pfister *et al.*, 2006b; Chen *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008, 2009; Cullen *et al.*, 2012; Struzyna, *et al.* 2015). Bien qu'une récupération de la mobilité de l'animal n'ait pas encore été observée, cette stratégie est prometteuse et pourrait inspirer de nouvelles méthodes d'ingénierie tissulaire dédiées à la réparation du cerveau et de la moelle épinière (Pfister *et al.*, 2007; Bueno & Schah, 2008; Smith *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2016).

## Remerciements

Nous remercions chaleureusement Sophie Gournet pour la réalisation des figures, et Isabelle Bonnet pour la relecture du manuscrit. Nous remercions également nos sources de financement: l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR projet blanc 11-BSV2-0006 - S.S.M.), la Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20140329544 - S.S.M. et bourse de post-doctorat - M.A.B.), l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, PJA 20131200051 - M.A.B.), le Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS 'Défi mécanobiologie' - M.A.B.) et Sorbonne Universités (Emergence 2016, SU-16-R-EMR-11, M.A.B.).

## Références

- Abe, I., Tsujino, A., Hara, Y., Ichimura, H., Ochiai, N. (2002). Paranodal demyelination by gradual nerve stretch can be repaired by elongation of internodes. *Acta Neuropathol*, 104, 505–512.
- Abe, I., Ochiai, N., Ichimura, H., Tsujino, A., Sun, J., Hara, Y. (2004). Internodes can nearly double in length with gradual elongation of the adult rat sciatic nerve. *J Orthop Res*, 22, 571–577.
- Baraban, M., Anselme, I., Schneider-Maunoury, S., Giudicelli, F. (2013). Zebrafish embryonic neurons transport messenger RNA to axons and growth cones in vivo. *J Neurosci*, 33, 15726–15734.
- Bosveld, F., Bonnet, I., Guirao, B., Tlili, S., Wang, Z., Petitalot, A., Marchand, R., Bardet, P.-L., Marcq, P., Graner, F., Bellaïche, Y. (2012). Mechanical control of morphogenesis by Fat/Dachsous/Four-jointed planar cell polarity pathway. *Science*, 336, 724–727.
- Bray, D. (1970). Surface movements during the growth of single explanted neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 65, 905–910.
- Bray, D. (1984). Axonal growth in response to experimentally applied mechanical tension. *Dev Biol*, 102, 379–389.
- Bray, D., Money, N.P., Harold, F.M., Bamberg, J.R. (1991). Responses of growth cones to changes in osmolality of the surrounding medium. *J Cell Sci*, 98, 507–515.
- Breau, M.A., Bonnet, I., Stoufflet, J., Xie, J., De Castro, S., Schneider-Maunoury, S. (2017).

Extrinsic mechanical forces mediate retrograde axon extension in a developing neuronal circuit. *Nat Commun*, 8, 282.

Bueno, F.R., Shah, S.B. (2008). Implications of tensile loading for the tissue engineering of nerves. *Tissue Eng Part B Rev*, 14, 219–233.

Buettner, H.M., Pittman, R.N., Ivins, J.K. (1994). A model of neurite extension across regions of nonpermissive substrate - Simulations based on experimental-measurement of growth cone motility and filopodial dynamics. *Dev Biol*, 163, 407–422.

Butko, M.T., Yang, J., Geng, Y., Kim, H.J., Jeon, N.L., Shu, X., Mackey, M.R., Ellisman, M.H., Tsien, R.Y., Lin, M.Z. (2012). Fluorescent and photo-oxidizing TimeSTAMP tags track protein fates in light and electron microscopy. *Nat Neurosci*, 15, 1742–1751.

Chada, S., Lamoureux, P., Buxbaum, R.E., Heidemann, S.R. (1997). Cytomechanics of neurite outgrowth from chick brain neurons. *J Cell Sci*, 110, 1179–1186.

Chen, H.I., Jgamadze, D., Serruya, M.D., Cullen, D.K., Wolf, J.A., Smith, D.H. (2016). Neural substrate expansion for the restoration of brain function. *Front Syst Neurosci*, 10, 1.

Cheng, J.P.X., Mendoza-Topaz, C., Howard, G., Chadwick, J., Shvets, E., Cowburn, A.S., Dunmore, B.J., Crosby, A., Morrell, N.W., Nichols, B.J. (2015). Caveolae protect endothelial cells from membrane rupture during increased cardiac output. *J Cell Biol*, 211, 53–61.

Conde, C., Caceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*, 10, 319–332.

Cullen, D.K., Tang-Schomer, M.D., Struzyna, L.A., Patel, A.R., Johnson, V.E., Wolf, J.A., Smith, D.H. (2012). Microtissue engineered constructs with living axons for targeted nervous system reconstruction. *Tissue Eng Part A*, 18, 2280–2289.

D'Este, E., Kamin, D., Goettfert, F., El-Hady, A., Hell, S.W. (2015). STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons. *Cell Rep*, 10, 1246–1251.

D'Este, E., Kamin, D., Velte, C., Goettfert, F., Simons, M., Hell, S.W. (2016). Subcortical cytoskeleton periodicity throughout the nervous system. *Sci Rep*, 6, 22741.

Dennerll, T.J., Joshi, H.C., Steel, V.L., Buxbaum, R.E., Heidemann, S.R. (1988). Tension and compression in the cytoskeleton of Pc-12 neurites : II - Quantitative measurements. *J Cell Biol*, 107, 665–674.

Dennerll, T.J., Lamoureux, P., Buxbaum, R.E., Heidemann, S.R. (1989). The cytomechanics of axonal elongation and retraction. *J Cell Biol*, 109, 3073–3083.

Dent, E.W., Gertler, F.B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, 40, 209–227.

Echarri, A., Del Pozo, M.A. (2015). Caveolae - mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments. *J Cell Sci*, 128, 2747–2758.

Franze, K., Gerdemann, J., Weick, M., Betz, T., Pawlizak, S., Lakadamyali, M., Bayer, J.,

- Rillich, K., Goegler, M., Lu, Y.-B., Reichenbach, A., Janmey, P., Käs, J. (2009). Neurite branch retraction is caused by a threshold-dependent mechanical impact. *Biophys J*, 97, 1883–1890.
- Gallo, G., Letourneau, P.C. (2000). Neurotrophins and the dynamic regulation of the neuronal cytoskeleton. *J Neurobiol*, 44, 159–173.
- Hammarlund, M., Jorgensen, E.M., Bastiani, M.J. (2007). Axons break in animals lacking beta-spectrin. *J Cell Biol*, 176, 269–275.
- Harrison, R.G. (1935). The Croonian Lecture - On the origin and development of the nervous system studied by the methods of experimental embryology. *Proc R Soc B-Biol Sci*, 118, 155–196.
- He, J., Zhou, R., Wu, Z., Carrasco, M.A., Kurshan, P.T., Farley, J.E., Simon, D.J., Wang, G., Han, B., Hao, J., Heller, E., Freeman, M.R., Shen, K., Maniatis, T., Tessier-Lavigne, M., Zhuang, X. (2016). Prevalent presence of periodic actin-spectrin-based membrane skeleton in a broad range of neuronal cell types and animal species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113, 6029–6034.
- Heidemann, S.R., Lamoureux, P., Buxbaum, R.E. (1995). Cytomechanics of axonal development. *Cell Biochem Biophys*, 27, 135–155.
- Heidemann, S.R., Bray, D. (2015). Tension-driven axon assembly: a possible mechanism. *Front Cell Neurosci*, 9, 316.
- Huang, J.H., Zager, E.L., Zhang, J., Groff, R.F., Pfister, B.J., Cohen, A.S., Grady, M.S., Maloney-Wilensky, E., Smith, D.H. (2008). Harvested human neurons engineered as live nervous tissue constructs: implications for transplantation. *J Neurosurg*, 108, 343–347.
- Huang, J.H., Cullen, D.K., Browne, K.D., Groff, R., Zhang, J., Pfister, B.J., Zager, E.L., Smith, D.H. (2009). Long-term survival and integration of transplanted engineered nervous tissue constructs promotes peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng Part A*, 15, 1677–1685.
- Iwata, A., Browne, K.D., Pfister, B.J., Gruner, J.A., Smith, D.H. (2006). Long-term survival and outgrowth of mechanically engineered nervous tissue constructs implanted into spinal cord lesions. *Tissue Eng*, 12, 101–110.
- Jacques-Fricke, B.T., Seow, Y.Q., Gottlieb, P.A., Sachs, F., Gomez, T.M. (2006). Ca<sup>2+</sup> influx through mechanosensitive channels inhibits neurite outgrowth in opposition to other influx pathways and release from intracellular stores. *J Neurosci*, 26, 5656–5664.
- Kerstein, P.C., Jacques-Fricke, B.T., Rengifo, J., Mogen, B.J., Williams, J.C., Gottlieb, P.A., Sachs, F., Gomez, T.M. (2013). Mechanosensitive TRPC1 channels promote calpain proteolysis of talin to regulate spinal axon outgrowth. *J Neurosci*, 33, 273–285.
- Kolodkin, A.L., Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and molecules of neuronal wiring: A primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3. doi: 10.1101/cshperspect.a001727.
- Koser, D.E., Thompson, A.J., Foster, S.K., Dwivedy, A., Pillai, E.K., Sheridan, G.K., Svoboda, H., Viana, M., Costa, L.D.F., Guck, J., Holt, C.E., Franze, K. (2016). Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat Neurosci*, 19, 1592–

1598.

Krieg, M., Dunn, A.R., Goodman, M.B. (2014). Mechanical control of the sense of touch by beta-spectrin. *Nat Cell Biol*, 16, 224–233.

Krieg, M., Dunn, A.R., Goodman, M.B. (2015). Mechanical systems biology of *C.elegans* touch sensation. *Bioessays*, 37, 335–344.

Krieg, M., Stuehmer, J., Cueva, J.G., Fetter, R., Spilker, K., Cremers, D., Shen, K., Dunn, A.R., Goodman, M.B. (2017). Genetic defects in beta-spectrin and tau sensitize *C.elegans* axons to movement-induced damage via torque-tension coupling. *eLife*, 6, eLife.20172.

Lakhina, V., Marcaccio, C.L., Shao, X., Lush, M.E., Jain, R.A., Fujimoto, E., Bonkowsky, J.L., Granato, M., Raper, J.A. (2012). Netrin/DCC signaling guides olfactory sensory axons to their correct location in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 32, 4440–4456.

Lamoureux, P., Buxbaum, R.E., Heidemann, S.R. (1989). Direct evidence that growth cones pull. *Nature*, 340, 156–162.

Lamoureux, P., Zheng, J., Buxbaum, R.E., Heidemann, S.R. (1992). A cytomechanical investigation of neurite growth on different culture surfaces. *J Cell Biol*, 118, 655–661.

Lamoureux, P., Heidemann, S.R., Martzke, N.R., Miller, K.E. (2010). Growth and elongation within and along the axon. *Dev Neurobiol*, 70, 135–149.

Lee, J., Ishihara, A., Oxford, G., Johnson, B., Jacobson, K. (1999). Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature*, 400, 382–386.

Lim, Y.-W., Lo, H.P., Ferguson, C., Martel, N., Giacomotto, J., Gomez, G.A., Yap, A.S., Hall, T.E., Parton, R.G. (2017). Caveolae protect notochord cells against catastrophic mechanical failure during development. *Curr Biol*, 27, 1968–1981.

Lo, H.P., Nixon, S.J., Hall, T.E., Cowling, B.S., Ferguson, C., Morgan, G.P., Schieber, N.L., Fernandez-Rojo, M.A., Bastiani, M., Floetenmeyer, M., Martel, N., Laporte, J., Pilch, P.F., Parton, R.G. (2015). The caveolin-cavin system plays a conserved and critical role in mechanoprotection of skeletal muscle. *J Cell Biol*, 210, 833–849.

Love, J.M., Bober, B.G., Orozco, E., White, A.T., Bremner, S.N., Lovering, R.M., Schenk, S., Shah, S.B. (2017). mTOR regulates peripheral nerve response to tensile strain. *J Neurophysiol*, 117, 2075–2084.

Loverde, J.R., Tolentino, R.E., Pfister, B.J. (2011). Axon stretch growth: The mechanotransduction of neuronal growth. *J Vis Exp*, 54. doi: 10.3791/2753.

Loverde, J.R., Pfister, B.J. (2015). Developmental axon stretch stimulates neuron growth while maintaining normal electrical activity, intracellular calcium flux, and somatic morphology. *Front Cell Neurosci*, 9, 308.

Lowery, L.A., van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 332–343.

Miller, K.E., Sheetz, M.P. (2006). Direct evidence for coherent low velocity axonal transport

of mitochondria. *J Cell Biol*, 173, 373–381.

Miller, K.E., Heidemann, S.R. (2008). What is slow axonal transport? *Exp Cell Res*, 314, 1981–1990.

Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S.Y., Hutson, L.D., Chien, C.B., Okamoto, H., Yoshihara, Y. (2005). Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development*, 132, 1283–1293.

Miyasaka, N., Knaut, H., Yoshihara, Y. (2007). Cxcl12/Cxcr4 chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system. *Development*, 134, 2459–2468.

O'Toole, M., Miller, K.E. (2011). The role of stretching in slow axonal transport. *Biophys J*, 100, 351–360.

O'Toole, M., Lamoureux, P., Miller, K.E. (2008). A physical model of axonal elongation: Force, viscosity, and adhesions govern the mode of outgrowth. *Biophys J*, 94, 2610–2620.

O'Toole, M., Lamoureux, P., Miller, K.E. (2015). Measurement of subcellular force generation in neurons. *Biophys J*, 108, 1027–1037.

Pfister, B.J., Weihs, T.P., Betenbaugh, M., Bao, G. (2003). An in vitro uniaxial stretch model for axonal injury. *Ann Biomed Eng*, 31, 589–598.

Pfister, B.J., Iwata, A., Meaney, D.F., Smith, D.H. (2004). Extreme stretch growth of integrated axons. *J Neurosci*, 24, 7978–7983.

Pfister, B.J., Bonislowski, D.P., Smith, D.H., Cohen, A.S. (2006a). Stretch-grown axons retain the ability to transmit active electrical signals. *FEBS Lett*, 580, 3525–3531.

Pfister, B.J., Iwata, A., Taylor, A.G., Wolf, J.A., Meaney, D.F., Smith, D.H. (2006b). Development of transplantable nervous tissue constructs comprised of stretch-grown axons. *J Neurosci Methods*, 153, 95–103.

Pfister, B.J., Huang, J.H., Kameswaran, N., Zager, E.L., Smith, D.H. (2007). Neural engineering to produce in vitro nerve constructs and neurointerface. *Neurosurgery*, 60, 137–141.

Polackwich, R.J., Koch, D., McAllister, R., Geller, H.M., Urbach, J.S. (2015). Traction force and tension fluctuations in growing axons. *Front Cell Neurosci*, 9, 417.

Purohit, P.K., Smith, D.H. (2016). A model for stretch growth of neurons. *J Biomech*, 49, 3934–3942.

Rajagopalan, J., Tofangchi, A., Saif, M.T.A. (2010). Drosophila neurons actively regulate axonal tension in vivo. *Biophys J*, 99, 3208–3215.

Ranade, S.S., Syeda, R., Patapoutian, A. (2015). Mechanically activated ion channels. *Neuron*, 87, 1162–1179.

Rauzi, M., Verant, P., Lecuit, T., Lenne, P.-F. (2008). Nature and anisotropy of cortical forces

orienting *Drosophila* tissue morphogenesis. *Nat Cell Biol*, 10, 1401–1457.

Rauzi, M., Lenne, P.-F., Lecuit, T. (2010). Planar polarized actomyosin contractile flows control epithelial junction remodelling. *Nature*, 468, 1110–U1515.

Rossi, F., Gianola, S., Corvetto, L. (2007). Regulation of intrinsic neuronal properties for axon growth and regeneration. *Prog Neurobiol*, 81, 1–28.

Shibasaki, K., Murayama, N., Ono, K., Ishizaki, Y., Tominaga, M. (2010). TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons. *J Neurosci*, 30, 4601–4612.

Siechen, S., Yang, S., Chiba, A., Saif, T. (2009). Mechanical tension contributes to clustering of neurotransmitter vesicles at presynaptic terminals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 12611–12616.

Sinha, B., Koester, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R.V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R.G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C., Nassoy, P. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144, 402–413.

Smit, D., Fouquet, C., Pincet, F., Zapotocky, M., Trembleau, A. (2017). Axon tension regulates fasciculation/defasciculation through the control of axon shaft zippering. *eLife*, 6. doi: 10.7554/eLife.19907.

Smith, A.N., Miller, L.A., Radice, G., Ashery-Padan, R., Lang, R.A. (2009). Stage-dependent modes of Pax6-Sox2 epistasis regulate lens development and eye morphogenesis. *Development*, 136, 3377–3377.

Smith, D.H., Wolf, J.A., Meaney, D.F. (2001). A new strategy to produce sustained growth of central nervous system axons: Continuous mechanical tension. *Tissue Eng*, 7, 131–139.

Struzyna, L.A., Wolf, J.A., Mietus, C.J., Adewole, D.O., Chen, H.I., Smith, D.H., Cullen, D.K. (2015). Rebuilding brain circuitry with living micro-tissue engineered neural networks. *Tissue Eng Part A*, 21, 2744–2756.

Sugimura, K., Lenne, P.-F., Graner, F. (2016). Measuring forces and stresses in situ in living tissues. *Development*, 143, 186–196.

Suter, D.M., Miller, K.E. (2011). The emerging role of forces in axonal elongation. *Prog Neurobiol*, 94, 91–101.

Weiss, P. (1941). Nerve pattern: the mechanics of nerve growth. *Growth (Suppl Third Growth Symp)*, 5, 163–203.

Xu, K., Zhong, G., Zhuang, X. (2013). Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science*, 339, 452–456.

Yamada, T., Yoshimura, H., Inaguma, A., Ozawa T. (2011). Visualization of nonengineered single mRNAs in living cells using genetically encoded fluorescent proteins. *Anal Chem*, 83, 5708–5714.

Zhang, H., Labouesse, M. (2012). Signalling through mechanical inputs - a coordinated process. *J Cell Sci*, 125, 3039–3049.

Zheng, J., Lamoureux, P., Santiago, V., Dennerll, T., Buxbaum, R.E., Heidemann, S.R. (1991). Tensile regulation of axonal elongation and initiation. *J Neurosci*, 11, 1117–1125.

## **Légendes des figures**

### **Figure 1 - Mécanismes de la croissance axonale**

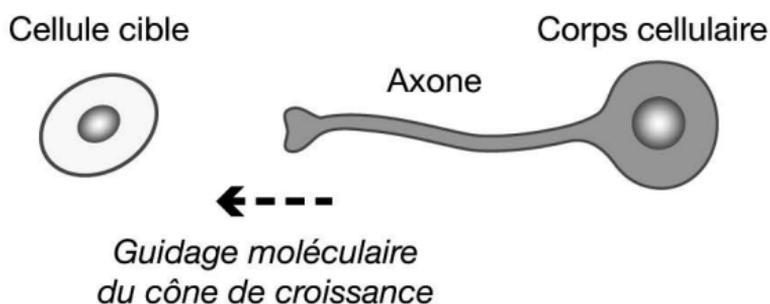
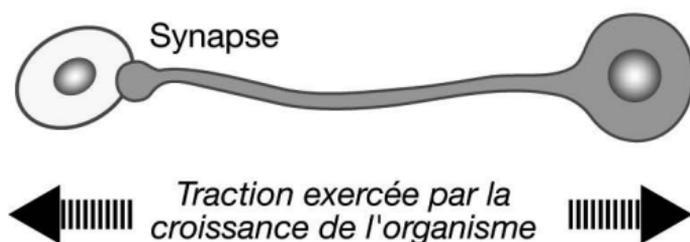
(A) Au cours de la première phase de croissance d'un axone, celui-ci s'allonge grâce à l'activité locomotrice de son extrémité (le cône de croissance), qui navigue vers sa cible en répondant à des signaux moléculaires présents dans son environnement.

(B) Schéma illustrant la croissance axonale par étirement: après la formation de la synapse avec la cellule cible, l'axone continue de grandir, possiblement sous l'effet de forces de traction exercées par la croissance de l'organisme.

(C) Dans le circuit olfactif du poisson-zèbre, les axones s'allongent par un mécanisme qui s'apparente à la croissance par étirement. Dans ce tissu, l'axone, dont l'extrémité est fixe, ancrée au cerveau, s'allonge par le mouvement passif du corps cellulaire, lui-même provoqué par des forces de traction ou de compression externes au neurone (Breau *et al.*, 2017).

### **Figure 2 - Dispositif d'étirement des axones intégrés *in vitro***

Ce schéma illustre le système de culture de neurones développé par l'équipe de Douglas H. Smith, qui permet la croissance par étirement d'axones intégrés, c'est à dire ayant formé une synapse avec une cellule-cible (ici, un neurone de la population opposée). Un dispositif mécanique éloigne progressivement les corps cellulaires des deux groupes de neurones, allongeant ainsi les faisceaux d'axones qui les relie (Pfister *et al.*, 2003).

**A****Croissance axonale classique****B****Croissance axonale par étirement****C****Circuit olfactif du poisson-zèbre**