

Université de Montréal

**Mécanismes de régulation de l'activité
de la lignée neurale adulte**

par Sandra Joppé

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophia Doctor (Ph.D.)
en Pathologie et Biologie Cellulaire

Mars 2018

© Sandra Joppé, 2018

Résumé

Chez l'adulte, la production de neurones est possible grâce aux cellules souches neurales (NSC) qui maintiennent la neurogenèse tout au long de la vie. La prolifération des NSC permet de générer des progéniteurs puis des neuroblastes. Cependant, la difficulté de croiser les données fonctionnelles et anatomiques pose un problème majeur pour l'étude de la neurogenèse. Plusieurs publications indiquent que les NSC mitotiques sont éphémères, ce qui nécessite la présence d'un réservoir de cellules pour leur succéder. L'hypothèse est qu'il existe des NSC dormantes qui seraient activées pour les remplacer. Anatomiquement, des cellules quiescentes, ayant la même morphologie et des caractéristiques antigéniques similaires, sont présentes aux côtés des NSC mitotiques, il a donc été suggéré que ces dernières forment le réservoir cellulaire. Leur transition, de l'état de quiescence à actif, ainsi que leurs mécanismes d'activation sont inconnus, mais représentent un enjeu majeur pour permettre la modulation de la neurogenèse adulte.

Afin de comprendre les mécanismes d'activation, nous avons voulu comprendre comment des facteurs extrinsèques, aux effets opposés, sont intégrés par les NSC et les progéniteurs. Ainsi, nous avons choisi d'opposer un facteur stimulant la prolifération cellulaire (EGF) à un anti-neurogénique (BMP). Les résultats obtenus démontrent que BMP est dominant sur l'ensemble des comportements cellulaires observés tels que la prolifération et la différenciation *in vitro*. La prépondérance de BMP n'est pas obtenue par l'inhibition des voies de signalisation en aval d'EGF, puisque la Rapamycine, un inhibiteur de mTOR, induit des effets différents de BMP. *In vivo*, BMP limite la prolifération induite par EGF. Grâce à l'électroporation, technique permettant de cibler spécifiquement les cellules astrocytaires du ventricule, nous avons démontré que l'inhibition de la voie des SMAD, qui intègre le facteur BMP, permet d'amorcer les NSC. Lors de cette expérience, nous avons réalisé que la grande majorité des cellules électroporées étaient quiescentes, nous offrant ainsi l'opportunité de définir les propriétés biologiques de ces cellules dormantes. Ainsi, cette approche nous a permis de déterminer que les cellules électroporées ne produisent que très peu de neurones. De plus, elles ne permettent pas la régénération de la zone sous-ventriculaire ni la production de neurosphères, ce qui implique qu'elles sont difficilement activables. Cependant, l'induction de la voie d'EGF dans

celles-ci permet de les amorcer et de les faire entrer dans le cycle cellulaire. Nos résultats suggèrent donc que les cellules électroporées ne contribuent que faiblement à la neurogenèse adulte et à la production des NSC mitotiques. Avec ces données obtenues, nous pouvons supposer qu'il existe une hétérogénéité des cellules astrocytaires, au contact du liquide cébro-spinal, dont certaines populations seulement contribuent à la neurogenèse ou que les NSC mitotiques sont générées à partir d'une autre population cellulaire.

Mots-clés : cellule souche neurale adulte, neurogenèse, zone sous-ventriculaire, prolifération, activation, quiescence, EGF, BMP, électroporation

Abstract

In the adult, neuron production is possible through neural stem cells (NSCs) that maintain neurogenesis throughout life. The proliferation of NSCs makes it possible to generate progenitors and new neuroblasts. The difficulty of intersecting functional and anatomical data poses a major problem. Several publications indicate that mitotic NSCs are ephemeral and disappear after division, which requires the presence of a reservoir of cells to succeed them. The hypothesis is that there are dormant NSCs that would be activated to replace them. Anatomically, quiescent cells, with same morphology and antigenic characteristics, are present alongside the mitotic NSCs, it has been postulated that they provide the cellular reservoir. Their transition, from quiescent state to active, and their activation mechanisms are unknown but represent a major issue to allow adult neurogenesis modulation.

To understand activation mechanisms, we wanted to understand how extrinsic factors, with opposite effects, can be integrated by NSCs and progenitors. Thus, we chose to oppose a factor stimulating cell proliferation (EGF) to an anti-neurogenic (BMP). The results obtained *in vitro* demonstrated that BMP is dominant over all observed cellular behaviors including proliferation and differentiation. The dominance of BMP is not achieved by the inhibition of downstream signaling pathways of EGF, since Rapamycin, an inhibitor of mTOR, induces different effects on BMP. *In vivo*, BMP limits the proliferation induced by EGF. Using electroporation, approach which allows to specifically target astrocytic cells in the lateral wall, we showed that the inhibition of the SMAD pathway, which integrates the BMP factor, makes it possible to prime the NSCs. In this experiment, we realized that the majority of electroporated cells were quiescent, giving us an opportunity to define the biological properties of these dormant cells. This approach allowed us to show that the electroporated cells are largely quiescent and produce very few neurons. In addition, they do not allow the regeneration of the subventricular zone nor the production of neurospheres, which implies that they are difficult to activate. However, activation of the EGF pathway can prime them and allow them to enter the cell cycle. Our results suggest that electroporated cells contribute only marginally to adult neurogenesis and mitotic NSC production. With these data, we can suppose that there exists a heterogeneity of the astrocytic cells in contact with the cerebrospinal fluid of which only some

populations contribute to neurogenesis or that the mitotic NSCs are generated from another cell population.

Keywords : adult neural stem cell, neurogenesis, subventricular zone, proliferation, activation, quiescence, EGF, BMP, electroporation

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvi
I. Introduction générale.....	1
A. La neurogenèse adulte.....	1
1. Les différents types de cellules souches.....	1
2. Le développement du système nerveux.....	1
3. La découverte de la neurogenèse adulte.....	2
4. La zone sous-ventriculaire, une des niches neurogéniques principales des cellules souches neurales adultes.....	3
a) La structure de la zone sous-ventriculaire.....	4
b) La lignée cellulaire des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire ...	6
(1) Les cellules souches neurales.....	6
(2) Les progéniteurs et neuroblastes.....	6
(3) Les interneurons.....	7
c) La neurogenèse adulte de la zone sous-ventriculaire chez l'humain.....	8
d) Fonctions de la neurogenèse de la zone sous-ventriculaire.....	11
(1) Chez les modèles murins.....	11
(2) Chez l'humain.....	12
B. La régulation de la lignée neurale.....	13
1. Importance de la régulation des cellules souches neurales adultes.....	13
2. Les structures majeures modulant la neurogenèse.....	14
a) Le système sanguin et la barrière hématoencéphalique.....	14

b)	Les astrocytes.....	14
c)	Les microglies.....	14
d)	Le liquide cérébro-spinal et plexus choroïde.....	15
e)	Les cellules épendymaires.....	15
3.	Les facteurs extrinsèques et voies de signalisation modulant la neurogenèse adulte.....	15
a)	Epidermal Growth Factor (EGF).....	16
b)	Bone Morphogenetic Protein (BMP).....	18
4.	La modulation de la neurogenèse adulte lors du vieillissement et de pathologies...	19
a)	Le vieillissement.....	19
(1)	Au niveau structurel.....	19
(2)	Au niveau cellulaire.....	20
(3)	Réactivation de la neurogenèse adulte lors du vieillissement.....	21
b)	La maladie d'Alzheimer.....	21
(1)	Pathologie.....	22
(2)	Maladie d'Alzheimer et neurogenèse adulte.....	22
C.	Les techniques d'étude de la neurogenèse adulte.....	24
1.	Les marqueurs cellulaires de la lignée neuronale.....	24
2.	Les techniques d'étude de la biologie des cellules souches neurales adultes.....	27
a)	La culture de précurseurs neuraux : l' <i>in vitro</i>	27
b)	L'utilisation de molécules.....	30
(1)	In vitro.....	30
(2)	In vivo.....	31
(a)	Injection.....	31
(b)	Infusion.....	32
c)	Les manipulations génétiques permettant l'identification des types cellulaires...	33
(1)	Les modèles de souris transgéniques.....	33
(a)	Les modèles constitutifs.....	33
(b)	Les modèles conditionnels et inductibles.....	35
(i)	Les modèles conditionnels Cre.....	37
(ii)	Les modèles inductibles.....	38

(a)	Les CreER.....	38
(b)	Les tTA.....	39
(c)	L'ablation cellulaire.....	39
(2)	Les virus.....	40
(a)	Les rétrovirus (RV).....	40
(b)	Les lentivirus (LV).....	41
(c)	Les adénovirus (Ad).....	42
(3)	Les plasmides.....	42
d)	La cytométrie en flux et le séquençage de l'ARN.....	44
e)	La transplantation.....	47
D.	Identification des cellules souches neurales.....	48
1.	Des cellules mitotiques dans le cerveau adulte produisent des neurones.....	49
2.	Description des cellules souches neurales et de leur lignée dans la SVZ.....	49
3.	Les cellules souches neurales sont des cellules épendymaires.....	50
4.	Les cellules souches neurales sont astrocytaires.....	51
5.	Les cellules souches neurales sont hétérogènes.....	53
6.	Les cellules souches neurales sont CD133 (Prominin-1) positives.....	53
7.	Les cellules de type B1 sont des cellules souches.....	53
8.	Les neurosphères sont produites par les aNSC et les progéniteurs.....	55
9.	La description spatiale des cellules de type B1.....	56
10.	Les cellules souches neurales ont une diversité moléculaire.....	57
11.	Les GEPCOT et leurs précurseurs : les pré-GEPCOT.....	57
12.	Identification des cellules souches neurales quiescentes.....	58
13.	La découverte des cellules souches neurales primitives.....	59
14.	Les cellules souches neurogéniques sont éphémères.....	60
15.	Les analyses transcriptomiques de cellules individuelles.....	61
16.	Les pNSC produisent les NSC astrocytaires lors de la régénération de la SVZ.....	62
17.	La neurogenèse adulte est maintenue par des divisions symétriques.....	63
18.	L'homéostasie des protéines est différente dans les cellules souches neurales quiescentes et actives.....	64
19.	Les cellules épendymaires ne sont pas des cellules souches.....	65

20. Résumé et interrogations	66
E. Hypothèses, Objectifs et approche expérimentale	68
II. Bone morphogenetic protein dominantly suppresses epidermal growth factor-induced proliferative expansion of adult forebrain neural precursors	70
A. Mise en contexte	72
B. Abstract	73
C. Introduction	73
D. Materials and methods	75
1. Animals	75
2. Cell culture experiments	75
3. In vivo experiments	77
4. Tissue processing	78
5. Immunostaining and TUNEL	78
6. Western blotting	79
7. Flow cytometry assays	79
8. Statistical analyses	80
E. Results	80
1. EGF and BMP exert opposing effects on SVZ-derived neural precursor proliferation	80
2. TAPs: BMP suppresses EGF-induced proliferation via highly dominant effects on proliferation, differentiation, cell cycle parameters and cell death	82
3. Distinct mechanisms of proliferation inhibition following EGF withdrawal and BMP treatment	83
4. NSCs: BMP promotes NSC quiescence by dominantly suppressing EGF-induced NSC activation	85
5. BMP limits EGF-induced proliferative expansion of TAPs <i>in vivo</i>	87
6. Inhibition of endogenous BMP signaling promotes NSC activation <i>in vivo</i>	88
F. Discussion	88
1. Proliferative expansion of TAPs	89
2. Activation of NSCs	90

G.	Table and Figures.....	93
H.	Acknowledgments.....	106
I.	Contribution des auteurs.....	106
III.	Biological properties of dormant ventricle-contacting neurogenic precursors revealed by genetic targeting in the adult murine brain.....	107
A.	Mise en contexte.....	109
B.	Abstract.....	110
C.	Introduction.....	110
D.	Materials and Methods.....	113
1.	Experimental model and subject details.....	113
2.	Method details.....	113
a)	Surgical procedures.....	113
b)	Electroporation.....	113
c)	Osmotic pump infusions.....	114
d)	Tissue analysis.....	114
e)	Immunostaining.....	114
f)	Neurosphere assays.....	115
3.	Quantification and statistical analyses.....	115
E.	Results.....	116
1.	Genetic targeting of a population of neurogenic ventricle-contacting GFAP ⁺ cells by adult brain electroporation.....	116
2.	Limited contribution of ventricle-contacting hGFAP ⁺ cells to adult neurogenesis.....	118
3.	Ventricle-contacting hGFAP ⁺ cells in the adult SVZ do not produce aNSCs.....	120
4.	Ventricle-contacting hGFAP cells are not recruited during repopulation of the SVZ.....	122
5.	Ventricle-contacting hGFAP cells can be recruited by ectopic EGFR signalling: differential responsiveness in the young adult, middle-aged, and 3xTg-AD niches.....	122
F.	Discussion.....	125
1.	The hGFAP ⁺ population has limited neurogenic output in the adult SVZ.....	126
2.	The aNSC pool is not sustained by the hGFAP ⁺ population.....	126

3.	Dormant hGFAP ⁺ cells have neurogenic potential that is inhibited in contexts of aging and AD	127
4.	Implications and possible caveats	128
G.	Tables and Figures	130
H.	Acknowledgements.....	145
I.	Contribution des auteurs	145
IV.	Discussion.....	146
A.	BMP limite les effets prolifératifs induits par EGF	146
1.	BMP enrayer la prolifération des progéniteurs.....	146
2.	BMP réfrène l'activation des NSC in vitro	149
B.	Caractérisation d'une sous-population astrocytaire dormante dans les ventricules latéraux grâce à l'électroporation.....	151
1.	L'électroporation une technique permettant l'étude des B1 chez la souris adulte.	152
2.	Les cellules hGFAP ⁺ sont largement quiescentes et possèdent des capacités neurogéniques limitées.....	153
3.	Les cellules hGFAP ⁺ ne sont pas des aNSC et ne les génèrent pas in vitro	154
4.	Les cellules hGFAP ⁺ ne permettent pas la régénération de la SVZ	154
5.	Les cellules hGFAP ⁺ peuvent être recrutées grâce à la voie d'EGF	155
6.	Implications sur la biologie des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire	157
C.	Conclusions et perspectives futures.....	159
V.	Bibliographie.....	162
VI.	Annexes.....	i
A.	Annexe A	i
B.	Annexe B	xvii
C.	Annexe C	xxvii

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I. Exemple de combinaisons de marqueurs utilisées pour le FACS.....	46
---	----

Chapitre II

Tableau I. Antibody list.....	93
-------------------------------	----

Chapitre III

Tableau I. Plasmid list.....	130
------------------------------	-----

Tableau II. Antibody list.....	131
--------------------------------	-----

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1 : Illustration de la niche neurogénique de la zone sous-ventriculaire.	5
Figure 2 : Marqueurs de la lignée neurale dans la SVZ.....	26

Chapitre II

Figure 1: Comparison of the pro- and anti- proliferative effects of 6 families of neurogenesis regulators on SVZ-derived neural precursor cultures.....	95
Figure 2: BMP exerts dominant effects over TAP proliferation, differentiation, cell cycle parameters and cell death.....	97
Figure 3: Similarities and differences between BMP treatment and EGF withdrawal-induced suppression of TAP proliferation.....	99
Figure 4: BMP dominantly suppresses NSC activation.....	101
Figure 5: BMP limits EGF-induced expansion of TAPs in vivo.....	103
Figure 6: Inhibition of BMP-SMAD signaling in NSCs promotes mTORC1 activity in vivo.	105

Chapitre III

Figure 1: Genetic targeting of a population of neurogenic ventricle-contacting GFAP ⁺ cells by adult brain electroporation.	133
Figure 2: Limited contribution of ventricle-contacting hGFAP ⁺ cells to adult neurogenesis	135
Figure 3: Ventricle-contacting hGFAP ⁺ cells in the adult SVZ do not produce neurosphere-forming aNSCs.....	137
Figure 4: Ventricle-contacting hGFAP ⁺ cells are not recruited during Ara-C-induced depletion and repopulation of the SVZ niche	139
Figure 5: Dormant hGFAP ⁺ cells can be recruited by ectopic EGFR signalling: differential responsiveness in the young adult, middle-aged, and 3xTg-AD SVZ.....	141
Figure 6: Implications for the model of the adult SVZ niche.....	142
Figure supplémentaire 1.....	144

Liste des abréviations

Ad : adénovirus

ADN : acide désoxyribonucléique

Akt : protéine kinase B ou encore PKB

AO : acide oléique

APP : protéine précurseur de l'amyloïde

Ara-C : *Cytosine β-D-arabinofuranoside*

ARN : acide ribonucléique

BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*

BHE : barrière hémato-encéphalique

BLBP : *brain lipid-binding protein*

BMP : *bone morphogenetic protein*

BMPR : *bone morphogenetic protein receptor*

BrdU : bromodésoxyuridine

CaMK : Ca^{2+} /*calmodulin-dependent protein kinase*

CD : *cluster of differentiation*

CFSE : *carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CNTF : *ciliary neurotrophic factor*

CNS : *central nervous system*, en français système nerveux central

DCX : *doublecortin*

Deptor : *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*

Dlx : *Distal-less homeobox*

DTA : *diphtheria toxin fragment A*

EGF : *epidermal growth factor*

EGFR : *epidermal growth factor receptor*

ERK : *extracellular signal-regulated kinases*

4EBP1 : *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*

FACS : *fluorescence-activated cell sorting*

FoxJ1 : *Forkhead box protein J1*

FGF : *fibroblast growth factor*

FUCCI : *fluorescence ubiquitination cell cycle indicator*
GABA : acide γ -aminobutyrique
GCV : *Ganciclovir*
GFAP : *glial fibrillary acidic protein*
GFP : protéine fluorescente verte
GLAST : *Glutamate ASpartate Transporter (Slcla3)*
mGluR2 : *metabotropic glutamate receptor 2*
HSV-TK : *herpes simplex virus thymidine kinase*
ICV : infusion intraventriculaire
Id1 : *Inhibitor of DNA binding 1*
IP : intra-péronéale
LCS : liquide cérébro-spinal
LeX : *Lewis X (ssea1)*
LIF : *leukemia inhibitory factor*
LRC : *label retaining cell*
LV : lentivirus
MA : maladie d'Alzheimer
MAPK : *mitogen-activated protein kinases*
Mash1 : *mammalian achaete scute homolog-1* ou *Ascl1 Achaete-scute homolog 1*
mLST8 : *mammalian lethal with SEC13 protein 8*
mSin1 : *mammalian SAPK interacting protein 1*
 α SMA : *alpha smooth muscle actin*
mTOR : *mammalian target of rapamycin* ou encore *mechanistic target of rapamycin*
aNSC : *active neural stem cell*, en français : cellule souche neurale active
N-CAM : *neural cell adhesion molecule*
NeuN : *neuronal nuclei*
NF κ B : *nuclear factor-kappa b*
NSC : *neural stem cell*, en français cellule souche neurale
qNSC : *quiescent neural stem cell*, en français : cellule souche neurale quiescente
NSE : *neuron specific enolase*
Oct4 : *octamer-binding transcription factor 4*

PCNA : *proliferating cell nuclear antigen*
PDGF : *platelet-derived growth factor*
PDK1 : pyruvate déshydrogénase kinase 1
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
pNSC : *primitive neural stem cell*, en français cellules souche neurale primitive
PRAS40 : *proline-rich Akt substrate of 40 kDa*
Prom1 : *Prominin-1 (CD133)*
Protor : *protein observed with RICTOR*
PS : *presenilin*
PSA-NCAM : *Polysialylated-neural cell adhesion molecule*
Raptor : *regulatory-associated protein of mTOR*
RCAS : *replication-competent avian sarcoma-leukosis*
RHEB : *ras homolog enriched in brain*
Rictor : *rapamycin insensitive companion of mTOR*
RV : rétrovirus
Shh : *sonic hedgehog*
Sox2 : *Sex determining region Y-box 2*
STAT : *signal transducers and activators of transcription*
SVZ : *subventricular zone*, en français zone sous-ventriculaire
S6 : rpS6 pour *ribosomal protein 6*
TAP : *transit amplifying cell*, en français cellule d'amplification transitoire
TGF : *transforming growth factor*
TK : *thymidine kinase*
TSC : *tuberous sclerosis protein*
tTA : protéine transactivatrice de la tétracycline
TUNEL : *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*
TVA : *tumor virus A*
VCAM1 : *Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106)*
VEGF : *vascular endothelial growth factor*

Remerciements

À mon directeur de thèse Karl Fernandes :

Je te remercie pour ta présence tout au long de mon doctorat, pour tes conseils et tes encouragements. Je te suis très reconnaissante d'avoir cru en moi, d'avoir pris le temps de me former et de me soutenir. Merci de m'avoir donné la chance de travailler et d'évoluer dans ton laboratoire.

À mes collègues :

Aux anciens collègues, Greg, Stef, Alex, Brianna, Catherine-Alexandra, Chuck, Matthieu, Farah, mais aussi aux actuels : Anne, Laura, Loïc et Clara, je vous dis un grand merci pour votre présence, votre soutien, votre aide et votre amitié. Grâce à vous, ces cinq dernières années seront inoubliables.

À mon comité de parrainage et de thèse :

Je tiens à remercier mes comités de parrainage et de thèse pour votre présence, vos conseils et votre temps. Merci aux Dr Michel Cayouette, Dr Nicolas Dumont, Dr Pierre Drapeau, Dr Philippe Roux et Dr Armen Shaghatelyan.

Enfin, à ma famille et mes amis :

Je souhaite vous remercier tout simplement pour votre présence et votre soutien, que ce soit pour les vacances, pour les week-ends ou pour les discussions de couloir.

I. Introduction générale

A. La neurogenèse adulte

Bien que le système nerveux central adulte soit d'une extrême complexité, dû à des milliards de cellules qui le composent et de leurs connexions spécifiques, de nouvelles cellules y sont intégrées chaque jour. Ces dernières ont pour objectifs de soutenir et de remplacer la structure préexistante. Ce phénomène est possible grâce à la présence de cellules souches neurales adultes qui ont été découvertes dans les années 1900.

1. Les différents types de cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées définies par deux critères essentiels : le premier étant la capacité d'autorenouvellement, c'est-à-dire de produire une cellule identique à celle d'origine. Le second est la potentialité, soit leur capacité à produire différents types cellulaires (McKay, 1997). Chez les mammifères, il existe deux principaux types de cellules souches : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes. Les cellules souches embryonnaires sont pluripotentes, soit capables de produire l'ensemble des types cellulaires qui composent le corps. Lors du développement, elles vont produire les trois couches primaires : l'endoderme, le mésoderme et enfin l'ectoderme, responsable de la production du système nerveux. Par la suite, elles vont perdre une partie de leur potentialité et devenir des cellules souches adultes. Ces dernières sont retrouvées dans de nombreux tissus (tels que la peau, l'intestin et le cerveau) et sont dites multipotentes. Elles sont uniquement capables de produire les différents types cellulaires qui composent un tissu.

2. Le développement du système nerveux

Lors du développement du système nerveux, les cellules neuroépithéliales du tube neural se divisent symétriquement afin d'augmenter leur nombre. Celles-ci vont par la suite se transformer en glias radiaires qui contactent de façon apicale le ventricule via un cil primaire et les vaisseaux sanguins au niveau basal. La fonction des glias radiaires est de se diviser de façon

symétrique et asymétrique afin de produire des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes, directement ou indirectement via la production de cellules progénitrices intermédiaires (Alvarez-Buylla et al., 2001; Bjornsson et al., 2015; Hamilton et al., 2013; Hansen et al., 2010; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

Jusqu'à très récemment, il a été considéré qu'après la formation du système nerveux, les glies radiaires rétractaient leurs prolongements et se différenciaient en cellules épendymaires ou en cellules souches neurales (qui seront par la suite décrites sous l'abréviation NSC pour *Neural Stem Cell*) adultes (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Merkle et al., 2004). Cependant, en 2015, il a été démontré, que chez la souris, les NSC adultes sont produites par les glies radiaires de E13,5 à E15,5 soit lors de l'embryogenèse (Fuentelba et al., 2015; Furutachi et al., 2015).

3. La découverte de la neurogenèse adulte

Aujourd'hui, il est reconnu et accepté que la neurogenèse adulte, c'est-à-dire la production de nouveaux neurones, soit présente dans deux régions principales du cerveau, soit dans la zone sous-ventriculaire (en anglais *subventricular zone*, abrégée ici en SVZ) bordant les ventricules latéraux et dans le gyrus dentelé de l'hippocampe. On la retrouve dans de nombreuses espèces incluant les murins (Altman and Das, 1965), les primates (Gould et al., 1999; Kornack and Rakic, 1999) ainsi que les humains (Eriksson et al., 1998; Kukekov et al., 1999). L'idée de la neurogenèse adulte apparait dans les années 1960 : grâce à la ³H-Thymidine, un agent intercalant de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) permettant de visualiser sa synthèse, Joseph Altman publie deux articles démontrant la présence de cellules mitotiques capable de produire de nouveaux neurones dans le gyrus dentelé de cerveaux de rats adultes (Altman and Das, 1965). Ses travaux rencontrent un fort scepticisme, jusqu'aux années 1990 où Weiss et Reynold parviennent à isoler les NSC *in vitro*. Ils découvrent, qu'en présence d'EGF (*Epidermal Growth Factor*), des cellules prolifèrent en formant des colonies flottantes, appelées neurosphères (Reynolds and Weiss, 1992). Ces dernières, contenant des cellules souches et des progéniteurs, sont capables d'autorenouvellement et de multipotence (Reynolds and Weiss, 1992; Vescovi et al., 1993). L'isolation des cellules souches neurales en culture a donné un élan pour la reconnaissance de la neurogenèse adulte ainsi que son étude.

Les premières preuves de la présence de la neurogenèse adulte chez l'humain ont été publiées en 1998 par le laboratoire du Dr Gage. Pour cela, ils ont étudié des cerveaux humains de patients ayant reçu pour traitement du BrdU (BromodésoxyUridine). Ce dernier est un analogue de la thymidine qui s'intègre à l'ADN lors de la division cellulaire, tel que la ³H-Thymidine. Chez ces patients, le laboratoire a pu observer des neurones BrdU positifs dans le gyrus dentelé et la zone sous-ventriculaire (Eriksson et al., 1998; Gage, 2000). De nos jours, l'étude de la neurogenèse adulte humaine est largement dominée par le laboratoire du Dr Frisen. Pour cela, il utilise les effets secondaires produits par les essais nucléaires dans les années 1960. En étudiant des cerveaux de personnes nées avant, pendant ou après ces explosions, ils sont capables de mesurer de façon quantitative le nombre de nouveaux neurones intégrés lors de la vie de leurs sujets. C'est ainsi qu'ils ont démontré que les hippocampes humains produisent 700 neurones par jour, représentant un renouvellement neuronal de 1,75 % par an, soit un renouvellement complet du gyrus dentelé sur une vie (Bergmann et al., 2015; Spalding et al., 2013). De même, les ventricules latéraux produisent un nombre similaire de cellules, représentant un renouvellement de 2,7 % des interneurons du striatum par an (Ernst et al., 2014).

4. La zone sous-ventriculaire, une des niches neurogéniques principales des cellules souches neurales adultes

Le cerveau adulte présente deux niches neurogéniques principales : le gyrus dentelé de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux. Une troisième est venue se greffer plus récemment, celle de l'hypothalamus (Gage, 2000; Ihrie et al., 2011; Rojczyk-Golebiewska et al., 2014). Chez la souris, la SVZ est la région neurogénique la plus importante. En effet, elle permet la production de nombreuses cellules, puisque plus de 30 000 d'entre elles passent par le trajet migratoire rostral par jour, alors que le gyrus dentelé en génère seulement 3 000 à 9 000 (Alvarez-Buylla et al., 2001; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Winner et al., 2002). Dans ce manuscrit, seule la SVZ sera décrite puisqu'elle est la région d'intérêt des articles présentés dans les chapitres 2 et 3.

a) La structure de la zone sous-ventriculaire

Les NSC adultes de la SVZ, aussi appelées cellules B, sont une sous-population astrocytaire. Elles sont présentes sous deux types cellulaires : les B1 et les B2 (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1997; Garcia et al., 2004; Imura et al., 2003; Sanai et al., 2004). Ces milliers de cellules possèdent une localisation idéale pour recevoir les signaux environnementaux. En effet, les B1 sont incluses dans le mur latéral constitué de cellules épendymaires multiciliées. Elles ont leur corps cellulaire en dessous de ceux des cellules épendymaires et contactent le liquide cérébro-spinal (LCS), via leur cil primaire au bord apical, et le système vasculaire sanguin du côté basal. Les cellules de types B2 sont présentes plus profondément dans le tissu et à proximité des vaisseaux sanguins (Figure 1) (Codega et al., 2014; Doetsch et al., 1999a; Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Le reste de la lignée des NSC, à savoir les progéniteurs et les neuroblastes, est retrouvé un peu plus profondément dans le tissu. Il a été calculé que la SVZ présente un ratio d'approximativement 3:2:1 pour les neuroblastes, les NSC et les progéniteurs respectivement. D'autres types cellulaires neuraux sont observés dans la SVZ tels que des microglies, des tancytes et des neurones, mais aussi des cellules non neurales telles que les cellules qui forment les vaisseaux sanguins (Doetsch et al., 1997). En effet, la SVZ est une région du cerveau largement vascularisée. Il a été démontré que l'ensemble des cellules en prolifération, que ce soit les NSC, les progéniteurs ou les neuroblastes, sont retrouvées à proximité de vaisseaux sanguins (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Plus récemment, la SVZ a été divisée en trois domaines selon sa structure et la présence des NSC. Le premier domaine (apical) contient le tissu au plus proche du ventricule et inclut les processus apicaux des NSC ainsi que les cellules épendymaires. Le second contient les progéniteurs et les neuroblastes ainsi que le corps cellulaire des NSC. Enfin, les extensions basales des NSC qui contactent les vaisseaux sanguins sont retrouvées dans le troisième domaine (basal) (Lim and Alvarez-Buylla, 2016).

D'après les analyses microscopiques faites dans le laboratoire du Dr Alvarez-Buylla, le mur du ventricule latéral est constitué de deux types cellulaires : un épendymaire et un astrocytaire (type B). Le type épendymaire est composé des cellules E1 et E2 qui diffèrent principalement par le nombre de cils au contact du LCS. Ils indiquent que le mur du ventricule latéral est constitué de 69 % de cellules E pour 31 % de cellules B1, ce qui représente plus 6200 cellules B1 par mur

latéral. La surface occupée par ces types cellulaires est drastiquement différente puisque la surface d'une cellule E est d'environ $265\mu\text{m}^2$ versus $21\mu\text{m}^2$ pour une cellule B1. Enfin, leur étude est une des premières à démontrer que les cellules B1 sont regroupées en amas, de 1 à 40 cellules, qui possèdent une forme de rosace, que l'on nomme *pinwheel* (Mirzadeh et al., 2008; Shook et al., 2012).

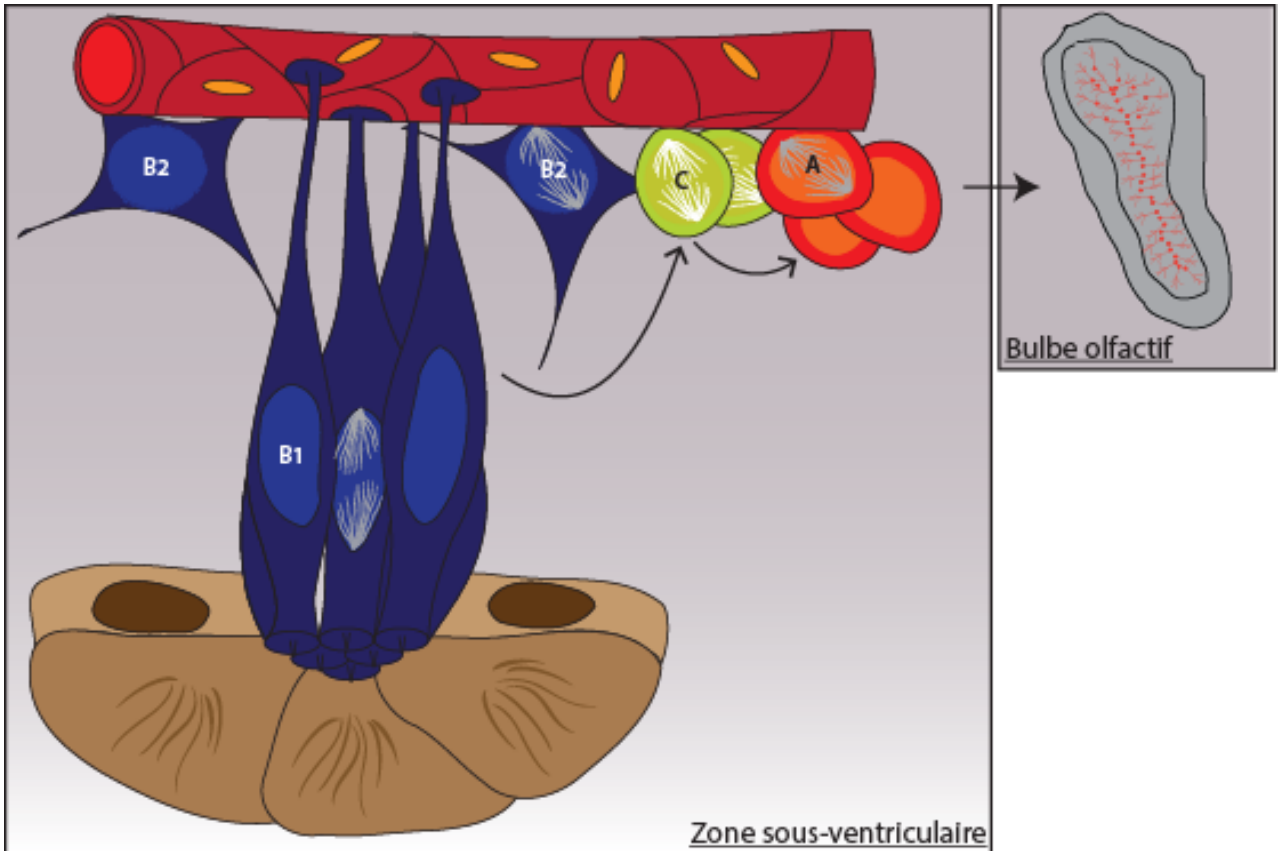


Figure 1 : Illustration de la niche neurogénique de la zone sous-ventriculaire.

Dans la zone sous-ventriculaire, la paroi des ventricules latéraux est composée de cellules épendymaires (E en marron). Deux types de cellules B sont présentes (en bleu) : la première, les B1, contacte le LCS par le bord apical et les vaisseaux sanguins par le côté basal. Le second, les cellules B2, sont présentes plus profondément dans le tissu. Les progéniteurs et les neuroblastes, cellules C et A (en vert et en rouge) respectivement, sont situés à proximité de la circulation sanguine. Les neuroblastes migrent par le trajet migratoire rostral afin de se rendre dans les bulbes olfactifs afin de s'intégrer et devenir fonctionnels. Illustration générée par Sandra Joppé.

b) La lignée cellulaire des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire

(1) Les cellules souches neurales

Comme mentionné précédemment, les NSC de la SVZ sont astrocytaire. En effet, la production de neuroblastes est dépendante de cellules exprimant le marqueur GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*). La suppression de celles-ci induit une absence de formation de neurosphères lorsque les murs latéraux sont mis en culture ainsi qu'un arrêt de la neurogenèse (Garcia et al., 2004; Imura et al., 2003; Morshead et al., 2003). L'identité et la fonction des NSC font partie d'un grand débat et restent à ce jour encore controversées. Afin de pouvoir pleinement discuter ce point, il est nécessaire d'apporter plusieurs notions qui seront abordées par la suite. Ainsi, ces deux points feront partie de l'un des derniers paragraphes de l'introduction de ce manuscrit (Paragraphe I. D).

Pour cette section, il sera assumé, de façon très théorique et schématique, que quand l'environnement devient permissif, les cellules souches neurales vont s'activer afin de se diviser pour générer des progéniteurs. Par conséquent, il existe au moins deux sous-populations fonctionnelles de NSC : les quiescentes (qNSC) et les actives, soit celles présentes dans le cycle cellulaire (aNSC).

(2) Les progéniteurs et neuroblastes

Les progéniteurs (aussi appelé cellule C ou TAP pour *Transit Amplifying Cell*) possèdent un rôle d'amplification transitoire et vont se diviser rapidement 2 à 3 fois. Par la suite, ils vont se différencier en neurones immatures (aussi appelés neuroblastes ou cellules A) ou en cellules gliales : astrocytes non neurogénique ou oligodendrocytes (Ponti et al., 2013). Les neuroblastes vont se diviser 1 à 2 fois dans la SVZ avant d'entamer leur migration jusqu'aux bulbes olfactifs (Bjornsson et al., 2015; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Ponti et al., 2013). Cette amplification exponentielle permet de générer un grand nombre de cellules : il est estimé que la division d'une seule NSC permet la production d'une trentaine de cellules différenciées (Ponti et al., 2013). C'est ainsi que, chez la souris, plus de 30 000 neuroblastes quittent la SVZ chaque jour (Jankovski and Sotelo, 1996; Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Le déplacement des cellules A de leur zone de production à leur destination finale se fait via le trajet migratoire rostral et est guidé par des signaux de chimiotactisme ainsi que par des molécules d'adhérence cellulaire telles que N-CAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) au sein d'une gaine astrocytaire (Hu and

Rutishauser, 1996; Ono et al., 1994; Tomasiewicz et al., 1993). Une fois le bulbe olfactif atteint, les neuroblastes s'intègrent au circuit neuronal préexistant en tant qu'interneurones (Figure 1).

(3) *Les interneurones*

La neurogenèse adulte de la SVZ produit une dizaine de types d'interneurones différents. Premièrement, dans la couche périglomérulaire, les neuroblastes peuvent se différencier en trois types d'interneurones définis par l'expression de la calbindine, de la calretinine ou de la tyrosine hydroxylase. Secondement, dans la couche granulaire, ils peuvent produire des interneurones différents définis selon leur localisation au sein de cette couche cellulaire et de leur expression de la calretinine, de la glycoprotéine 5T4, de mGluR2 (*metabotropic glutamate receptor 2*) ou encore de la CaMK (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases*). Récemment, quatre nouveaux types d'interneurones ont été découverts présentant une morphologie plus arborisée appelés cellules de type 1-4 (Batista-Brito et al., 2008; Hardy and Saghatelian, 2017; Imamura et al., 2006; Kosaka et al., 1995; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Merkle et al., 2004; Price and Powell, 1970; Zou et al., 2002). La majorité des nouveaux neurones deviennent des cellules granulaires (75-99%) et les autres, des cellules périglomérulaires (1-25%) (Carleton et al., 2003; Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002). Chez la souris, l'ensemble des interneurones produits exprime le GABA (acide γ -aminobutyrique) (Kohwi et al., 2007; Kosaka et al., 1995; Lledo et al., 2008).

Il est intéressant de noter qu'il existe une spécification régionale dans la production des différents types d'interneurones. En effet, des études, menées par traçage de lignée génétique, démontrent que la production d'un type d'interneurones implique les NSC d'une certaine région de la SVZ. Selon l'axe antéromédial de la SVZ, différentes populations d'interneurones périglomérulaires sont observées (Brill et al., 2009; Lim and Alvarez-Buylla, 2016; Merkle et al., 2007). Cette spécification régionale est déjà établie lors de la production des cellules souches neurales adultes lors de l'embryogenèse (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015; Lim and Alvarez-Buylla, 2016).

Seulement 50% des neuroblastes produits vont devenir des cellules fonctionnelles, les autres vont mourir par apoptose dans les 2 à 4 semaines suivant leur production (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Rochefort et al., 2002; Winner et al., 2002; Yamaguchi and Mori, 2005). La neurogenèse de la SVZ est donc capable de produire des interneurones ayant de multiples

différences, que ce soit antigéniques, morphologiques, neurochimiques, synaptiques et, etc. (Lledo et al., 2008).

c) **La neurogenèse adulte de la zone sous-ventriculaire chez l'humain**

L'ensemble des données présentées ci-dessus proviennent de l'étude de modèles murins. Cependant, ce ne sont pas les seuls à posséder des NSC adultes dans cette région. En effet, il a été démontré que celles-ci sont présentes chez les singes et/ou chez les humains (Altman and Das, 1965; Eriksson et al., 1998; Ernst et al., 2014; Kornack and Rakic, 2001; Quinones-Hinojosa et al., 2006; Sanai et al., 2004; Sorrells et al., 2018; Wang et al., 2011). Tout comme dans les modèles murins, la mise en culture de biopsie de cerveaux humains contenant la SVZ permet de produire des neurosphères (Kukekov et al., 1999). La niche neurogénique chez l'Homme est très similaire : la neurogenèse se déroule en dessous de la couche des cellules épendymaires puisque des précurseurs neuraux et des neuroblastes peuvent y être observés (Leonard et al., 2009; Quinones-Hinojosa et al., 2006; Sanai et al., 2004). La différence structurelle majeure est la présence d'une zone à faible densité cellulaire située en dessous des cellules épendymaires (*hypocellular gap*) (Leonard et al., 2009; Quinones-Hinojosa et al., 2006; Sanai et al., 2004). Il est intéressant de noter que la SVZ humaine présente aussi trois types d'astrocytes. Le premier est caractérisé par de petites cellules possédant de longues projections horizontales alors que le second type est défini par un corps cellulaire large et des prolongements avec de nombreuses organelles. Enfin, le dernier est similaire au deuxième type, mais diffère par un cytoplasme plus clair dû à un nombre d'organelles plus faibles (Quinones-Hinojosa et al., 2006). Au moins une sous-population de ces astrocytes est capable de proliférer et de produire des progéniteurs que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. En culture, la multipotence de ces cellules a été démontrée, ce qui permet de soutenir l'idée de la présence de NSC adultes (Sanai et al., 2004).

Les NSC humaines sont capables de produire de nouveaux neurones puisque des marqueurs spécifiques tels que DCX (*Doublecortin*) et TuJ1 (aussi connu sous le nom *Neuron-specific class III β -tubulin*), sont observés dans la SVZ. Ces cellules présentent de longues extensions et une morphologie allongée laissant supposer qu'elles sont en migration (Bernier et al., 2000; Quinones-Hinojosa et al., 2006; Sanai et al., 2004; Weickert et al., 2000). La

destination des neurones produits reste controversée et est encore sujette à débat : le Dr Curtis a été le premier à publier que les cellules prolifératives PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) positives forment une voie de migration sous le noyau caudé se rendant au cortex olfactif antérieur. Dans cette étude, les marqueurs neuronaux tels que β III-tubuline, PSA-NCAM (*Polysialylated-neural cell adhesion molecule*), NeuN (*Neuronal Nuclei*) sont présents dans le bulbe olfactif humain (Bedard and Parent, 2004; Curtis et al., 2007; Maresh et al., 2008). Quelques années plus tard, il a été démontré que le nombre de cellules, présentant la morphologie et les marqueurs de neuroblastes en migration, décline après la naissance chez les humains. Il est important de mentionner que les auteurs notent la présence de cellules similaires chez l'adulte bien qu'elles ne forment plus une voie de migration (Sanai et al., 2011). La difficulté majeure pour détecter la neurogenèse humaine est que les nouveaux neurones produits ne sont différenciables des anciens que pendant quelques semaines (Ming and Song, 2011). Une des hypothèses qui pourrait expliquer les résultats trouvés dans les bulbes olfactifs est la présence de cellules souches de l'épithélium olfactif. Ces dernières peuvent être neurogéniques et produire une descendance neurale partageant de nombreux marqueurs avec celles issues de la SVZ (Fletcher et al., 2017; Graziadei and Graziadei, 1979; Mackay-Sim and Kittel, 1991; Yu and Wu, 2017).

Ce problème fut résolu dans les années 2000, par Bergmann et ses collègues du laboratoire Frisen, grâce à leur technique de datation du ^{14}C (carbone 14) pour observer l'addition de nouvelles cellules dans le cerveau humain. Le taux de ^{14}C présent dans l'air a été relativement stable jusqu'à la guerre froide, où plusieurs pays ont réalisé des tests sur l'explosion nucléaire. Par conséquent, le taux de carbone radioactif a augmenté dans notre environnement. Ce dernier, réagissant avec l'oxygène, se retrouve dans le dioxyde de carbone ($^{14}\text{CO}_2$) et par conséquent dans les plantes, les animaux et les Hommes. Lors d'une division cellulaire, la cellule intègre du carbone lors de sa synthèse d'ADN. Ainsi, si du ^{14}C est présent dans le corps de l'hôte, la cellule en division va utiliser ce carbone et obtenir un ADN radioactif. Puisque le taux de ^{14}C atmosphérique au cours du temps est connu, il ne reste plus qu'à analyser ce taux dans l'ADN génomique pour savoir à quelle date la cellule est apparue et donc d'estimer le taux de renouvellement d'un tissu (Bergmann et al., 2015).

Grâce à cette technique, ce laboratoire indique que, chez l'humain, des cellules non neuronales sont apparues dans la structure du bulbe olfactif après la naissance de leurs sujets

avec un renouvellement annuel de 2-3%. Cependant, le taux de ^{14}C génomique des cellules neuronales est similaire au taux atmosphérique observé à leur naissance. Ils calculent un renouvellement annuel de 0,008% soit moins de 1% sur une vie entière (Bergmann et al., 2012; Ernst and Frisen, 2015). Ces données contrastent avec celles obtenues chez les rongeurs qui présentent un renouvellement de plus de 50% de leurs neurones olfactifs (Imayoshi et al., 2008). De plus, ils démontrent, grâce à des techniques de biologie moléculaire, la présence de neuroblastes dans la SVZ et le striatum. Ces données sont confirmées avec leur technique de datation des cellules au ^{14}C . D'après l'article d'Ernst et *al.* paru en 2014, les nouveaux neurones produits par la neurogenèse adulte de la SVZ seraient des interneurons du striatum et permettraient un renouvellement de 2,7% par an (Ernst et al., 2014; Ernst and Frisen, 2015).

Très récemment, trois articles ont été publiés sur la neurogenèse humaine. Bien leur région d'intérêt soit l'hippocampe, certains résultats présentés sont sur la SVZ. Deux de ces articles indiquent que la neurogenèse adulte humaine est quasiment indétectable dans l'hippocampe. Pour cela, les auteurs ont effectué plusieurs immunomarquages sur des cerveaux de personnes dont les âges variaient entre 22 semaines de gestation à 77 ans. Leurs résultats indiquent que la neurogenèse de l'hippocampe est présente lors du développement embryonnaire jusqu'à 7-10 ans. Cependant, chez l'adulte, la neurogenèse est absente (Cipriani et al., 2018; Sorrells et al., 2018). Le laboratoire du Dr Alvarez-Buylla explique que leurs résultats diffèrent de ceux obtenus par la datation au ^{14}C puisque ces derniers peuvent être biaisés par les mécanismes de méthylation et de réparation de l'ADN (Sorrells et al., 2018). A l'opposé, l'article proposé par l'équipe de recherche du Dr John Mann indique que la neurogenèse de l'hippocampe humain soit conservée chez l'adulte et persiste lors du vieillissement (Boldrini et al., 2018). Leurs données sont obtenues par la même approche expérimentale que les deux publications précédentes. Malheureusement, les auteurs ne débattent pas de leurs résultats avec ceux-ci-dessus. Ils ne font que mentionner qu'ils ne peuvent pas faire de comparaison puisqu'eux utilisent une quantification stéréotaxique mais pas Sorrells et *al.* et Cipriani et *al.* (Boldrini et al., 2018). Cette discussion sera cependant très rapidement effectuée par un consortium d'experts de la neurogenèse hippocampale, incluant entre autres les docteurs Kempermann, Gage, Curtis, Jesseberger, Gould et Frisen. Dans cette revue, deux principaux arguments sont apportés. Premièrement, les auteurs indiquent que les résultats obtenus avec la datation du ^{14}C ne peuvent pas être uniquement dû à la réparation ou la méthylation de l'ADN puisque cela

nécessiterait un remplacement de plus de 30% de l'ADN génomique des neurones (Kempermann et al., 2018; Spalding et al., 2013). De plus, ces mécanismes ne serait pas suffisant pour permettre la détection de cellules BrdU positives (Eriksson et al., 1998; Kempermann et al., 2018). Deuxièmement, Kempermann et *al.* indiquent que les immunomarquages sont particulièrement sensibles au délai post-mortem, soit le temps entre la mort de la personne et la fixation du cerveau. Dans l'article de Sorrells et ses collègues, ce délai est d'environ deux jours contre 26h pour Boldrini et *al.*. Dans l'article du groupe de recherche du Dr Adle-Biassette, ce délai n'est pas indiqué dans 70% des tissus, rendant l'analyse impossible (Boldrini et al., 2018; Cipriani et al., 2018; Kempermann et al., 2018; Sorrells et al., 2018).

Pour revenir à la région d'intérêt, la zone sous-ventriculaire, il est important de noter que dans plusieurs de ces publications, les auteurs sont capables d'observer de rares neuroblastes dans leurs échantillons de SVZ humaine de patients adultes. Ainsi, les auteurs supportent la notion de production de nouveaux neurones dans cette région (Cipriani et al., 2018; Sorrells et al., 2018).

d) Fonctions de la neurogenèse de la zone sous-ventriculaire

Le rôle des nouveaux neurones produits dans la SVZ, que ce soit chez les murins ou les humains, reste controversé. Tel que mentionné précédemment, ces derniers s'intègrent dans les bulbes olfactifs ou dans le striatum afin de devenir fonctionnels. Cette différence de localisation finale rend l'étude de la fonctionnalité bien plus ardue.

(1) Chez les modèles murins

Chez les rongeurs, la neurogenèse adulte permet de produire de nouvelles cellules dans le bulbe olfactif. Bien qu'il y ait une arrivée constante de celles-ci, la taille de la structure n'est pas modulée en fonction de l'âge. Cette observation permet de dire qu'il n'y a pas addition, mais plutôt remplacement cellulaire, ce qui laisse fortement supposer le maintien d'une ou plusieurs fonctions olfactives (Mouret et al., 2008). L'olfaction est très développée chez les rongeurs puisqu'elle permet de trouver de la nourriture, de se reproduire ou de sentir le danger. Déterminer spécifiquement le rôle des nouveaux interneurons dans le bulbe reste difficile

puisque les NSC de la SVZ en produisent de nombreux types ayant des caractéristiques différentes.

Plusieurs publications portent sur le rôle de la neurogenèse adulte de la SVZ. Théoriquement, il est possible de définir la fonction des nouveaux interneurons en bloquant leur production. Cependant, de nombreux articles ne démontrent pas les mêmes conclusions. Ceci peut être expliqué par l'utilisation de différents modèles ou approches expérimentales pour l'étude du comportement, de leur durée, etc. La neurogenèse adulte peut être bloquée par l'irradiation (Lazarini et al., 2009), les drogues antimitotiques (Breton-Provencher et al., 2009) ou encore les modèles transgéniques (Imayoshi et al., 2008). L'utilisation de drogues antimitotique diminue les capacités à discriminer les odeurs de faibles concentrations ainsi que leur mémorisation à court terme alors que celle à long terme n'est pas modulée (Breton-Provencher et al., 2009). Dans les modèles transgéniques, il existe aussi une déficience dans la discrimination des odeurs (Bath et al., 2008; Gheusi et al., 2000). À l'opposé, d'autres publications ont démontré que l'abolition de la neurogenèse, par l'irradiation, ne modulait aucun de ces comportements à l'exception de la mémorisation à long terme (Lazarini et al., 2009).

Bien que l'ensemble des données ne soit pas toute en accord, la majorité s'accorde pour dire que le blocage de la neurogenèse de la SVZ, à long terme, induit une modification de la structure des bulbes olfactifs ainsi que des circuits neuronaux (Breton-Provencher et al., 2009; Imayoshi et al., 2008; Sakamoto et al., 2011). Ainsi, la neurogenèse adulte permet de produire de nouveaux interneurons qui possèdent un rôle olfactif, pouvant inclure la discrimination, l'apprentissage, la mémorisation des odeurs et les interactions sociales (Carlen et al., 2002; Lazarini and Lledo, 2011).

(2) Chez l'humain

Chez l'humain, le rôle de la neurogenèse adulte de la SVZ reste assez peu connu, en partie puisqu'il semble différent de celui des modèles murins, mais aussi puisqu'il est difficile à étudier directement chez l'Homme. Cependant, il est assez facile de supposer que la neurogenèse adulte de la SVZ chez l'humain ne soit pas impliquée dans la fonction olfactive. En effet, les cellules neuronales de cette structure ne sont pas remplacées ni additionnées. De plus, la fonction olfactive des humains est moins développée et ne possède pas une importance vitale. Ces différences majeures indiquent pourquoi le rôle de la neurogenèse chez l'Homme ne peut pas

être déduit de celui observé chez la souris. Sachant que les nouveaux neurones produits chez les humains migrent dans le striatum, le rôle de la neurogenèse pourrait être impliqué dans les fonctions de celui-ci telles que la motricité, la cognition, la dépendance et dans les mécanismes de récompense (Pessoa, 2017; Vink et al., 2005; Yager et al., 2015).

B. La régulation de la lignée neurale

1. Importance de la régulation des cellules souches neurales adultes

Les NSC adultes doivent produire une descendance tout au long de la vie de leur hôte. C'est pourquoi elles doivent être largement régulées et protégées, de façon à pouvoir traverser les mois et les années. Cette régulation est capitale puisqu'une quiescence excessive induit un manque de production cellulaire. À l'opposé, une suractivation mène à i) une surproduction de cellules qui n'est pas nécessaire au tissu (incluant les cancers) ou à ii) une perte des cellules souches à long terme, via leur épuisement. Afin de gérer cette balance, les NSC sont maintenues et protégées dans un micro-environnement, appelé niche, dans laquelle se retrouvent de nombreux signaux et structures (Schofield, 1978). Il est reconnu depuis de nombreuses années que les NSC et leurs descendances répondent aux changements de leur niche. Ces derniers sont induits par plusieurs structures capables de sécréter une multitude de molécules extrinsèques permettant un ajustement constant de l'environnement. Dans ces éléments régulateurs, on retrouve les fluides biologiques (liquide cérébro-spinal et sang), mais aussi les cellules souches elles-mêmes, les cellules adjacentes et, etc. Ceux-ci modulent la signalisation intrinsèque et/ou extrinsèque des NSC afin de déterminer leur comportement en fonction des besoins du tissu neural (prolifération, autorenouvellement, destin cellulaire, différenciation, survie, migration) (Fuchs et al., 2004; Morrison and Spradling, 2008; Suh et al., 2009; Walker et al., 2009). Ainsi, l'ensemble de cette régulation permet de faire la balance entre l'autorenouvellement des NSC, qui permet leur maintien et par conséquent celui de la neurogenèse tout au long de la vie, versus la production de nouvelles cellules.

2. Les structures majeures modulant la neurogenèse

a) Le système sanguin et la barrière hématoencéphalique

Plusieurs structures sont connues pour moduler la neurogenèse adulte. Parmi celles-ci, le système sanguin et la barrière hématoencéphalique (BHE) qui forment une barrière physiologique permettant de protéger le cerveau (Zlokovic, 2008). Ces structures sont particulièrement importantes pour la neurogenèse adulte puisqu'il a été démontré que l'ensemble de cellules prolifératives dans la SVZ se situe à proximité des vaisseaux (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Le système vasculaire agit sur la neurogenèse adulte comme le démontrent les expériences de parabiose, technique permettant de fusionner les vaisseaux sanguins de deux animaux pour n'obtenir plus qu'un unique système. Il a été démontré que la parabiose d'une souris jeune avec une autre âgée permet d'augmenter la prolifération cellulaire dans la SVZ et la production de nouveaux neurones chez la souris âgée au détriment de la plus jeune (Katsimpardi et al., 2014).

b) Les astrocytes

Ces cellules gliales gèrent l'apport des molécules des vaisseaux sanguins au milieu neural et sont donc capables de moduler la neurogenèse adulte via la gestion des facteurs (Barres, 2008; Saunders et al., 2013; Siegenthaler et al., 2013). Il a été démontré que les astrocytes augmentaient la prolifération des NSC et des progéniteurs *in vitro* ainsi que leur différenciation en neurones (Lim and Alvarez-Buylla, 1999).

c) Les microglies

Les microglies sont aussi des cellules gliales, ce sont les macrophages du système nerveux central, soit les cellules immunitaires (Lawson et al., 1992). Lors de la neurogenèse adulte, les microglies jouent un rôle prépondérant dans l'élimination des cellules. Bien que de nombreux neuroblastes soient produits, peu se rendent jusqu'à l'étape finale : devenir des neurones fonctionnels. Il a été démontré que lors de la neurogenèse hippocampale, les microglies permettent l'élimination des neuroblastes (Ribak et al., 2009; Sierra et al., 2010).

d) Le liquide cérébro-spinal et plexus choroïde

Le liquide cérébro-spinal (LCS) est le liquide biologique, contenu dans les méninges, présent autour et dans le système nerveux central. Il est produit par les plexus choroïdes, qui sont des structures dans les ventricules du cerveau (latéraux, 3^{ème} et 4^{ème} ventricule) (Bjornsson et al., 2015; Redzic et al., 2005). Celui-ci regorge de facteurs extrinsèques, capables de moduler la neurogenèse adulte. Il a été démontré que le plexus choroïde est suffisant à lui seul pour permettre la croissance de neurosphères *in vitro* sans ajout d'autres facteurs tel qu'EGF (Silva-Vargas et al., 2016).

e) Les cellules épendymaires

Les cellules épendymaires forment la barrière physique entre le tissu neural et le LCS. Elles possèdent de longs cils moteurs responsables de la circulation du LCS. Ce flux permet de créer des gradients de chimiotactisme répulsif gouvernant la migration des neuroblastes de la SVZ aux bulbes olfactifs (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004; Sawamoto et al., 2006). De plus, les cellules épendymaires sécrètent plusieurs facteurs de croissance connus pour moduler l'activité des cellules souches telle que Noggin, qui sera mentionné dans la section suivante (Lim et al., 2000). Il a été proposé que les cellules épendymaires soient les cellules souches neurales adultes du ventricule latéral (Coskun et al., 2008; Johansson et al., 1999). Ce point sera discuté dans le paragraphe dédié à l'identité des NSC.

3. Les facteurs extrinsèques et voies de signalisation modulant la neurogenèse adulte

Les différentes structures mentionnées précédemment sont capables de moduler la neurogenèse adulte. Pour cela, elles apportent et diffusent des molécules qui sont des facteurs neurotrophiques (ou extrinsèques ou encore de croissance). Depuis plusieurs années, l'hypothèse de la régulation des NSC est bâtie sur la présence de signaux extrinsèques et environnementaux modulant leurs voies de signalisation (Gage, 2000; Mudo et al., 2009). La

signalisation extrinsèque est réalisée par la liaison de ligands à leurs récepteurs à la surface des cellules. Celle-ci va induire une cascade d'évènements intracellulaires, via les voies de signalisation, et permettre de nombreuses modifications telles que l'expression d'un ou plusieurs gènes. Ces derniers peuvent induire de nombreux changements, dans le métabolisme énergétique, la ribogenèse ou la lipogenèse, et mener à un comportement cellulaire comme la prolifération, la différenciation, la migration ou la mort (Llorens-Bobadilla et al., 2015).

Dans les paragraphes suivants, il est possible que les articles cités démontrent des résultats différents. Ceci peut être expliqué par différentes raisons : premièrement, les études ne sont pas menées avec les mêmes protocoles. L'*in vitro* peut générer des conclusions qui ne sont pas applicables à l'*in vivo*. De même, les différences d'espèces ou de modèles transgéniques peuvent induire des variations. Ensuite, la concentration des facteurs utilisée est un élément décisif sur l'effet obtenu. Enfin, le ou les types cellulaires étudiés peuvent varier selon les articles.

Le nombre de facteurs extrinsèques connus pour avoir un effet sur la neurogenèse est important. En effet, parmi ceux-ci, on retrouve certes les facteurs neurotrophiques, mais aussi les hormones et les neurotransmetteurs. Ainsi, de nombreuses molécules ne seront pas citées, telles que Notch, Shh (*Sonic Hedgehog*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*), BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), etc (Lim and Alvarez-Buylla, 2016).

a) Epidermal Growth Factor (EGF)

EGF (*Epidermal Growth Factor*) est un des facteurs clefs de la neurogenèse. Il est largement reconnu pour son fort potentiel mitotique, mais aussi pour ses fonctions dans la survie et la différenciation des cellules de mammifères. Ce fut un des premiers facteurs impliqués dans la neurogenèse adulte puisque Reynold et Weiss ont pu isoler les NSC *in vitro* grâce à ce dernier (Reynolds and Weiss, 1992).

Que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, la liaison d'EGF sur son récepteur tyrosine kinase présent à la surface cellulaire des NSC et des progéniteurs permet la modulation de plusieurs voies de signalisation telles que les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), les STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), les NFkB (*Nuclear Factor-Kappa B*) et mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin* ou encore *Mechanistic Target Of Rapamycin*) (Magri et al.,

2011; Oda et al., 2005; Paliouras et al., 2012). De façon très schématique, cette liaison permet l'activation en cascade de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) suivie de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) ce qui provoque la phosphorylation d'Akt (protéine kinase B ou encore PKB). Sous cette forme, elle inhibe le complexe TSC1/TSC2 (*Tuberous Sclerosis Protein*) qui naturellement bloque RHEB (*Ras Homolog Enriched in Brain*). Cette double inhibition permet au complexe mTORC1 de se constituer avec les protéines PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*), mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*), Deptor (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) et Raptor (*Regulatory-associated protein of mTOR*). Ce complexe va permettre la production de protéines via la phosphorylation des voies de S6 (ou rpS6 pour *Ribosomal protein 6*) et 4EBP1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*). Le complexe mTORC2 est composé des éléments protéiques mLST8, mSin 1 (*mammalian SAPK interacting protein 1*), Deptor, Rictor (*rapamycin insensitive companion of mTOR*) et Protor (*protein observed with RICTOR*). Celui-ci est capable de phosphoryler Akt et donc de favoriser à terme la formation de mTORC1 (Kennedy and Lamming, 2016; Oda et al., 2005).

Bien qu'il ne soit pas clair si les précurseurs sécrètent EGF, il a été démontré que son récepteur (EGFR) est présent sur les cellules en prolifération dans la SVZ soit les NSC actives et les progéniteurs (Codega et al., 2014; Doetsch et al., 2002; Lim and Alvarez-Buylla, 2016; Pastrana et al., 2009; Sun et al., 2005; Vescovi et al., 1993). Plusieurs groupes ont utilisé les infusions d'EGF pour étudier son rôle sur la neurogenèse et ont démontré qu'il induisait une augmentation de la prolifération, du nombre de NSC et de la migration des neuroblastes dans la SVZ (Aguirre and Gallo, 2007; Aguirre et al., 2005; Craig et al., 1996; Doetsch et al., 2002; Gonzalez-Perez et al., 2009; Paliouras et al., 2012). Dans le cerveau adulte, le ligand principal d'EGFR n'est pas EGF mais TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*), un membre de la même famille. Il est produit par les astrocytes et est particulièrement important pour la prolifération des précurseurs neuraux. Son infusion induit une forte augmentation du nombre de cellules en division (Craig et al., 1996; Mudo et al., 2009). De plus, il a été démontré que chez des souris transgéniques, ne possédant pas de TGF- α , la prolifération dans la SVZ est affaiblie induisant une diminution du nombre de neuroblastes. Cependant, quand le striatum de ces souris est mis en culture en présence d'EGF, le nombre de neurosphères formées est similaire à celui des souris de type sauvage (Tropepe et al., 1997).

b) Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Les BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) sont une classe de cytokines appartenant à la famille des TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*). Ils ont été découverts dans les années 1960 pour induire la formation des os et du cartilage (Urist, 1965). À ce jour, les BMP sont largement connus pour leur implication sur le système nerveux central. En effet, lors du développement, ces cytokines jouent une fonction majeure pour la mise en place de l'axe dorso-ventral. Les BMP sont intégrés via la voie de signalisation des SMAD (Bandyopadhyay et al., 2013; Bond et al., 2012).

Bien qu'il existe une vingtaine de BMP, les plus fréquemment utilisés pour l'étude de la neurogenèse adulte sont BMP2, 4 et 7. Leur mécanisme d'intégration est similaire et est composé de deux types de récepteurs, I et II, qui sont des sérines/thréonines kinases. Il a été démontré que les ligands BMP sont capables de lier trois types de BMPRI, à savoir BMPRI-IA (ou ALK-3), BMPRI-IB (ou ALK-6) et ActR-IA (ALK-2), et ainsi que les trois types II : BMPRII, ActR-II et ActR-IIB. La liaison de BMP au récepteur de type II va induire la phosphorylation du récepteur de type I, ayant pour conséquence la phosphorylation de SMAD1/5/8. Ces derniers vont former un hétérodimère avec SMAD4 afin de pouvoir migrer au noyau et réguler la transcription de plusieurs gènes (Bandyopadhyay et al., 2013).

Dans la SVZ, les NSC et les progéniteurs expriment les BMP et leurs récepteurs. De plus, ces ligands sont retrouvés dans le LCS (Lim and Alvarez-Buylla, 2016; Lim et al., 2000; Peretto et al., 2004). Il a été démontré que BMP induit la production d'astrocytes en limitant celle des neurones et oligodendrocytes (Bond et al., 2012; Colak et al., 2008; Lim and Alvarez-Buylla, 2016; Lim et al., 2000; Morell et al., 2014; Peretto et al., 2004). L'inhibition de BMP via Noggin, qui est sécrété par les cellules épendymaires, augmente la neurogenèse, impliquant ce facteur dans la quiescence des précurseurs neuraux et/ou leur différenciation (Bond et al., 2012; Lim and Alvarez-Buylla, 2016). De plus, il a été démontré que l'infusion de Noggin induit une augmentation de l'oligodendrogenèse (Colak et al., 2008). La délétion de Smad4 dans les cellules GLAST (*Glutamate ASpartate Transporter*) positives (soit les NSC et les astrocytes), induit une diminution de la neurogenèse (Colak et al., 2008).

4. La modulation de la neurogenèse adulte lors du vieillissement et de pathologies

La dérégulation de la neurogenèse adulte est observée dans de nombreuses pathologies, bien qu'il ne soit pas toujours évident si elle en est la cause ou la conséquence. Dans les maladies les mieux étudiées, les désordres psychologiques et les stress post-traumatiques sont reconnus pour avoir une neurogenèse hippocampale diminuée chez les murins (Bergmann and Frisen, 2013; Kheirbek et al., 2012; Santarelli et al., 2003). Dans ce chapitre, seulement deux cas seront étudiés : le vieillissement et la maladie d'Alzheimer.

a) Le vieillissement

Lors du vieillissement, le maintien des tissus et leur régénération par les cellules souches sont diminués dans l'ensemble du corps. Il en est de même pour la neurogenèse adulte, puisqu'il est observé une diminution fonctionnelle dans l'ensemble des zones neurogéniques en fonction de l'âge, qui peut être observée après quelques mois chez la souris et quelques années chez l'Homme (Apple et al., 2017; Chaker et al., 2016; Hamilton et al., 2013; Sanai et al., 2011; Sorrells et al., 2018). Plusieurs hypothèses ont été énoncées afin de comprendre les raisons pour lesquelles la neurogenèse adulte est réduite lors du vieillissement. Parmi celles-ci, il existe trois grands axes, avec la diminution i) du nombre de NSC, ii) de leur capacité de division/amplification, et enfin iii) la modification de leur environnement local et systémique (Apple et al., 2017; Giachino et al., 2014; Hamilton et al., 2013). Dans l'objectif de détailler ceux-ci, de nombreuses études ont été menées sur le vieillissement mais les résultats obtenus ne sont pas toujours cohérents dû à des méthodes d'analyses différentes mais surtout aux différences d'âge utilisées pour les études, allant de 6 à 22 mois (Hamilton et al., 2013).

(1) Au niveau structurel

La SVZ subit des modifications morphologiques lors du vieillissement. Premièrement, la diminution du nombre de cellules prolifératives va induire un affinement de la structure (Luo et al., 2006). Deuxièmement, les parois des ventricules latéraux vont fusionner : dans ces zones, la neurogenèse adulte est presque absente. Ceci induit une diminution de la taille de la niche de plus de 89% entre 3 et 24 mois (Luo et al., 2006; Shook et al., 2012). Enfin, le trajet migratoire

rostral présente un diamètre plus faible lors du vieillissement pouvant être la conséquence d'un nombre de neuroblastes en migration plus petits (Luo et al., 2006).

(2) *Au niveau cellulaire*

Lors du vieillissement, le nombre de cellules totales en prolifération va diminuer de plus de 50% (Ahlenius et al., 2009; Apple et al., 2017; Enwere et al., 2004; Hamilton et al., 2013; Luo et al., 2006; Maslov et al., 2004; Tropepe et al., 1997). En conséquence, le nombre de neuroblastes produit diminue de plus de 40% (Ahlenius et al., 2009; Enwere et al., 2004; Hamilton et al., 2013). Entre 3 et 24 mois, il a été reporté que le nombre de *pinwheels*/mm² diminue de 78% et que le nombre d'astrocytes au contact du LCS chute de 86%. Cependant, il est toujours possible d'observer des NSC en prolifération (Capilla-Gonzalez et al., 2014). Bien que le nombre de NSC et de *pinwheels* diminue lors du vieillissement, le nombre de NSC en prolifération reste similaire (Shook et al., 2012).

Certains groupes ont utilisé la mise en culture pour observer la capacité de formation des neurosphères lors du vieillissement. Certains reportent que le nombre de neurosphères formées, à partir de la SVZ de souris jeunes ou âgées, est similaire (Bouab et al., 2011; Tropepe et al., 1997) alors que d'autres démontrent une diminution supérieure à 20% (Ahlenius et al., 2009; Enwere et al., 2004; Hamilton et al., 2013; Maslov et al., 2004). De plus, il a été démontré que le temps de division d'une NSC va être augmenté, via l'allongement de la durée de la phase G1 (Daynac et al., 2016; Daynac et al., 2014; Luo et al., 2006). Enfin, il est important de noter que la production des différentes sous-populations d'interneurones est conservée lors du vieillissement, puisque les ratios entre celles-ci restent respectés chez les souris âgées (Shook et al., 2012).

La régulation des NSC par leur environnement est aussi modulée lors du vieillissement. En effet, il a été démontré que les cellules présentes dans la niche subissent des changements tels que les microglies qui deviennent plus activées, probablement dû à une augmentation de l'inflammation environnante (Capilla-Gonzalez et al., 2014). Cela induit un changement dans les molécules qu'elles sécrètent à proximité des NSC, ce qui module la neurogenèse adulte (Michell-Robinson et al., 2015). De plus, le système vasculaire est aussi modifié avec le vieillissement : la densité vasculaire ainsi que le débit sanguin sont plus faibles chez les modèles âgés (Katsimpardi et al., 2014). Bien d'autres changements apparaissent et modifient

l'environnement de la niche lors du vieillissement tels que l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les murs des ventricules ou encore la modification de la composition du LCS (Baird et al., 2012; Bouab et al., 2011).

(3) *Réactivation de la neurogenèse adulte lors du vieillissement*

L'ensemble des événements cités ci-dessus induit une diminution du nombre d'interneurones qui s'intègre dans les bulbes olfactifs induisant un déficit olfactif (Enwere et al., 2004; Rochefort et al., 2002). Cependant, plusieurs études ont démontré qu'il était possible de réactiver la neurogenèse adulte par différentes techniques. Premièrement, l'infusion de molécules, telles qu'EGF, chez les souris âgées peut permettre d'augmenter la prolifération dans la SVZ (Paliouras et al., 2012). Deuxièmement, les expériences de parabioses, permettant de fusionner la circulation sanguine d'une souris jeune avec une plus âgée, démontrent que chez les souris âgées, il y a une amélioration de la neurogenèse. La parabiose permet aussi d'observer une amélioration de la densité vasculaire et du débit sanguin chez la souris âgée. Ces données démontrent que les changements de la neurogenèse, lors du vieillissement, sont la conséquence d'un appauvrissement du système vasculaire (Katsimpardi et al., 2014). Ces données supportent donc l'idée que la niche subit une dérégulation dans la sécrétion et l'apport des facteurs neurotrophiques, induisant un affaiblissement du soutien de l'activité mitotique. De plus, elles démontrent que les NSC présentes dans la SVZ sont capables de répondre au changement de leur environnement, suggérant une quiescence plus importante lors du vieillissement.

Pour conclure, la neurogenèse adulte de la SVZ est diminuée lors du vieillissement. Cet affaiblissement semble être la conséquence de la diminution du nombre de NSC et de la modification de leur niche au niveau local et systémique.

b) La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est la principale cause de démence. Elle a été découverte, dans les années 1900, par le Dr Alois Alzheimer. À ce jour, elle touche des millions de personnes à travers le monde et est la maladie neurodégénérative la plus coûteuse malgré l'absence de traitement (Alzheimer, 1907; Ballard et al., 2011). Bien que la MA ait été découverte il y a plus de 100 ans, elle reste une pathologie incomprise et fait encore l'objet de nombreuses recherches :

les données accumulées sur ce domaine sont donc considérables. Dans ce paragraphe, la MA sera survolée et décrite pour ses effets sur la neurogenèse adulte. Il est important de noter que plusieurs maladies neurodégénératives, autre que la MA, ont un impact sur la neurogenèse adulte telles que Parkinson, Huntington, les accidents vasculaires cérébraux, etc (Faiz et al., 2015; Hamilton and Fernandes, 2018; Winner and Winkler, 2015).

(1) *Pathologie*

La MA a été décrite en 1905 par cinq signes pathologiques dans le cerveau : les enchevêtrements neurofibrillaires, les dépôts d'amyloïdes, des vaisseaux sanguins anormaux, une gliose et une accumulation de lipide. Les enchevêtrements neurofibrillaires sont des agrégats de protéines Tau hyperphosphorylées présents dans le cytoplasme des cellules. Celle-ci est, une protéine associée aux microtubules, reconnue pour être impliquée dans d'autres démences : les tauopathies. Les dépôts d'amyloïdes sont aussi des agrégats mais constitués de protéines bêta-amyloïde ($A\beta$) et extracellulaires. Ils sont formés par les peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ issus du clivage de la protéine transmembranaire APP (protéine précurseur de l'amyloïde) par la γ -sécrétase (Selkoe and Wolfe, 2000). La gliose est induite par une activité plus importante des cellules gliales et enfin l'accumulation de lipide est retrouvée dans les cellules non neuronales (Alzheimer, 1907; Hamilton et al., 2015; Lazarov and Marr, 2010; Lazarov et al., 2010).

La MA existe sous deux formes : sporadique et familiale. Dans le premier cas, elle se déclare après 60 ans alors que dans le second, elle est plus précoce. Les cas familiaux ne représentent que 5% des personnes souffrant de la MA. Dans cette population, il existe des mutations dans les gènes *APP* (*amyloid precursor protein*), *PS1* (*presenilin 1*) et *PS2* (*presenilin 2*) (Ballard et al., 2011).

(2) *Maladie d'Alzheimer et neurogenèse adulte*

La MA peut être associée à la neurogenèse adulte par deux arguments principaux. Premièrement, c'est une maladie associée au vieillissement, associé avec le déclin de la neurogenèse adulte. Secondement, la neurogenèse est impliquée dans les mécanismes d'apprentissage, de mémorisation et de cognition. Ceux-ci sont modulés dans la MA, suggérant fortement un lien entre cette pathologie et la production de nouveaux neurones (Alzheimer,

1907; Hamilton et al., 2010; Hamilton and Fernandes, 2018; Lazarov and Marr, 2010; Lazarov et al., 2010; Rosen et al., 1984). De plus, il a été reporté que l'accumulation de Tau dans les bulbes olfactifs corrèle avec les différentes étapes de la maladie (Attems and Jellinger, 2006).

De nombreux modèles transgéniques permettent l'étude de la MA. Parmi ceux-ci, les gènes retrouvés dans les cas familiaux, à savoir : APP, PS1 et PS2 mais aussi tau, sont mutés ou ajoutés de façon unique ou en combinaison (Hamilton and Fernandes, 2018). Ces différents modèles ont permis de démontrer que l'accumulation du peptide A β est en amont et responsable de la formation des agrégats de Tau (Gotz et al., 2001; Oddo et al., 2003). Puisqu'il existe différentes mutations pour chaque gène, les résultats obtenus dans les études ne sont pas toujours cohérents entre eux. De plus, la pathologie n'apparaît et n'évolue pas à la même vitesse.

Il a été démontré que le peptide A β ₁₋₄₂ permet d'augmenter le nombre et la taille des neurosphères ainsi que la neurogenèse *in vitro*. Cependant, cet effet est dépendant de la concentration utilisée puisqu'une grande quantité de peptides induit les effets opposés (Heo et al., 2007; Sotthibundhu et al., 2009). Les souris transgéniques présentant une mutation d'APP démontrent une augmentation du nombre de cellules en prolifération dans la SVZ (Jin et al., 2004a). À l'opposé, les souris doubles transgéniques pour APP et PS1 ne démontrent aucun changement dans le nombre de cellules en prolifération dans la SVZ (Demars et al., 2010; Niidome et al., 2008).

L'utilisation des souris triples transgéniques (3xTg), présentant des mutations sur APP, PS1 et Tau, permet de retrouver les cinq pathologies décrites par le Dr Alzheimer ainsi que les signes cliniques (Hamilton and Fernandes, 2018). Dans ces souris, le nombre de cellules en prolifération dans la SVZ diminue avant l'apparition des premiers symptômes cliniques et pathologiques (Hamilton et al., 2010; Hamilton et al., 2015; Rodriguez et al., 2008; Rodriguez et al., 2009). Il a été démontré qu'à 2 mois, les souris 3xTg ont une diminution du nombre de cellules Ki67+ total, Ki67+GFAP+ et Ki67+DCX+, représentant les cellules totales, les NSC et les neuroblastes en division respectivement. De plus, le modèle transgénique présente une accumulation de lipide dans les cellules épendymaires. Ces gouttelettes lipidiques sont enrichies en acide oléique (AO). Ce dernier est capable de diminuer le nombre de neurosphères produites *in vitro*, ainsi que leur prolifération et leur autorenouvellement. *In vivo*, la présence d'AO diminue la capacité de régénération de la SVZ à la suite d'un traitement antimitotique. De façon inattendue, l'inhibition de SCD-1 (*Stearoyl-CoA* desaturase), l'enzyme responsable de la

production de l'AO, permet d'augmenter le nombre de cellules Ki67+ total, Ki67+GFAP+ et Ki67+DCX+, soit l'ensemble des populations cellulaires qui sont régulées à la baisse dans ce modèle de la MA (Hamilton et al., 2015).

Chez l'Homme, l'étude de la neurogenèse lors de la MA indique des résultats variables. En effet, certains ont démontré une augmentation des marqueurs de neurones immatures alors que d'autres indiquent une diminution (Boekhoorn et al., 2006; Crews et al., 2010; Jin et al., 2004b; Perry et al., 2012; Ziabreva et al., 2006). Il est important de noter que l'accumulation de gouttelettes lipidiques est retrouvée dans les cellules épendymaires de patients souffrant de cette maladie (Hamilton et al., 2010).

Ainsi, plusieurs études démontrent que la neurogenèse est modulée dans les modèles animaux reflétant la MA dans la SVZ et mais aussi dans le gyrus dentelé (Hamilton et al., 2010; Lazarov and Marr, 2010; Lazarov et al., 2010). Bien que les résultats obtenus à partir de l'ensemble des modèles transgéniques ne permettent pas toujours de dresser un tableau clair de l'effet de chaque gène ou combinaison de gènes sur la neurogenèse adulte, il est possible de noter des effets indiquant que les mutations retrouvées dans la MA sont capables de moduler le comportement des NSC. La poursuite de ces études est particulièrement importante puisqu'elles pourront peut-être permettre un jour d'utiliser les NSC comme outil de régénération ou de prévention de la MA.

C. Les techniques d'étude de la neurogenèse adulte

Dans de nombreux tissus, l'étude des cellules souches reste ardue puisque leur identification est difficile. Dans cette section, les principales approches permettant l'étude de la biologie des NSC seront développées.

1. Les marqueurs cellulaires de la lignée neuronale

Plusieurs marqueurs ont été cités dans les paragraphes précédents afin d'identifier les différentes populations qui composent la lignée neurale. Cependant, il existe une difficulté majeure, puisqu'à ce jour, il n'existe aucun marqueur spécifique pour chacune d'entre elles. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser des combinaisons afin de distinguer les NSC (aNSC et qNSC),

des progéniteurs ou des autres types cellulaires présents dans la SVZ. La figure 2 présente les principaux marqueurs utilisés pour l'étude de la lignée neurale de la SVZ (Beckervordersandforth et al., 2010; Capela and Temple, 2002; Codega et al., 2014; Giachino et al., 2014; Mamber et al., 2013; Mich et al., 2014).

Certains des marqueurs cités précédemment sont connus depuis de nombreuses années. Par exemple, EGFR est reconnu pour être présent dans une population de cellules capables de se diviser dans la SVZ et peut colocaliser avec Nestin (Morshead et al., 1994). De même, il a été démontré que certaines cellules peuvent être GFAP et Nestin positives et avoir la capacité de division (Doetsch et al., 1997). Ces premiers marqueurs, utilisés depuis plus de 20 ans, ont permis de nombreuses avancées dans l'étude des NSC. De nos jours, ils sont toujours utilisés et restent une référence. Cependant, les avancées technologiques permettent de combiner de plus en plus de marqueurs. C'est ainsi qu'ils sont comparés révélant de nouvelles sous-populations cellulaires. D'autres marqueurs présentés dans la figure 2 sont bien plus récents : par exemple, Oct4 n'est apparu qu'en 2014 en même temps que la découverte des NSC primitives (Sachewsky et al., 2014).

L'utilisation du FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) est de plus en plus présente dans l'étude de la biologie des NSC. Cette technique permet de trier plusieurs dizaines de marqueurs, ce qui représente un réel atout en l'absence de marqueur spécifique. Plusieurs groupes ont associé le FACS avec des analyses de séquençage de l'ARN (acide ribonucléique) et proposent de nouveaux marqueurs pour l'étude des NSC et de leur descendance. Bien que la plupart ne soient pas encore validés dans des publications, ils deviendront peut-être de futurs épitopes clefs (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mich et al., 2014). De plus, ces analyses ont permis d'éliminer certaines erreurs faites sur les marqueurs dans le passé. En effet, FoxJ1, que l'on pensait être un marqueur de cellule épandymaire seulement, s'est révélé être exprimé dans les NSC (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014).

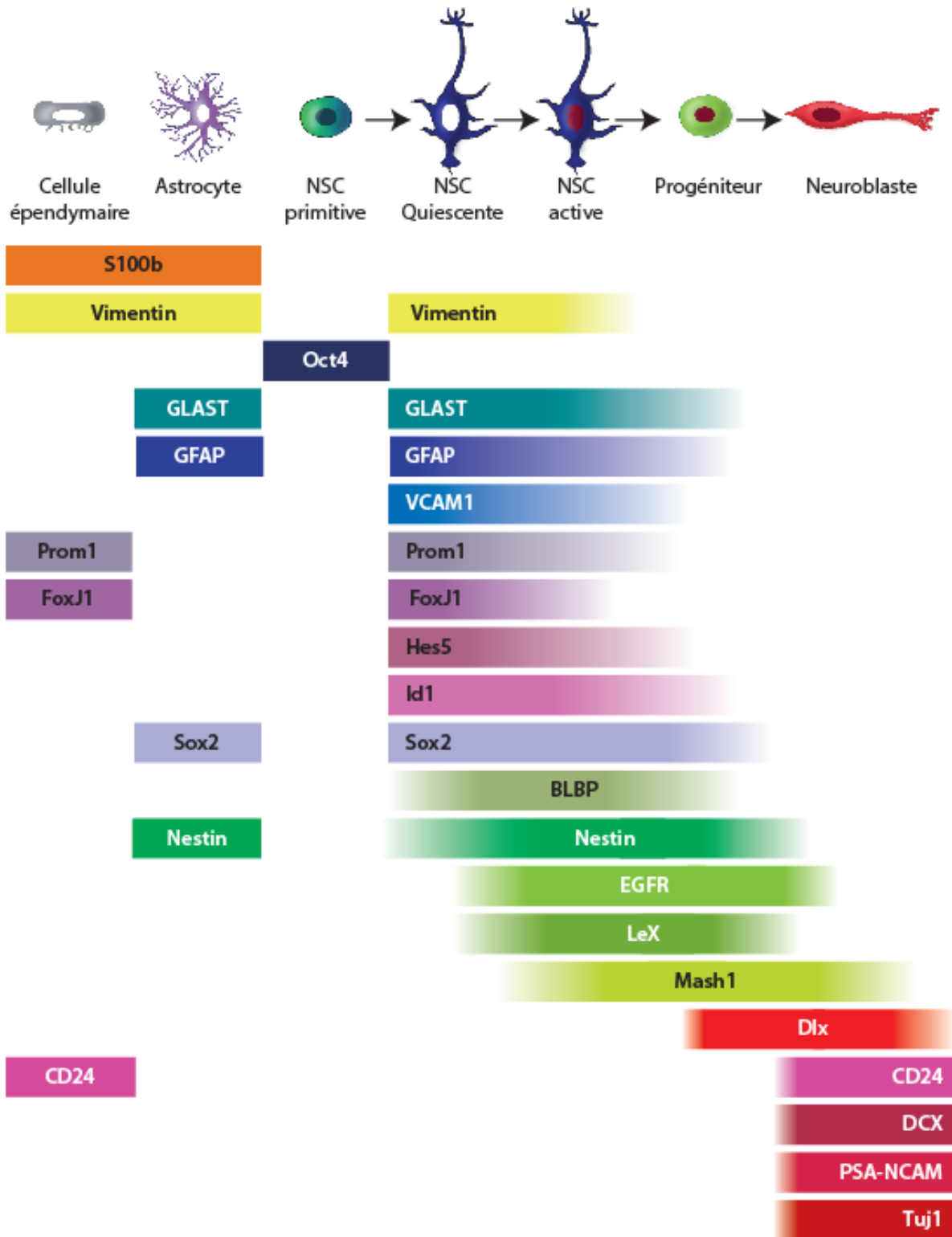


Figure 2 : Marqueurs de la lignée neurale dans la SVZ.

(Légende Figure 2 sur la page suivante)

Légende Figure 2 :

Les différents marqueurs utilisés pour l'étude des NSC et de leur descendance démontrent une continuité entre les différentes populations cellulaires. La majorité d'entre eux ne sont pas spécifiques mais sont régulés à la hausse ou à la baisse lors de la progression cellulaire. Il est important de noter que de nombreux marqueurs utilisés pour définir les NSC sont aussi exprimés dans les cellules épendymaires ou les astrocytes. De plus, la séparation entre les qNSC et les aNSC reste très compliquée due à l'absence de marqueurs spécifiques définis. Abréviations : Oct4 : *octamer-binding transcription factor 4* ; GLAST : *glutamate aspartate transporter* (Slcla3) ; GFAP : *Glial fibrillary acidic protein* ; VCAM1 : *Vascular cell adhesion molecule 1* (CD106) ; Prom1 : *Prominin-1* (CD133) ; FoxJ1 : *Forkhead box protein J1* ; Id1 : *Inhibitor of DNA binding 1* ; Sox2 : *Sex determining region Y-box 2* ; BLBP : *Brain lipid-binding protein* ; EGFR : *Epidermal Growth Factor receptor* ; LeX : *Lewis X* (ssea1) ; Mash1 : ; Dlx : *Distal-less homeobox* ; CD24 : *cluster of differentiation 24* ; DCX : *Doublecortin* ; PSA-NCAM : *Polysialylated-neural cell adhesion molecule* ; Tuj1 : *Neuron-specific class III beta-tubulin*. (Beckervordersandforth et al., 2010; Capela and Temple, 2002; Codega et al., 2014; Giachino et al., 2014; Mamber et al., 2013; Mich et al., 2014). Image produite par Sandra Joppé et Loïc Cochard.

2. Les techniques d'étude de la biologie des cellules souches neurales adultes

a) La culture de précurseurs neurales : *l'in vitro*

La première technique qui a permis l'étude des NSC a été la culture cellulaire. En 1992, Reynolds et Weiss ont mis en culture un striatum en présence d'EGF. Une sous-population de cellules a été capable de proliférer et de former des colonies flottantes qu'ils ont appelées neurosphères. Ces dernières peuvent être dissociées en cellules individuelles et remisent en culture : de nouvelles neurosphères reviennent, démontrant leur capacité d'autorenouvellement. De plus, lorsqu'elles sont placées dans des conditions de différenciation, elles produisent les trois types neurales : des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes, démontrant leur multipotentialité (Reynolds and Weiss, 1992, 1996; Vescovi et al., 1993). Plus de 25 ans après leur découverte, elles restent encore largement utilisées, avec un protocole assez peu modifié. En effet, elles permettent d'amplifier les précurseurs neurales et d'étudier de nombreuses molécules sur leur comportement. L'avantage principal est que les cellules sont dans un environnement maîtrisé, sans l'influence des facteurs présents dans la niche, permettant une bonne reproductibilité. Cependant, il est aussi important de noter que l'ensemble des résultats obtenus *in vitro* ne sont pas toujours similaires. En effet, des différences dans les protocoles,

telles que la densité cellulaire, les facteurs présents et leurs concentrations ainsi que le nombre de passages peuvent faire varier les résultats (Hack et al., 2004; Jensen and Parmar, 2006).

L'inconvénient majeur de la mise en culture des précurseurs est qu'elle ne permet pas la purification des NSC. En effet, les cultures primaires sont composées des nombreux types cellulaires présents dans la SVZ, tels que les neurones, les cellules sanguines, endothéliales, épendymaires, et, etc., capables de sécréter des facteurs extrinsèques. De plus, les neurosphères ne sont pas composées d'un seul type cellulaire mais sont hétérogènes. Dans celles-ci seulement quelques cellules sont capables de produire à nouveau des neurosphères et donc répondent aux critères de NSC. Chaque colonie est composée de cellules à plusieurs stades de différenciation, dont les NSC, les progéniteurs, les neuroblastes, les neurones et les cellules gliales (Jensen and Parmar, 2006; Reynolds and Weiss, 1992, 1996; Suslov et al., 2002).

Cette approche s'est heurtée à une question majeure : quel type cellulaire initie la formation des neurosphères ? En 1994, un article démontre que l'injection de fortes doses de ³H-thymidine, afin de tuer les cellules en prolifération, ne module pas le nombre de neurosphères produites. Cependant, l'ajout d'une seconde ronde d'injection diminue le nombre de neurosphères de 50%. Les auteurs en déduisent que les cellules hautement mitotiques (soit les progéniteurs) ne sont pas responsables de la formation des colonies flottantes, mais que ces dernières sont dues à une population en amont : les NSC (Morshead et al., 1994). En 1999, Doetsch injecte dans le ventricule latéral de souris, un adénovirus GFAP-GFP (protéine fluorescente verte), permettant la production de la protéine GFP dans les cellules exprimant GFAP (soit les astrocytes et les NSC, voir figure 2). Lorsqu'elle met en culture la SVZ de ces souris, elle obtient 9 à 14,3% de neurosphères GFP+, impliquant que les cellules GFAP positives forment des neurosphères (Doetsch et al., 1999a). Ces données sont confirmées grâce à une approche utilisant les souris transgéniques GFAP-TK (*Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase*), permettant de tuer les cellules GFAP+ en prolifération en présence de GCV (*Ganciclovir*). La mise en culture de la SVZ de ces souris en présence de GCV ne permet la formation que de rares neurosphères (Imura et al., 2003). Ces résultats impliquent donc les cellules de type astrocytaire dans la production des colonies flottantes.

Peu après, Doetsch publie un second article où elle démontre que ce sont les cellules fortement mitotiques qui forment les neurosphères. Pour cela, elle injecte de la ³H-Thymidine dans des souris avant de les mettre en culture. Elle indique que 43% des colonies formées sont

détectées comme étant ^3H -Thymidine positives. Ces résultats sont confirmés par une seconde approche, lors de laquelle, les cellules mitotiques sont tuées avec une infusion d'Ara-C (*Cytosine β -D-arabino-furanoside*). À la fin du traitement, les progéniteurs et les neuroblastes sont absents de la SVZ et la culture de cette région ne permet la production que de très peu de neurosphères. En revanche, 3 jours après la fin de l'infusion, quand les progéniteurs sont à nouveau présents dans la SVZ, le nombre de neurosphères formées redevient similaire au contrôle (Doetsch et al., 2002). Ces données peuvent être interprétées de deux manières : soit ce sont les progéniteurs qui sont responsables de la formation des colonies, soit ce sont les NSC présentes dans le cycle cellulaire. Pour répondre à cette question, l'auteur démontre que l'élimination des progéniteurs via le promoteur *Dlx2* induit une diminution de 60% dans la formation des neurosphères. De plus, elle a utilisé une approche par FACS pour mettre uniquement les progéniteurs en culture : 1 progéniteur sur 7 est capable de former une neurosphère contre 1 cellule sur 370 pour la SVZ (Doetsch et al., 2002). Les auteurs vont donc à l'encontre de l'article de Morshead, puisqu'ils indiquent que la majorité des colonies sont produites par les progéniteurs, cellules fortement mitotiques, bien qu'ils acceptent qu'une petite fraction puisse être dérivée des aNSC.

Enfin, une autre étude utilise le FACS pour étudier les types cellulaires capables de former les neurosphères. Pour cela, les auteurs utilisent les souris transgéniques *GFAP::GFP* dans lesquelles les astrocytes et les NSC sont GFP+. La cytométrie de flux leur permet d'obtenir plusieurs populations dont les GFP+EGFR- (qNSC), les GFP+EGFR+ (aNSC) et les GFP-EGFR+ (progéniteurs). Cet article indique que 30% des neurosphères formées proviennent des cellules GFP+EGFR+ contre 10% pour les GFP-EGFR+. Les auteurs en concluent que les aNSC et les progéniteurs sont capables de former les neurosphères *in vitro* (Pastrana et al., 2009). Cette étude est soutenue par un second article qui utilise une approche similaire mais avec d'autres marqueurs. Dans celle-ci, les auteurs se servent des protéines membranaires GLAST, EGFR, PlexinB2, CD24, O4, PSA-NCAM, Ter119 et CD45. Ils démontrent que les cellules qu'ils appellent GPCOT (GLAST+ EGFR+ PlexinB2+ CD24- O4- PSA-NCAM- Ter119- et CD45-) sont responsables de la formation des neurosphères puisque 36% d'entre elles forment des colonies flottantes (Mich et al., 2014).

L'ensemble de ces études ne sont pas en parfaite cohérence. Cependant, comme il a été mentionné dans le paragraphe précédent, les marqueurs cellulaires se chevauchent dans la lignée

neurale. Ainsi, il ne peut pas être exclu que dans les souris transgéniques les protéines en aval du promoteur GFAP, ne restent pas présentes un certain temps dans les progéniteurs. De plus, les drogues et les virus ne possèdent jamais un effet total, laissant donc des cellules en vie ou non infectées. Ainsi, l'ensemble de la communauté scientifique accepte que les neurosphères formées, en réponse au facteur EGF, proviennent des aNSC et des progéniteurs précoces.

Pour finir, une nouvelle approche de culture est apparue pour permettre l'étude des NSC primitives. Ces cellules, dont l'identité sera discutée plus tardivement, ne sont pas capables de générer des colonies dans un milieu de culture prolifératif standard. En effet, ces dernières ne nécessitent pas la présence d'EGF ou FGF (*Fibroblast Growth Factor*) mais uniquement la présence de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) pour leur permettre de former des colonies *in vitro*. Il semblerait que ce soit le seul type cellulaire capable de proliférer dans ces conditions (Reeve et al., 2017; Sachewsky et al., 2014).

b) L'utilisation de molécules

Afin de comprendre la régulation de la lignée neurale, il est nécessaire de disséquer le rôle des molécules qui agissent sur les NSC et leurs descendances. Pour cela, deux approches peuvent être utilisées : augmenter leur présence ou la diminuer. Pour ne citer que quelques exemples, celles-ci peuvent être des facteurs tels qu'EGF (Doetsch et al., 2002), des lipides (Hamilton et al., 2015), des inhibiteurs pharmacologiques (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b; Doetsch et al., 2002), etc.

(1) In vitro

La culture cellulaire permet d'amplifier les NSC et les progéniteurs dans un milieu prolifératif et de les différencier en absence d'EGF. La culture permet donc d'observer les différentes étapes de la neurogenèse en dehors de la SVZ. L'*in vitro* est donc une des approches les plus faciles pour étudier l'effet de molécules sur la prolifération, l'autorenouvellement ou encore la différenciation cellulaire. Pour observer l'effet d'une molécule dans ce système, il suffit de l'ajouter aux cellules en culture, au moment désiré dans des conditions permettant l'observation du comportement voulu. Les procédures *in vitro* permettant de tester des molécules sur la neurogenèse sont donc particulièrement nombreuses.

De nombreux articles utilisent cette approche, par exemple, un article démontre que la voie de signalisation de mTOR est un médiateur dans la prolifération induite par EGF. La mise en culture en présence de la Rapamycin, un inhibiteur de mTORC1, induit une diminution du nombre de neurosphères ainsi que de leur taille (Paliouras et al., 2012). L'ajout de molécules *in vitro* a aussi permis à Lim de démontrer que BMP2 et BMP4 inhibent la différenciation neurale. De plus, cet auteur indique que cet effet peut être bloqué si Noggin est présent en même temps que BMP (Lim et al., 2000).

La culture cellulaire reste la technique la plus facile pour tester des molécules et mener les premières observations. Cependant, cette approche est artificielle, puisqu'elle élimine les interactions cellulaires et l'environnement de la niche, et est souvent appuyée par une seconde approche *in vivo*.

(2) *In vivo*

Afin de valider les effets d'une molécule sur la neurogenèse adulte, le passage *in vivo* reste nécessaire. Plusieurs approches permettent d'augmenter ou d'inhiber les molécules ou leurs voies de signalisations. Pour cela, il est possible de faire des injections, des infusions ou encore d'utiliser des modèles génétiques.

(a) Injection

Les injections permettent d'introduire des molécules dans des modèles animaux vivants. Elles peuvent se faire de différentes façons : en intraveineuse, en intrapéritonéale (IP) mais aussi directement dans les ventricules latéraux. Les intraveineuses ne sont pas fréquemment utilisées pour l'étude de la neurogenèse adulte. Cependant, certains articles, tel que celui de Villeda, l'utilise afin d'injecter le plasma de souris jeunes ou âgées dans des souris jeunes. Celles-ci sont suffisantes pour induire une diminution du nombre de neuroblastes produits (Villeda et al., 2011).

Les IP sont largement plus communes, puisque cette technique est un mode d'administration facile nécessitant seulement une immobilisation de courte durée des animaux. Elles sont particulièrement utilisées pour l'injection d'agents intercalants à l'ADN tels que le BrdU ou la ³H-Thymidine. Ce type d'injections est donc retrouvé dans de nombreuses publications observant la prolifération des NSC et de leurs descendances (Doetsch et al., 1999a;

Doetsch et al., 1999b; Morshead et al., 1998; Morshead and van der Kooy, 1992; Ponti et al., 2013).

Les injections dans le ventricule latéral sont une approche reconnue pour l'étude de la neurogenèse. En effet, elles permettent de délivrer les molécules directement dans la niche, sans passer par les différents systèmes pouvant limiter l'accès des molécules tel que la BHE. C'est l'approche utilisée par Mudo qui a injecté des anticorps anti-FGF-2 dans les ventricules de rats. Ainsi, les auteurs ont démontré que l'inhibition de FGF-2 peut bloquer la prolifération cellulaire induite par la nicotine (Mudo et al., 2007). Le désavantage majeur de ce type d'injection est qu'il nécessite une anesthésie générale des animaux ainsi qu'une chirurgie induisant des lésions.

Les injections permettent donc l'administration de molécules *in vivo*. Elles possèdent de nombreux avantages dont le choix de l'âge, du modèle, la concentration, la durée du traitement, ainsi que la fréquence d'administration. Seules les injections intraventriculaires ne permettent pas un traitement répété, puisque les aiguilles engendrent de grandes lésions, mais il est possible de remédier à ce problème grâce aux infusions.

(b) Infusion

L'injection de molécules dans le cerveau ne peut pas être réalisée à de nombreuses reprises. Cependant, certains traitements nécessitent une exposition prolongée afin d'observer des effets. Pour cela, les groupes de recherche utilisent des pompes osmotiques qui permettent de délivrer les molécules de façon continue sur plusieurs jours ou semaines. Un traitement fréquemment retrouvé sous cette forme est l'administration de l'antimitotique Ara-C, qui permet de tuer les cellules en prolifération (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b; Doetsch et al., 2002; Reeve et al., 2017). Cette technique nécessite aussi une anesthésie générale des animaux afin de placer une canule à la surface du cerveau ou dans les ventricules latéraux, pouvant induire des lésions et une activation des NSC (Faiz et al., 2015). Les injections et les infusions, induisant une diffusion de la molécule dans l'organisme et le tissu, ne permettent généralement pas d'observer un seul comportement. En effet, il est possible d'obtenir un résultat dû à une réaction indirecte.

c) **Les manipulations génétiques permettant l'identification des types cellulaires**

L'étude de la neurogenèse adulte nécessite la modulation de voies de signalisation, ce qui peut être réalisé par la production d'animaux transgéniques. Ces derniers permettent aussi de détecter les NSC et leurs descendances sur différentes périodes. En effet, les immunomarquages ne sont pas toujours suffisants puisqu'ils ne permettent l'observation de la SVZ qu'au moment du sacrifice. Afin de pallier ce problème, de nombreuses techniques basées sur la manipulation génétique sont utilisées : les souris transgéniques, les virus et les plasmides.

(1) *Les modèles de souris transgéniques*

De nos jours, de nombreux modèles murins transgéniques sont disponibles sur le marché pour l'étude de la neurogenèse adulte. Généralement, ceux-ci ont pour objectif de marquer une ou plusieurs populations cellulaires ou de moduler leurs signalisations intrinsèques. Pour cela, deux types de modèles transgéniques existent : les reporteurs constitutifs ou inductibles.

(a) Les modèles constitutifs

Les modèles transgéniques constitutifs permettent de marquer/modifier une population cellulaire en fonction du promoteur utilisé. Pour créer ce type de modèle, il est nécessaire de construire un transgène composé de deux éléments : 1- un élément régulateur/promoteur exprimé dans le type cellulaire étudié (par exemple GFAP pour les NSC et les astrocytes) et 2- d'un gène pouvant coder pour une protéine de détection ou d'intérêt, tel que la GFP ou Notch. De cette façon, le gène choisi sera exprimé dans les cellules qui sont capables d'activer l'élément régulateur. Le transgène peut être inséré de façon aléatoire dans le génome par injection pronucléaire dans un zygote ou dans les cellules souches embryonnaires. Cependant, il est aussi possible de l'intégrer à la place du gène de l'hôte ou même de le fusionner à celui-ci par recombinaison homologe : dans ce cas de figure, ce sera un *Knock in* (Dhaliwal and Lagace, 2011).

Dans les études de la neurogenèse adulte, de nombreux modèles constitutifs sont des modèles reporteurs, ainsi, le principe sera expliqué sur celui-ci. Dans le cadre des reporteurs, c'est l'ADN codant pour une protéine de détection, telle que la GFP qui est placée en aval de l'élément régulateur. Cette protéine reportrice ne doit pas posséder d'effet biologique pour ne pas moduler le comportement de la cellule qui l'exprime (Hadjantonakis et al., 2003).

Les modèles reporteurs constitutifs sont nombreux et permettent d'étudier plusieurs types cellulaires. Un de ces modèles les plus utilisés pour l'étude de la neurogenèse adulte est les souris GFAP::GFP qui ont été caractérisées par le laboratoire du Dr Bordey (Figure 3A) (Platel et al., 2009). Dans celles-ci, l'élément régulateur est un fragment de 2,2 kb provenant du promoteur GFAP humain (Nolte et al., 2001; Zhuo et al., 1997). Dans la SVZ de ces souris, la GFP est exprimée dans les NSC et les astrocytes mais aussi dans une sous-population de progéniteurs. En revanche, les neurones matures et les cellules épendymaires ne sont pas marqués (Dhaliwal and Lagace, 2011; Tavazoie et al., 2008). Ces souris ont été utilisées pour décrire l'emplacement des NSC et leur relation avec les cellules qui les entourent dans la SVZ. En effet, elles présentent un avantage majeur puisque la GFP est exprimée dans l'ensemble du cytoplasme alors qu'un immunomarquage avec un anticorps anti-GFAP ne permet d'observer qu'une multitude de filaments intermédiaires : il est donc plus facile de localiser les cellules GFAP positives dans ce modèle transgénique (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). De plus, elles sont largement utilisées lors des protocoles de triage par FACS (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Pastrana et al., 2009).

Il existe plusieurs autres modèles de souris similaires aux GFAP::GFP tels que les souris ayant en élément régulateur GLAST- (Slezak et al., 2007) ou encore Nestin- (Mignone et al., 2004). Le principe des souris reportrices constitutives peut être décliné à l'infini. Ainsi, il est possible d'avoir des souris doubles transgéniques telles que présentées dans l'article de Kanki. Dans celui-ci, les souris possèdent deux transgènes, l'un permettant le marquage des cellules Nestin positives en orange (Nestin-Kusabira Orange) et l'autre les neuroblastes en vert (DCX-GFP) (Kanki et al., 2010). De même, les souris reporteurs peuvent permettre de visualiser l'activation d'un gène plutôt qu'une population cellulaire. Par exemple, des souris Hes5-GFP rendent possible l'observation de l'activation de la voie de Notch (Basak and Taylor, 2007). Enfin, certaines souris transgéniques permettent l'étude de la cinétique de prolifération des tissus. Les souris FUCCI (*Fluorescence Ubiquitination Cell Cycle Indicator*) expriment différents fluorophores selon la phase de division. Ainsi, les cellules en phase G1 sont rouges, alors que les phases S, G2 et M sont vertes (Sakaue-Sawano et al., 2008).

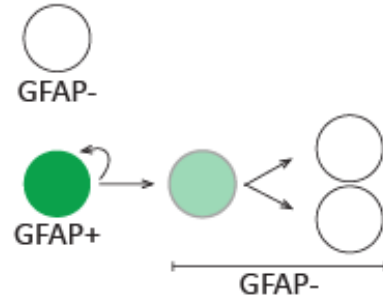
Ce type de modèle transgénique est particulièrement utile, car il permet une forte expression du transgène afin de localiser ou moduler la signalisation intrinsèque d'une population cellulaire. En revanche, il possède un inconvénient majeur : la production et le

maintien de la protéine reportrice. En effet, selon la durée pendant laquelle l'élément régulateur est activé et la demi-vie de la protéine, il se peut que le reporteur ne soit pas correctement exprimé. Le maintien de la protéine reportrice après que l'élément régulateur ne soit plus activé pourrait être limité via l'utilisation de protéine reportrice fusionnée avec un domaine de dégradation. Malheureusement, ce système présente des difficultés de sensibilité et n'est que très peu utilisé (Dhaliwal and Lagace, 2011; Hadjantonakis et al., 2003).

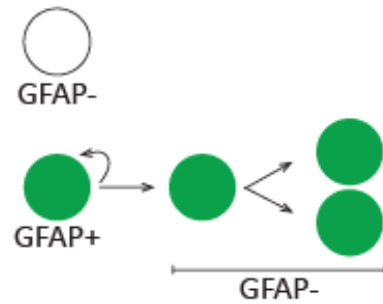
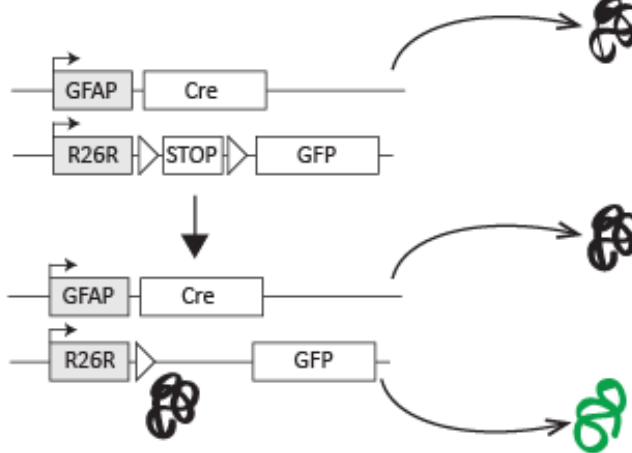
(b) Les modèles conditionnels et inductibles

Les modèles conditionnels ou inductibles sont différents des reporteurs puisque les modifications faites dans ce modèle sont permanentes et se retrouvent dans les cellules filles. Ainsi, même si l'élément régulateur n'est plus activé, le changement est maintenu.

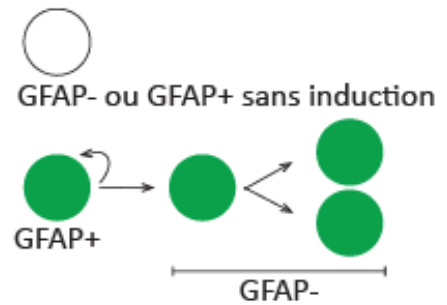
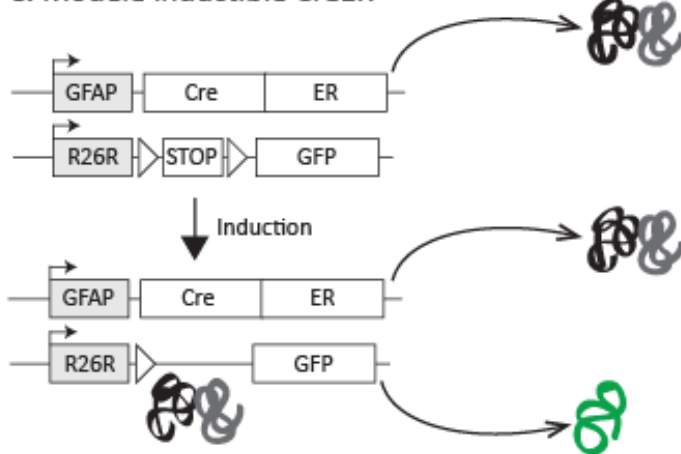
A. Modèle reporteur constitutif



B. Modèle conditionnel Cre



C. Modèle inducible CreER








Légende  Promoteur  Séquence codante pour une protéine  STOP Codon STOP  Site loxP  Protéine

Figure 3 : Modèles de souris transgéniques

(Légende Figure 3 sur la page suivante)

Légende figure 3 :

De nombreuses souris transgéniques permettent l'étude de la neurogenèse adulte. A- modèle reporteur constitutif : les souris GFAP::GFP permettent l'expression de la GFP lorsque le promoteur GFAP est activé. Dans la SVZ, la protéine fluorescente est retrouvée dans les NSC et les astrocytes. La descendance des NSC n'exprimant plus le promoteur GFAP va conserver, pour un temps limité, la protéine GFP jusqu'à sa dégradation. B- modèle conditionnel Cre : la Cre recombinase est exprimée en aval du promoteur GFAP. Le second transgène est identique à celui retrouvé dans de nombreux modèles de reporteur : la GFP est placée en aval du locus R26R ubiquitaire. Entre les deux séquences, un codon STOP est présent entouré par deux sites loxP. Dans les cellules GFAP positives, il va y avoir production de la protéine Cre dans le cytoplasme qui va entrer dans le noyau afin de permettre la recombinaison des loxP et l'excision du codon STOP : par conséquent l'expression de la GFP. L'ensemble de la descendance d'une cellule recombinée continuera de produire la protéine fluorescente. C- modèle inducible CreER : la protéine fusion CreER dépend de l'activation du promoteur GFAP. Le deuxième transgène est identique au modèle B. Les cellules GFAP positives vont produire la CreER qui sera maintenue dans le cytoplasme. Lors d'une induction au Tamoxifen, la CreER pourra migrer au noyau pour éliminer le codon STOP et induire l'expression de la GFP. Après l'induction, les cellules filles d'une cellule recombinée continueront de produire la protéine fluorescente. Abréviations : GFAP : *Glial Fibrillary Acidic Protein* ; GFP : protéine fluorescente verte. Image générée par Sandra Joppé.

(i) Les modèles conditionnels Cre

Les modèles conditionnels classiques Cre/Lox reposent sur un système de recombinaison permettant la délétion, l'inversion ou la translocation d'une séquence d'ADN. Afin d'expliquer ce modèle, l'exemple présent dans l'article de Garcia sera utilisé. Dans celui-ci, les auteurs cherchent à cartographier la descendance des NSC. Pour cela, ils utilisent des souris présentant deux constructions : dans la première, la Cre est placée en aval du promoteur GFAP. Dans la seconde, une construction classique de reporteur floxé : le locus ROSA26 suivi d'une séquence loxP, puis d'un codon STOP, ensuite un second site loxP et enfin l'ADN codant pour la GFP. Dans cette souris transgénique, toutes les cellules GFAP positives vont produire la protéine Cre. Celle-ci étant nucléaire, elle va migrer au noyau et lier les deux sites loxP pour induire la délétion du codon STOP. Sachant que le locus ROSA26 est exprimé de façon ubiquitaire, la GFP va être exprimée dans les cellules GFAP positives mais aussi dans leurs descendance (Figure 3B). Ainsi, les auteurs ont démontré que l'ensemble des cellules vertes étaient produites à partir de cellules astrocytaires (Garcia et al., 2004). Le modèle classique Cre/Lox n'est cependant pas très utilisé puisque de nombreux promoteurs sont activés lors du développement, ce qui rend impossible de dissocier la neurogenèse embryonnaire de l'adulte (Dhaliwal and Lagace, 2011).

(ii) Les modèles inductibles

(a) *Les CreER*

Le système inductible CreER est permis grâce à la fusion de deux protéines : la Cre et ER. L'induction peut se faire à l'âge désiré grâce à un traitement avec un ligand œstrogène tel que le Tamoxifen. Plusieurs types de ER existent avec une sensibilité plus ou moins forte au ligand tels que ER^T et ER^{T2} (Indra et al., 1999). En reprenant, l'exemple ci-dessus mais en ajoutant l'induction, la CreER est placée en aval du promoteur GFAP. La seconde construction reste le même reporteur floxé. Dans ce modèle, l'ensemble des cellules GFAP positives vont exprimer et produire la protéine fusion CreER, cependant aucune cellule n'exprimera la GFP. En effet, la protéine ER permet de retenir la Cre dans le cytoplasme. Au moment choisi, les souris pourront être induites avec le Tamoxifen : le ligand va permettre le passage de la CreER au noyau et ainsi la délétion du codon STOP. Par conséquent, les cellules GFAP positives ainsi que leurs descendances vont exprimer la GFP (Figure 3C). Cet exemple est un modèle inductible permettant de réaliser des traçages de lignée cellulaire chez l'adulte. Plusieurs articles ont étudié la neurogenèse adulte avec un système similaire mais en utilisant des souris Nestin::CreER (Carlen et al., 2006; Imayoshi et al., 2006; Lagace et al., 2007).

Bien évidemment, cet exemple peut être détourné, en changeant les promoteurs ou les protéines, par exemple pour bloquer la neurogenèse adulte. Imayoshi a utilisé des souris comprenant les deux constructions : Nestin::CreER et NSE-loxP-STOP-loxP-DTA afin de tuer les neurones produits pendant ou après l'induction au Tamoxifen. Dans ce modèle, la recombinaison a lieu dans les NSC et les progéniteurs. Quand leurs descendances vont maturer en neurones, elles vont activer le promoteur NSE (*Neuron Specific Enolase*) et induire la production de la DTA (*Diphtheria Toxin fragment A*) qui correspond à la toxine diphtérique, ce qui induit leur mort (Imayoshi et al., 2008).

L'avantage de ce système Cre inductible est la possibilité de commencer l'étude à l'âge désiré. Le second intérêt, qui peut aussi se révéler comme un inconvénient, est l'efficacité de recombinaison. En effet, il est possible de moduler le traitement afin que la recombinaison soit rare, moyenne ou forte. Les inconvénients sont similaires aux modèles constitutifs auxquels il faut ajouter la possibilité d'une recombinaison incomplète (Enikolopov et al., 2015).

(b) *Les tTA*

Un autre système inductible existe, le tTA (protéine transactivatrice de la tétracycline). Dans ce modèle deux constructions sont présentes : la première code pour la tTA en aval d'un promoteur et la seconde code pour une protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur *tTA-responsive TetOp*. En absence de l'antibiotique tétracycline, ou de l'un de ses dérivés tels que la Doxycycline, la tTA lie TetOp ce qui induit l'expression de la protéine. En présence de l'agent pharmaceutique, la tTA ne peut plus lier l'ADN ce qui induit un arrêt de la production de la protéine d'intérêt. Ce système est retrouvé dans la littérature sous le terme « *Tet-off* ». Le « *Tet-on* » est le procédé inverse qui permet l'expression de la protéine seulement en présence de l'antibiotique grâce à une tTA inverse (rtTA) (Dhaliwal and Lagace, 2011). Récemment, un article a utilisé ce système afin d'observer la cinétique de division des NSC primitive. Dans celui-ci, les auteurs ont utilisé des souris tet-O-HIST1H2B/GFP dans lesquelles les cellules mitotiques deviennent GFP positives lorsqu'elles sont traitées avec de la Doxycycline. Ce modèle leur a permis de définir la fréquence de division de leurs cellules d'intérêt (Reeve et al., 2017).

Ces modèles « *Tet-on* » et « *Tet-off* » sont particulièrement intéressants puisqu'ils permettent une induction ponctuelle, malheureusement, la Doxycycline peut être toxique à fortes doses.

(c) *L'ablation cellulaire*

L'étude de la neurogenèse comprend aussi un volet sur le rôle fonctionnel de ces cellules. Une des techniques les plus utilisées pour répondre à cette question est d'éliminer les cellules qu'on étudie afin d'observer une amélioration ou détérioration d'une ou plusieurs fonctions. Comme il a été mentionné précédemment, plusieurs articles ont supprimé les cellules mitotiques via l'injection de ³H-Thymidine ou d'Ara-C. Cependant, certains modèles transgéniques permettent de supprimer uniquement les cellules en division d'une population cellulaire. À l'origine, ce modèle est apparu sous la forme HSV-TK qui permet de supprimer l'ensemble des cellules mitotiques en présence de l'agent antiviral GCV (*Ganciclovir*) (Fillat et al., 2003). Pour l'étude de la neurogenèse adulte, des souris GFAP-TK sont disponibles et permettent de supprimer la neurogenèse à 98% (Garcia et al., 2004). Dans ce modèle, comme pour l'ablation

cellulaire avec les drogues, il est possible d'observer une régénération de la SVZ après le traitement au GCV (Imura et al., 2003; Sachewsky et al., 2014).

Pour conclure, le nombre de souris transgéniques disponibles pour l'étude de la neurogenèse adulte augmente rapidement. Ces modèles permettent de pallier certains problèmes techniques et d'observer la biologie des NSC *in vivo*. Cependant, l'ensemble des modèles est basé sur l'utilisation de promoteurs qui dirigent l'expression des marqueurs cellulaires. Ces derniers n'étant pas spécifiques à un type cellulaire, il reste toujours difficile de savoir si les effets observés sont uniquement dus au type cellulaire que l'on cible. De plus, la cinétique de production ainsi que la demi-vie des protéines d'intérêt peuvent rendre difficiles certaines interprétations.

(2) *Les virus*

En plus des modèles transgéniques, il est possible de détecter ou de modifier la signalisation intracellulaire via une autre approche génétique : les vecteurs viraux. Ils sont présents sous plusieurs formes incluant les rétrovirus (RV), les lentivirus (LV) et les adénovirus (Ad). Ces derniers peuvent remplacer certains modèles transgéniques tels que conditionnels Cre ou être utilisés en combinaison. Les virus offrent plusieurs avantages tels que pouvoir être injectés à n'importe quel âge et de permettre les analyses sur différentes durées. De plus, ils offrent la possibilité d'être injectés avec différentes titrations permettant l'infection d'un nombre plus ou moins grand de cellules. Les virus permettent de réaliser des traçages de lignée puisqu'une fois infectées, les cellules mères transmettent le génome viral à leurs cellules filles (Enikolopov et al., 2015). Enfin, l'étude de la neurogenèse adulte par les virus ouvre une porte pour la possibilité des thérapies géniques chez l'humain (Cockrell and Kafri, 2007; Thomas et al., 2003). L'ensemble des virus sont construits de façon similaire aux modèles transgéniques vu que la séquence codante de la protéine d'intérêt est placée en aval d'un promoteur qui peut être spécifique à une population cellulaire.

(a) Les rétrovirus (RV)

Les rétrovirus sont des virus à ARN enveloppé de la famille des *Retroviridae*. Leur mode d'infection est assez simple : le RV se lie à la membrane de la cellule hôte permettant la fusion

de l'enveloppe virale avec cette dernière. Ceci permet la libération de l'ARN viral dans la cellule puis la formation d'un ADN viral via la transcriptase inverse. Lorsque la cellule hôte entre en mitose, la membrane nucléaire va se briser permettant à l'ADN viral de s'intégrer à celui de l'hôte grâce à l'intégrase. L'intégration du matériel génétique viral n'est possible que si la cellule entre en division : les RV permettent donc uniquement l'étude des cellules mitotiques (Enikolopov et al., 2015; Mitchell et al., 2004). Cet outil peut donc être utilisé afin de marquer des cellules produites lors de l'infection.

Les RV sont largement utilisés afin d'observer la lignée des NSC. Par exemple, Morshead a utilisé cet outil afin de quantifier le nombre et le destin des cellules produites dans la SVZ. Grâce à différentes approches, dont les RV, elle a pu déterminer la durée du cycle cellulaire des progéniteurs ainsi que leur taux de survie ou de migration dans le trajet migratoire rostral (Morshead et al., 1998; Morshead and van der Kooy, 1992). De plus, c'est grâce à ce type de virus que le groupe du Dr Alvarez-Buylla a démontré l'origine des NSC adultes. Pour cela, ils ont utilisé une librairie de rétrovirus « code-barre » dans lesquels chacun codait pour la GFP et une séquence unique de 24 paires de bases. Ainsi, en comparant cette séquence présente dans les interneurons et dans les NSC, les auteurs ont été capables de savoir quels neurones ont été produits par quelle NSC (Fuentelba et al., 2015).

(b) Les lentivirus (LV)

Les lentivirus font partie de la même famille que les rétrovirus. Ce sont donc des particules à ARN enveloppé de la famille des *Retroviridae*. Les LV sont un outil intéressant puisqu'ils peuvent transporter de grands transgènes d'environ 12kb. Ils peuvent infecter des cellules quiescentes, caractéristique importante pour l'étude des cellules de la SVZ (Cockrell and Kafri, 2007; Enikolopov et al., 2015).

En 2006, une publication compare les LV aux RV pour définir lesquels sont les plus intéressants pour l'étude des NSC. Ce groupe a démontré que l'injection de LV dans le ventricule permettait de marquer les NSC ainsi que les neuroblastes alors que les RV se retrouvent majoritairement dans les neurones immatures de la SVZ (Geraerts et al., 2006). Cette approche virale peut aussi permettre l'étude des voies de signalisation dans les cellules épendymaires (Carlen et al., 2009).

(c) Les adénovirus (Ad)

Les adénovirus sont des virus de la famille des *Adenoviridae* qui comprend une centaine de virus dont certains sont capables d'infecter l'Homme. Ce sont des virus à ADN double brin qui ne possèdent pas d'enveloppe. Ils sont capables d'infecter les cellules quiescentes comme les LV et peuvent charrier un transgène d'environ 8kb (Davidson and Bohn, 1997). Les Ad sont aussi fréquemment utilisés pour l'étude de la neurogenèse adulte. Pour ne citer qu'un exemple, Merkle a eu recours à cette technique afin de tracer la descendance des NSC selon leur localisation dans la SVZ. C'est avec ces virus que la description de la régionalisation des NSC a été publiée (Merkle et al., 2007).

Les virus représentent un outil important pour l'étude de la neurogenèse. Cependant, comme toute technique, ils présentent plusieurs inconvénients. Premièrement, même si leur durée de vie reste limitée *in vivo*, il n'est pas évident de connaître exactement la période où ils restent infectieux. En second, leur injection dans les niches neurogéniques induit des lésions induisant l'activation des NSC (Faiz et al., 2015). Enfin, ce sont de petites molécules de 20 à 100 nanomètres : elles vont donc se diffuser dans le LCS et possiblement dans le tissu. Le site d'infection est donc bien plus large que le site d'injection. Ceci est reconnu dans la littérature, puisque dans plusieurs articles, les virus sont injectés dans un ventricule latéral mais les analyses sont effectuées sur le bord contralatéral afin de limiter la diffusion dans la zone sous-épendymaire (Carlen et al., 2009; Mirzadeh et al., 2008).

(3) *Les plasmides*

L'électroporation est une technique permettant l'introduction d'une séquence d'acides nucléiques dans une cellule de façon transitoire. À l'origine, elle a été développée chez les embryons de poulet (Nakamura et al., 2000). Le mécanisme moléculaire exact de cette technique n'est pas parfaitement connu, cependant, le principe général consiste à injecter de l'ADN dans la région d'intérêt puis à appliquer un courant électrique afin de générer des pores transitoires dans les membranes cellulaires. L'intégration de l'ADN, chargé négativement, se fait par migration de celui-ci vers l'anode (Bigey et al., 2002; Bloquel et al., 2004; De Vry et al., 2010a; De Vry et al., 2010b). Cette technique présente donc une spécificité spatiale et temporelle, puisque l'intégration de l'ADN ne peut se faire qu'au moment du choc électrique, qui est un des

avantages majeurs absents des modèles d'études présentés ci-dessus. Généralement, l'électroporation se fait avec des plasmides, qui sont des molécules d'ADN double brin circulaire. Selon le gène présent, l'électroporation peut permettre de localiser des cellules ou moduler la signalisation intracellulaire. De plus, il est possible d'utiliser des promoteurs particuliers permettant l'expression du gène dans une sous-population cellulaire, similaire à ce qui a été expliqué précédemment pour les modèles transgéniques ou les virus. De nos jours, l'électroporation est utilisée dans plusieurs espèces, dont les murins, à différents âges et dans de nombreux tissus tels que le cerveau, la rétine, les muscles, le foie et, etc. Pour l'étude de la neurogenèse, il est possible d'électroporer des embryons *in utero* (Saito and Nakatsuji, 2001), des nouveau-nés (Boutin et al., 2008; Ding et al., 2012) et des adultes (Barnabe-Heider et al., 2008; Tanaka et al., 2000). L'électroporation est une technique qui a été utilisée pour l'étude de la biologie des NSC. Par exemple, elle a été utilisée pour définir le rôle des cadhérines dans le maintien de l'intégrité de la niche neurogénique de la SVZ (Barnabe-Heider et al., 2008).

L'électroporation est une technique permettant l'étude de la neurogenèse adulte qui utilise approximativement les mêmes bases que les modèles transgéniques ou viraux, à savoir un promoteur spécifique et un transgène. La différence majeure est que l'électroporation est une technique transitoire alors que les autres permettent une expression du transgène stable pouvant être transmis aux générations suivantes. Cependant, chez les nouveau-nés, il a été démontré que l'électroporation induit l'expression de la GFP pendant au moins 20 jours (Ding et al., 2012). Cette technique peut aussi permettre le traçage de lignée grâce à l'utilisation d'un plasmide Cre dans un modèle reporteur. L'inconvénient majeur de l'électroporation est l'induction de lésions lors de la chirurgie avec l'injection et les pulsations électriques. Cependant, il est possible de remplacer les aiguilles-électrodes par des pinces électrodes, se plaçant de chaque bord du crâne. Cette dernière est bien moins invasive mais induit une électrocution d'une région plus importante. L'électroporation se démarque des procédures précédentes, car c'est une technique peu coûteuse, rapide mais aussi peu toxique.

d) La cytométrie en flux et le séquençage de l'ARN

La cytométrie en flux est une technique arrivée récemment dans la recherche sur les NSC. De façon très rapide, cette technique permet la caractérisation de différentes propriétés cellulaires. Pour cela, des cellules dissociées passent devant un ou plusieurs faisceaux, ce qui permet de détecter leur taille, leur granulosité, la fluorescence émise, etc. Cette dernière peut être endogène, grâce aux modèles transgéniques ou couplés avec des anticorps. Pour l'étude de la neurogenèse adulte, la cytométrie en flux basique n'est pas très utilisée : elle va généralement compléter d'autres analyses. Par exemple, le CFSE (*CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester*) est un marqueur fluorescent permettant d'observer la prolifération. Il a été utilisé *in vitro* en complément d'immunomarquages, tel que Ki67 (Hamilton et al., 2015). De façon similaire, l'iodure de propidium permet de déterminer la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouvent les cellules, et donc obtenir des informations sur leur prolifération (Zhang et al., 2014).

Le FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) est un type de cytométrie en flux. Son principe est identique mais cette technique permet de trier et de récupérer des sous-populations. Grâce aux marquages membranaires, il est possible de remettre les cellules vivantes en culture ou de les transplanter. C'est cette approche qui a été utilisée pour définir le type cellulaire capable de produire les neurosphères (Codega et al., 2014; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mich et al., 2014; Pastrana et al., 2009). Dans le domaine de la neurogenèse adulte, plusieurs combinaisons de marqueurs peuvent être utilisées. Quelques exemples de celles-ci, issus d'articles importants, sont regroupés dans le tableau 1.

La possibilité de trier les différentes sous-populations avec le FACS a permis une nouvelle approche pour étudier les NSC et leurs descendances. Dans les dernières années, plusieurs articles ont effectué des séquençages d'ARN sur les différents types cellulaires présents dans la SVZ. Cette technique permet d'observer l'activation des gènes puisqu'elle identifie et quantifie les ARN. Selon la technique utilisée, il est possible d'analyser l'ensemble des ARN messagers, ribosomiaux, de transfert ou microARN. De façon générale, les cellules sont isolées puis leurs ARN sont collectés avant d'être fragmentés en segments plus petits. Ces derniers sont convertis en ADN grâce à la transcriptase inverse avant d'être amplifiés. Puis le séquençage est réalisé grâce à la liaison de nucléotides fluorescents capable d'être reconnue par un appareil effectuant

la lecture. L'ensemble des étapes suivantes vont consister à faire correspondre les fragments analysés avec le génome et effectuer l'ensemble des analyses.

Un des premiers articles ayant utilisé cette technique a comparé les NSC adultes avec différents types cellulaires (Beckervordersandforth et al., 2010). Par la suite, plusieurs articles ont effectué des analyses similaires en comparant les différentes sous-populations de la lignée neuronale (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015). Ces derniers seront détaillés dans le chapitre sur l'identification des NSC. Cependant, il est important de noter que ces résultats permettent d'observer des comportements moléculaires spécifiques à une ou plusieurs populations cellulaires, leur permettant généralement de définir une hiérarchie. La transition d'un état au suivant va être réalisée par l'augmentation ou la diminution de procédés intracellulaires. Ces études permettent de définir de nouveaux marqueurs cellulaires pour la neurogenèse adulte (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015).

Comme n'importe quelle technique, le FACS et le séquençage des ARN présentent des faiblesses. En effet, ces techniques ne permettent pas d'obtenir des informations sur le positionnement des cellules dans la SVZ, leurs rôles, ni leurs interactions. De plus, les ARN sont rapidement et fortement contrôlés. Ainsi, un FACS sur des cellules dissociées suivi par une lyse peut durer plusieurs heures. Les résultats obtenus peuvent donc être biaisés par le stress cellulaire.

Tableau I. Exemple de combinaisons de marqueurs utilisées pour le FACS.

Cellule épendymaire	Astrocyte	qNSC	aNSC	Progéniteur	Neuroblaste	Références
GFAP::GFP- EGFR- CD24+	GFAP::GFP+ EGFR- CD24-	ND	GFAP::GFP+ EGFR+ CD24-	GFAP::GFP- EGFR+ CD24-	GFAP::GFP- EGFR- CD24+	Pastrana, 2009
GFAP::GFP- CD133+	GFAP::GFP+ CD133-	GFAP::GFP+ CD133+		GFAP::GFP- CD133-		Beckervordersandforth, 2010
ND	ND	GLAST++ EGFR- PlexinB2+ CD24- O4- PSA-NCAM- Ter119- CD45-	GLAST+ EGFR++ PlexinB2++ CD24- O4- PSA-NCAM- Ter119- CD45-		ND	Mich, 2014*
ND	GFAP::GFP+ CD133- EGFR- CD24-	GFAP::GFP+ CD133+ EGFR- CD24-	GFAP::GFP+ CD133+ EGFR+ CD24-	ND	ND	Codega, 2014
CD133+ CD24+ CD45-	GLAST++ O4- CD45-	GLAST+ CD133+ CD24- O4- PSA-NCAM- CD45-		GLAST- CD133- EGFR+ O4- PSA-NCAM- CD45-	PSA-NCAM+ CD45-	Llorens-Bobadilla, 2015*
CD31- CD24+ CD45-	GFAP::GFP+ CD133- CD31- CD24- CD45-	GFAP::GFP+ CD133+ EGFR- CD31- CD24- CD45-	GFAP::GFP+ CD133+ EGFR+ CD31- CD24- CD45-	GFAP::GFP- EGFR+ CD31- CD24- CD45-	CD31- CD24+ CD45-	Dulken, 2017

ND Non défini/discuté

* ++ Forte expression + Expression moyenne - Expression faible ou absente

(Légende Tableau I sur la page suivante)

Légende Tableau I :

Les différents types cellulaires présents dans la SVZ peuvent être séparés grâce à différentes stratégies de marquages. Dans les exemples cités, les épitopes membranaires EGFR, CD24, CD133 (Prominin-1), GLAST, PlexinB2, O4, PSA-NCAM, Ter119, CD45, et CD31 sont utilisés sur des souris de phénotype sauvage ou dans des souris transgéniques GFAP::GFP. La majorité des marqueurs de ce tableau font partie de la lignée neurale et sont indiqués dans la figure 2. O4 est un marqueur des oligodendrocytes, Ter119 est exprimé par les cellules sanguines, CD45 l'est par les microglies et les cellules hématopoïétiques, enfin CD31 par les cellules endothéliales. Abréviations : GLAST : glutamate aspartate transporter) ; GFAP : Glial fibrillary acidic protein ; EGFR : Epidermal Growth Factor receptor ; CD : cluster of differentiation ; PSA-NCAM : Polysialylated-neural cell adhesion molecule. (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mich et al., 2014; Pastrana et al., 2009). Tableau généré par Sandra Joppé

e) La transplantation

Les transplantations ont largement été utilisées pour les études sur la formation du système nerveux central. Ce système permet d'observer plusieurs aspects des cellules embryonnaires, dont la spécificité régionale, la différenciation et la production cellulaire de celles-ci. Cette technique est aussi utilisée sur des cellules adultes, dont les précurseurs neuraux (Jankovski and Sotelo, 1996). Dans le milieu de la neurogenèse adulte, les transplantations sont utilisées pour deux objectifs principaux. Premièrement, elles sont un modèle d'étude pour les thérapies par les cellules souches. L'objectif est à peu près toujours similaire, à savoir s'il est possible de transplanter des NSC afin de produire de nouveaux neurones, astrocytes ou oligodendrocytes afin de limiter les maladies neurodégénératives (Lim et al., 2007; Trounson and McDonald, 2015). Le travail de cette thèse ne portant ni sur la transplantation ni sur les cas pathologiques, ce paragraphe ne sera pas plus détaillé.

Deuxièmement, les transplantations permettent de valider biologiquement le type cellulaire purifié. Par exemple, Llorens-Bobadilla a utilisé cette technique pour démontrer que sa population de cellules GLAST+ Prom1+ contenait bien des NSC. Pour cela, il a isolé les cellules GLAST+ Prom1+ des souris Rainbow 2 (ayant une fluorescence ubiquitaire). Par la suite, il a injecté 2 à 4 000 de celles-ci dans le ventricule latéral d'une souris hôte. Après un mois, les auteurs ont retrouvé des cellules fluorescentes dans la SVZ, ainsi mais aussi des interneurones dans les bulbes olfactifs. Cette technique permet donc aux auteurs d'affirmer que la population cellulaire obtenue après le FACS contient bien des NSC car elles sont

neurogéniques (Llorens-Bobadilla et al., 2015). Plusieurs autres groupes ont eu recours à cette technique afin d'obtenir la validation de leur population cellulaire (Codega et al., 2014; Colak et al., 2008).

La technique de transplantation est donc importante pour démontrer la présence des NSC dans les tris cellulaires et reste, à ce jour, une des meilleures preuves que les auteurs puissent fournir. Cependant, la transplantation n'est pas une technique très efficace et nécessite l'injection d'un grand nombre de cellules. Seulement quelques-unes d'entre elles vont être capables de s'intégrer alors que la majorité va mourir dans le LCS et donc induire une réaction immunitaire. De plus, cette technique produit une lésion du cortex lors de l'insertion de l'aiguille jusqu'au ventricule.

À travers ces pages, la majorité des techniques utilisées pour l'étude de la neurogenèse adulte ont été décrites. Chacune d'entre elles représente une approche permettant de comprendre un aspect de la biologie des NSC. Comme toutes procédures expérimentales, elles possèdent des forces mais aussi des faiblesses. Tel qu'il l'a été plusieurs fois mentionnés précédemment, les inconvénients fréquemment retrouvés sont la présence de lésions du système nerveux central lorsque les chirurgies sont nécessaires, mais aussi l'absence de marqueurs spécifiques.

D. Identification des cellules souches neurales

Depuis des dizaines de pages, ce manuscrit décrit la neurogenèse adulte, qui est rendue possible grâce aux cellules souches neurales adultes. Ce paragraphe, portant sur leur identité, aurait donc dû être placé bien plus tôt dans cette introduction. Cependant, le véritable visage des NSC reste indéfini. Avec un nombre grandissant d'articles sur ce sujet, il est évident que la biologie des NSC et de leur lignée est bien plus complexe et hétérogène qu'au premier abord. Afin de traiter ce thème, il était nécessaire de passer à travers les différentes techniques d'étude de la neurogenèse pour comprendre les forces et les lacunes des observations menées. Dans ce paragraphe, plusieurs publications seront regroupées par ordre chronologique, puis discutées afin de comprendre qui sont les NSC et où elles se situent.

1. Des cellules mitotiques dans le cerveau adulte produisent des neurones

Au milieu des années 1900, plusieurs publications évoquent la présence de cellules mitotiques dans le cerveau de rongeurs adultes. Un Montréalais, le Dr Smart, est un des premiers à démontrer ces cellules en division dans la région subependymale (Smart, 1961). Cependant, l'histoire de la neurogenèse adulte ne commence réellement qu'avec les docteurs Altman et Das qui démontrent que des cellules mitotiques sont capables de produire ou de se différencier en neurones dans le gyrus dentelé (Altman, 1966; Altman and Das, 1965). Bien qu'à cette époque le terme de NSC ne soit pas évoqué, l'idée de la neurogenèse adulte émerge. Plusieurs groupes se lancent sur cette thématique et caractérisent les taux de prolifération, les types de cellules produites et leur destination (Altman, 1966; Privat and Leblond, 1972). Pour ne citer qu'un article, Cindy Morshead et Derek Van Der Kooy ont démontré que 10% des cellules de la SVZ proliféraient avec un cycle cellulaire de 12,7h et que la moitié d'entre elles mourraient (Morshead and van der Kooy, 1992). Par la suite, les docteurs Reynold et Weiss démontrent que certaines cellules du striatum permettent de produire des neurosphères étant multipotentes et capables d'autorenouvellement (Reynolds and Weiss, 1992). Ces caractéristiques étant celles des cellules souches, la dénomination « cellule souche neurale adulte » est enfin validée.

2. Description des cellules souches neurales et de leur lignée dans la SVZ

En 1994, Morshead et ses collègues publient un second article particulièrement intéressant puisqu'il initie l'idée d'une hiérarchie cellulaire. Premièrement, ils démontrent que la culture de neurosphères ne peut se faire que si la SVZ est mise en culture. Dans un second temps, ils indiquent que cette région peut être régénérée : en effet, s'ils tuent les cellules en division, celles-ci réapparaissent. Cependant, s'ils ajoutent un deuxième traitement identique au jour 2, la régénération et la production de neurosphères sont largement diminuées. Les auteurs indiquent donc qu'il existe une population de NSC relativement quiescente. La division de celles-ci permet la production de cellules transitoires fortement mitotiques (les progéniteurs). Ils proposent donc une hiérarchie, avec deux types cellulaires, où les NSC entreraient en division toutes les 3-4 semaines (Morshead et al., 1994).

Une des premières analyses de la composition de la SVZ a été donnée en 1997 par Fiona Doetsch et ses collègues du laboratoire du Dr Alvarez-Buylla. Dans son article, ils décrivent cinq types cellulaires principaux. Premièrement, les cellules de type A qui possèdent un corps cellulaire allongé avec un ou deux prolongements et un cytoplasme foncé. Elles sont groupées et forment une chaîne. Ces cellules sont détectées avec des anticorps tels que Tuj1 et PSA-NCAM et sont donc des neuroblastes. En second, les cellules de type B possèdent de nombreux filaments intermédiaires et un cytoplasme clair. Deux populations composent ce type cellulaire : les B1, à proximité des cellules épendymaires, qui sont larges et claires et les B2, situées à l'interface du parenchyme striatal, décrites comme plus petites et foncées. Ces deux sous-populations sont révélées par des immunomarquages avec GFAP : ce sont des astrocytes. Troisièmement, les cellules de type C sont larges et sphériques, et se présentent en petits groupes à proximité des cellules A. D'autres types cellulaires sont présentés comme les cellules de type D et E, qui sont les tancytes et les cellules épendymaires respectivement. Plusieurs types cellulaires décrits ci-dessus sont capables d'incorporer la ^3H -Thymidine : sur 79 cellules prolifératives, 52% sont des cellules de type C, 15 % de type A et 12% de type B2 (Doetsch et al., 1997).

À son tour, le laboratoire du Dr Van Der Kooy détaille les caractéristiques de prolifération des NSC. Grâce à des injections de rétrovirus, ils démontrent que 60% de la descendance des cellules fortement mitotiques meurent, 25% migrent dans les bulbes olfactifs et 15% restent dans la SVZ (Morshead et al., 1998). Puisque l'article précédent indique qu'il y a trois types cellulaires différents capables de se diviser, il n'est pas évident que ces données révèlent la cinétique de prolifération des NSC mais plutôt le destin cellulaire des cellules produites lors de la neurogenèse adulte. Enfin, les auteurs estiment qu'il y a 1200 NSC dans le proencéphale de souris. Ce chiffre est obtenu en croisant le nombre de cellules en division après un traitement antimitotique, le nombre de neurosphères produites et le nombre de cellules LRC (*Label Retaining Cell*), soit capables de retenir le BrdU (Morshead et al., 1998).

3. Les cellules souches neurales sont des cellules épendymaires

En 1999, une nouvelle théorie apparaît : les cellules épendymaires sont des NSC. Cette opinion est issue de plusieurs faits : premièrement, chez l'embryon, les NSC sont les cellules au

contact de la lumière du tube neural. Chez l'adulte, les cellules au contact du ventricule sont majoritairement celles de type E. Deuxièmement, il est possible de former des neurosphères à partir de la moelle épinière de souris adulte, qui contient des cellules épendymaires mais pas de SVZ (Weiss et al., 1996). En se basant sur ces arguments, Clas Johansson et ses collègues du laboratoire du Dr Frisen, postulent que les cellules épendymaires peuvent être des NSC. Pour tester leur hypothèse, ils utilisent des injections de colorant lipophile (Dil) ou d'adénovirus, afin de marquer la couche épendymaire. Ils indiquent que le nombre de cellules positives augmente dans la SVZ au fil du temps et qu'il est possible d'en observer dans les bulbes olfactifs. La mise en culture de striatum de souris injectées au Dil permet l'observation de 88,6% de neurosphères colorées. Enfin, les auteurs indiquent que les cellules épendymaires sont des LRC. Ces données permettent donc de supporter l'idée que les cellules de type E sont les NSC responsables de la production des progéniteurs et des neurones (Johansson et al., 1999). Ces résultats vont à l'encontre de ceux publiés par Doetsch et ses collègues, puisqu'ils ont indiqué, 2 ans auparavant, que sur les 79 cellules en division, aucune n'était de type E (Doetsch et al., 1997). Cependant, l'article de Johansson et al accepte l'idée qu'il existe plusieurs populations de NSC dans la SVZ. Cet article a été fortement contesté : techniquement, il est possible que le colorant ou le virus ait diffusé à travers le tissu, allant ainsi marquer d'autres types cellulaires. Peu après, un second article est publié par l'équipe du Dr Van Der Kooy. Dans celui-ci, les auteurs cherchent à savoir si ce sont les cellules épendymaires ou sous-épendymaires qui sont capables de former les neurosphères. Grâce à des microdissections avant la mise en culture, ils indiquent que les cellules épendymaires peuvent former de petites colonies de moins de 100µm mais que celles-ci ne sont pas capables d'autorenouvellement ni de multipotence : ce ne sont donc pas des NSC (Chiasson et al., 1999).

4. Les cellules souches neurales sont astrocytaires

Quelques mois plus tard, le laboratoire du Dr Alvarez-Buylla indique que les NSC sont des astrocytes grâce à deux articles. Pour ces études, les auteurs utilisent la capacité de régénération de la SVZ à la suite d'un traitement avec l'Ara-C. Après 6 jours d'infusion, ils notent que les cellules de type A et C ont disparues mais que celles de type B et E sont maintenues et représentent 55% et 37% des cellules de la SVZ. 12h après l'arrêt de la drogue,

sur les 152 cellules mitotiques comptées, toutes sont des cellules astrocytaire de type B. Ces dernières sont responsables de la production des cellules de type C puis du type A. La régénération est possible grâce à la prolifération des cellules de type B et C. De plus, 30 jours après une injection de BrdU, les 23 cellules positives analysées sont des cellules de type B : ce sont des LRC. Enfin grâce à l'utilisation de virus exprimés dans les cellules GFAP, les auteurs démontrent que ces cellules sont capables de produire des neurones dans les bulbes olfactifs *in vivo* et de former des neurosphères *in vitro* (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b). Cet article se pose donc en complète opposition à celui de Johansson et ses collègues. À la suite de ces articles, une nouvelle notion va apparaître : celle de NSC quiescentes (par la suite abrégé par qNSC pour *quiescent NSC*). Celles-ci se divisent rarement, donc capables de survivre à un traitement antimitotique, et être responsables de la régénération de la SVZ.

En 2002, Doetsch et ses collègues observent l'impact du facteur EGF sur la neurogenèse adulte. Premièrement, ils indiquent que ce récepteur est présent sur les cellules de type C mais aussi sur certaines cellules GFAP qui contactent le ventricule (B1). Ses résultats démontrent qu'une courte infusion d'EGF augmente la prolifération des progéniteurs. De plus, ils démontrent que ceux-ci sont capables de générer des neurosphères à la suite d'un traitement à l'Ara-C : à la fin de l'infusion de la drogue, le nombre de neurosphères produites par la SVZ est largement diminué. Cependant, les auteurs indiquent que la formation de colonies flottantes augmente entre les jours 1 et 3 suivants l'arrêt de l'Ara-C, au moment où les progéniteurs réapparaissent. Ils en concluent que dans certaines conditions, les progéniteurs sont capables de conserver les caractéristiques des NSC. Enfin, il est intéressant de noter que les auteurs remarquent que le nombre d'astrocytes au contact du LCS augmente de 1,4 à 4,0/mm alors que le nombre total d'astrocytes reste inchangé (Doetsch et al., 2002).

Le type cellulaire des NSC est soutenu par un autre article de l'équipe de recherche du Dr Van Der Kooy. Grâce à la mise en culture de souris GFAP-TK, les auteurs démontrent que les astrocytes mitotiques sont responsables de la production des neurosphères puisque 98% d'entre elles disparaissent quand le GCV est présent dans le milieu. Il est intéressant de noter que la capacité de formation des neurosphères est diminuée de façon similaire lorsque le GCV est infusé *in vivo* (Morshead et al., 2003).

5. Les cellules souches neurales sont hétérogènes

L'article de Merkle et ses collègues publié en 2007, ne rentre pas dans le thème « qui sont les NSC ? » mais apporte un élément important. Dans son article, les auteurs indiquent que toutes les NSC ne sont pas capables de produire tous les types d'interneurones : elles possèdent des restrictions selon leur localisation spatiale. Cet article est un des premiers à démontrer que les NSC ne sont pas identiques mais qu'il existe au moins une certaine diversité (Merkle et al., 2007).

6. Les cellules souches neurales sont CD133 (Prominin-1) positives

Pour revenir sur le sujet d'intérêt, un second article veut soutenir l'hypothèse de Johansson et ses collègues, à savoir que les cellules épendymaires sont des NSC. Pour cela, les auteurs utilisent le marqueur ciliaire CD133 (Prominin-1), afin de détecter les cellules de type E. Ils démontrent que l'ARNm de CD133 est présent uniquement dans ces dernières et colocalise avec le marqueur S100 β mais pas GFAP. Grâce au FACS, ils mettent en culture les cellules CD133+ et démontrent qu'elles sont capables de former des neurosphères multipotentes et capables d'autorenouvellement. *In vivo*, les auteurs sont capables d'observer des cellules CD133+ BrdU+ lors de la régénération de la SVZ. De plus, deux mois après la transplantation de cellules CD133+, il est possible d'en observer dans la SVZ mais aussi dans les bulbes. Enfin, les auteurs utilisent l'électroporation du plasmide P2-cre, dans lequel l'élément régulateur P2 correspond au promoteur humain de CD133, dans des souris reporteur. Cette technique, qui ne permet la recombinaison que des cellules CD133+ GFAP-, permet d'observer des cellules LacZ dans les bulbes olfactifs. Grâce à l'ensemble de ces données, les auteurs démontrent que les cellules CD133+, soit les cellules épendymaires, présentent les caractéristiques des NSC (Coskun et al., 2008).

7. Les cellules de type B1 sont des cellules souches

Quelques mois plus tard, 3 articles sont publiés par Cell Stem Cell sur la neurogenèse et le système vasculaire. Le premier, écrit par l'équipe du Dr Alvarez-Buylla, décrit l'architecture

de la SVZ. Cette description est celle utilisée dans le paragraphe précédent sur la structure de la niche neurogénique, ainsi le focus sera fait ici sur l'identification des NSC. Dans leur article, les auteurs démontrent que 29% des cellules B1 expriment le marqueur CD133 et qu'elles peuvent proliférer. Ils indiquent donc que les cellules identifiées comme les NSC par Coskun et ses collègues, ne sont pas des cellules épendymaires mais des B1 qui contactent le ventricule. Afin d'étudier la lignée cellulaire de celles-ci, les auteurs utilisent un adénovirus GFAP-cre dans un modèle de souris reporteur. Afin de limiter les possibles diffusions du virus, ils effectuent leurs analyses dans le côté contralatéral à l'injection. Ils indiquent la présence de neuroblastes et de neurones GFP+ dans la SVZ et le bulbe olfactif. De plus, la mise en culture du striatum infecté permet de former des neurosphères GFP+, soit issues des cellules B1. Cet article est particulièrement important dans le domaine de la neurogenèse adulte de la SVZ : il est le premier à montrer que les cellules B1 peuvent proliférer et produire des colonies flottantes. Cependant, ces données dépendent uniquement de la non-diffusion des virus dans le tissu, qui à ce jour n'a jamais été prouvée. Il est important de noter que c'est le premier article qui relie les termes microscopiques « B1 » et fonctionnel « NSC ». Ils basent cette nomenclature sur les articles de Doetsch et ses collègues publiés en 1999, où ils indiquent que les NSC sont des cellules B responsables de la régénération. Cependant, en y prêtant un peu plus d'attention, ceux-ci ne font mention que des cellules de type B.

Les deux autres articles sont sur le système vasculaire et la neurogenèse. Ceux-ci sont largement en accord et indiquent que les cellules mitotiques de la SVZ se situent à proximité des vaisseaux sanguins (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Un de ces articles explore plus en détail l'interface entre les cellules et les vaisseaux (Tavazoie et al., 2008), alors que le second termine sur le rôle des intégrines dans la niche de la SVZ (Shen et al., 2008). Shen et ses collègues sont les seuls à décrire les deux types de cellules B. Ils indiquent que les B1 contactent les vaisseaux sanguins mais que la plupart des cellules B2 ont leur soma sur ceux-ci. Malheureusement, lors de la quantification des cellules en prolifération, ils ne différencient plus les deux types de cellules B. Il est intéressant de noter que les auteurs indiquent qu'il est possible que les cellules de type B qui projettent leur prolongement à travers la couche épendymaire puissent être les NSC actives (aNSC) dès le premier paragraphe des résultats, bien que cette hypothèse ne soit pas basée sur ces quantifications (Shen et al., 2008). Cette publication sera l'une des rares à mentionner les cellules de type B2 pour les 10 années à venir.

8. Les neurosphères sont produites par les aNSC et les progéniteurs

L'article de Pastrana et ses collègues a été cité précédemment pour ses conclusions obtenues sur les cellules responsables de la formation des neurosphères. Ils ont utilisé des souris GFAP-GFP avec l'anticorps anti-EGFR afin de définir trois populations : les GFP+EGFR-, GFP+EGFR+, GFP-EGFR+. Grâce à cette séparation de ces populations par FACS, ils indiquent que seules les deux dernières sont capables de produire des neurosphères pouvant être passées et multipotentes. Grâce à l'infusion d'Ara-C, les auteurs démontrent que l'ensemble des cellules EGFR+ meurent alors que les GFP+EGFR- y sont résistantes. 12h après l'arrêt de l'Ara-C, les cellules GFP+EGFR+ apparaissent. Depuis cet article, les aNSC (NSC activées) sont des astrocytes exprimant EGFR et capables de générer des neurosphères. À l'opposé, les qNSC (NSC quiescentes) sont des cellules EGFR-, ne formant pas de neurosphères et résistantes à l'Ara-C. Dans leur discussion, les auteurs suggèrent que les qNSC sont en amont des aNSC mais malheureusement ne valident pas cette hypothèse par un traçage de lignée (Pastrana et al., 2009).

C'est en 2010 qu'un des premiers articles de FACS suivi d'un séquençage de l'ARN apparait dans le domaine de la neurogenèse adulte. Cet article, publié par le laboratoire du Dr Götz, combine les techniques classiques d'immunomarquages, de traçage de la lignée cellulaire avec les techniques plus récentes. Pour cette étude, les auteurs utilisent les souris transgéniques GFAP-GFP et l'antigène CD133 (Prominin-1). La caractérisation de ce modèle indique que la majorité des cellules GFP+ sont CD133-. Cependant, les cellules possédant le double marquage sont au centre des *pinwheels* avec des prolongements sur les vaisseaux sanguins, soit des cellules B1. Il est important de noter que les auteurs indiquent qu'ils sont capables d'observer des neuroblastes GFP+ DCX+ ainsi que des cellules E multiciliées GFAP+ et CD133+ (Beckervordersandforth et al., 2010). Ces dernières ont déjà été reportées à au moins deux reprises par les laboratoires du Dr Conover et du Dr Bordey (Luo et al., 2006; Platel et al., 2009). Afin d'effectuer leur suivi de la lignée cellulaire, les auteurs utilisent un système astucieux afin de recombiner les cellules GFAP et CD133 positives. Ce système appelé *Split-Cre* contient la séquence codante de la Cre en 2 fragments : le premier est placé en aval du promoteur humain P2 (soit CD133) alors que le second est sous le contrôle du promoteur GFAP. Lors de l'injection de ces deux virus distincts, seules les cellules capables d'activer les deux promoteurs pourront

être recombinaées. Dans cette expérience, les auteurs indiquent que certaines cellules GFP+ ont une morphologie radiale suggérant des cellules B1. De plus, ces cellules recombinaées participent à la neurogenèse adulte puisqu'ils observent des cellules GFP+DCX+ et GFP+NeuN+ (neurones immatures et matures respectivement), indiquant que ce sont des NSC. Afin de confirmer leur identité, les auteurs les mettent en culture après un FACS : 72% des cellules recombinaées sont capables de former des neurosphères pouvant être passées et multipotentes. Enfin, les auteurs terminent leur article en comparant le transcriptome des NSC, des astrocytes et des cellules épendymaires. De façon étonnante, ils remarquent que les cellules de type E sont plus similaires aux astrocytes qu'aux NSC, indiquant que ces dernières possèdent une signature spécifique particulièrement attribuable aux gènes impliqués dans le destin neurogénique. De plus, ils indiquent que le gène FoxJ1, jusqu'ici attribué uniquement aux cellules épendymaires, est aussi présent dans les NSC. Pour finir, les auteurs laissent une interprétation ouverte sur les 30% de cellules GFP+CD133+ ne formant pas de neurosphères : celles-ci pourraient être des cellules quiescentes ou ne possédant pas les caractéristiques des NSC (Beckervordersandforth et al., 2010).

9. La description spatiale des cellules de type B1

L'article du laboratoire du Dr Conover est un des derniers articles basés uniquement sur la caractérisation microscopique qui sera discuté dans ce paragraphe. Bien que celui-ci est basé sur les changements physiques de la SVZ lors du vieillissement, plusieurs informations peuvent en être extraites. Grâce au comptage de l'ensemble des murs latéraux (*wholemout*), les auteurs indiquent que les souris adultes (de 3 à 6 mois) possèdent 400 *pinwheels*/mm² pour 1000 NSC/mm². Une des données particulièrement importantes est qu'ils comptent environ 20 NSC en prolifération /mm², ce qui représente 2,5% des NSC totales. Lors du vieillissement, les auteurs démontrent que le nombre de *pinwheels* et de NSC diminue. Ils en concluent que les NSC adultes ne possèdent pas une capacité d'autorenouvellement illimité (Shook et al., 2012).

10. Les cellules souches neurales ont une diversité moléculaire

L'équipe de recherche du Dr Taylor démontre l'hétérogénéité des NSC. Dans cet article, les NSC sont décrites comme étant des B1. Les auteurs basent leur article sur les marqueurs GFAP, BLBP et l'effecteur de Notch : Hes5. Grâce au traçage de lignée avec les souris Hes5::CreER^{T2}, ils reportent la présence de neuroblastes dans la SVZ et de neurones dans les bulbes, indiquant que ce marqueur est présent dans les NSC. De plus, leurs modèles leur permettent de déterminer trois populations de cellules B1 Hes5+ : les GFAP+BLBP-, les GFAP+BLBP+ et les GFAP-BLBP+, qu'ils appellent type 1, 2 et 3 respectivement. Grâce à l'observation de ces différentes populations, ils indiquent une hétérogénéité de populations cellulaires. Afin de déterminer l'activation de ces trois populations, ils trient au FACS les SVZ de souris Hes5::GFP et Blbp::mCherry avant de les mettre en culture. Ils notent que les cellules doubles négatives ne produisent aucune neurosphère alors que les Hes5+BLBP+ (types 2 et 3) les génèrent plus efficacement que les cellules Hes5+BLBP- et Hes5-BLBP+ (type 1 et progéniteurs respectivement). Il est intéressant de noter que 53% des cellules Hes5+BLBP- génèrent *in vitro* des cellules Hes5+BLBP+, indiquant une hiérarchie. En regardant la présence d'EGFR, les auteurs indiquent que la majorité de cellules Hes5+BLBP+ le possède pour seulement 13% des Hes5+BLBP-. Ces résultats, cohérents avec ceux obtenus par Pastrana et ses collègues, indiquent que les aNSC sont Hes5+ et BLBP+. Ces cellules sont capables de répondre à une infusion d'EGF et d'être partiellement marquées avec du BrdU. Enfin, ces cellules Hes5+ BLBP+ sont des LRC. Les auteurs en déduisent donc que celles-ci se divisent rarement, probablement en sortant du cycle cellulaire, bien qu'elles ne deviennent pas des cellules de type 1 (Giachino et al., 2014).

11. Les GEPCOT et leurs précurseurs : les pré-GEPCOT

Dans sa publication, le laboratoire du Dr Morrison désire vérifier quel type de NSC est responsable de la formation des neurosphères. Pour cela, Mich et ses collègues utilisent une approche par FACS combinant 8 différents marqueurs afin de purifier une sous-population : les GEPCOT. Ces dernières possèdent une expression modérée de GLAST, forte d'EGFR et PlexinB2 et faible ou négative de CD24, O4, PSA-NCAM, Ter199 et CD45 (Tableau 1). Ces

cellules représentent 3% des cellules de la SVZ et 36% d'entre elles génèrent des neurosphères multipotentes et capables d'autorenouvellement. *In vivo*, ces cellules peuvent être marquées par des injections de BrdU. Les auteurs déterminent une seconde population de cellules qu'ils nomment pré-GEPCOT. Celles-ci diffèrent puisqu'elles présentent une expression forte de GLAST, modérée de PlexinB2 et faible ou négative pour les six autres marqueurs. Elles représentent 6% des cellules de la SVZ et ne sont que très rarement capables de former des colonies flottantes. Les auteurs cherchent par la suite à démontrer que les pré-GEPCOT sont les précurseurs des GEPCOT. Pour cela, ils utilisent des souris GFAP-CreER^{T2} croisées avec un modèle reporteur inducible au Tamoxifen. Après l'induction, 29% des cellules recombinaées sont des pré-GEPCOT pour 7% de GEPCOT ; cependant après 28 jours, les pourcentages augmentent à 44 et 32% respectivement. Ces données indiquent donc que les pré-GEPCOT sont capables de produire les GEPCOT. Au microscope, les auteurs indiquent que certaines pré-GEPCOT possèdent la morphologie et la position des cellules de types B1 alors que les GEPCOT sont majoritairement de type C. Enfin, les auteurs démontrent qu'un antimitotique permet l'élimination des GEPCOT mais pas des pré-GEPCOT. De plus, un second traitement antimitotique 12 jours après le premier induit une déplétion des pré-GEPCOT à long terme (Mich et al., 2014). Cet article est particulièrement important car c'est le premier à mettre en lumière la possibilité que les qNSC puissent générer des aNSC. Cependant, leur technique d'isolation de ces deux populations ne permet pas d'obtenir des populations purifiées. En effet, les GEPCOT contiennent les progéniteurs (cellules de type C) et des aNSC.

12. Identification des cellules souches neurales quiescentes

Un second article est sorti peu après, utilisant une approche similaire à celle de Pastrana et ses collègues, utilisant les souris GFAP::GFP, mais en ajoutant le marqueur CD133. Dans celle-ci, le laboratoire du Dr Doetsch indique qu'il existe deux populations d'astrocytes exprimant celui-ci : les GFP+CD133+EGFR-, possédant un cil primaire et les GFP+CD133+EGFR+. Dans ces dernières, le marquage à CD133 est diffus et le cil est absent. La population GFP+CD133+EGFR+ est largement plus présente dans le cycle cellulaire, puisque le FACS détecte 60% de ces cellules en prolifération et très peu dans les cellules GFP+CD133+EGFR-. Il n'est donc pas étonnant que la première population soit éliminée par

l'Ara-C alors que la seconde y est résistante. Par la suite, les auteurs testent la capacité de formation de neurosphères des cellules GFP+CD133+EGFR+ et GFP+CD133+EGFR-. Alors que 48% de la première population en est apte, moins de 1% de la seconde y parvient. De plus, les cellules GFP+CD133+EGFR- nécessite 1 semaine de plus pour produire des colonies flottantes. Les auteurs reportent que les cellules GFP+CD133+EGFR- sont capables de produire des GFP+CD133+EGFR+ et inversement, impliquant qu'*in vitro* les cellules soient capables de se convertir. La transplantation de ces deux populations permet de générer des neurones dans les bulbes olfactifs. Cependant, la population EGFR négative nécessite un plus grand délai. Grâce à l'ensemble de ces expériences, les auteurs ont démontré que les cellules GFP+CD133+EGFR+ sont des aNSC alors que les GFP+CD133+EGFR- sont des qNSC. Les auteurs terminent leur article par une analyse de l'expression des gènes dans ces populations. Ils indiquent que les propriétés moléculaires de celles-ci sont différentes puisque, par exemple, les aNSC ont un transcriptome enrichi avec les gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la transcription et la traduction alors que les qNSC présentent une régulation plus importante de la communication ou l'adhésion cellulaire (Codega et al., 2014).

13. La découverte des cellules souches neurales primitives

Le prochain article discuté est innovateur et démontre l'existence d'une nouvelle population de NSC. En effet, le laboratoire du Dr Morshead, démontre la présence des cellules souches neurales primitives (pNSC). Ces dernières ne sont pas une sous-population astrocytaire et peuvent générer des neurosphères multipotentes et capables d'autorenouvellement lorsque le facteur LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) est présent dans leur milieu de culture. Cependant, ce taux de formation est très faible puisque seulement une cellule sur 40 000 forme une colonie. *In vitro*, les auteurs démontrent que ces cellules, GFAP- qui répondent au facteur LIF, sont capables de produire les aNSC capables de produire des neurosphères en présence d'EGF. Grâce à des immunomarquages, ils démontrent que les pNSC expriment Oct4 (*octamer-binding transcription factor 4*). Grâce aux souris Oct4-GFP, ils indiquent que les pNSC sont situées dans la région périventriculaire de la SVZ et représentent environ 80 cellules. Avec différentes approches utilisant le GCV dans des souris GFAP-TK suivi par une mise en culture, les auteurs indiquent que les pNSC régénèrent les NSC astrocytaires. Cependant, lorsque les auteurs

induisent la mort des pNSC avant d'induire la suppression des cellules mitotiques, ils n'observent plus de neurosphère. Leurs résultats indiquent donc que les pNSC sont des cellules en amont de celles-ci. Enfin, la transplantation des pNSC permet d'observer leur descendance dans les bulbes olfactifs, impliquant leur potentiel neurogénique (Sachewsky et al., 2014). Cet article est particulièrement intéressant car il dévoile une nouvelle population de NSC ayant des caractéristiques différentes de celles des NSC astrocytaires. Cependant, une expérience majeure est absente : le traçage de lignée de ces cellules *in vivo* afin de déterminer leur rôle physiologique dans la neurogenèse adulte.

14. Les cellules souches neurogéniques sont éphémères

De retour sur l'étude des NSC astrocytaire, l'article de Filippo Calzolari et de ses collègues induit aussi un changement majeur dans la visualisation de la lignée des NSC. Grâce à des souris $Glast^{CreERT2}$ croisées avec des souris Confetti et induites avec une faible dose de Tamoxifen, les auteurs peuvent suivre de rares cellules recombinaisons. Ce modèle est astucieux puisque les souris Confetti sont des modèles reporteurs qui induisent la fluorescence dans plusieurs couleurs, permettant de pouvoir suivre la lignée d'une cellule en fonction de son fluorophore. À différents temps post-induction, les auteurs décrivent plusieurs types de clones : les émergents, les matures et les inactifs. Les premiers contiennent des progéniteurs et des neuroblastes, le second possède des progéniteurs et des neurones matures et enfin le troisième ne présente que des neurones matures. Grâce à leurs différentes analyses, les auteurs parviennent à étudier la dynamique de la prolifération des NSC et indiquent que celles-ci vont se diviser à plusieurs reprises, produisant plusieurs vagues de progéniteurs sur une courte période, puis disparaître de la SVZ (Calzolari et al., 2015). Cet article est très important puisque c'est le premier à indiquer que les NSC neurogéniques sont éphémères. Par conséquent, il est nécessaire de les remplacer par d'autres NSC doivent donc être quiescentes. Tel que mentionné précédemment, jusqu'à cet article, les chercheurs pensaient que les qNSC avaient un cycle cellulaire lent. En 2014, il est donc nécessaire de revoir la définition de ces cellules : ainsi, les qNSC deviennent des cellules résistantes aux antimitotiques puisqu'elles sont dormantes.

Ces données sont soutenues par un autre article dont le sujet principal est la production des NSC adultes. Cette publication a été citée précédemment car elle démontre que les NSC

adultes sont produites par les glies radiaires lors de la neurogenèse embryonnaire. Dans celle-ci les auteurs utilisent deux approches afin de démontrer que les NSC adultes restent en dormance. Grâce à leur virus « code-barre », ils observent que plus de la moitié des NSC recombinées ne possèdent pas de descendances dans les bulbes olfactifs. De plus, ils injectent des souris gestantes avec du BrdU au moment de la production des NSC adultes (E15,5) et remarquent que 4 semaines plus tard, l'intensité de BrdU est forte, impliquant que les cellules n'ont pas dilué l'agent intercalant lors de divisions. Les auteurs en concluent que les NSC adultes, une fois produites, restent en dormance jusqu'à leur activation afin de produire des neurones. Ils finissent par indiquer que leurs observations vont à l'encontre de l'idée de l'autorenouvellement des NSC *in vivo* (Fuentelba et al., 2015).

15. Les analyses transcriptomiques de cellules individuelles

À la suite des articles de Mich et de Codega et leurs collègues, les séquençages des ARN se sont faits plus fréquents. Récemment, deux articles principaux se démarquent par leurs analyses puisqu'elles sont réalisées sur des cellules individuelles. Le premier, du laboratoire du Dr Martin-Villalba, s'intéresse principalement aux NSC dormantes (qNSC) et leur activation. Grâce à la combinaison de 7 anticorps, les auteurs parviennent à isoler différentes populations dont ils analyseront 104 cellules GLAST+Prom1+ (Tableau 1). Puisque la transplantation de ces cellules permet d'observer la neurogenèse, ils considèrent ces cellules comme des NSC. Sur ces 104 cellules, les auteurs distinguent deux grandes populations en fonction de l'expression des gènes associés au cycle cellulaire (dont EGFR), ce qui leur permet de séparer les aNSC des qNSC. De plus, ils remarquent que ces populations peuvent être à nouveau divisées en deux. Ils obtiennent un continuum avec la lignée cellulaire suivante : les astrocytes différenciés sont à une extrémité, suivi par les qNSC1, puis les qNSC2, ensuite les aNSC1 et enfin les aNSC2. De façon très schématique, les qNSC1 sont dormantes, les qNSC2 sont des cellules quiescentes amorcées (de l'anglais *prime*), les aNSC1 sont non-mitotiques et enfin les aNSC2 sont dans le cycle cellulaire. De très nombreux groupes de gènes sont plus ou moins présents dans ces dernières, dont ceux pour la lipogenèse, le cycle cellulaire, la glycolyse, etc. Ainsi chaque population possède un profil moléculaire distinct. Les auteurs terminent leur article en démontrant qu'en cas d'ischémie, cas pathologique reconnu pour activer la neurogenèse (Faiz

et al., 2015), les NSC deviennent plus actives. En effet, la lésion diminue la population de qNSC1 de 40 à 6%, alors que les populations de qNSC2 augmentent de 26 à 37% et les aNSC de 33 à 55% (Llorens-Bobadilla et al., 2015).

Le second article est celui du laboratoire du Dr Brunet qui se propose d'étudier le sujet de l'hétérogénéité des NSC. Pour cela, ils effectuent un séquençage des ARN sur 329 cellules triées par FACS, en utilisant l'approche de Codega et ses collègues (Tableau 1). Les auteurs définissent quatre populations cellulaires : les astrocytes différenciés, les qNSC, les aNSC et les progéniteurs. Cet article retrouve beaucoup de similitudes avec celui de Llorens-Bobadilla et ses collègues tout en ajoutant de nouvelles données. Par exemple, la transition entre les q et les aNSC commence par une augmentation de la régulation de la biogenèse de ribosomes puis par les marqueurs du cycle cellulaire. Dans cette publication, les aNSC sont divisées en trois sous-populations : les précoces (*early*), les intermédiaires (*middle*) et les tardives (*late*). Par exemple, le passage de la première à la seconde se fait par l'augmentation de l'expression des gènes liés au cycle cellulaire alors que le cheminement à la troisième est réalisé par une diminution de l'activité des gènes impliqués dans l'identité astrocytaire. Les auteurs terminent leur article par une méta-analyse de leurs données avec celles obtenues par Llorens-Bobadilla et ses collègues. Bien que la combinaison antigénique utilisée pour le triage cellulaire soit différente, ils indiquent que les deux publications ont des résultats très similaires (Dulken et al., 2017).

16. Les pNSC produisent les NSC astrocytaires lors de la régénération de la SVZ

Le laboratoire du Dr Van Der Kooy, continue les recherches sur les pNSC commencées par celui du Dr Morshead. Les méthodes utilisées dans celui-ci restent très similaires au précédent avec des traitements *in vivo* puis la mise en culture en présence de LIF. Pour commencer, les auteurs utilisent des souris H2B-GFP afin d'observer la division des NSC *in vivo* avant la mise en culture. Ils notent qu'immédiatement après 6 semaines de Doxycycline, 44% et 41% des neurosphères issues des NSC astrocytaires et des pNSC sont vertes, impliquant qu'elles se sont divisées lors de l'administration de la drogue. Cependant, la mise en culture de la SVZ, plusieurs semaines après l'arrêt de la Doxycycline, indique que l'intensité des neurosphères produites par les pNSC est similaire alors que celles produites par les NSC

astrocytaires sont plus faibles. Ces données suggèrent que les pNSC se divisent moins fréquemment. Les auteurs leur ont calculé une entrée dans le cycle cellulaire tous les 3-5 mois, soit environ 5 à 8 divisions sur la vie d'une souris. Grâce à l'utilisation de souris knockout conditionnelles pour Oct4 croisées avec des GFAP-TK, dans lesquelles les pNSC ne sont pas fonctionnelles, les auteurs ont pu réaliser une double élimination des cellules en prolifération. Dans cette expérience, 50% des souris ne présentent aucune régénération de la SVZ. Afin de prouver que ce sont les pNSC qui se divisent pour générer les NSC astrocytaires, les auteurs traitent les souris H2B-GFP avec de l'antimitotique. Ils notent que les neurosphères issues des pNSC présentent un marquage plus faible, suggérant que les pNSC se soient divisées pour permettre la régénération. Pour conclure, les auteurs indiquent que les pNSC seraient en amont de toutes les NSC astrocytaires connues, que ce soit les pré-GEPCOT, qNSC, GEPCOT et aNSC (Reeve et al., 2017). Cependant, en l'absence d'un traçage de lignée, cette affirmation ne peut pas être confirmée.

17. La neurogenèse adulte est maintenue par des divisions symétriques

Récemment, le laboratoire du Dr Alvarez-Buylla a publié un article sur la biologie des cellules de type B1 mitotiques. Dans celui-ci, Kristen Obernier et ses collègues utilisent des souris Nestin::Cre^{ERT2} ou GFAP::CreERT2 croisées avec un modèle reporteur. De plus, ils ont recours à l'injection de rétrovirus RCAS (*Replication-Competent Avian Sarcoma-leukosis*) dans des souris GFAP-TVA (*Tumor Virus A*). Dans ce dernier, le virus pénètre que les cellules présentant le récepteur TVA et s'intègre au génome lors de la division de la cellule infectée. Les auteurs indiquent que cette technique permet de marquer les cellules B1 mitotiques. C'est ainsi qu'ils démontrent que les B1 se divisent symétriquement. La majorité (80%) produit des progéniteurs, ce qui induit la disparition des cellules mères, et le reste (20%) permet l'autorenouvellement des NSC. Les chercheurs indiquent que ces NSC filles sont capables de produire des progéniteurs une fois qu'elles sont activées. De plus, ce laboratoire mentionne à nouveau les cellules de type B2 puisqu'ils montrent que la division des cellules B1 peut produire des cellules de type B2. C'est donc la première publication qui révèle que ces deux types cellulaires appartiennent à la même lignée (Obernier et al., 2018). Cet article est particulièrement intéressant puisqu'il suggère que les aNSC, dans le cycle cellulaire, sont un type de cellule

particulièrement éphémère puisque leur division ne dure que 17h (Ponti et al., 2013). Il soutient donc la conclusion faite par Calzolari et ses collègues sur le rôle temporaire des aNSC. Cependant, ceux-ci indiquaient que ces dernières effectuaient plusieurs divisions avant de disparaître. L'équipe de recherche du Dr Alvarez-Buylla, qui ne retrouve pas ces résultats, suggère que ce soit les cellules issues de l'autorenouvellement qui avaient été observées et par conséquent qui soient restées plus longtemps dans la SVZ (Calzolari et al., 2015; Obernier et al., 2018). Il est intéressant de noter que dans la discussion de cet article, les auteurs mentionnent que les cellules B2 pourraient être une réserve de NSC pour maintenir la neurogenèse adulte, une fois que les B1 sont épuisées. Cette hypothèse n'étant pas directement extraite des données de cet article, il est possible de supposer que le groupe de recherche publiera prochainement un article expliquant celle-ci. Cette publication est arrivée à extraire des résultats à la limite des approches expérimentales utilisées. En effet, le système RCAS-TVA n'est pas le plus efficace pour étudier les divisions cellulaires puisqu'il ne permet que le marquage d'une seule cellule fille. De plus, aucune de leurs approches génétiques ne permet de différencier les cellules de type B1 et B2. L'analyse microscopique des SVZ *ex vivo* reste artificielle et les résultats obtenus peuvent être différents dans le contexte *in vivo*.

18. L'homéostasie des protéines est différente dans les cellules souches neurales quiescentes et actives

Le séquençage des ARN, particulièrement populaire ces dernières années, a permis au groupe de recherche d'Anne Brunet de démontrer que les NSC quiescentes et actives possédaient une homéostasie protéique différente. Pour cela, les auteurs ont trié par FACS cinq populations cellulaires grâce à des marquages CD31, CD133, EGFR, CD45 et CD24 sur des souris GFAP::GFP avant d'effectuer une analyses des transcrits. Leurs analyses bio-informatiques indiquent que les aNSC possèdent une forte expression des gènes impliqués dans la dégradation des protéines via le protéasome alors que les qNSC expriment ceux concernant les lysosomes. Ces données démontrent que les NSC, selon leur état d'activation, ne mobilisent pas les mêmes dispositifs de régulation des protéines (Leeman et al., 2018). Leurs résultats sont confirmés par des immunomarquages démontrant que les qNSC possèdent des lysosomes plus

nombreux mais aussi plus larges que les aNSC. Ceux-ci sont fonctionnels puisqu'ils ont l'acidité requise pour l'activité protéolytique. De plus, ceux-ci peuvent être retrouvés en complexe avec les autophagosomes afin de former des autolysosomes. Les auteurs notent cependant que la dégradation protéique est plus rapide dans les aNSC que les qNSC. Il semble donc logique que les qNSC présentent une accumulation plus importante d'agrégats protéiques même s'il est déjà reconnu et accepté que la production des chaînes polypeptidiques est plus faible dans les cellules quiescentes (Leeman et al., 2018; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Valcourt et al., 2012). Les auteurs terminent leur publication en démontrant l'importance de ce mécanisme dans le maintien de la quiescence des qNSC. Grâce à la mise en culture des cellules triées en présence de la Bafilomycine A, molécule permettant de bloquer l'acidification des lysosomes, et de déprivation de nutriment, Leeman et al. indiquent que la stimulation du mécanisme lysosome-autophagie permet d'augmenter l'activation des qNSC en réponse à des facteurs de croissance (Leeman et al., 2018). Ainsi, les auteurs concluent que la suppression des agrégats protéiques permet de fournir l'énergie nécessaire à l'activation des qNSC. Ce mécanisme de dégradation pourrait aussi être un moyen de limiter la propagation d'agrégats toxiques dans la lignée neurales (Leeman et al., 2018).

19. Les cellules épendymaires ne sont pas des cellules souches

Le dernier article discuté dans cette partie est celui de Shah et al.. Ce dernier nous renvoie à nouveau dans le débat des cellules épendymaires et leur(s) possible(s) rôle(s) neurogénique(s). Dans cette publication, les auteurs indiquent qu'ils ont trouvé un marqueur spécifique des cellules E : l' α SMA (*alpha smooth muscle actin*). Grâce au croisement de souris α SMACreER^{T2} avec des souris reporteur, ils démontrent que les cellules épendymaires ne prolifèrent ni ne survivent *in vitro* en présence de différents facteurs de croissance (Shah et al., 2018). Ces données sont donc en opposition à celles publiées par Johansson et al. (Johansson et al., 1999). Le laboratoire du Dr Biernaskie a, par la suite, effectué un tri cellulaire en fonction de l'expression de l' α SMA et de Sox2 avant d'analyser le profil transcriptionnel de cellule individuelle. Il est intéressant de noter que les cellules épendymaires partagent moins de 5% des transcrits avec les aNSC ou les neuroblastes. En revanche, celles-ci sont très fortement similaires

aux qNSC puisque plus de 88% des ARN sont identiques dans ces deux populations (Shah et al., 2018). Par la suite, les auteurs ont démontré que les cellules épendymaires ne pouvaient pas s'activer en réponse à une lésion. Pour cela, ils ont induit une hémorragie intracérébrale dans le striatum via l'injection de collagénase. Leurs observations à 1 ou 4 semaines post-lésion ne démontrent aucun signe de prolifération des cellules E. Cependant, ils indiquent que les cellules α SMA positives surexpriment de façon temporaire GFAP. Ces données sont confirmées sur de jeunes souris (P10). A nouveau, aucun signe neurogénique de la part des cellules épendymaires n'est observé (Shah et al., 2018). Ces résultats sont donc en opposition avec ceux obtenus par Carlen et ses collègues (Carlen et al., 2009).

Pour conclure, les auteurs indiquent que leurs résultats ne permettent pas de supposer que les cellules épendymaires possèdent des caractéristiques de cellules souches, même si celles-ci possèdent de nombreux gènes en communs avec les qNSC (Katakura et al., 2009).

20. Résumé et interrogations

Depuis le début de ce paragraphe, une trentaine d'articles ont été passés en revue sur l'identité des NSC adultes. Dans cette section, un court récapitulatif va être effectué selon les principales caractéristiques, avant de discuter les questions en suspens.

Les cellules souches neurales sont hétérogènes et comprennent au moins deux populations : les astrocytaires (GFAP positives) et les primitives (Oct4 positives). Les premières génèrent des neurosphères en présence d'EGF et les secondes avec LIF (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b; Doetsch et al., 2002; Morshead et al., 2003; Reeve et al., 2017; Sachewsky et al., 2014). Les pNSC sont capables de générer des NSC astrocytaires *in vitro* et lors de la régénération de la SVZ (Reeve et al., 2017; Sachewsky et al., 2014).

Les cellules souches neurales actives (aNSC) sont neurogéniques, capables de former des neurosphères et possèdent le récepteur EGFR (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014; Doetsch et al., 2002; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Morshead and van der Kooy, 1992; Pastrana et al., 2009). Les cellules souches neurales quiescentes (qNSC) sont EGFR négatives et ne produisent pas de neurosphères en présence d'EGF. Elles peuvent produire des neurones lors de transplantations (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014;

Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Pastrana et al., 2009). Les cellules de type B1 et B2 sont capables de proliférer (Doetsch et al., 1997; Mirzadeh et al., 2008; Obernier et al., 2018; Shook et al., 2012).

Malheureusement, les articles cités précédemment ne permettent pas de définir quel(s) type(s) fonctionnel(s) (aNSC ou qNSC) apparten(en)nt à quel(s) type(s) cellulaire(s) (B1 ou B2), ou si les deux premiers sont présents dans les deux derniers. De plus, le caractère temporaire des aNSC nécessite la présence de cellules réservoirs permettant de les remplacer tout au long de la vie. Il a donc été supposé que les qNSC, similaires par leurs propriétés antigéniques, remplissent cette fonction. Cependant, physiologiquement et *in vivo*, il n'existe aucune preuve que les qNSC deviennent des aNSC pour produire des neurones.

Le croisement de l'analyse fonctionnelle et microscopique est rendu difficile par le manque de marqueurs spécifiques des différents types de cellules souches neurales en fonction de leur localisation. En effet, les marqueurs cellulaires n'étant pas parfaitement établis, dans l'espace, dans les types cellulaires et dans la lignée, les tris par FACS ne permettent pas une isolation parfaite des sous-populations. Par exemple, CD133 est reconnu pour être présent sur les cils primaires des cellules B1. Cependant, il a été indiqué que les cellules de type B2 possédaient aussi un cil primaire, bien qu'il ne soit pas défini si celui-ci est CD133 positif (Capilla-Gonzalez et al., 2014).

De nombreuses questions restent en suspens pour l'étude de la neurogenèse adulte puisqu'il est difficile d'étudier les NSC individuellement dans leur contexte *in vivo*. Notre compréhension de cette biologie est largement obtenue grâce à des modèles *ex vivo* tels que la culture ou le FACS. Malheureusement, celles-ci supposent une homogénéité cellulaire. Cependant, il a déjà été démontré que les NSC sont hétérogènes et peuvent être divisées en plusieurs sous-populations. Ces dernières peuvent différer par leur localisation, leur morphologie ou encore pour leur(s) fonction(s). De plus, il reste envisageable que chacune de ces sous-populations puisse être encore hiérarchisée et présente sous différents états d'activation ou de dormance. La difficulté majeure est de caractériser des populations de précurseurs neuraux dont nous ne connaissons pas l'existence ni les caractéristiques. Techniquement parlant, chaque approche doit être interprétée avec précaution puisqu'elle peut inclure une ou plusieurs populations de cellules (Goritz and Frisen, 2012).

E. Hypothèses, Objectifs et approche expérimentale

Objectif principal : Comprendre les mécanismes d'activation des précurseurs neuraux afin de moduler la neurogenèse adulte de la zone sous-ventriculaire.

Hypothèses :

1. Lors de la neurogenèse adulte, la quiescence est un signal dominant sur la prolifération pour les précurseurs neuraux.
 - Objectif : Identifier la dominance des signaux de quiescence et de prolifération sur les précurseurs neuraux.
2. L'électroporation est une technique permettant de cibler les cellules souches neurales adultes de façon spécifique.
 - Objectif : Développer et caractériser une technique permettant l'étude fonctionnelle des cellules B1.
3. Les cellules souches neurales adultes quiescentes sont en amont des actives et permettent le maintien de la neurogenèse tout au long de la vie.
 - Objectif : Définir le(s) rôle(s) fonctionnel(s) des cellules quiescentes B1.

Approche expérimentale :

Afin de définir la dominance des signaux de quiescence et de prolifération, nous avons choisi d'utiliser deux facteurs extrinsèques reconnus pour ses comportements cellulaires, à savoir BMP et EGF respectivement. Nous avons tiré avantage de la culture cellulaire via des protocoles classiques et modifiés de croissance de neurosphères et de différenciation afin de déterminer l'activation des NSC, leur autorenouvellement ainsi que l'expansion des précurseurs. Ces résultats ont été validés *in vivo* grâce à des infusions intracérébroventriculaires et la modification des voies de signalisation.

Par la suite, nous avons développé et caractérisé l'électroporation plasmidique. Grâce à l'utilisation du promoteur spécifique GFAP, nous avons été capables d'observer une population cellulaire qui contacte le ventricule, les cellules B1. L'étude fonctionnelle de celle-ci a été

réalisée grâce à différentes approches de mise en culture, de traçage de lignée cellulaire, d'infusions intracérébroventriculaires et de modification de la voie de signalisation d'EGF.

Le travail effectué lors de ma thèse a permis de contribuer aux articles suivants :

1. Annexe A : Paliouras GN, Hamilton LK, Aumont A, **Joppé SE**, Barnabé-Heider F, Fernandes KJ. Mammalian target of rapamycin signaling is a key regulator of the transit-amplifying progenitor pool in the adult and aging forebrain. *J Neurosci*. 2012 Oct 24;32(43):15012-26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2248-12.2012.
2. Annexe B : Hamilton LK, **Joppé SE**, Cochard LM and Fernandes KJ. Review: Aging and neurogenesis in the adult forebrain: what we have learned and where we should go from here. *Eur J Neurosci*. 2013 Jun;37(12):1978-86. doi: 10.1111/ejn.12207.
3. Annexe C : Hamilton LK, Dufresne M, **Joppé SE**, Petryszyn S, Aumont A, Calon F, Barnabé-Heider F, Furtos A, Parent M, Chaurand P, Fernandes KJ. Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell*. 2015 Oct 1;17(4):397-411. doi: 10.1016/j.stem.2015.08.001. Epub 2015 Aug 27.
4. Chapitre II : **Joppé SE**, Hamilton LK, Cochard LM, Levros LC, Aumont A, Barnabé-Heider F and Fernandes KJ. Bone morphogenetic protein dominantly suppresses epidermal growth factor-induced proliferative expansion of adult forebrain neural precursors. *Front Neurosci*. 2015 Oct 29;9:407. doi: 10.3389/fnins.2015.00407. eCollection 2015.
5. Chapitre III : **Joppé SE**, Cochard LM, Hamilton LK, Ameslon P, Levros LC, Aumont A and Fernandes KJ. A dormant population of ventricle-contacting neurogenic precursors revealed by genetic targeting in the adult murine brain. Soumission prévue en mars 2018.

Chapitre 2

Premier article

II. Bone morphogenetic protein dominantly suppresses epidermal growth factor-induced proliferative expansion of adult forebrain neural precursors

Bone morphogenetic protein dominantly suppresses epidermal growth factor-induced proliferative expansion of adult forebrain neural precursors

Sandra E. Joppé¹, Laura K. Hamilton¹, Loic M. Cochard¹, Louis-Charles Levros¹, Anne Aumont¹, Fanie Barnabé-Heider², Karl J. L. Fernandes¹

¹Research Center of the University of Montreal Hospital (CRCHUM), CNS Research Group (GRSNC), Department of Pathology and Cell Biology, and Department of Neurosciences, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

²Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

A. Mise en contexte

Au moment de cette étude, il est accepté que les cellules souches neurales adultes permettent la production d'un grand nombre de neurones tout au long de la vie. Seulement une petite fraction d'entre elles sont dans le cycle cellulaire : la majorité des NSC sont quiescentes et ne se divisent qu'environ toutes les trois semaines (Morshead 1994). Ces mitoses produisent des progéniteurs fortement mitotiques permettant une amplification cellulaire. La neurogenèse adulte est donc régulée par deux balances. La première, au niveau des NSC, permet la gestion entre la prolifération et la quiescence. La seconde, chez les progéniteurs, permet de réguler la prolifération et la différenciation de ces derniers.

Ces deux régulations sont reconnues pour impliquer de nombreux facteurs de croissance dont EGF (*Epidermal Growth Factor*) et BMP (*Bone Morphogenetic Protein*). EGF est un des ligands les plus connus pour stimuler la prolifération des NSC et des progéniteurs, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Codega et al., 2014; Craig et al., 1996; Doetsch et al., 2002; Paliouras et al., 2012; Pastrana et al., 2009; Reynolds and Weiss, 1992; Sun et al., 2005). A l'opposé, le rôle de BMP est un peu plus flou mais plusieurs groupes s'accordent sur son rôle anti-neurogénique, que ce soit sur la prolifération observée dans les niches ou dans la production de nouveaux neurones (Bonaguidi et al., 2008; Bond et al., 2012; Bond et al., 2014; Colak et al., 2008; Lim et al., 2000; Mira et al., 2010; Morell et al., 2014).

L'objectif principal de cette étude est de définir comment les NSC et les progéniteurs sont capables d'intégrer des signaux prolifératifs ou antiprolifératifs. Pour répondre à cette question, nous avons choisi d'opposer le facteur EGF à BMP, dans différentes conditions *in vitro* et *in vivo*.

B. Abstract

A single asymmetric division by an adult neural stem cell (NSC) ultimately generates dozens of differentiated progeny, a feat made possible by the proliferative expansion of transit-amplifying progenitor cells (TAPs). Although NSC activation and TAP expansion is determined by pro- and anti-proliferative signals found within the niche, remarkably little is known about how these cells integrate simultaneous conflicting signals. We investigated this question focusing on the subventricular zone (SVZ) niche of the adult murine forebrain. Using primary cultures of SVZ cells, we demonstrate that Epidermal Growth Factor (EGF) and Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2 are particularly powerful pro- and anti-proliferative factors for SVZ-derived neural precursors. Dose-response experiments showed that when simultaneously exposed to both signals, BMP dominantly suppressed EGF-induced proliferation; moreover, this dominance extended to all parameters of neural precursor behavior tested, including inhibition of proliferation, modulation of cell cycle, promotion of differentiation, and increase of cell death. BMP's anti-proliferative effect did not involve inhibition of mTORC1 or ERK signaling, key mediators of EGF-induced proliferation, and had distinct stage-specific consequences, promoting TAP differentiation but NSC quiescence. In line with these *in vitro* data, *in vivo* experiments showed that exogenous BMP limits EGF-induced proliferation of TAPs while inhibition of BMP-SMAD signaling promotes activation of quiescent NSCs. These findings clarify the stage-specific effects of BMPs on SVZ neural precursors, and support a hierarchical model in which the anti-proliferative effects of BMP dominate over EGF proliferation signaling to constitutively drive TAP differentiation and NSC quiescence.

Keywords: Adult neurogenesis, Subventricular zone, BMP, EGF, Neural precursors, mTOR.

C. Introduction

Neural stem cells (NSCs) are essential for the normal function, maintenance, and injury-induced repair of the adult central nervous system (CNS). Although only a small percentage of NSCs is cycling at any given moment, they are able to accomplish these critical functions by producing and maintaining a large pool of transit-amplifying progenitor cells (TAPs). In the

forebrain subventricular zone (SVZ) niche, lineage analysis suggests that each TAP undergoes about 3-4 rounds of rapid proliferative expansion before differentiating, allowing a single asymmetric division by an activated NSC to ultimately give rise to as many as 32 neuroblasts (Ponti et al., 2013). TAP-derived neuroblasts and glial cells are required to maintain specific subpopulations of forebrain neural cells (Imayoshi et al., 2008; Luo et al., 2008; Menn et al., 2006) and to contribute to tissue repair following brain injury (Benner et al., 2013; Kolb et al., 2007; Yamashita et al., 2006). Since SVZ NSCs are typically quiescent, re-entering the cell cycle only once every 2-3 weeks (Morshead et al., 1994), NSC roles in CNS homeostasis and repair are critically dependent on both NSC activation and, importantly, the proliferative expansion of their downstream TAPs.

Proliferation of NSCs and TAPs (herein, collectively referred to as neural precursors) is promoted by many families of molecules within the SVZ niche (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Bond et al., 2012; Gage, 2000; Pathania et al., 2010), including the Epidermal Growth Factor (EGF) family. EGF family members signal through the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), a cell surface tyrosine kinase receptor expressed in activated NSCs (Codega et al., 2014; Doetsch et al., 2002; Pastrana et al., 2009) and in the highly proliferative TAPs (Ferron et al., 2011; Sun et al., 2005). Ligand-induced activation of EGFR stimulates proliferation of activated NSCs and TAPs *in vivo* and allows neural precursor expansion as neurospheres *in vitro* (Craig et al., 1996; Paliouras et al., 2012; Reynolds and Weiss, 1992). Conversely, mice deficient for EGFR ligands show reduced SVZ neurogenesis (Tropepe et al., 1997). Multiple downstream signaling cascades are initiated upon EGFR activation, including the Akt-mTOR pathway. EGF treatment of cultured neural precursors stimulates mTOR activation within minutes, and EGF-induced mTOR activation is essential for proliferative expansion of the NSC lineage both *in vitro* and *in vivo* (Feliciano et al., 2011; Hartman et al., 2013; Magri et al., 2011; Paliouras et al., 2012).

The signaling mechanisms that counterbalance EGFR-induced proliferation in order to promote neural precursor quiescence are considerably less understood. Indeed, while many niche-derived factors modulate cell proliferation and/or neurogenesis within the SVZ (Pathania et al., 2010), how the ensemble of these signals is integrated within specific cell populations to coordinate the quiescence/proliferation/differentiation decisions of neural precursors is unclear.

Here, we focused on bone morphogenetic proteins (BMPs). BMPs are expressed locally within the SVZ, where they have been shown to promote production of astrocytes at the expense of neurons and oligodendrocytes (Lim et al., 2000; Morell et al., 2014). Inhibition of endogenous BMP signaling modulates neurogenesis in both the SVZ and dentate gyrus niches, although there is conflicting data that likely reflects unresolved stage-specific effects on the neurogenic lineage and differences between niches (Bonaguidi et al., 2008; Bond et al., 2012; Bond et al., 2014; Colak et al., 2008; Gobeske et al., 2009; Guo et al., 2011; Lim et al., 2000; Mira et al., 2010).

In the present study, we ask how SVZ NSCs and TAPs integrate opposing pro- and anti-proliferation signals. Our findings reveal a hierarchical relationship between two key niche signals, EGFR ligands and BMPs, in regulating the quiescence/proliferation/differentiation decisions of SVZ neural precursors.

D. Materials and methods

1. Animals

C57BL/6 mice at 2-3 months of age were used for this study (Charles River). Experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and were approved by the institutional ethics review committees of the University of Montreal and the Research Center of the University of Montreal Hospital (CRCHUM). *In vivo* procedures were performed with mice under isoflurane general anaesthesia supplemented with injection of Buprivacaine local anaesthetic (Hospira) (1mg/kg). Mice were euthanized by injection of a mixture of ketamine (Bimeda-MTC)/xylazine (Bayer Healthcare)/acepromazine (Boehringer Ingelheim Canada Ltd) (200/10/2mg/kg).

2. Cell culture experiments

Clonally-derived neurosphere cultures were generated from the adult mouse striatum using a protocol based on Reynolds and Weiss (Reynolds and Weiss, 1992) and as detailed

previously (Bouab et al., 2011; Paliouras et al., 2012). Standard neurosphere growth medium consisted of DMEM:F12 (3:1, Invitrogen), Penicillin/Streptomycin (1%, Wisent), Fungizone (1mg/ml, Invitrogen) and B27 (2%, Invitrogen), supplemented with 20ng/ml EGF (Sigma). In some experiments, we used additional extrinsic factors that included FGF-2 (Feldan), BMP-2 (Peprotech), PDGF-AA (Peprotech), VEGF-C (Peprotech) or SHH (Peprotech), as indicated. Cultures of primary neurospheres were passaged by mechanical dissociation and were expanded at a clonal plating density of 2,000 cells/cm². Primary neurospheres were used in quantitative neurosphere assays (i.e., counts of clonally-derived neurospheres). Secondary neurospheres were used when it was necessary to amplify neural precursor numbers for high-density adherent cultures for biochemical and flow cytometry analyses.

For the pro-proliferative assay, neurospheres were mechanically dissociated and plated at a high density of 25,000 cells/cm² in a basal differentiation medium (i.e., neurosphere growth medium in which EGF was replaced with 2% Fetal Bovine Serum (FBS, Wisent)) and treated with 20 ng/ml of each extrinsic factor.

For the anti-proliferative assay, SVZ-derived cells were plated in non-adherent 24-well plates in medium containing a basal EGF concentration of 5 ng/ml (EGF^{low}) to sustain neurosphere formation and treated on day 0 with 100 ng/ml of each extrinsic factor.

For the dose-response experiments, neurospheres were dissociated and plated on coated dishes at a density of 25,000 cells/cm² for 6 days in medium containing 2% FBS to promote cell adherence and survival. Cells were treated on days 0 and 3 with the indicated concentrations of EGF and/or BMP-2.

For Olig2 labelling and Ki67-TUNEL double-labelling, neurospheres were dissociated and plated on coated dishes at a density of 25,000 cells/cm² for two days in medium containing 5 ng/ml EGF (EGF^{low}) and 1% FBS. Adherent cells were treated on day 0 with 100 ng/ml of EGF and/or BMP-2, and were processed after 2-3 days for immunofluorescence labelling.

For the experiments comparing the effects of transient treatment with BMP-2 and Rapamycin treatment, neurospheres were dissociated and plated at 25,000 cells/cm² in medium containing 5 ng/ml EGF (EGF^{low}) and 1% FBS, supplemented with either 100 ng/ml BMP-2 or 20 nM Rapamycin (Tocris). After 24h of treatment (1 DIV), cells were washed twice with

DMEM/F12 and then placed in medium containing 20 ng/ml EGF supplemented with 1% FBS for adherence/survival for an additional 4 days. Cells were lysed daily up to 5 DIV (i.e., up to 4 days after withdrawal of BMP-2 or Rapamycin).

For self-renewal assays, growth factor treatments were performed during primary neurosphere growth, then 60 average-sized primary neurospheres/condition were collected manually, mechanically dissociated, and the cells counted and re-seeded at clonal density (1.5 cells/ μ l) in standard neurosphere growth medium (above); this allowed quantification of the number of secondary neurospheres generated and retrospective calculation of the mean number of neurosphere-forming NSCs that were present per primary neurosphere.

Neurosphere numbers were quantified by plating cells in 24-well plates at the clonal densities indicated above (minimum of 8 wells/treatment/N). Neurosphere sizes were quantified by measuring the diameter of at least 100 neurospheres/condition using ImageJ software (version 1.47v, NIH, USA), and the data expressed using frequency histograms (GraphPad Prism, Version 5.02 (GraphPad Software, Inc)).

3. In vivo experiments

Intracerebroventricular (ICV) infusions were performed using 7 days osmotic pumps (Alzet, model 1007D, Durect) that were attached to brain infusion cannulae (Alzet, Brain infusion kit 3, Durect). Cannulae were stereotaxically implanted at coordinates: 0mm anteroposterior (AP) and 0.9 mm mediolateral (ML) to the bregma. Growth factors were diluted in a vehicle solution (0.1% BSA in PBS) and infused at 400 ng/day. Animals were sacrificed after 5 days.

Adult brain electroporations were performed essentially as described previously (Barnabe-Heider et al., 2008). Briefly, plasmids were stereotaxically injected into the left lateral ventricle using a 1 ml Hamilton syringe (coordinates: 0mm AP, 0.9 mm ML, 1.5mm dorsoventral, relative to Bregma). Each animal received an ICV injection of 2 μ l, delivered over 1.5-2 minutes, containing 10 μ g of each plasmid (20 μ g total). Electrical pulses (5 pulses, 50 ms intervals, 200 mvolts) were delivered using a square wave electroporator (ECM 830, Harvard

Apparatus) with 7mm Platinum Tweezertrodes (Harvard Apparatus). Animals were sacrificed after 3 days, which we determined to yield the peak number of plasmid-expressing cells.

Plasmids were amplified using Maxiprep (Promega), then the DNA precipitated and resuspended in 10mM Tris-EDTA, pH 8, prior to use. GFAP::*myrTomato* and pGFAP::*myrGFP* were gifts from Robert Benezra (Addgene plasmids # 22671 and 22672 respectively)(Nam and Benezra, 2009). CS2 Flag-Smad6 was a gift from Joan Massague (Addgene plasmid # 14961) (Hata et al., 1998). Plasmids were precipitated with ethanol and resuspended in PBS prior to electroporation.

4. Tissue processing

Anaesthetized mice were perfused intracardially with 30 ml PBS pH 7.4 (Wisent) followed by 40 ml of 4% formaldehyde freshly prepared from paraformaldehyde (Acros). Brains were removed and post-fixed overnight at 4°C. Tissues were cut into 40µm sections using a vibrating microtome (Leica VT1000S) and stored at -20°C in antifreeze solution (Bouab et al., 2011).

5. Immunostaining and TUNEL

Immunostaining experiments were performed either using a 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) detection step (brain sections) or a fluorescent secondary antibody detection step (brain sections and cell cultures), as described previously (Bouab et al., 2011; Gregoire et al., 2014). Antibodies are listed in Table 1.

For Ki67-TUNEL double-labelling on cell cultures, immunostaining was first performed for Ki67 (1:100, mouse anti-human Ki67, BD Biosciences), and following the secondary antibody step, the TUNEL cell death assay (Roche) was used according to the manufacturer's instructions. Negative and positive controls were omission of dUTP and addition of DNase (Sigma), respectively. Quantification of Ki67-TUNEL double-labelling was performed by

counting the number of Hoechst-labelled nuclei that were double-labelled with either Ki67 or TUNEL from 20x photos (8 fields of view by condition).

Quantification of Ki67, Olig2, pS6, and DCX immunofluorescence staining was performed on brain sections following ICV infusions. Marker-positive cells were counted at 600x total magnification from 2 sections situated within 1 mm rostral to the level of infusion. Quantifications were performed contralateral to the side of pump implantation to avoid local injury responses, were restricted to the lateral (striatal) SVZ, and were normalized to the length of SVZ quantified (4 animals per group).

Quantification of GFAP::myrTomato or GFAP::myrGFP-expressing cells that co-expressed pS6 was performed following *in vivo* adult brain electroporations. 5-10 sections within the electroporated region of the SVZ were processed for pS6 immunostaining. GFAP::myrTomato or GFAP::myrGFP -expressing cells were then identified at 600x total magnification and assessed for co-expression of pS6. A total of 500-1400 reporter-expressing cells were assessed from a total of 7-8 animals per plasmid combination.

6. Western blotting

Cultures analysed by Western blotting were lysed in RIPA Buffer as previously described (Bouab et al., 2011). Protein samples for Western Blotting were prepared as described previously (Bouab et al., 2011; Paliouras et al., 2012), and primary antibody information is provided in Table 1. HRP-conjugated secondary antibodies were used at the following dilutions: anti-mouse IgG (1:5000, Bio Rad) or anti-rabbit IgG (1:5000, Jackson Immuno Research). Signals were revealed using the Clarity kit (Bio-Rad), detected using ChemiDoc (Bio-Rad) and quantified using Image Lab 4.1 software (Bio-Rad).

7. Flow cytometry assays

CarboxyFluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) cell division assay. To assess cell division, dissociated neurospheres were treated with 1 μ M CFSE (Life technology) at 1

million cells/ml for 8 minutes at 37°C. The reaction was quenched with 100% FBS (1-2mins), and the labeled cells were then washed with PBS and DMEM/F-12 (3:1) medium and subsequently plated onto Poly-L-Lysine coated dishes at a density of 12,500 cells/cm² in DMEM/F-12 (3:1) medium supplemented with 2% B27, 1% FBS, and 5 ng/ml EGF. Cells were treated on day 0 with 100 ng/ml of factors. After 3 days, the cells were harvested by trypsinization, washed and analysed on an LSRII cytometer (BD Biosciences). Data analysis was performed using FlowJo v7.6.5 (Tree Star).

Propidium iodide and cell cycle analysis. Dissociated neurosphere cells were plated at 25,000 cells/cm² in medium containing the indicated treatments. Cells were harvested by trypsinization after 24h of treatment, rinsed and frozen in 70% ethanol in PBS until analysis. Prior to flow cytometry analysis, samples were treated with 0.5 mg/ml of DNase-free RNase (Sigma) (30 minutes at room temperature) and incubated with 50 mg/ml of propidium iodide (Sigma).

8. Statistical analyses

Statistical comparisons were made using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by either Dunnett's (comparison to a single control group) or Tukey's (multiple group comparison) post-hoc tests. For *in vitro* experiments, a repeated measures ANOVA was used as each animal had its own internal Vehicle control. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism, Version 5.02 (GraphPad Software, Inc).

E. Results

1. EGF and BMP exert opposing effects on SVZ-derived neural precursor proliferation

In order to understand how SVZ neural precursors integrate conflicting signals, we first sought to identify two factors that exert opposing effects. To do so, we used the neurosphere

culture system to perform pro- and anti-proliferative assays, and compared the effects of six distinct families of secreted niche factors.

To identify proliferation-promoting SVZ signals, neurospheres expanded from the adult SVZ were dissociated and plated in a basal survival-promoting medium that was supplemented with 20 ng/ml of either EGF, FGF, BMP, PDGF, VEGF or SHH (Fig. 1A). Three days later, cells were lysed and analysed biochemically for changes in proliferation and differentiation markers (Fig. 1B). Western blot analysis showed that in comparison to the unsupplemented control, EGF and to a lesser extent FGF were the only factors that stimulated expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Fig. 1B). Consistent with this, EGF and FGF increased levels of Sox2 and Olig2, while decreasing levels of the astrocyte marker GFAP (the principal differentiated cell type in neurosphere-derived cultures) (Fig. 1B). In this regard, Sox2 is expressed by both NSCs and TAPs in the SVZ. Although Olig2 normally identifies only a small subset of the SVZ TAP population, previous studies have shown that the vast majority of TAPs generated using exogenous EGF/FGF are Olig2+Sox2+ positive progenitors (Gabay et al., 2003; Lindberg et al., 2012). Thus, among these six factors, EGF is the prominent pro-proliferative factor for TAPs.

To identify anti-proliferative SVZ signals, neurospheres were grown from the dissociated SVZ using a low basal concentration of 5 ng/ml EGF (EGF^{low}) to allow neurosphere formation and further supplemented with 100 ng/ml of each individual factor (Fig. 1C). Quantifications showed that, at the clonal cell density used to grow neurospheres, treatment with 100 ng/ml EGF did not further increase the number (Fig. 1D) or size (Fig. 1E) of neurosphere colonies compared to the EGF^{low} control condition. Likewise, none of the other factors significantly increased neurosphere number over the EGF^{low} condition (Fig. 1D), although FGF increased the mean colony size from 192.4±3.3 µm to 227.2±4.0 µm. Notably, however, BMP treatment reduced the number of neurospheres generated from the SVZ by more than 50%, and reduced the mean colony size to 139.1±2.8µm (Fig. 1D,E).

Together, these assays identified EGF and BMP as particularly potent pro- and anti-proliferative factors for SVZ-derived neural precursors, respectively.

2. TAPs: BMP suppresses EGF-induced proliferation via highly dominant effects on proliferation, differentiation, cell cycle parameters and cell death

TAPs constitute more than 95% of cells within individual neurospheres and express receptors for both EGF and BMP (Codega et al., 2014; Doetsch et al., 2002; Lim et al., 2000; Pastrana et al., 2009; Peretto et al., 2004). To examine how TAPs respond when simultaneously challenged with EGF and BMP, we used SVZ-derived neurospheres to generate high density adherent cultures for dose-response experiments. Adherent cultures were treated with either (1) increasing concentrations of EGF, (2) increasing concentrations of BMP, (3) intermediate levels of EGF plus increasing concentrations of BMP, or (4) intermediate levels of BMP plus increasing concentrations of EGF (Fig. 2A,B).

Biochemical analysis showed that cells treated with increasing concentrations of EGF (5 to 40 ng/ml) exhibited a dose-dependent increase in markers of proliferation (PCNA) and TAPs (Sox2, Olig2) and suppression of astrocytic differentiation (GFAP). However, neurosphere-derived cells were rendered insensitive to these proliferation- and TAP-inducing effects of EGF when they were simultaneously exposed to 20 ng/ml BMP (Fig. 2B-H). Conversely, BMP alone dose-dependently increased markers of differentiation and had no effect on proliferation and TAP markers; when simultaneously exposed to a constant 20 ng/ml EGF concentration, increasing the concentration of BMP suppressed EGF-induced TAP proliferation and increased differentiation in a dose-dependant manner (Fig. 2B-H). Thus, these dose-response experiments showed that EGF and BMP have opposing effects on proliferation and differentiation of TAPs, and that the anti-proliferative/pro-differentiation effects of BMPs are highly dominant: when combined, BMP but not EGF is able to exert a dose-dependent suppression of the conflicting signal.

We next used immunocytochemistry and flow cytometry assays to better understand the cellular mechanisms involved in BMP's dominance over EGF (Fig. 2I-Q). Secondary neurospheres were dissociated and plated for 48h in a basal proliferation medium containing 5 ng/ml EGF (EGF^{low}) that was further supplemented with either Vehicle, 100 ng/ml EGF (EGF^{hi}), 100 ng/ml BMP (BMP^{hi}), or both factors (EGF^{hi}+BMP^{hi})(Fig. 2I). EGF^{hi}-treated cultures did

not contain more cells than the Vehicle group, indicating that the basal EGF^{low} concentration maintained maximal proliferation over this time period. However, BMP^{hi} and EGF^{hi}+BMP^{hi} groups both contained 55% fewer cells than the Vehicle- and EGF^{hi} groups (Fig. 2J,L). Immunocytochemistry showed that BMP's effects are primarily anti-proliferative rather than pro-apoptotic. The proportion of cells that were in proliferation (Ki67+) decreased from 53.84±2.80% and 55.19±3.46% in the Vehicle and EGF^{hi}-treated cultures to 9.34±1.41 and 4.66±1.11% in the BMP^{hi} and EGF^{hi}+BMP^{hi} groups (Fig. 2J,M). Similarly, Olig2 expression decreased from 75.19±6.30% and 70.35±3.34% in the Vehicle and EGF^{hi}-treated cultures to 26.93±5.50% and 30.86±3.58% in the BMP^{hi} and EGF^{hi}+BMP^{hi} groups (Fig. 2K,N). There was also a smaller 7.5% increase in the proportion of cells that were apoptotic (TUNEL+) (Fig. 2O). Consistent with BMP's anti-proliferative effects, propidium iodide (PI)-based flow cytometry analyses showed that the BMP^{hi} and EGF^{hi}+BMP^{hi} conditions both shifted approximately 10% of neural precursors from the S- and G2-M phases of the cell cycle into G0-G1 within one day of treatment (Fig. 2P, Q).

Notably, the effects of BMP^{hi} and EGF^{hi}+BMP^{hi} conditions were virtually identical in all of these assays, revealing that the effects of BMP on neural precursor proliferation, cell cycle parameters, and apoptosis are all highly dominant to those of EGF.

3. Distinct mechanisms of proliferation inhibition following EGF withdrawal and BMP treatment

In order to explore the kinetics of BMP's suppression of EGF-induced proliferation, we performed a label retention-based assay using CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester (CFSE). CFSE is a fluorescent dye that is passively incorporated into cells and then serially diluted from their cytoplasm during each subsequent cell division. Dissociated neurosphere cells were pre-labeled with CFSE, treated under various conditions for 3 days, and then analysed for CFSE retention by flow cytometry (Fig. 3A). As expected, control cultures plated under differentiation conditions of complete EGF withdrawal (No EGF) exhibited 2-fold more CFSE-fluorescence than the EGF^{low}-containing Vehicle and EGF^{hi} conditions. Notably, BMP^{hi} and EGF^{hi}+BMP^{hi}-treated cultures closely resembled the No EGF differentiation condition, revealing that

suppression of proliferation in response to BMP treatment follows similar kinetics as following EGF withdrawal (Fig. 3B,C).

mTORC1 signalling is a key mediator of EGF-induced proliferative expansion of TAPs (Paliouras et al., 2012). Given the similar suppression of TAP proliferation between EGF withdrawal and BMP treatment conditions, we asked whether BMP operates by inhibiting mTORC1 signalling. Neurosphere-derived cells were exposed to either BMP or the mTORC1 inhibitor Rapamycin for 24h, then switched to a proliferation medium containing 20 ng/ml EGF for up to 5 days to assess recovery of TAP proliferation and mTOR signalling (Fig. 3D). Following treatment with the respective vehicle solutions (BSA for BMP or DMSO for Rapamycin), cells switched to the 20ng/ml EGF proliferation medium exhibited a continual increase in expression of the proliferation marker PCNA accompanied by increasing expression of the TAP-associated mTORC1 pathway markers, pmTOR, pS6, and p4EBP (Fig. 3E). In comparison, cells treated with either BMP or the reversible mTORC1 inhibitor Rapamycin displayed a rapid drop in PCNA levels (Fig. 3E). In the case of Rapamycin, this drop was accompanied by immediate disappearance of the mTORC1 pathway markers, and PCNA and the p4EBP branch of the mTORC1 pathway subsequently recovered by day 4 (Fig. 3E). In the case of BMP, the decrease in PCNA levels showed only a delayed and partial recovery, and notably, levels of pmTOR, pS6, and p4EBP did not parallel the reduction in PCNA, only displaying a slow and relatively minor decline over the 5-day period (Fig. 3E). BMP-treated cells showed a strong and transient increase in pSMAD1/5/8, confirming BMP pathway activation (Fig. 3E). Levels of pERK1/2 (a second proliferation-associated EGFR-induced pathway) were likewise relatively unchanged by BMP treatment (Fig. 3E).

Further analysis confirmed that the recovery of proliferation following Rapamycin treatment was associated with a recovery of the TAP markers Sox2 and Olig2 (Fig. 3F-J). In contrast, recovery of TAP markers following BMP treatment was limited, and instead, there was a strong increase in markers of differentiated astrocytes and neurons. The BMP differentiation response was primarily astrocytic, as immunocytochemistry showed the increase in β III-tubulin was mainly due to enhanced neuronal morphological complexity (not shown).

This analysis reveals that despite the similarity in their time-course of proliferation inhibition, EGF withdrawal and BMP treatment are mechanistically distinct. EGF withdrawal,

but not BMP treatment, is mediated by suppression of mTORC1 signalling. Moreover, TAPs transiently treated with Rapamycin undergo a reversible inhibition of proliferation, while TAPs transiently treated with BMP terminally differentiate into astrocytes despite the ongoing presence of EGF.

4. NSCs: BMP promotes NSC quiescence by dominantly suppressing EGF-induced NSC activation

We next focused on the integration of EGF and BMP signals at the level of activated NSCs, which likewise express receptors for both EGF and BMP (Codega et al., 2014; Colak et al., 2008; Doetsch et al., 2002; Pastrana et al., 2009). To do so, we investigated the individual and combined impacts of these factors on growth and self-renewal of clonally derived neurospheres.

To determine whether EGF or BMP is dominant for activated NSCs, primary neurosphere colonies were grown at clonal density in the presence of 5 ng/ml EGF to sustain neurosphere formation (EGF^{low}) and supplemented with either BSA (Vehicle), 100 ng/ml EGF (EGF^{hi}), 100 ng/ml BMP (BMP^{hi}), or 100 ng/ml EGF+100 ng/ml BMP (EGF^{hi}+BMP^{hi}) (Fig. 4A). Quantification showed that there was no difference in the number (Fig. 4B) or size distribution (Fig. 4C) of neurosphere colonies between the Vehicle and EGF^{hi} conditions, confirming that the EGF^{low} concentration is saturating at the clonal cell density required in the neurosphere assay. Consistent with the anti-proliferative effect of BMP on TAPs described earlier, BMP^{hi} and EGF^{hi}+BMP^{hi} conditions both significantly decreased neurosphere number and size (Fig. 4B,C). Importantly, however, further analysis of the size distribution data showed that BMP reduced the number of full-sized colonies (larger than 70 μ m) without increasing the number of small-sized colonies (less than 70 μ m) (Fig. 4B), indicating that BMP is also a negative regulator of neurosphere initiation (NSC activation). Biochemical analysis of these neurospheres showed that, as expected, EGF^{low} neurospheres that were Untreated, Vehicle- or EGF^{hi}-treated all displayed high levels of the proliferation (PCNA) and TAP (Sox2, Olig2) markers and virtually undetectable levels of differentiation markers (β III-tubulin, GFAP, and CNPase) (Fig. 4D-G). However, this profile was reversed in the neurospheres obtained in the

BMP^{hi} and EGF^{hi}+BMP^{hi} conditions: BMP suppressed the expression of PCNA, Sox2, and Olig2, and induced expression of differentiated neuronal and glial markers (Fig. 4D-G). Thus, in the colony-forming neurosphere assay, BMP overcomes the mitogenic effects of EGF at the level of both TAPs and NSCs.

To determine whether the BMP-induced decrease in neurosphere initiation was due to NSC *loss* (terminal differentiation, death, and/or irreversible senescence) versus NSC *quiescence* (reversible slowing or exit from the cell cycle), we performed a neurosphere self-renewal assay. Specifically, we tested whether neurosphere-initiating NSCs are still present in neurospheres grown in the presence of BMP. Neurosphere colonies were grown in the same growth factor combinations as above, but following the generation of primary neurospheres, 60 neurospheres from each condition were dissociated and replated at clonal density in standard neurosphere-forming conditions (Fig. 4A, "self-renewal assay"). Primary neurospheres grown in the BMP^{hi} and EGF^{hi}+BMP^{hi} conditions again generated smaller primary neurospheres, and thus contained 65-70% fewer cells (data not shown) as compared to neurospheres grown in the Vehicle or EGF^{hi} conditions. However, when these smaller BMP-treated primary neurospheres were dissociated and replated under standard neurosphere-forming conditions, they were found to retain a disproportionately high number of neurosphere-initiating cells, exhibiting only a 30-35% decrease (not statistically significant) in secondary neurospheres generated (Fig. 4H). Interestingly, further analysis of these secondary neurospheres showed that NSCs within the smaller BMP-treated primary neurospheres actually generated *larger* secondary neurospheres (Fig. 4I). These larger secondary neurospheres exhibited a variety of biochemical differences, including enhanced expression of proliferation (PCNA), TAP (Sox2, Olig2) and differentiated (β III-tubulin, GFAP, and CNPase) neural markers (Fig. 4J-M).

These *in vitro* data reveal that i) BMP is dominant over EGF at the level of activated NSCs, ii) that BMP restrains NSC expansion by promoting a reversible quiescence rather than NSC loss, and iii) that BMP-restrained NSCs subsequently exhibit an enhanced capacity for proliferation and differentiation.

5. BMP limits EGF-induced proliferative expansion of TAPs *in vivo*

We next assessed whether the dominant anti-proliferative effects of BMP are also observed in an *in vivo* setting. Intracerebroventricular (ICV) infusions were used to deliver Vehicle solution (BSA), EGF, BMP, or a combination of EGF+BMP into the lateral ventricles of adult mice (Fig. 5A). Immunohistochemical analysis after 5 days of infusion indicated that EGF dramatically increased Ki67+ cell proliferation surrounding the lateral ventricles, that BMP had no detectable effect on its own, but that BMP seemed to partially limit the EGF-induced proliferation (Fig. 5B). To quantify and extend these observations, we performed immunofluorescence for Ki67, Olig2, the neuroblast marker doublecortin (DCX), and the mTORC1 readout pS6 (Fig. 5C). Quantifications confirmed that EGF, but not EGF+BMP, stimulated a statistically significant increase in Ki67+ proliferating cells relative to Vehicle (Fig. 5D). EGF is reported to increase the number of Olig2+ TAPs (Lindberg et al., 2012); we found that the EGF and EGF+BMP groups both exhibited statistically significant increases in Olig2+ cells relative to Vehicle, but that the EGF+BMP group was significantly lower than the EGF group (Fig. 5E). Likewise, pS6 immunoreactivity is mainly expressed in TAPs, and was significantly increased in the EGF but not EGF+BMP groups relative to Vehicle (Fig. 5F). Neuroblast numbers were decreased to a similar extent in both the EGF and EGF+BMP groups relative to Vehicle (Fig. 5G). Given the massive proliferative response to EGF, it was not possible to reliably quantify numbers of GFAP+ astrocytes or ventricle-contacting GFAP+Ki67+ NSCs in this paradigm. Notably, while infusion of BMP by itself showed a tendency to decrease Ki67 and DCX levels compared to Vehicle infusion, it did not induce statistically significant changes for any of the markers examined.

Together, these quantifications reveal that in an *in vivo* context, TAP proliferation is induced by exogenous EGF when EGF is administered alone but not when it is co-administered with BMP.

6. Inhibition of endogenous BMP signaling promotes NSC activation *in vivo*

Since it was not possible to study growth factor-induced changes in NSC proliferation in the infusion paradigm, we turned to an *in vivo* adult brain electroporation strategy that would allow selective targeting of NSCs within their niche (Barnabe-Heider et al., 2008). To determine whether inhibition of endogenous BMP signalling can lead to NSC activation, plasmids expressing GFAP promoter-driven GFP (GFAP::myr-GFP, to label NSCs) were mixed with plasmids expressing either SMAD6 (a negative regulator of BMP-induced SMAD signaling)(Hata et al., 1998) or CMV6 (empty vector). Plasmid mixtures were injected into the lateral ventricles of adult mice and co-electroporated into the ventricle walls (Fig. 6A,B). Immunofluorescence analysis of the SVZ 3 days post-electroporation revealed that in mice electroporated with empty vector, 5.98% (81 of 1353 cells) of GFAP::myr-GFP-expressing NSCs co-labeled with the mTORC1 readout pS6 (i.e, had undergone activation) (Fig. 6B,C). In mice electroporated with SMAD6, this increased by 52.8%, to 9.14% of GFAP::myr-GFP-expressing NSCs (50 of 547 cells) (Fig. 6C). Thus, endogenous BMP-SMAD signalling constitutively suppresses NSC activation, and acutely inhibiting endogenous BMP-SMAD signaling is sufficient to allow an increase in NSC activation.

F. Discussion

The present study investigates signal integration during proliferative expansion of TAPs and their upstream activated NSCs. Strict regulation of this process is essential for maintaining a pool of TAPs that can participate in the ongoing replacement of specific neuronal and glial populations and that can dynamically modulate production of neural cells in response to changing local needs (as occurs following tissue injury). Here, we provide new insights into how TAPs and activated NSCs integrate two major pro- and anti-proliferation pathways, EGF-mTOR and BMP-SMAD.

1. Proliferative expansion of TAPs

EGF-induced mTOR signaling is emerging as a central regulator of adult neurogenesis. In our previous work, we demonstrated that EGF-induced mTORC1 signaling plays a critical role during proliferative expansion of the TAP population (Paliouras et al., 2012). mTORC1 activity was present in the majority of proliferating cells in neurosphere cultures *in vitro*, and in the SVZ was localized primarily to GFAP-negative cells that were positive for Ki67 and Mash1 (Paliouras et al., 2012). Such a phenotype identifies TAPs, but more recent studies suggest it may also include activated NSCs, which downregulate GFAP expression and upregulate Nestin (Codega et al., 2014).

We found here that, at the level of TAPs, BMP exerts completely opposing and highly dominant effects compared to EGF. A side-by-side comparison of multiple families of SVZ neurogenesis regulators confirmed that EGF is a particularly prominent pro-proliferative signal and demonstrated that BMP is a powerful anti-proliferative signal for neural precursors. BMP powerfully suppressed overall neural precursor proliferation in neurosphere-based assays, contrasting the effects of EGF, FGF, PDGF, VEGF and SHH, other SVZ neurogenesis regulators. TAPs represent the vast majority of cells in neurospheres and neurosphere-derived adherent cultures. Dose-response experiments were performed to study how TAPs respond to simultaneous exposure to BMP and EGF, and showed that BMP's anti-proliferative effects were unchanged by increasing and excess levels of EGF, while conversely, EGF's pro-proliferative effects were suppressed in a dose-dependent manner by BMP. Notably, BMP-induced reductions in markers of cell proliferation (adherent cultures) and colony size (neurosphere cultures) were paralleled by powerful suppression of TAP markers such as Sox2, Olig2, and the mTOR pathway, and concomitant stimulation of differentiated neural markers (predominantly GFAP). *In vitro* analyses further revealed that BMP's anti-proliferative activity rapidly arrested EGF-induced cell division, stimulated differentiation, increased retention of cells in the G0-G1 phase of the cell cycle, and marginally increased cell death. These effects of BMP were opposite to those of EGF, and occurred regardless of coincident treatment with saturating concentrations of EGF, revealing that, *in vitro*, BMP is highly dominant to EGF on TAPs.

We hypothesized that BMP's anti-proliferative effect may operate via direct suppression of EGF-induced mTORC1 signaling, based on its dominant effects when co-

administered with EGF, together with the identical kinetics of proliferation inhibition following BMP treatment and EGF withdrawal (CFSE experiment). However, unlike Rapamycin, which suppresses EGF-induced proliferation by directly blocking mTORC1 activity, BMP suppressed proliferation without decreasing mTORC1 activity. Thus, BMP treatment and EGF withdrawal suppress proliferation via distinct mechanisms. Inhibition of proliferation and expression of differentiation markers reached their maximum 1-2 days after the peak of BMP-induced SMAD signaling; this suggests that BMP initiates a differentiation process, but that the cells don't fully differentiate and stop proliferating until a few days later. Interestingly, proliferation recovery following transient Rapamycin treatment was paralleled by recovery of the 4EBP but not the S6 branch of mTORC1 signalling, consistent with a previous report that 4EBP rather than S6 kinase may be the main mTOR proliferation effector (Hartman et al., 2013).

We performed ICV growth factor infusions to validate these findings *in vivo*, finding both similarities and differences. When administered simultaneously *in vivo*, BMP was indeed found to attenuate EGF-induced expansion of markers of cell proliferation (Ki67) and TAPs (Olig2, pS6). However, there was an apparent difference in the effects of BMP on endogenous versus EGF-induced proliferation. Specifically, BMP infusion by itself had no statistically significant effects on endogenous levels of Ki67 or TAPs, although a tendency for reduced Ki67 was noted. The most likely explanation for this difference is that endogenous ependymal-derived noggin may be capable of blocking exogenously administered BMP (Lim et al., 2000).

2. Activation of NSCs

BMP was also found to have opposing and dominant anti-proliferative effects over EGF at the level of activated NSCs. Because NSCs represent only a few percent of cells within neurosphere-derived cultures or within the SVZ *in vivo*, measuring changes in NSC activity requires specific assays that can distinguish NSCs from their more abundant TAP progeny. *In vitro*, we used the neurosphere culture system to perform quantitative colony-forming assays. BMP treatment strongly inhibited EGF-induced neurosphere formation, and notably, this was not accompanied by an increase in under-sized colonies, suggesting that BMP had a quiescence-promoting effect on neurosphere-initiating NSCs. Consistent with this, self-renewal assays of

BMP-treated neurospheres showed that they retained an almost normal complement of neurosphere-initiating cells, despite being reduced by more than 80% in neurosphere number and 65% in cells/neurosphere. Moreover, these BMP-treated NSCs generated significantly larger neurospheres when returned to a normal EGF-containing proliferation medium. These *in vitro* data indicate that BMP treatment does not cause a loss of NSCs (i.e., as would occur following terminal differentiation, death, or senescence); rather, BMP stimulates NSCs to enter a state of reversible quiescence that reduces their immediate TAP production but endows them with an enhanced capacity for subsequent proliferative expansion.

To test whether BMP constitutively restrains NSC activation *in vivo*, we turned to a recently developed *in vivo* adult brain electroporation protocol (Barnabe-Heider et al., 2008). Using this approach allowed us to identify and target ventricle-contacting GFAP-expressing NSCs for genetic manipulation. Previous studies suggest that 13.3% of NSCs express EGFR (Pastrana et al., 2009), representing NSCs that are either activated or primed for activation. Three days after electroporating quiescent GFAP+ NSCs with a control empty vector, we found that 6.0% expressed the mTORC1 readout pS6. Electroporating GFAP+ NSCs with a plasmid overexpressing SMAD6, a negative regulator of BMP-induced SMAD signaling, increased the percentage of electroporated NSCs that acquire mTORC1 activity to 9.1%, an increase of over 50%. It is not yet established whether this mTORC1 activity begins at the stage of stem cell activation (as occurs in muscle stem cells) (Rodgers et al., 2014) or upon generation of a TAP, however these data support a model in which BMP signaling constitutively represses NSC activation, and relieving this inhibition is sufficient to allow initiation of proliferative expansion. Interestingly, the question of whether prolonged suppression of BMP signaling would lead to exhaustion of the SVZ NSC pool has not yet been answered. In the dentate gyrus neurogenic niche, where NSCs have distinct growth and differentiation properties (Seaberg and van der Kooy, 2002), consensus has also not been reached on this question, with some studies reporting that that loss of BMP signaling leads to an eventual loss of NSC activity (Mira et al., 2010) and others reporting no such loss (Bonaguidi et al., 2008; Gobeske et al., 2009; Guo et al., 2011).

Together, the present data enable us to begin developing a picture of how pro- and anti-proliferative signals are integrated during proliferative expansion of the TAP pool. Interestingly, a BMP signaling increase during aging may be a factor contributing to age-related decline in

NSC activity (Yousef et al., 2015), suggesting that excessive quiescence signaling can perturb NSC functions under physiological conditions *in vivo*. Importantly, BMP-SMAD and EGF-mTOR represent only selected components of what is most likely a complex, multi-step and multi-factorial integration process. Indeed, while BMP suppression increased NSC activation, the majority of NSCs remained quiescent within the 3 day time-frame examined, suggesting that other players are involved (Ottone et al., 2014).

G. Table and Figures

Tableau I. Antibody list.

Antibody	Compagny	Western Blot	Immunohistochemistry
Actin (mouse)	Abcam	1/20000	
Alexa-555 goat anti-mouse	Invitrogen		1/1000
Alexa-555 goat anti-guinea pig	Invitrogen		1/1000
Alexa-488 goat anti-chicken	Invitrogen		1/1000
Alexa-488 goat anti-rabbit	Invitrogen		1/1000
Alexa-647 goat anti-rabbit	Invitrogen		1/1000
CNPase (mouse)	Chemicon	1/500	
Doublecortin (guinea pig)	Chemicon		1/3000
Phospho-4EBP (Thr37/46) (rabbit)	Cell Signaling	1/1000	
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (thr202/tyr204) (rabbit)	Cell Signaling	1/1000	
GFAP (chicken)	Novus Biological		1/1000
GFAP (rabbit)	Dako Diagnostic	1/1000	
HRP secondary Ab (anti-mouse)	Bio-Rad	1/5000	
HRP secondary Ab (anti-rabbit)	Jackson Immuno Research	1/5000	
Ki67 (mouse)	BD Biosciences		1/100
Olig2 (rabbit)	Chemicon	1/1000	1/250
Phospho-mTOR (Ser2448) (rabbit)	Cell Signaling	1/1000	
Phospho-S6 (Ser240/244) (rabbit)	Cell Signaling	1/1000	1/300
Sox2 (rabbit)	Chemicon	1/500	
Phospho-Smad1 (Ser463/465)/Smad5 (Ser463/465)/Smad8(Ser426/428) (rabbit)	Cell Signaling	1/1000	
β III-tubulin (TUJ1) (mouse)	Covance	1/1000	

Figure 1

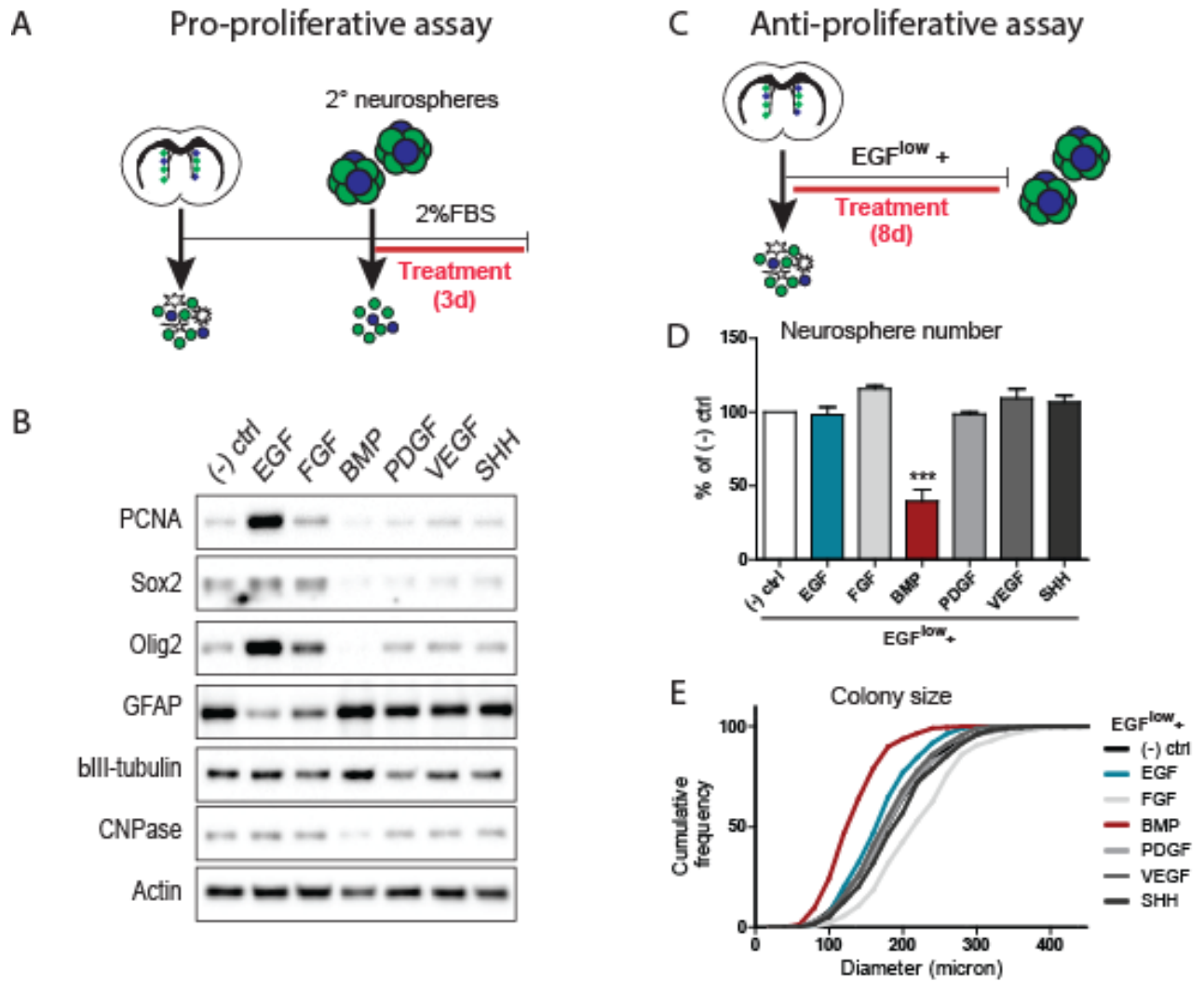


Figure 1: Comparison of the pro- and anti-proliferative effects of 6 families of neurogenesis regulators on SVZ-derived neural precursor cultures.

(A-B) Assay for pro-proliferative effects. Experimental paradigm (see Methods for details) (A). Western blotting analysis of cell lysates following growth factor treatments (representative example from 1 of 3 experiments) (B). Note that EGF is the prominent stimulator of markers of proliferation (PCNA) and TAPs (Sox2, Olig2). (C-E) Assay for anti-proliferative effects. Experimental paradigm (see Methods for details) (C). Quantification of the effects of growth factor treatments on neurosphere numbers (D) and sizes (E). Note that BMP exerts a powerful anti-proliferative effect on neural precursors during neurosphere formation. *** $p < 0.001$, one-way ANOVA (Dunnett's post-hoc test). Data are represented as mean \pm SEM.

Figure 2

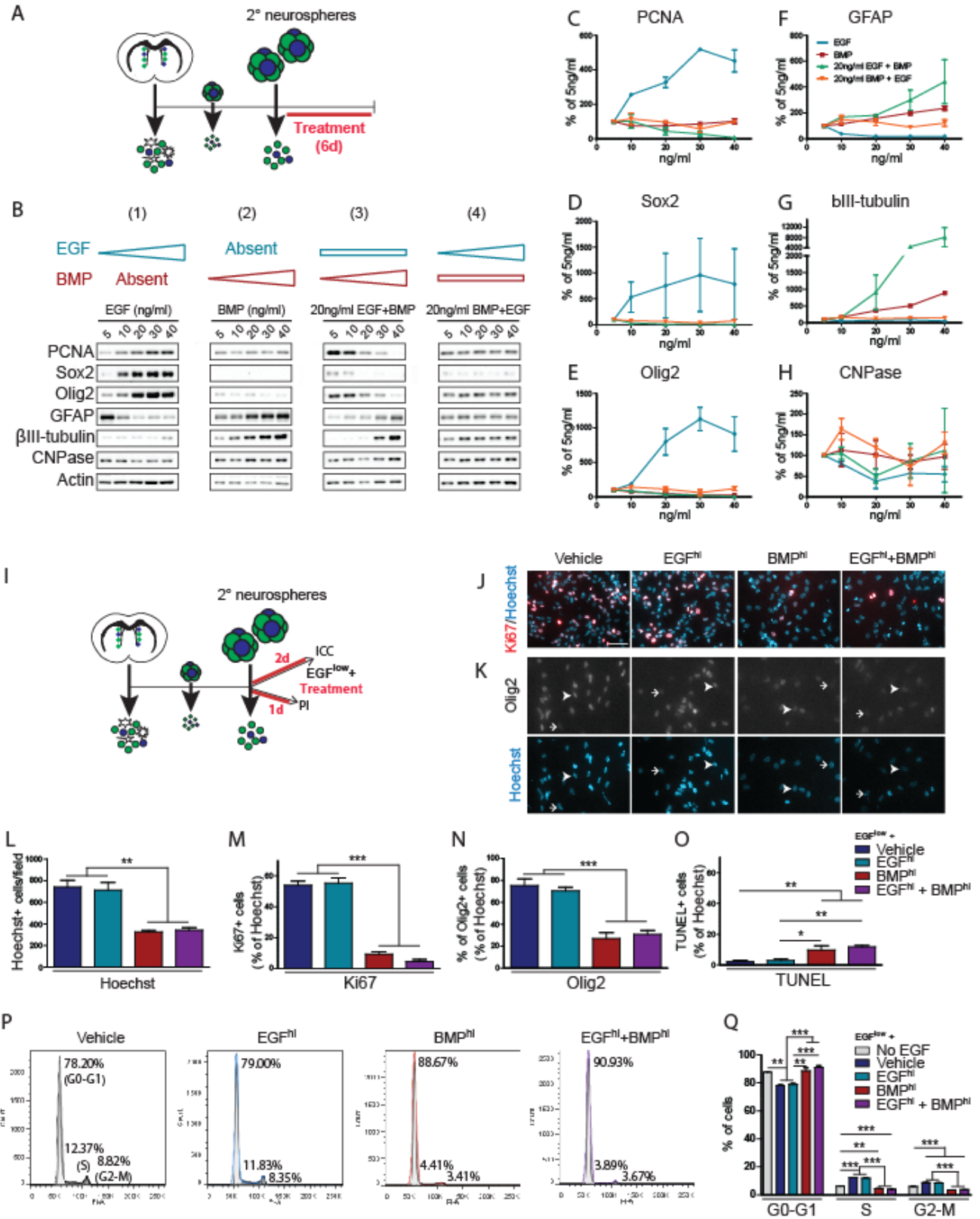


Figure 2: BMP exerts dominant effects over TAP proliferation, differentiation, cell cycle parameters and cell death.

(A-H) EGF and BMP dose-response experiments. Experimental paradigm (see Methods for details) (A). Western blot analysis of cell lysates following dose-response treatments (representative example from 1 of 2 experiments) (B). Note that EGF-induced effects are suppressed in a dose-dependent manner by BMP, while BMP-induced effects are insensitive to EGF concentration. Densitometric quantification of markers of proliferation (PCNA) (C), TAPs (Sox2, Olig2) (D, E) and neural subtypes (astrocytes, GFAP; neurons, β III-tubulin; oligodendrocytes, CNPase) (F, G, H). (I-Q) Effect of EGF and BMP on cell proliferation, death and cell cycle. Experimental paradigms (see Methods for details) (I). Immunofluorescence analysis for Ki67 (J) or Olig2 (K), counterstained with Hoechst. Arrowheads and arrows show examples of positive and negative cells, respectively. Quantification of immunocytochemistry experiments showing the treatment effects on total number of Hoechst-positive nuclei (L) and proportion of cells that are positive for Ki67(M), Olig2 (N) or TUNEL (O). Cell cycle analysis by flow cytometry for DNA content using propidium iodide (representative example from 1 of 3 experiments) (P), with quantification by cell cycle phase (Q). Note that BMP has dominant effects on cell proliferation, cell cycle and cell death. Scale bar in J is 50 microns (for J,K). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA (Tukey post-hoc test). Data are represented as mean \pm SEM.

Figure 3

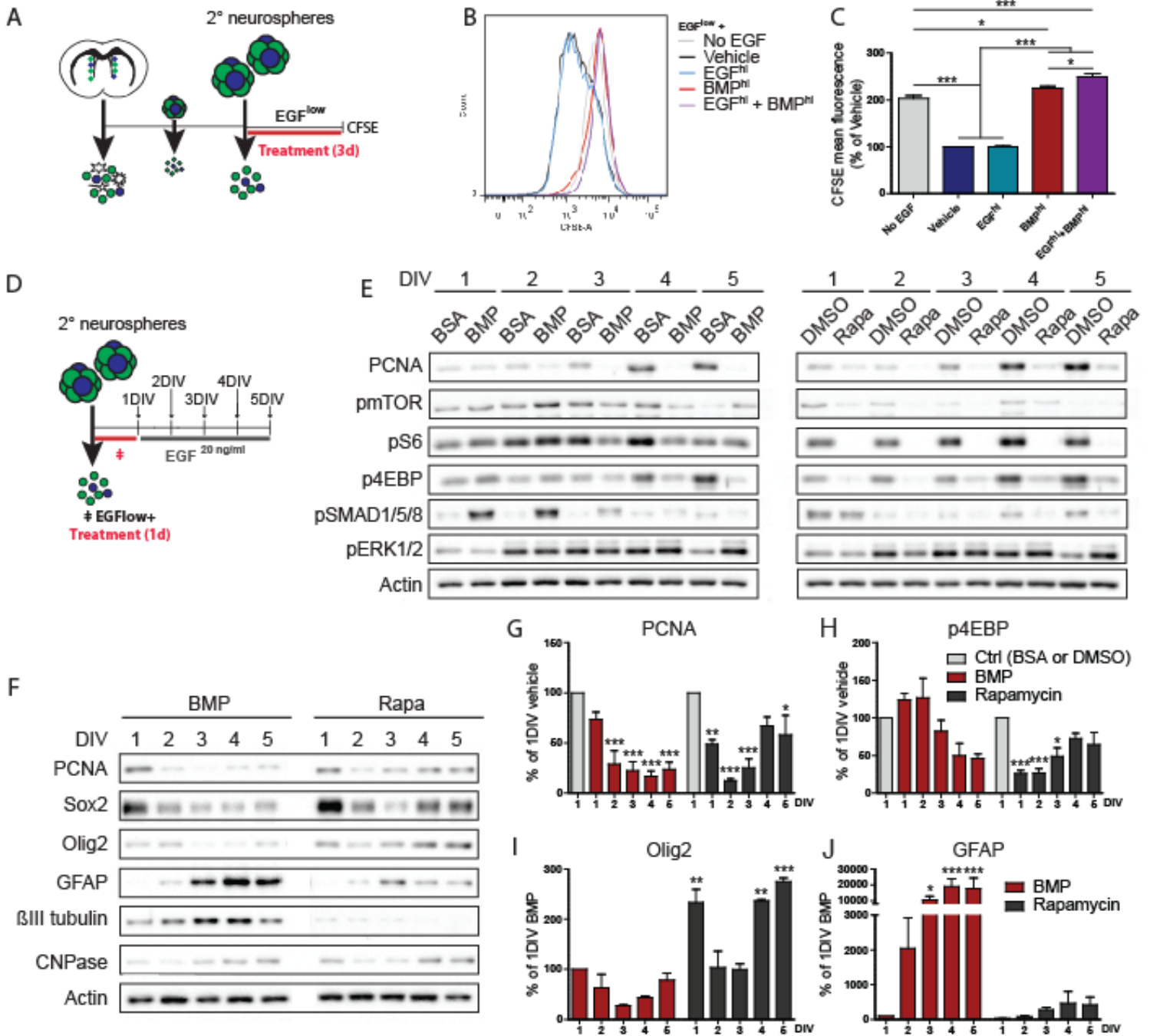


Figure 3: Similarities and differences between BMP treatment and EGF withdrawal-induced suppression of TAP proliferation.

(A-C) Effect of EGF and BMP on proliferation kinetics. Experimental paradigm for CFSE experiment (see Methods for details) (A). CFSE fluorescence intensity curves (representative example from 1 of 3 experiments) (B), with mean fluorescence (C). Note that BMP completely suppresses EGF-induced dilution of CFSE, a measure of the number of cell divisions, and is identical to EGF withdrawal. (D-J) Proliferation recovery assay following transient treatment with BMP or Rapamycin. Experimental paradigm (see Methods for details) (D). Western blot analysis for proliferation (PCNA), mTORC1 pathway activation (pmTOR, pS6, p4EBP), SMAD pathway activation (pSMAD1/5/8), ERK pathway activation (pERK1/2), and actin loading control (E). Representative example from 1 of 3 experiments. (F-J) Western blot analysis for PCNA, TAP (Sox2, Olig2) and differentiation (GFAP, β III-tubulin, CNPase) markers (representative example from 1 of 3 experiments) (F). Densitometry quantifications (G-J). Note BMP and Rapamycin both suppress proliferation, but BMP additionally stimulates differentiation and does not require a decrease in mTOR pathway activation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA (Tukey post-hoc test in C, Dunnett's post-hoc test in G-J). Data are represented as mean \pm SEM.

Figure 4

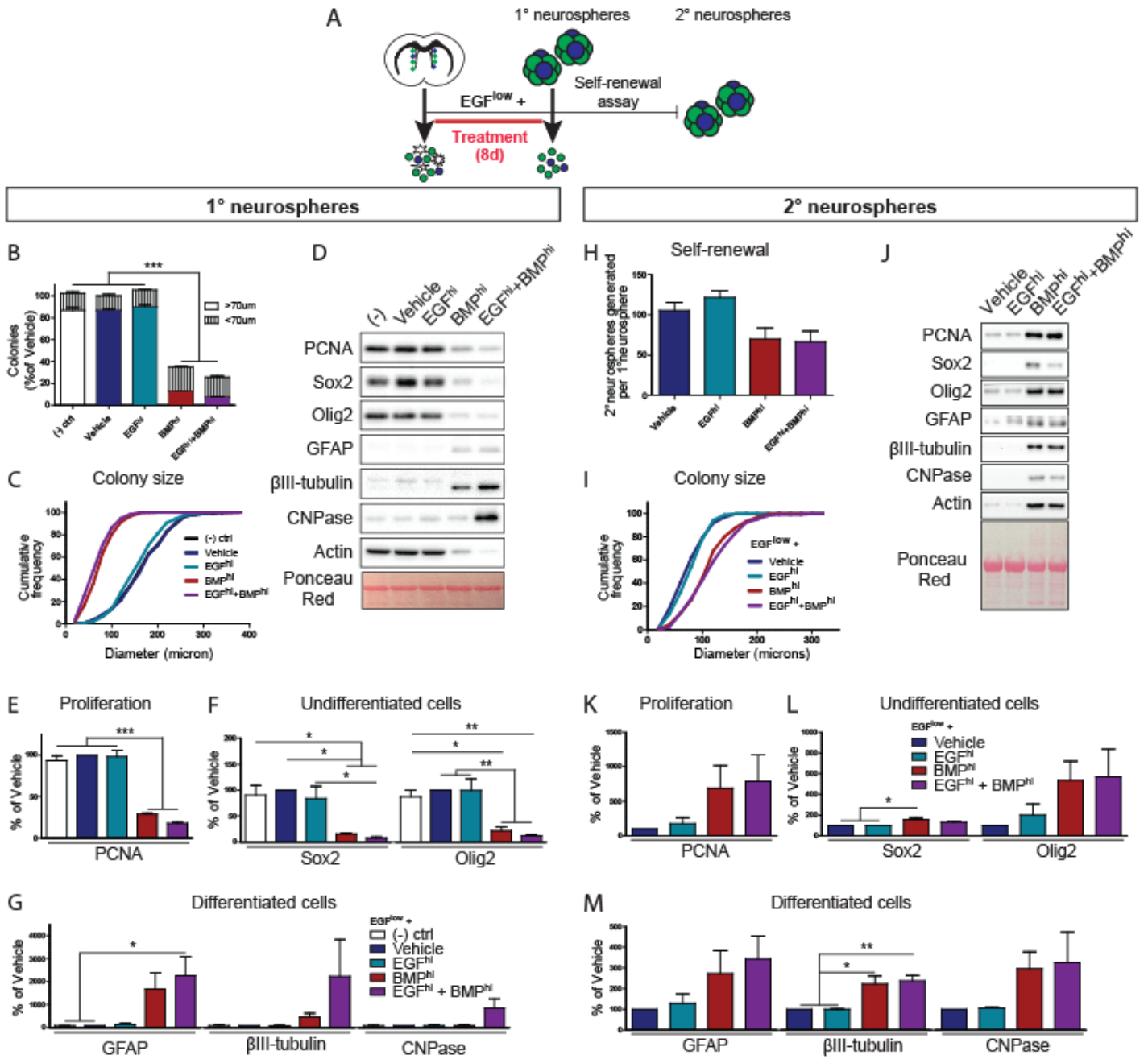


Figure 4: BMP dominantly suppresses NSC activation.

(A) Experimental paradigm for neurosphere assay (primary neurospheres) and self-renewal assay (secondary neurospheres) (see Methods for details) (A). (B-G) Primary neurosphere assay. Quantification of the number of floating colonies that are greater or less than 70 microns (B). Cumulative frequency histogram of colony sizes (C). Western blots of lysates from treated primary neurospheres (representative example from 1 of 3 experiments) (D). Densitometric quantifications of markers of proliferation (PCNA) (E), TAPs (Sox2, Olig2) (F) and neural subtypes (astrocytes, GFAP; neurons, β III-tubulin; oligodendrocytes, CNPase) (G). (H-M) Self-renewal assay (see Methods for details). Quantification of the average number of secondary neurospheres generated in normal proliferation medium from each primary neurosphere (H). Cumulative frequency graph of colony sizes (I). Western blots of lysates from secondary neurospheres (representative example from 1 of 3 experiments) (J). Densitometric quantifications for markers of proliferation (PCNA)(K), TAPs (Sox2, Olig2)(L) and neural subtypes (astrocytes, GFAP; neurons, β III-tubulin; oligodendrocytes, CNPase)(M). Note that BMP-treated neurospheres remain capable of generating new neurospheres, and that neurospheres generated from NSCs that had been grown in the presence of BMP are larger with altered biochemical characteristics. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA (Tukey post-hoc test). Data are represented as mean \pm SEM.

Figure 5

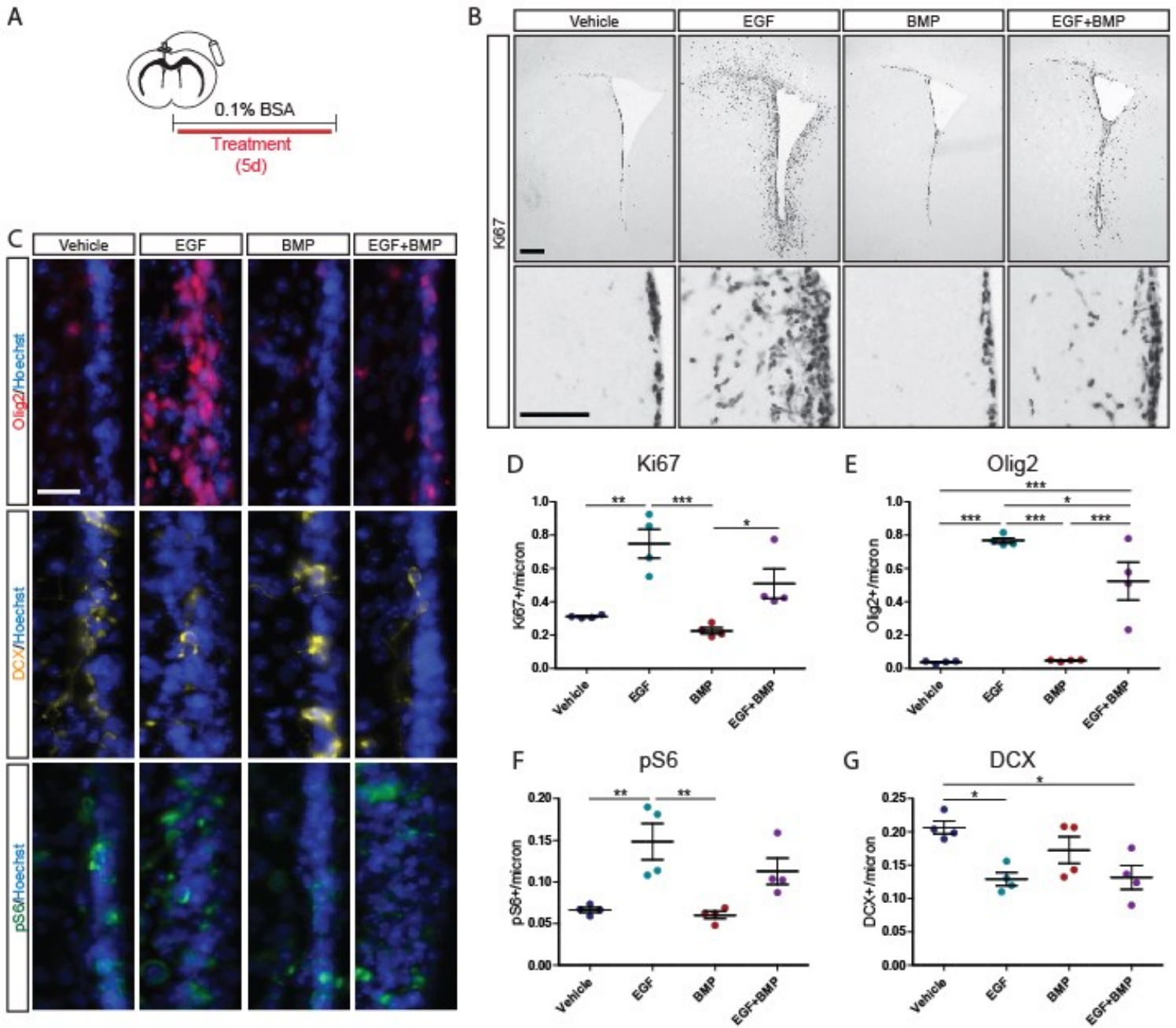


Figure 5: BMP limits EGF-induced expansion of TAPs in vivo.

Intracerebroventricular infusion paradigm (see Methods for details) (A). Brightfield immunohistochemistry for Ki67, with low magnification (upper) and high magnification (lower) images of each condition (B). Immunofluorescence for Olig2 (upper), DCX (middle) and pS6 (lower), each counterstained with Hoechst (C). Quantification of Ki67+ (D), Olig2+ (E), pS6+ (F) and DCX+ (G) SVZ cells (N=4/group). Scale bars: B top: 250 microns, B bottom: 100 microns, C: 25 microns. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, one-way ANOVA (Tukey post-hoc test). Data are represented as mean±SEM.

Figure 6

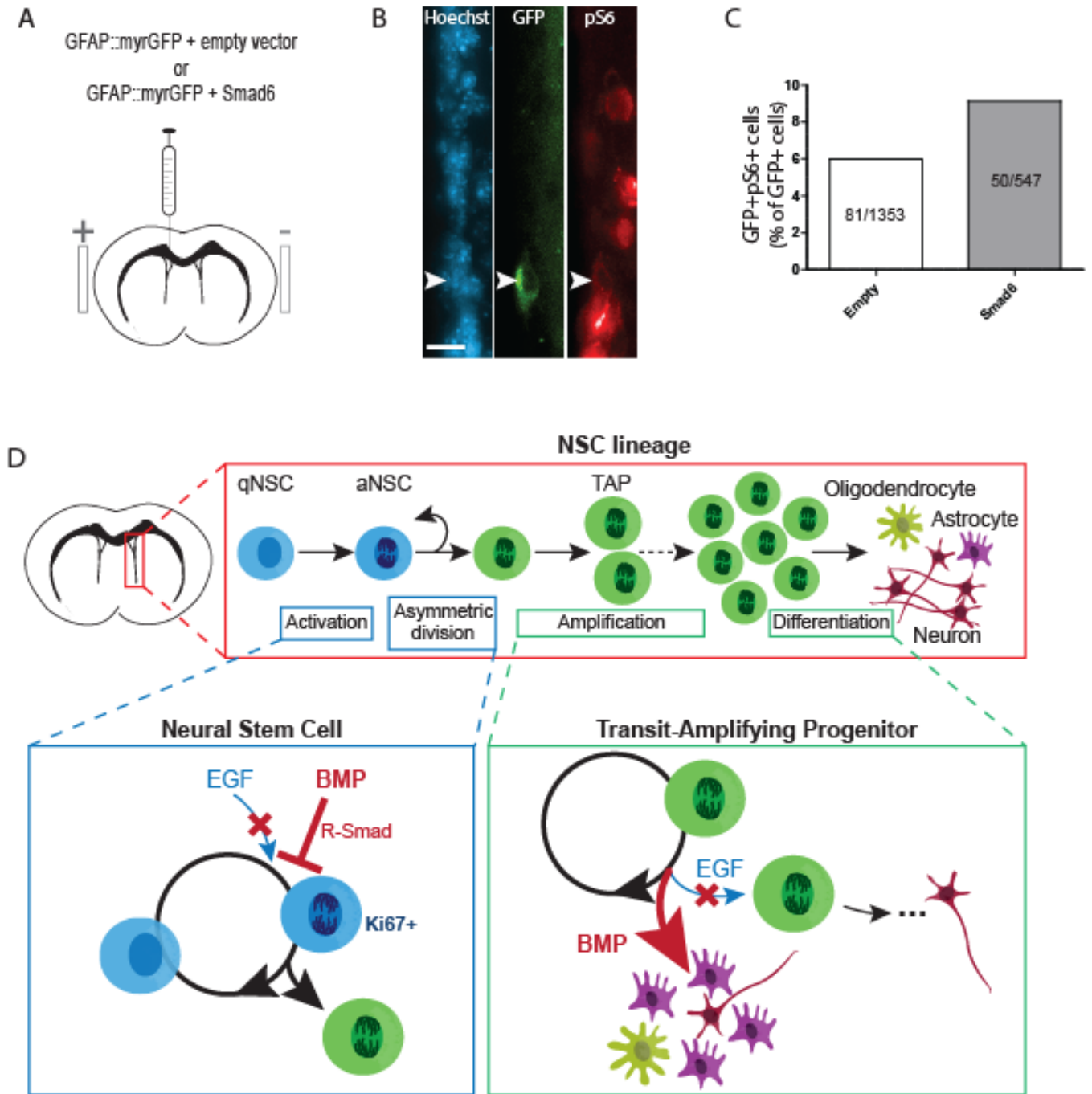


Figure 6: Inhibition of BMP-SMAD signaling in NSCs promotes mTORC1 activity in vivo.

(A-C) *In vivo* electroporation of SMAD6 upregulates mTORC1 signaling in quiescent GFAP-positive NSCs. Experimental paradigm of *in vivo* adult brain electroporation (see Methods for details) (A). Representative immunofluorescence images of GFAP::myrGFP-expressing NSCs that were double-labelled with pS6 (B). Counts of GFAP::myrGFP cells that were double-labelled with pS6 (data pooled from N=7-8 per group) (C). (D) Summary figure: EGF-induced proliferative expansion of TAPs is dominantly suppressed by BMP via distinct stage-specific mechanisms. (Top) The majority of NSCs in the SVZ niche are quiescent. Upon EGF receptor (EGFR) activation, an NSC divides asymmetrically to generate a TAP, which undergoes several rounds of proliferative expansion before generating differentiated neural progeny (under normal conditions, predominantly neurons). (Lower left) At the NSC stage, ligand-induced stimulation of EGFR promotes NSC activation to generate a TAP via asymmetric division. BMP-induced activation of receptor-regulated SMAD (R-SMAD) dominantly inhibits EGFR-mediated NSC activation to promote NSC quiescence. (Lower right) At the TAP stage, EGFR stimulation promotes proliferative expansion of TAPs. BMP dominantly inhibits EGFR-mediated TAP proliferation and promotes astrocytic differentiation. Thus, increased BMP signalling in the SVZ leads depletes the TAP population by promoting quiescence of upstream NSCs and differentiation of TAPs. Scale bar (B) = 25 microns.

H. Acknowledgments

We thank members of the Fernandes laboratory for discussion and critiques; D. Gauchat at the CRCHUM cytometry core facility for assistance with flow cytometry.; G. Chouinard for expertise in cell cycle analyses. S.J. and L.C. are funded by Excellence studentships from the University of Montreal. L.H. is funded by studentships from the Alzheimer Society of Canada and the Fonds de recherche de Québec en Santé (FRQS). K.F. holds a Canada Research Chair in Neural Stem Cell Biology. This work has been supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

I. Contribution des auteurs

S.J. a développé le concept, réalisé les expériences et analysé les données. L.H., L.C., L.C.L. et A.A. ont aidé à la production de certaines expériences. F.B-H. a développé la technique d'électroporation. K.F. a développé le concept et analysé les données. L'article a été co-écrit par K.F et S.J.. Tous les auteurs ont lu le manuscrit.

Chapitre 3

Second article

III. Biological properties of dormant ventricle-contacting neurogenic precursors revealed by genetic targeting in the adult murine brain

Soumission à Cell Stem Cell prévue en mars 2018

**Biological properties of dormant ventricle-contacting
neurogenic precursors revealed by genetic targeting
in the adult murine brain**

Authors and Affiliations:

*Sandra E. Joppé^{1,2}, *Loic M. Cochard^{1,3}, Louis-Charles Levros Jr.^{1,3}, Laura K. Hamilton^{1,3},
Clara Delort^{1,3}, Pierre Ameslon^{1,3}, Anne Aumont¹, and Karl Fernandes^{1,3}

¹Research Center of the University of Montreal Hospital (CRCHUM), Departments of
²Pathology and Cell Biology and ³Neurosciences, Faculty of Medicine, University of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada

Footnotes:

* these authors contributed equally

Correspondence: karl.jl.fernandes@umontreal.ca

A. Mise en contexte

Afin de pouvoir démontrer, *in vivo*, l'impact de la voie de BMP sur l'activation des NSC, il a été nécessaire de trouver une approche permettant de cibler uniquement les NSC. En choisissant l'approche par électroporation combinée avec le promoteur sélectif GFAP, nous avons été capables de cibler les cellules astrocytaires au contact du LCS. Lors de la quantification des coupes de cerveaux, nous avons réalisé que moins de 2% des cellules électroporées étaient en prolifération (Ki67 positives).

Depuis de nombreuses années, la question de l'identité des cellules souches neurales adultes demeure. L'utilisation d'immunomarquage par *wholemout* pour observer les ventricules latéraux ainsi que l'utilisation du marqueur CD133 (Prominin1) dans les analyses de FACS suggèrent que les cellules B1 sont les NSC présentes sous au moins deux sous-populations : les qNSC et les aNSC (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014; Coskun et al., 2008; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mirzadeh et al., 2008). Plusieurs de ces articles indiquent que les aNSC sont des cellules éphémères qui disparaissent après leur division (Calzolari et al., 2015; Obernier et al., 2018). Ceci implique qu'il existe une autre population quiescente en amont qui permet de générer les aNSC tout au long de la vie de l'hôte. Puisqu'il existe des cellules B1 en dehors du cycle cellulaire (qNSC) qui partagent de nombreuses caractéristiques avec les B1 prolifératives, il semble envisageable que celles-ci puissent composer ce réservoir.

Nous venons donc d'utiliser une des rares techniques qui permet d'étudier la cinétique de transition entre les q et les aNSC. Ainsi, l'objectif principal de cette étude est de définir le rôle fonctionnel des cellules B1 non mitotiques afin de déterminer si elles sont en amont des aNSC. Pour répondre à cette question, nous avons développé et caractérisé la technique d'électroporation chez l'adulte afin de cibler spécifiquement les cellules GFAP positives qui contactent le ventricule.

B. Abstract

Thousands of neural cells are produced daily within the ventricle walls of the adult mammalian brain, a region containing multiple cell types having neural stem cell (NSC) features. We used electroporation and transgenic strategies to probe the biology of ventricle-contacting, glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing neural precursors, which current models suggest are the primary neurogenic precursors in the adult brain. Fate-mapping revealed these highly quiescent precursors produce relatively few olfactory neurons during adulthood, are unresponsive during niche repopulation, and do not readily generate neurosphere-initiating (“activated”) aNSCs even after extended periods *in vivo*. Activating ectopic epidermal growth factor receptor signaling is sufficient to prime these dormant precursors, enabling cell cycle entry during early adulthood but not in contexts of aging or Alzheimer’s disease. These findings challenge our current understanding of SVZ niche function and have important implications for neural regeneration strategies based on mobilization of endogenous NSCs.

Keywords: Adult neurogenesis, neural stem cell, B1 astrocyte, aNSC, quiescence, aging, Alzheimer’s disease, neurosphere, mouse, SVZ, qNSC

C. Introduction

The subventricular zone (SVZ) niche of the forebrain lateral ventricles is the largest germinal zone in the adult rodent brain, producing tens of thousands of neuroblasts each day (Alvarez-Buylla et al., 2001; Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Similar to other stem cell niches of the body, the SVZ contains multiple pools of adult stem cells that differ in basal rates of proliferation, marker expression, and most likely *in vivo* functions. These SVZ stem cells have been described on the basis of anatomical (Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008; Shook et al., 2012), colony forming (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014; Pastrana et al., 2009), or single cell transcriptomic approaches (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015), but cross correlation of findings between these approaches is still lacking. Ablation studies demonstrate that SVZ neurogenesis is directly maintained by a glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing neural stem cell (NSC) that is actively dividing *in vivo* and colony-forming *in vitro* (Garcia et al., 2004; Imura

et al., 2003; Morshead et al., 2003). The precise *in vivo* localization of these “activated” NSCs (aNSCs) is not yet established, but aNSCs can be isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) on the basis of their co-expression of the epidermal growth factor (EGF) receptor, EGFR (Codega et al., 2014; Doetsch et al., 1999a; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mich et al., 2014; Pastrana et al., 2009). In addition to aNSCs, multiple populations of precursor cells having neurogenic potential and that only rarely divide *in vivo* have also been reported. These more dormant precursors have been identified within both the GFAP⁺ (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mich et al., 2014) and GFAP⁻ (Luo et al., 2015; Reeve et al., 2017; Sachewsky et al., 2014) populations of SVZ cells, but their cellular identities and lineage relationships with each other and with aNSCs remain ambiguous. Since individual aNSCs seem to have a limited *in vivo* lifespan (Calzolari et al., 2015; Obernier et al., 2018), yet the aNSC pool recovers after depletion with anti-mitotic agents (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b; Morshead et al., 1994; Reeve et al., 2017), it is presumed that one or more dormant precursor cell types is an upstream NSC that maintains the aNSC pool under basal and/or regenerating conditions (Calzolari et al., 2015; Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b; Obernier et al., 2018; Reeve et al., 2017; Sachewsky et al., 2014).

The most studied of the rarely dividing SVZ populations are B1 astrocytes, an anatomically defined GFAP⁺ cell type whose radial morphology bridges from the ventricular surface to the underlying SVZ vasculature (Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008). B1 astrocytes sort by FACS as part of the GFAP⁺CD133⁺EGFR⁻ population that has been named “quiescent” NSCs (qNSCs) (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Pastrana et al., 2009). Supporting their neurogenic ability, FACS-isolated qNSCs generated OB neurons when transplanted into the SVZ and produced neurospheres when placed in EGF-containing colony-forming conditions, both with a slower time-course than for aNSCs (Codega et al., 2014). In addition to neurons, B1 astrocytes have been implicated in producing oligodendrocytes, ependymal cells, and astrocytes under pathological conditions (Benner et al., 2013; Luo et al., 2008; Menn et al., 2006). Thus, dormant B1 astrocytes are widely considered to be the prime candidates for upstream precursors that sustain periventricular neurogenesis by maintaining/replenishing the aNSC pool.

In this regard, evidence of a direct *in vivo* lineage relationship between dormant B1 astrocytes/qNSCs and aNSCs is limited. The neurogenic properties of the dormant B1 astrocyte population are largely inferred from *in vitro* and transplantation experiments (Codega et al., 2014; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mich et al., 2014) or from viral approaches that specifically label dividing B1 cells (Mirzadeh et al., 2008; Obernier et al., 2018), which are EGFR⁺ and hence potentially aNSCs. Indeed, single-cell RNA sequencing of the GFAP⁺CD133⁺EGFR⁻ population indicates that qNSCs are actually more transcriptionally similar to astrocytes from non-neurogenic regions than to aNSCs (Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015). Specific lineage tracing of the dormant B1 cell population represents a challenging hurdle, as conventional transgenic and viral strategies do not distinguish ventricle-contacting astrocytes from deeper astrocytes (i.e., B2 astrocytes and mature astrocytes) and/or are selective for the rare subpopulation of ventricle-contacting astrocytes that divide.

In the present study, we sought to uncover the *in vivo* biological properties of the dormant population of B1 astrocytes in the adult brain. Using two independent lineage-tracing approaches, both of which limit tracing to ventricle-contacting cells and are not selective to dividing cells, we find that the wider ventricle-contacting GFAP-expressing population shows only limited contribution to either periventricular neurogenesis or to the aNSC pool in the adult brain, whether under basal conditions, during niche repopulation, or even after extended periods of *in vivo* fate-mapping. Notably, artificially activating EGFR signaling in these dormant precursors drives them into a primed state, allowing for increased cell cycle entry in the young adult brain but not in models of early aging or Alzheimer disease, in which neurogenesis is already decreased. We propose a model in which ventricle-contacting GFAP⁺ cells are a pool of potentially recruitable neural precursors that normally contributes little to maintenance of aNSC-mediated adult neurogenesis.

D. Materials and Methods

1. Experimental model and subject details

Animal work was conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and were approved by the animal care committees of the University of Montreal and the Research Center of the University of Montreal Hospital (CRCHUM). For these experiments, we used male Rosa26-stop-EYFP (B6.19X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos}/J, stock number: 006148), FoxJ1-GFP (B6;C3-Tg(FOXJ1-EGFP)85Leo/J, stock number: 010827), hGFAP::GFP (FVB/N-Tg(GFAPGFP)14Mes/J, stock number: 003257) and female 3xTg-AD (B6;129-Psen1^{tm1Mpm} Tg(APP^{Swe},tauP301L)1Lfa/Mmjax; stock number: 034830-JAX) and their WT strain (B6129SF2/J; stock number: 101045). FoxJ1-Cre^{ERT2}GFP (Foxj1^{tm1.1(cre/ERT2/GFP)Htg}/J; stock number 027012) were crossed with Rosa26-stop-EYFP mice, and tamoxifen induction was performed by two gavages at 750mg/kg diluted in corn oil and ethanol 3:1. Mice were socially housed (up to 5 mice/cage) on a 12h light-dark cycle with free access to water and food.

2. Method details

a) Surgical procedures

Mice received acetaminophen drinking solution (1.34mg/ml, Tylenol) for 4 days prior to surgery. Surgeries were performed under isoflurane general anaesthesia (Baxter) and Bupivacaine local anesthesia (1 mg/kg, Hospira).

b) Electroporation

Adult brain electroporation was conducted as described in (Barnabe-Heider et al., 2008; Hamilton et al., 2015; Joppe et al., 2015). Plasmids (Table 1) were amplified by using an endotoxin-free 40min Fast Plasmid Maxiprep Kit (Biotool), then purified and concentrated by ethanol precipitation. Intracerebroventricular plasmid injections were performed using a 1ml

Hamilton syringe into the left ventricle at coordinates: 0mm anteroposterior (AP), +0.9mm mediolateral (ML), -1.5mm dorsoventral (DV) to Bregma. Animals received an ICV injection of 10µg of total DNA in 2µl, delivered over 2 minutes, following by 5 pulses at 50ms intervals at 200V applied with 7mm platinum Tweezertrodes (Havard Apparatus) and an electroporator (ECM 830, Havard Apparatus). If electroporation was combined with osmotic pump infusion, pumps were implanted contralaterally.

c) Osmotic pump infusions

ICV infusions were performed using 3-, 7- or 28-day osmotic pumps (Alzet, model 1007D or 1004 respectively, Durect) attached to brain infusion cannula (Alzet, Brain infusion kit 3, Durect). Cannulae were stereotaxically implanted in the right ventricle at coordinates: 0mm AP and -0.9mm ML to the bregma. For antimetabolic experiments, 2% of Ara-C (Sigma) or vehicle was infused for 7 days, then animals were either euthanized for immediate analysis or pumps were removed and mice euthanized 21 days later. For EGF infusion experiments, EGF was infused at 400ng/day.

d) Tissue analysis

Mice were euthanized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (266/33 mg/kg, Bimeda-MTC/Boehringer Ingelheim Canada Ltd). For immunostaining, mice were intracardially perfused with PBS (Wisent) followed by freshly prepared 4% paraformaldehyde (Acros). Brains were removed, post-fixed overnight, and then cut into 40µm sections using a Leica VT1000S vibrating microtome. Tissue sections were stored in antifreeze at -20C (Bouab et al., 2011). For neurosphere assays, brains were dissected from freshly euthanized mice.

e) Immunostaining

Antibodies are listed in Table 2. Immunostaining was performed as described previously (Bouab et al., 2011; Gregoire et al., 2014). Citrate-EDTA antigen retrieval was used for immunostaining with DCX and Ki67 antibodies. BrdU staining of the olfactory bulbs was performed using HCl denaturation and visualization using DAB (3-3'-diaminobenzide) (Gregoire et al., 2014). Wholemount stainings were performed as described in (Mirzadeh et al., 2008).

EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) staining was performed as described by Salic (Salic and Mitchison, 2008). Briefly, sections were incubated in EdU reaction solution (100mM Tris-buffered saline, 2mM CuSO₄, 4uM Sulfo-Cyanine 3 Azide and 100mM Sodium Ascorbate) for 5 mins, then washed with two quick wash before to be incubated 5min in copper blocking reaction (10mM THPTA in PBS). When EdU staining was coupled with another antibody staining, EdU was performed first.

f) Neurosphere assays

Neurosphere cultures were generated from adult mouse electroporated striatum using 20ng/ml EGF (Sigma) and a protocol based on Reynolds and Weiss (Reynolds and Weiss, 1992), as detailed previously (Bouab et al., 2011; Hamilton et al., 2015; Joppe et al., 2015). Cells were fed each week with EGF and B27 (2%, Invitrogen).

3. Quantification and statistical analyses

Immunostained tissue sections were examined using a motorized Olympus IX81 fluorescence microscope, an Olympus BX43F light microscope, or a Zeiss Axio Observer.Z1 inverted microscope coupled with a Yokogawa Spinning Disc scanning Unit CSU-X1 (Yokogawa Electric Corporation, Japan). All quantifications were performed by a blinded observer using coded slides and 40X or 60X objectives. For quantification of total Ki67 or DCX cells, 4-6 SVZ sections/animal were analyzed. For quantification of electroporated cells and their progeny, 6-12 sections/animal were used for the SVZ and 5-15 sections/animal for the OB. Counts in the SVZ were limited to the DAPI-defined subventricular zone. Counts in the OB were performed by scanning the entire OB sections for positive cells at 40x. All positive cells in the SVZ or OB were confirmed for the presence of a DAPI-stained nucleus. Occasional animals presented relatively few electroporated cells and were thus considered unsuccessful electroporations; these were excluded from the study. Criteria for exclusion was having less than 20% of the mean number of electroporated cells/section for that experimental group. Of the 275 mice used in this study, a total of 8 mice were excluded (2 deaths during surgery, 6 unsuccessful electroporations).

All statistical analyses were achieved using GraphPad Prism, Version 6.01 (GraphPad Software, Inc). Statistical analysis used a two-tailed unpaired Student's t-test or one-way ANOVA with Tukey post-test, as indicated in figure legends. Error bars represent mean \pm standard error of the mean (SEM). Significance level was set at $p \leq 0.05$.

E. Results

1. Genetic targeting of a population of neurogenic ventricle-contacting GFAP⁺ cells by adult brain electroporation

To develop an approach for exploring whether B1 astrocytes in the adult brain participate in aNSC-mediated neurogenesis (Fig. 1A), we turned to a recently described adult brain electroporation strategy that enables genetic targeting of lateral ventricle-contacting cells (Barnabe-Heider et al., 2008). To test the extent of transfection that could be reliably achieved using this approach, plasmids driving GFP or RFP reporter expression from the non-specific CMV regulatory elements were injected into the lateral ventricles and electroporated into the ipsilateral striatal wall. After 3 days, electroporated cells could be seen distributed across the entire extent of the striatal walls on wholemount preparations (Fig. 1B) and on coronal sections (Fig. 1C). Under our experimental conditions, plasmid titration tests showed that multiple plasmids were optimally electroporated when using a total of 10 μ g of injected DNA (Suppl Fig 1A-C). Within these parameters, 1174 ± 151 electroporated cells were labelled after as little as 3 days ($n=5$). Importantly, reporter-positive cells were never observed co-labelled with Mash1, Olig2 or DCX at this early time point (Fig. 1D), indicating that sub-ependymal transit-amplifying progenitors and neuroblasts are not directly transfected by electroporation. We examined multiple parameters of niche activity (Fig. 1E) and, consistent with previous work, the SVZ remained functional following adult brain electroporation. Specifically, the numbers of neurospheres derived from the SVZ (a measure of aNSCs; Fig. 1F), total SVZ proliferating cells (Ki67⁺, Fig 1G) and total SVZ neuroblasts (DCX⁺, Fig. 1H) were unchanged at 3 days following electroporation. Similarly, the number of BrdU-labelled cells found in the olfactory

bulbs was unchanged after 2 weeks, confirming that neuroblast production and migration is normal (Fig. 1I).

The lateral ventricles of young adult mice are lined by ependymal cells (GFAP⁻) and B1 astrocytes (GFAP⁺), with the latter estimated to represent 31% of the total ventricle-contacting cells (Mirzadeh et al., 2008). Since previous studies have used hGFAP-GFP mice to purify aNSC and qNSC astrocyte subpopulations by FACS (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Pastrana et al., 2009), we tested whether the same hGFAP promoter could be used via electroporation to limit genetic modifications to ventricle-contacting GFAP-expressing cells (i.e., potential B1 astrocytes). When we co-electroporated CMV-RFP and hGFAP-myrGFP (myristolated GFP) plasmids, the hGFAP promoter restricted reporter expression to 41% of the total electroporated cells (Fig. 1J, K). Directly electroporating a hGFAP-myrTom (myristolated Tomato) plasmid in hGFAP::GFP mice confirmed that Tomato expression was almost entirely found within the hGFAP::GFP population (Fig. 1L, M). Moreover, when we co-electroporated plasmids driven by the hGFAP promoter and the Nestin promoter, which is also expressed by B1 astrocytes (Mirzadeh et al., 2008; Shook et al., 2012), the vast majority of hGFAP-myrTom cells co-expressed Nestin-GFP (Fig. 1N). We also co-electroporated hGFAP-myrTom and hGFAP-cre plasmids in Rosa26-stop-EYFP reporter mice and found nearly complete overlap between Tomato and Cre-mediated YFP expression, validating hGFAP-cre electroporation in floxed reporter mice as a lineage-tracing tool for these cells (Suppl. Fig. 1D-F). Using these hGFAP-driven reporter and lineage-tracing plasmids, we antigenically characterized the hGFAP plasmid-expressing cells: when immuno-labelled 3-7 days post-electroporation, 45.3±9.4% were GFAP-expressing, 48.5±1.3% were Sox2-expressing, and 14.3±2.5% were S100-expressing (Fig. 1O, P). On average, at these timepoints post-electroporation we obtained approximately 557.5 ± 50.9 hGFAP promoter-expressing cells per electroporated SVZ (n=40). Given that there are an estimated 6225 anatomically identified B1 cells per SVZ in the young adult mouse (Mirzadeh et al., 2008), this represents a potential upper maximum of 6-7% of the total population of ventricle-contacting B1 astrocytes.

Notably, about 2% of B1 astrocytes in the young adult brain are normally dividing (Shook et al., 2012). Using EdU injections and lineage-tracing in Rosa26-stop-EYFP reporter mice, we indeed detected rare hGFAP plasmid-expressing cells that incorporate EdU (Fig. 1Q) and that

give rise to YFP⁺DCX⁺ neuroblasts in the SVZ (Fig. 1R) and YFP⁺ neurons in the olfactory bulbs (Fig. 1S). Taken together, these data indicate that adult brain electroporation with hGFAP-driven plasmids targets a ventricle-contacting cell population that expresses multiple B1 astrocyte markers and contributes to olfactory neurogenesis. We herein refer to the totality of cells targeted by hGFAP-driven plasmids as the hGFAP⁺ population.

2. Limited contribution of ventricle-contacting hGFAP⁺ cells to adult neurogenesis

We used the adult brain electroporation strategy to study the *in vivo* dynamics of proliferation and neurogenesis by the hGFAP⁺ population in greater detail (Fig. 2A). When we electroporated 3-month-old mice with hGFAP-myrGFP and administered single daily injections of EdU (allowing a small fraction of the total dividing cells to be identified), GFP⁺EdU⁺ cells were not detected after 3 or 7 days and appeared in 2/5 mice at 14 days (3d, 0/1105 GFP⁺ cells, n=4; 7d, 0/782 GFP⁺ cells, n=4; 14d, 3/800 GFP⁺ cells, n=5) (Fig. 2B,C). Since plasmid-driven reporter expression is transient and EdU injections only label cells entering S-phase within a few hours of injection, we also electroporated hGFAP-cre plasmids into Rosa26-stop-EYFP mice to permanently label hGFAP⁺ cells and then delivered EdU intraventricularly for 28-days via osmotic pumps. Using this second approach, we confirmed that rare YFP⁺EdU⁺ cells (4/730 YFP⁺ cells) were present in 4/4 mice (Fig. 2D). The observed number of dividing YFP⁺ cells may represent an underestimate, as EdU exhibits some toxicity for dividing cells. Thus, the overall hGFAP⁺ population targeted by electroporation at 3 months of age is highly quiescent but contains rare cells that will enter the cell cycle over the following month.

Using the hGFAP-Cre plasmid to drive recombination in the Rosa26-stop-EYFP electroporation fate-mapping model, we then examined the temporal appearance of SVZ neuroblasts and olfactory bulb (OB) neurons derived from this hGFAP⁺ population. Mice were electroporated at 3 months of age and the hGFAP⁺ cells were lineage traced for up to 5 additional months. In the SVZ, total numbers of YFP⁺ cells did not significantly change across this period (Fig. 2E), and the initially labelled cohort of cells was found to exhibit a constant production of small numbers of neuroblasts (Fig. 2F). YFP⁺DCX⁺ neuroblasts were not present in the SVZ at

one week post electroporation, and then represented a mean of less than 3% of YFP⁺ cells/animal in the SVZ at all subsequent post-electroporation time-points (Fig. 2F). In the olfactory bulbs, YFP⁺ neurons were detected in 2/4 electroporated mice after 4 weeks (3.9±3.8 YFP⁺ cells/section), 5/5 mice after 12 weeks (3.0±2.6 cells/section), and 3/3 mice after 21 weeks (3.6±0.6 cells/section) (Fig. 2G), and calculation of the SVZ-to-OB ratio of YFP⁺ cells confirmed a time-dependent increase in labelled OB neurons (Fig. 2H). Interestingly, while total numbers of YFP⁺ SVZ neuroblasts and OB neurons generally remained relatively low, occasional animals with higher numbers of YFP⁺ cells were also encountered (see individual data points, Fig. 2E,G); this suggests that dividing cells in the hGFAP⁺ population typically produce only small numbers of neurons, but either i) occasionally undergo very rare higher amplification divisions as well, or ii) occasionally include a directly electroporated aNSC. Overall, when electroporated at 3 months of age, virtually all animals that undergo electroporation-mediated labelling of a cohort of hGFAP⁺ cells eventually produce labelled SVZ neuroblasts and olfactory bulb neurons.

Given the unexpectedly small number of neurons derived from the hGFAP⁺ population, we sought an alternative method that would be capable of specifically lineage-tracing this ventricle-contacting hGFAP⁺ population. In this regard, transcriptomic studies have identified expression of the ependymal cell-associated gene FoxJ1 in NSCs (Beckervordersandforth et al., 2010; Jacquet et al., 2011), and primarily in qNSCs (Codega et al., 2014). Using hFOXJ1-EGFP transgenic mice, we indeed found that approximately one-third of the electroporated hGFAP⁺ cells are located within the EGFP-expressing population (Fig. 2I,J). We therefore used heterozygous FoxJ1^{CreERT2} knock-in (KI) mice, in which Tamoxifen-inducible CreER is knocked into one allele of the endogenous FoxJ1 locus, in order to lineage trace the Foxj1-expressing population. FoxJ1^{CreERT2} KI mice were crossed with Rosa26-stop-EYFP mice (the cross herein referred to as FoxJ1^{CreERT2}-EYFP mice) to enable tamoxifen-induced YFP expression in FoxJ1⁺ cells and their progeny. One month following tamoxifen administration to young adult FoxJ1^{CreERT2}-EYFP mice, strong YFP labelling was present along the entire ependyma of the ventricular system, confirming highly efficient recombination (Fig. 2K). Supporting that the endogenous FoxJ1 promoter recombines within a neurogenic precursor, immunostaining revealed rare YFP⁺DCX⁺ cells within the SVZ of 3/3 mice at 1 month post-

tamoxifen and 3/3 mice at 4 months post-Tamoxifen (1m, 18/1418 YFP⁺ cells, n=3; 4m, 11/905 YFP⁺ cells, n=3) (Fig. 2L, M). In accord with our electroporation data, we also identified increasing numbers of YFP⁺ neurons within the olfactory bulbs over this time period (1m, 0.7±0.3 YFP⁺ cells/section, 4/5 mice; 4m, 1.8±0.3 YFP⁺ cells/section, 4/4 mice) (Fig. 2N, O). Notably, despite extensive tamoxifen-induced recombination in the SVZ, total numbers of neuroblasts and neurons remained low.

Together, these complementary electroporation and transgenic fate-mapping strategies are consistent in indicating that the ventricle-contacting hGFAP⁺ population within the adult SVZ has a detectable but minimal contribution to ongoing neurogenesis.

3. Ventricle-contacting hGFAP⁺ cells in the adult SVZ do not produce aNSCs

The minimal involvement of hGFAP⁺ precursors to ongoing adult neurogenesis prompted us to more directly test whether or not these cells are upstream of aNSCs. To do so, we examined their *in vitro* and *in vivo* abilities to generate EGF-responsive neurosphere-initiating cells. To test the capacity of the hGFAP⁺ population to produce aNSCs *in vitro*, we cultured SVZ neurospheres within a short period after electroporation (Fig. 3A). 3-month-old Rosa26-stop-EYFP reporter mice were first electroporated with either hGFAP-cre, Nestin-cre, or CAG-cre plasmids, and 7 days later the electroporated SVZs were dissected and cultured in standard EGF-containing neurosphere-forming conditions. All cultures produced approximately normal numbers of neurospheres, but no YFP⁺ neurospheres were obtained (Fig. 3B, C). Since one possibility for the failure of neurosphere formation by electroporated hGFAP⁺ cells might be a requirement for additional factors, we then repeated this experiment using various growth factor combinations reported to be mitogenic for different NSC states/subtypes. 3-month-old Rosa26-stop-EYFP reporter mice were electroporated with hGFAP-cre and 7 days later the SVZs were cultured in the presence of either EGF alone, EGF/FGF2, EGF/FGF2/LIF, or LIF alone. Normal numbers of neurospheres were generated in all trophic conditions containing EGF, yet again, no YFP⁺ neurospheres were obtained in any condition. Interestingly, we observed small clusters of YFP⁺ cells in all conditions, which began appearing after 7 days *in*

vitro, peaked in number around 14 days *in vitro*, and had almost disappeared by 28 days *in vitro*; however, these clusters never exceeded about 10 cells (Fig. 3D, E).

To independently verify this finding, we used the FoxJ1^{CreERT2}-EYFP model. 3.5-month-old FoxJ1^{CreERT2}-EYFP mice were tamoxifen treated and processed 13 days later to generate neurosphere cultures from both the SVZ and the spinal cord. In cultures derived from the spinal cord, a niche where neurospheres originate primarily from hFOXJ1-expressing cells (Barnabe-Heider et al., 2010), we indeed found that approximately 50% of neurospheres were YFP⁺. In contrast, the same mice did not produce any YFP⁺ neurospheres from the SVZ (Fig. 3F-H). Together, the absence of labelled neurospheres in the electroporation and transgenic models indicates i) that the EdU-incorporating hGFAP⁺ cells do not themselves correspond to EGF- or EGF/FGF2-responsive aNSCs or to LIF-responsive "primitive" NSCs, and ii) that hGFAP⁺ cells do not spontaneously default into neurosphere-forming aNSCs when removed from their *in vivo* niche.

We then tested whether hGFAP⁺ cells might exhibit a time-dependent generation of aNSCs if maintained for a more prolonged period within their *in vivo* niche (Fig. 3I). To do so, we extended the interval between electroporation and culturing to several months. When neurosphere cultures were generated 2 months following electroporation, YFP⁺ neurospheres were still not produced *in vitro*, regardless of whether Cre expression had been driven by the hGFAP, Nestin, or CAG promoters (not shown). As previously, only small clusters of YFP⁺ cells were observed (Fig. 3J). We confirmed and extended this finding using the FoxJ1^{CreERT2}-EYFP model. When 4-month-old mice were tamoxifen treated and then cultured after an additional 4 months *in vivo*, 3/4 mice yielded extremely rare YFP⁺ neurospheres (1.3 ± 0.5 YFP⁺ neurospheres/SVZ) (Fig. 3K). This suggests that hGFAP⁺ cells within the FoxJ1-expressing qNSC population might, very rarely, generate rapidly amplifying aNSCs.

Together, these data allow us to conclude that ventricle-contacting hGFAP⁺ cells in adult mice contribute small numbers of neurons to the olfactory bulb neurons but do not play a significant role in maintaining the overall pool of aNSCs.

4. Ventricle-contacting hGFAP cells are not recruited during repopulation of the SVZ

Since one function of dormant stem cell populations may be to participate in tissue repair, we tested whether ventricle-contacting hGFAP cells are recruited in a well characterized model of SVZ repopulation. Administration of the anti-mitotic agent cytosine-arabinoside (Ara-C) depletes the SVZ of its actively dividing NSCs, progenitors and neuroblasts, which are subsequently replenished by more quiescent NSCs. To determine whether ventricle-contacting hGFAP cells are recruited during this repopulation process, we electroporated Rosa26-stop-EYFP reporter mice with hGFAP-cre as previously and immediately implanted 7d intracerebroventricular (ICV) pumps containing Ara-C (Fig. 4A). As expected, one week of Ara-C infusion drastically decreased total numbers of proliferating SVZ cells (Ki67⁺) and SVZ neuroblasts (DCX⁺) (Fig. 4B, E, G). Analysis of the electroporated YFP⁺ population revealed that total YFP⁺ cells were unaffected at the end of 7 days of Ara-C treatment, indicating that they remain dormant during this period (Fig. 4I). In animals that underwent an additional 21 days of repopulation, the Ki67 and DCX populations were completely restored to normal levels (Fig. 4C, F, H). In these repopulated animals, although there was a tendency towards a loss of YFP⁺ cells in the SVZ (Fig. 4J), there was no corresponding increase in YFP⁺DCX⁺ neuroblasts within the repopulated SVZ (Fig. 4K). Thus, ventricle-contacting hGFAP⁺ cells do not play a significant role in niche repopulation in response to Ara-C-mediated depletion of the SVZ niche.

5. Ventricle-contacting hGFAP cells can be recruited by ectopic EGFR signalling: differential responsiveness in the young adult, middle-aged, and 3xTg-AD niches

EGFR is a marker of aNSCs that is not expressed in qNSCs/dormant B1 astrocytes, and EGFR activation is sufficient to stimulate proliferation of aNSCs (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015). To evaluate whether the hGFAP⁺ cell population is responsive to EGF *in vivo*, we electroporated hGFAP-cre plasmid in 3-month-old Rosa26-stop-

EYFP reporter mice and then implanted 3-day EGF-containing osmotic pumps (Fig. 5A). EGF infusion robustly increased total EdU incorporation surrounding the lateral ventricles, as expected (Fig. 5B, C), but did not significantly affect EdU incorporation by the hGFAP⁺ cells (Fig. 5D-F). We therefore asked whether ectopically stimulating EGFR-induced signalling pathways in these hGFAP⁺ cells could recruit them into the cell cycle.

To achieve this, 3-month-old Rosa26-stop-EYFP reporter mice were co-electroporated with plasmids encoding hGFAP-cre mixed with either an empty vector (EV) or a constitutively active form of EGFR (EGFR-CA) (Fig. 5G). Immunostaining at 7-days post-electroporation confirmed that EGFR-CA electroporation increased the proportion of hGFAP⁺ cells that were EGFR⁺ cells by 35-fold (EV, 0.5±0.2% of YFP⁺ cells; EGFR-CA, 18.1±1.9% of YFP⁺ cells) (Fig. 5H, I). Immunostaining for phospho-S6 ribosomal protein (pS6), which is a readout of EGFR-induced mTOR signalling (Paliouras et al., 2012) and also a putative marker of “primed” quiescent stem cells (Rodgers et al., 2014), likewise showed a 10-fold increase (EV, 2.1±0.6% of YFP⁺ cells; EGFR-CA, 22.8±1.4% of YFP⁺ cells), confirming that EGFR-CA successfully activates downstream signalling pathways in hGFAP⁺ cells (Fig. 5J, K). Analysis of EdU incorporation by the electroporated cells revealed that EGFR-CA increased cell cycle entry of hGFAP⁺ cells by 1.7-fold (EV, 2.9±0.2% of YFP⁺ cells; EGFR-CA, 5.0±0.3% of YFP⁺ cells) (Fig. 5H, J, L). Thus, ectopically activating EGFR-induced signalling in the hGFAP⁺ population is sufficient to prime dormant hGFAP⁺ precursors, enhancing their likelihood of undergoing proliferation.

Overall proliferation in the SVZ decreases continuously in the postnatal and adult mouse brain, including a steep phase of decline until about 6 months of age (Hamilton et al., 2013). This age-related decrease is further accelerated in models of Alzheimer’s disease (AD) (Hamilton and Fernandes, 2018). Although the exact mechanisms are incompletely understood, age- and AD-related decreases in SVZ proliferation are mediated by both cell-intrinsic and micro-environmental factors (Hamilton et al., 2013; Piccin et al., 2013). We therefore tested whether aging and AD affect the baseline activity of the hGFAP⁺ population and/or their ability to be activated by ectopic EGFR-CA. Interestingly, when 6-month-old (middle-aged) Rosa26-stop-EYFP reporter mice were electroporated as above (Fig. 5M), the basal percentage of hGFAP⁺ cells that were primed (pS6⁺) was 2-3-fold higher than for their younger 3-month-old

counterparts (EV at 3m, $2.2 \pm 0.5\%$; EV at 6m, $5.6 \pm 1.2\%$) ($p < 0.03$, t-test) (Fig. 5N). Notably, while 3- and 6-month-old mice achieved similar proportions of hGFAP⁺ cells that are primed (pS6⁺) in response to EGFR-CA (Fig. 5N), only the 3-month-old mice showed an increase in EdU incorporation (Fig. 5O). The increase in hGFAP⁺EdU⁺ cells in 3-month-old mice occurred selectively in hGFAP⁺ cells that had up-regulated pS6 expression, confirming that cell cycle entry is restricted to the primed population. These data reveal an age-related suppression of the ability of primed hGFAP⁺ cells to enter the cell cycle (Fig. 5P).

We also asked whether ventricle-contacting hGFAP⁺ cells can be activated in the 3xTg model of AD. Since 3xTg-AD mice and their WT control strain do not permit Cre-mediated lineage tracing, we electroporated them with EV or EGFR-CA plasmids that were mixed with an hGFAP-myrGFP reporter plasmid (Fig. 5Q). At 6 months of age, 3xTg-AD mice and their WT strain controls were not significantly different in their baseline proportion of primed hGFAP⁺ cells (i.e., GFP⁺pS6⁺) (Fig. 5R). EGFR-CA increased the primed hGFAP⁺ cells equally in 3xTg-AD and WT strains (WT strain, $10.4 \pm 2.7\%$ pS6; 3xTg-AD, $12.8 \pm 3.6\%$ pS6) (Fig. 5R). However, EdU incorporation increased significantly in only the WT strain (Fig. 5S). Thus, at an age at which hGFAP⁺ precursors in the WT strain can undergo both EGFR-induced priming and subsequent cell cycle entry, hGFAP⁺ precursors in 3xTg-AD mice can be equally efficiently primed yet are unable to overcome an AD-associated proliferative inhibition.

Despite only transient expression of the electroporated EGFR-CA plasmid, longer term analysis is consistent with EGFR-CA-induced activation promoting entry of young adult hGFAP⁺ precursors into a neurogenic pathway (Fig. 5U). When analyzed at 1 month post-electroporation, mice electroporated with hGFAP-cre and EGFR-CA had fewer YFP⁺ cells within the SVZ (Fig. 5V), more YFP⁺ cells in the olfactory bulbs (Fig. 5W), and consequently a shift in their OB/SVZ ratio of hGFAP-derived cells (Fig. 5X). Collectively, these data demonstrate that ectopic activation of EGFR signalling in ventricle-contacting hGFAP precursors facilitates their release from dormancy. This is sufficient to allow their cell cycle entry and recruitment into a neurogenic pathway during early adulthood, but is blocked by age- and AD-related anti-neurogenic signals.

F. Discussion

Heterogeneity of GFAP-expressing cells within periventricular tissue poses significant challenges to deciphering the identity and biology of upstream players within the SVZ lineage. Most attention has focused on the ventricle-contacting subpopulation of GFAP⁺ cells, i.e., B1 astrocytes, as a potential upstream precursor for the actively dividing aNSC population (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015). FACS-based isolation of GFAP⁺CD133⁺EGFR⁻ cells, a phenotype that includes B1 astrocytes, supports that this population has neurogenic potential. In the young adult brain, about 2% of ventricle-contacting astrocytes are indeed in the cell cycle, and a recent retroviral lineage tracing strategy indicated the majority of these divisions in the adolescent mouse brain are symmetric differentiating divisions that lead to neuroblast formation (Obernier et al., 2018; Shook et al., 2012). However, it is not yet clear to what extent dividing and non-dividing B1 astrocytes represent the same or distinct cellular pools, particularly during adulthood. Moreover, under conditions of AraC-induced depletion of the SVZ, other precursors that include deeper B2 astrocytes, pre-GEPCOT cells, and GFAP-negative “primitive” NSCs appear capable of replenishing aNSCs and restoring neurogenesis (Mich et al., 2014; Obernier et al., 2018; Reeve et al., 2017; Sachewsky et al., 2014). Thus, a direct lineage relationship between dormant B1 astrocytes and the aNSC pool under homeostatic and/or regenerating conditions has not yet been established.

Here, we have used two independent methodologies to attempt to directly test the contribution of B1 astrocytes to aNSC-mediated adult neurogenesis. Importantly, both approaches enable lineage-tracing of dormant ventricle-contacting populations of cells. First, we used an adult brain electroporation strategy involving intraventricular injection of plasmids driven by the same hGFAP promoter that enabled FACS-based isolation of qNSCs. Second, we used a transgenic strategy driven by the promoter for FoxJ1, a cilia-associated gene that is expressed in both ependymal cells and qNSCs (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014). Like previous transgenic and viral approaches, the strategies we used each have potential caveats and limitations that are discussed below. Nevertheless, these approaches yielded nearly identical findings, supporting several conclusions that impact our current understanding of SVZ niche function.

1. The hGFAP⁺ population has limited neurogenic output in the adult SVZ

First, our data support the existence of a population of ventricle-contacting GFAP⁺ cells that can act as neurogenic precursors during adulthood, but whose neurogenic contribution seems relatively minor against the massive neurogenic output of the young adult SVZ. Using electroporation, we initially labelled hundreds of hGFAP⁺ cells per animal yet there were typically less than 5 neurons/olfactory bulb section after as much as 5 months *in vivo*. Similarly, using FoxJ1-driven recombination to transgenically label the FoxJ1-expressing NSC population typically yielded less than 2 olfactory neurons/section after as much as 4 months. Even taking into account that these approaches label only a fraction of the estimated 6225 B1 cells in young adult mice, the number of labelled olfactory neurons is still at least an order of magnitude lower than the 30000 neuroblasts that enter the olfactory bulbs *daily* in young adult mice (hundreds of thousands per month during early adulthood). The interpretation that B1-derived neurons represent only a minor proportion of SVZ-derived neurons appears to be consistent with data in a recent study that used electroporation-mediated transfer of Cre mRNA into the SVZ of reporter mice (Bugeon et al., 2017). In that study, electroporation of mRNA (as opposed to promoter-driven plasmids) resulted in non-specific tracing of the majority of ventricle-contacting cells of the lateral ventricle wall, yet still only labelled approximately about 17 neurons/olfactory bulb section after 1 month. Similarly, very recent modeling of changes in B1 astrocyte numbers led Obernier and colleagues to predict that B1 astrocytes may have a diminished role in maintaining adult neurogenesis (Obernier et al., 2018).

2. The aNSC pool is not sustained by the hGFAP⁺ population

Second, our data fail to detect a contribution of ventricle-contacting hGFAP⁺ cells to either ongoing maintenance of the aNSC pool or to niche replenishment following experimental depletion of constitutively proliferating SVZ cells. Neurosphere-initiating cells include both aNSCs and their immediate progeny, the transit-amplifying progenitor population (Doetsch et al., 1999a; Imura et al., 2003; Pastrana et al., 2009). Using both the electroporation and transgenic models, we found that the hGFAP⁺ population does not produce neurospheres when

cultured within 2 weeks of electroporation. This finding bears similarities to recent FACS-based studies that have indicated a dissociation between EGFR-negative or –low cells SVZ cells and neurosphere-initiating ability (Codega et al., 2014; Mich et al., 2014). Our data validate that hGFAP⁺ cells recombined using the electroporation and transgenic lineage-tracing models are not themselves neurosphere-initiating cells (neither aNSCs nor progenitors), and moreover, demonstrate that the hGFAP⁺ population does not include cells that can directly default into neurosphere-initiating cells when transferred into favorable *in vitro* conditions. Since it is possible that the generation of aNSCs involves a multi-step activation process that is not easily replicated *in vitro*, we then extended the interval between labelling and *in vitro* culturing to several months, allowing time for hGFAP⁺ cells to generate neurosphere-initiating cells within their *in vivo* niche: again, labelled neurospheres were absent (electroporation strategy) or extremely rare (transgenic strategy), providing definitive *in vivo* evidence that ventricle-contacting hGFAP⁺ cells within the adult brain have a negligible contribution to maintenance of the aNSC pool under homeostatic conditions.

Using the electroporation strategy, we also found that hGFAP⁺ cells are not recruited during the robust AraC-mediated model of *in vivo* niche depletion and repopulation. Following 21 days of repopulation that completely replenished the SVZ, there was no detectable increase or decrease in hGFAP⁺ cell-derived proliferating cells, progenitors or neuroblasts within the regenerated SVZ. This aligns with a previous study showing that, at least at early stages of SVZ repopulation, FACS-isolated qNSCs do not increase their propensity to produce neurospheres. The exact precursor lineage involved in SVZ repopulation remains unclear, but Oct-4-expressing pNSCs, pre-GEPCOT cells, and deeper B2 astrocytes have all been implicated (Mich et al., 2014; Reeve et al., 2017; Tavazoie et al., 2008).

3. Dormant hGFAP⁺ cells have neurogenic potential that is inhibited in contexts of aging and AD

Third, our data indicate that ectopic expression of an activated EGF receptor is sufficient to recruit dormant ventricle-contacting GFAP-expressing cells into a neurogenic pathway, but that recruitment is blocked in the contexts of aging and AD. EGFR is a marker of proliferating SVZ stem cells and progenitors, and availability of EGFR ligands directly modulates overall

levels of SVZ proliferation (Paliouras et al., 2012; Tropepe et al., 1997). We found that the hGFAP⁺ population was not responsive to infusion of EGF ligand itself, suggesting an absence of EGFR expression, but electroporation of EGFR-CA led to EGFR expression and activation of downstream mTOR signaling within 20-25% of the dormant hGFAP⁺ cells. In young adult mice, we could subsequently detect cell cycle entry by about one-tenth of the EGFR-primed hGFAP⁺ cells over the course of 1 week, and a shift in hGFAP-derived cells from the SVZ to the olfactory bulb after 1 month. Notably, it is well known that total levels of SVZ proliferation decline markedly between 3 and 6 months of age, as well as in AD disease models. The mechanisms underlying these declines involve both cell-intrinsic and microenvironmental factors (Hamilton et al., 2013), and recent studies suggest that the microenvironmental changes may be particularly prominent (DeCarolis et al., 2015; Hamilton et al., 2013; Piccin et al., 2014; Villeda et al., 2011). Interestingly, EGFR-CA-induced cell cycle entry was not detected in 6-month-old mice or in the 3xTg model of Alzheimer's disease, despite achieving similar levels of primed hGFAP⁺ cells as in 3-month-old mice. These findings show that dormant hGFAP⁺ cells have latent neurogenic potential that can potentially be exploited via ectopic stimulation of their EGFR signaling, but that inhibitory age- and AD-associated environmental signals remain dominant and would require coincident suppression.

4. Implications and possible caveats

How can these data be reconciled with the current model of SVZ function? The presence of a population of ventricle-contacting GFAP⁺ cells that has *in vivo* neurogenic activity, and yet shows no evidence of contributing to the aNSC pool under either homeostatic or repopulation conditions, is not predicted by the current model. The implication of this finding is that there are at least two pools of neurogenically competent cells, aNSCs and ventricle-contacting GFAP⁺ cells, with little ongoing flux from the ventricle-contacting pool to the aNSC pool during adulthood. Interestingly, this bears a resemblance to events occurring during development of the primate cortex, when cortical neurogenesis is initiated by ventricle-contacting radial glial cells, and later sustained by non-ventricle-contacting outer radial glia cells, which have withdrawn their apical process (Hansen et al., 2010; Nowakowski et al., 2016).

Although the electroporation- and transgenic-based strategies used here both support the existence of B1 astrocytes that have little contribution to aNSC-mediated neurogenesis during adulthood, our findings do not completely exclude the possibility of a heterogeneous B1 astrocyte population that includes a more highly neurogenic subtype (Fig. 6). This is not implausible, as it is already clear that the B1 population contains both dividing and dormant populations (Mirzadeh et al., 2008; Obernier et al., 2018; Shook et al., 2012), and it remains unproven to what extent these populations are functionally equivalent or whether the dormant population rather serves as a niche cell for the dividing B1 cells. Moreover, dividing B1 astrocytes can also be separated into symmetrically differentiating and symmetrically self-renewing members, which may represent distinct lineages (Obernier et al., 2018). In light of the present findings, such possibilities would require that B1 astrocytes contributing to aNSC-mediated neurogenesis are resistant to electroporation (perhaps for anatomical reasons or to lack of GFAP promoter expression) and are also FoxJ1 negative. Interestingly, it is reported that EGF infusion results in a rapid increase in the number of ventricle-contacting GFAP cells, raising the possibility that small numbers of non-B1 astrocytes might undergo transient, activation-associated contact with the ventricle (Doetsch et al., 2002). Indeed, Obernier and colleagues recently showed that a subpopulation of cells infected with intraventricular retrovirus had the anatomical features of vascular-adjacent B2 astrocytes (Obernier et al., 2018). This raises the possibility that the occasional animals we observed having higher numbers of hGFAP-derived neurons or rare FoxJ1-derived neurospheres might actually represent tracings of B2 astrocytes rather than rare higher amplification events by B1 astrocytes.

Overall, these data argue that, during adulthood, the aNSC pool and adult SVZ neurogenesis are largely maintained independently of a direct neurogenic contribution from ventricle-contacting GFAP⁺ cells. The importance of the dormant B1 cell population as niche components, and whether they can be expanded *in vivo* to serve as a potentially exploitable neurogenic reservoir, are important topics that remain to be explored.

G. Tables and Figures

Tableau I. Plasmid list

Name	Promoter	Gene	Company	Principal Investigator
Empty Vector	CMV	NA	-	Eric Rassart
EGFR-CA	SV40	EGFR L858R	Addgene (# 11012)	Matthew Meyerson
CAG-cre:GFP	CAG	Cre:GFP	Addgene (# 13776)	Connie Cepko
GFPC2	CMV	GFP	-	Grigorios Paliouras
hGFAP-cre	hGFAP	Cre	Addgene (# 40591)	Albee Messing
hGFAPmyrGFP	hGFAP	myrGFP	Addgene (# 22672)	Robert Benezra
hGFAPmyrTomato	hGFAP	myrTomato	Addgene (# 22671)	Robert Benezra
Nestin-cre	Nestin	Cre	-	Fanie Barnabé-Heider
Nestin-GFP	Nestin	GFP	-	Fanie Barnabé-Heider
RFP	CAG	RFP	-	Fanie Barnabé-Heider

Tableau II. Antibody list

Name	Specie	Company	Dilution
BrdU	Rat	AbDSerotec	1:800
DCX	Guinea Pig	Chemicon	1:3000
DCX	Goat	Santa Cruz biotech	1:250
EGFR	Rabbit	Abcam	1:100
GFP	Chicken	Aves Lab	1:2000
GFAP	Rabbit	Dako Diagnostic	1:500
GFAP	Mouse	Chemicon	1:1000
Ki67	Mouse	BD Biosciences	1:100
Mash1	Mouse	BD Biosciences	1:50
Olig2	Rabbit	Chemicon	1: 250
S100B	Mouse/Rabbit	Sigma	1:1000
Sox2	Rabbit	Chemicon	1:1000
pS6	Rabbit	Cell Signaling	1:3000
Secondary Ab (Alexa)	-	Invitrogen	1 : 1000

Figure 1

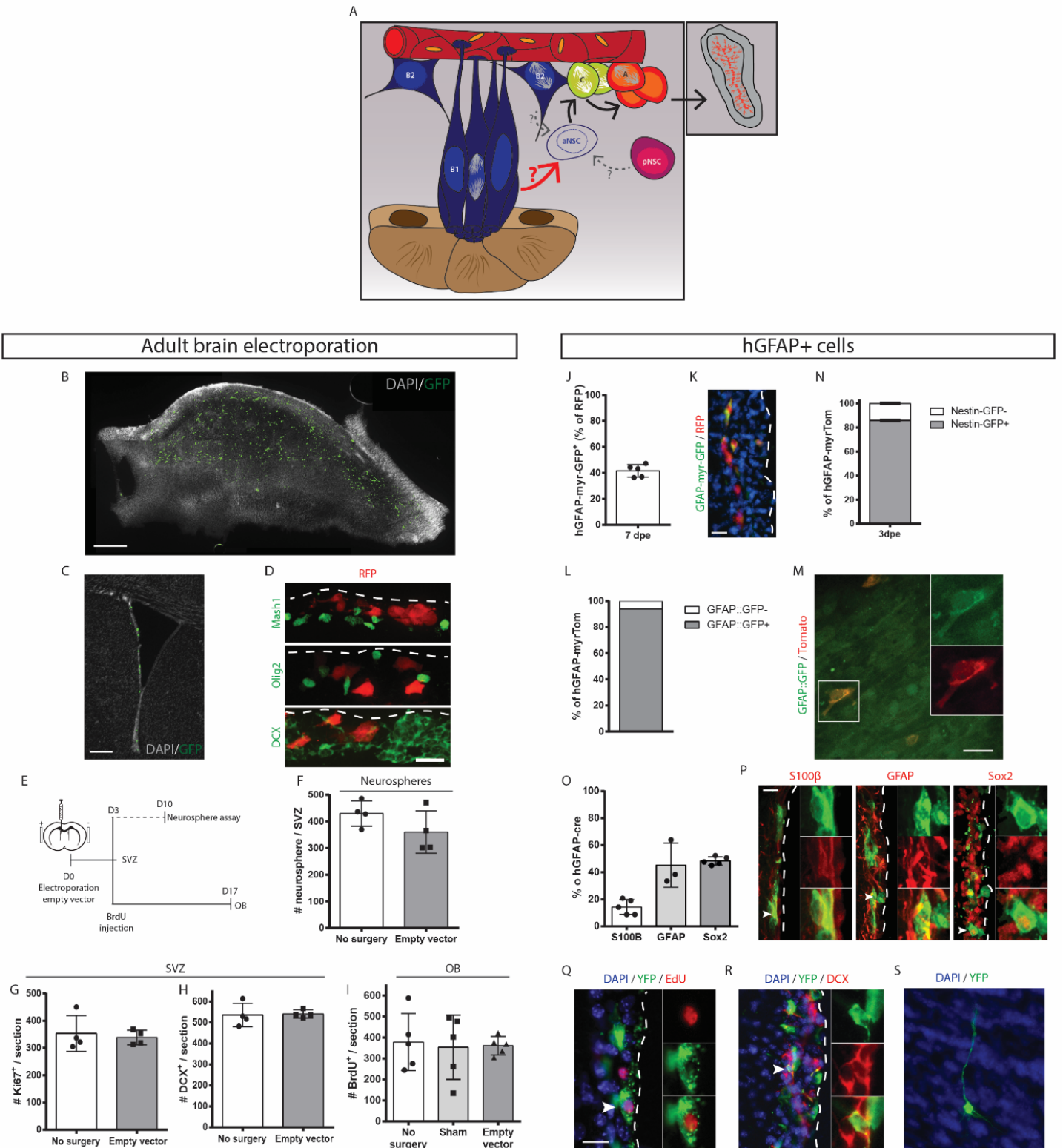


Figure 1: Genetic targeting of a population of neurogenic ventricle-contacting GFAP⁺ cells by adult brain electroporation.

(A) Model of potential upstream precursors contributing to aNSC-mediated adult neurogenesis.

(B-I) Adult brain electroporation. (B,C) Distribution of electroporated cells across the ventricle wall on wholemount preparations (B) and coronal sections (C). (D) Representative micrographs of electroporated cells after 3 days showing no colocalization with Mash1, DCX and Olig2 (n=5). (E) Timelines of electroporation control experiments. (F-H) 3 days after procedure, electroporated (n=4) and non-electroporated (n=4) animals were sacrificed for neurosphere assays (F) and quantification of SVZ Ki67⁺ proliferating cells (G) and DCX⁺ neuroblasts (H) (unpaired t-tests). (I) Unoperated (n=5), sham operated (n=5) and electroporated (n=5) mice received BrdU on day 3 and were analyzed on day 17 for quantification of the BrdU⁺ cells in the OB (one-way ANOVA).

(J-S) Characterization of the ventricle-contacting hGFAP⁺ cell population in 3-month-old mice. (J,K) hGFAP-myrGFP and CAG-RFP plasmids were co-electroporated and analyzed after 7 days (n=5). Quantification of colocalization between GFP⁺ and RFP⁺ signals (J) and representative micrograph (K). (L,M) SVZ wholemounts prepared from hGFAP::GFP transgenic mice 7-days post-electroporation with hGFAP-myrTom plasmids. Quantification of colocalization between Tom⁺ and GFP⁺ signals (L) and representative micrograph (M). (N) Quantification of colocalization between Nestin-GFP⁺ and hGFAP⁺ cells 3 days after electroporation (n=6). (O,P) Colocalization of hGFAP⁺ cells with ependymal (S100^β), astrocytic (GFAP) and precursor (Sox2) markers 7 days after electroporation with hGFAP-Cre (n=5). Quantification (O) and representative micrographs (P). (Q-S) Representative micrographs of electroporated EdU⁺ cells (Q) and hGFAP-derived DCX⁺ neuroblasts (R) in the SVZ and hGFAP-derived interneurons in the OB (S).

Scale bars represent 200μm in (A), 500μm in (B), 20μm in (C), 20μm in (J), 20μm in (M) (for the 3 micrographs), 20μm in (O) (for P, Q and R). Error bars represent mean ± SEM.

Figure 2

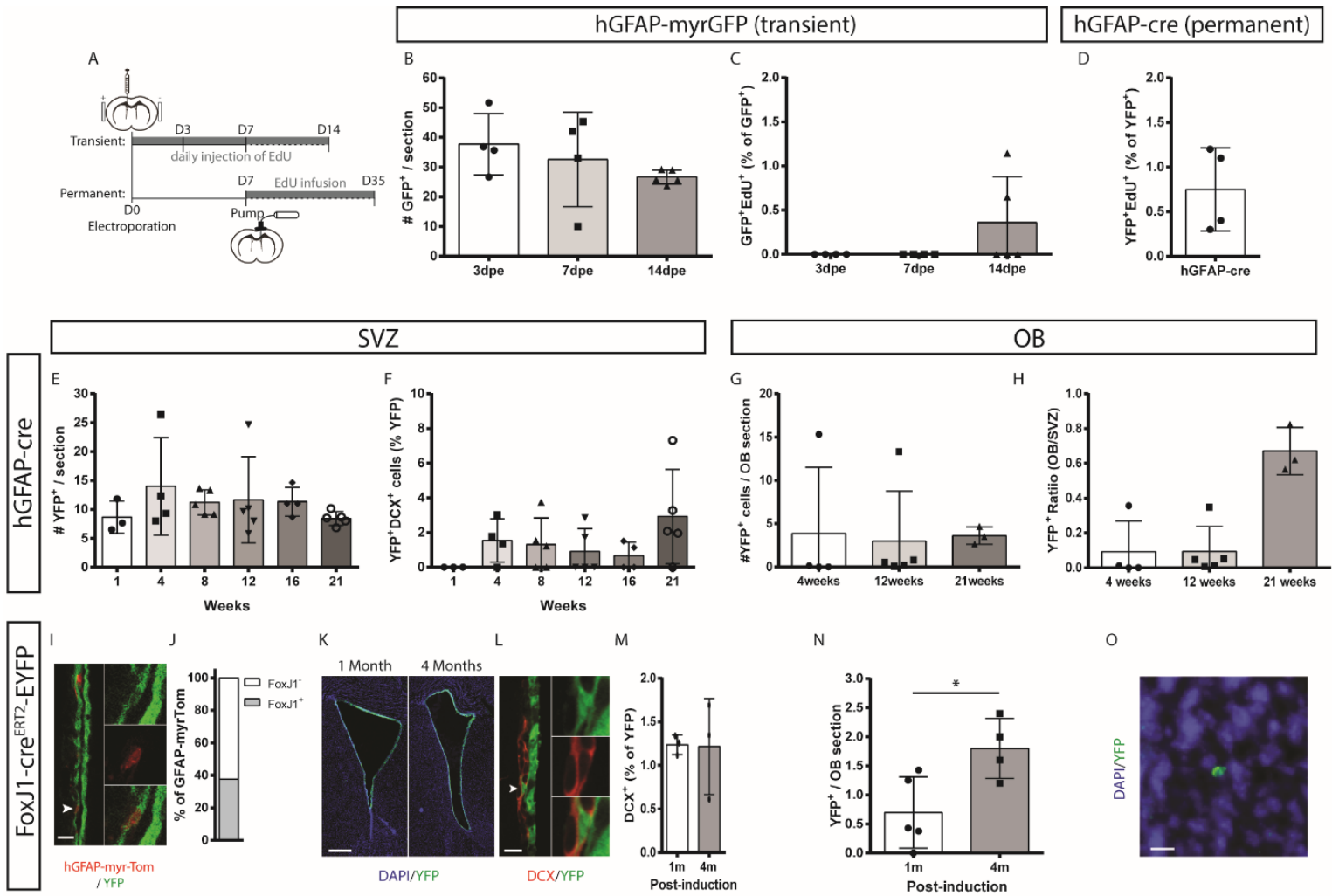


Figure 2: Limited contribution of ventricle-contacting hGFAP⁺ cells to adult neurogenesis

(A-D) EdU incorporation by hGFAP⁺ cells. (A) EdU incorporation paradigms. (B,C) Transiently labelled hGFAP⁺ cells in 3-month-old mice electroporated with hGFAP-myrGFP plasmids and analyzed after 3 days (n=4), 7 days (n=4) and 14 days (n=5). Quantification of the GFP⁺ cells (B) and the GFP⁺ EdU⁺ (C) cells in the SVZ (one-way ANOVA). (D) Quantification of permanently labelled hGFAP⁺ cells in ROSA26-stop-EYFP reporter mice electroporated with hGFAP-cre plasmids that incorporated EdU after 28 day EdU infusion (n=4).

(E-H) Neurogenesis by hGFAP⁺ cells. 3-month-old Rosa26-stop-EYFP mice electroporated with hGFAP-Cre and analyzed after 1 (n=3), 4 (n=4), 8 (n=5), 12 (n=5), 16 (n=4) and 21 weeks (n=5). Quantifications of the YFP⁺ cells (E) and the YFP⁺DCX⁺ neuroblasts (F) in the SVZ, the YFP⁺ cells in the OB (G), and the OB/SVZ ratio of YFP⁺ cells (H). One-way ANOVA.

(I-O) Neurogenesis by FoxJ1⁺ cells. (I,J) FOXJ1-EGFP transgenic mice electroporated with hGFAP-myrTom plasmids. Representative micrograph (I) and quantification (J).

(K-O) FoxJ1-Cre^{ERT2}-EYFP (knock-in) mice administered Tamoxifen for 1 week and sacrificed after 1 week or 4 months (n=3). Representative micrographs of recombination in the SVZ (K) and quantification of YFP⁺ DCX⁺ neuroblasts in the SVZ (L). (N,O) YFP⁺ cells in the OB. Quantifications 1 month (n=5) and 4 months (n=5) after Tamoxifen administration (N) and representative micrograph (O). Unpaired t-test.

Scale bars represent 20 μ m in (I) and (L), 200 μ m in (K).

Figure 3

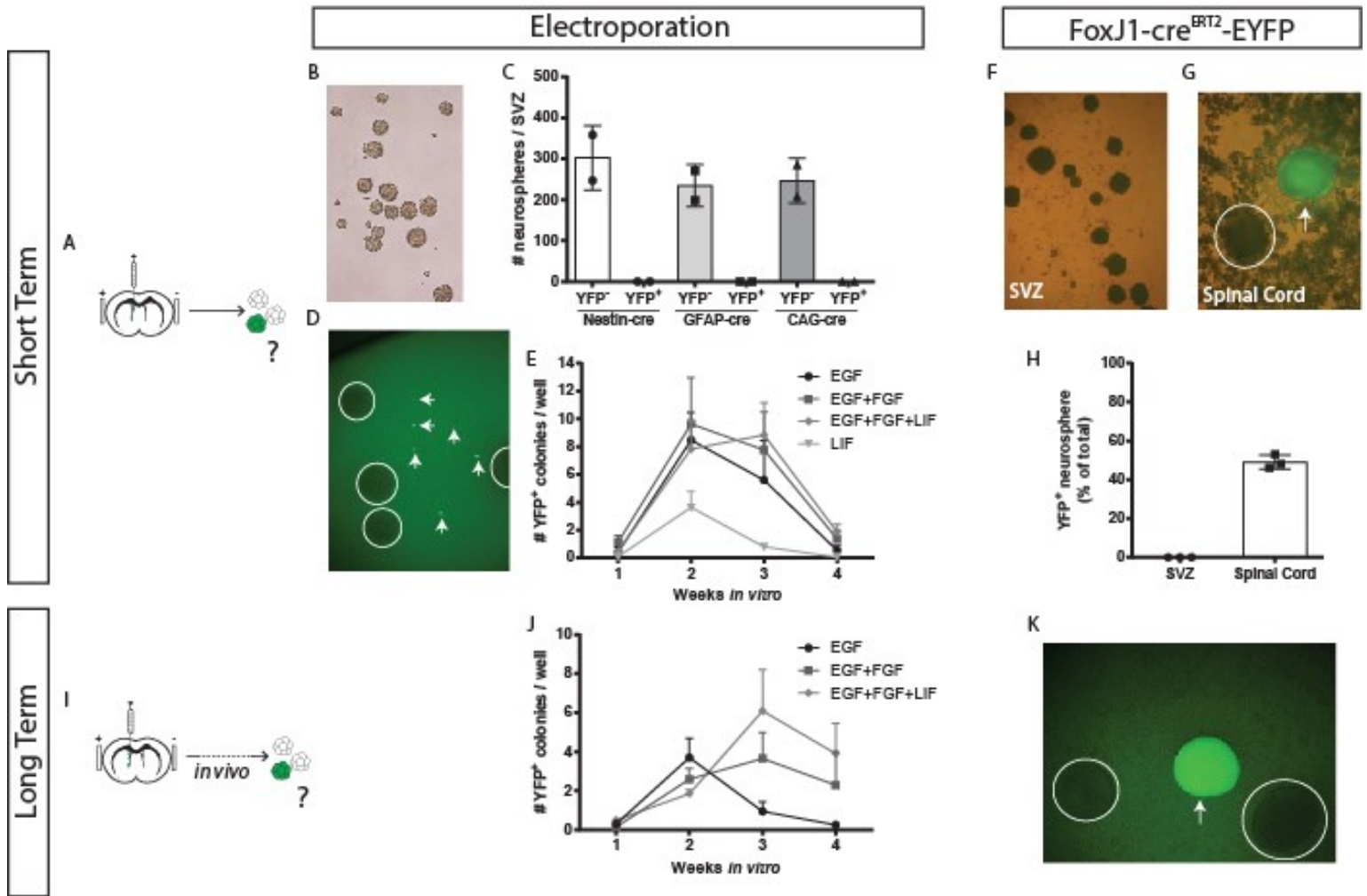


Figure 3: Ventricle-contacting hGFAP⁺ cells in the adult SVZ do not produce neurosphere-forming aNSCs

(A-H) *In vitro* paradigm for generating neurosphere-initiating cells. (A) Schematic of paradigm. (B-E) Quantification of neurospheres formed from SVZ of 3-month-old electroporated Rosa26-stop-EYFP mice. Representative micrograph (B) and quantification (C) of neurospheres generated following electroporation with hGFAP-Cre (n=3), Nestin-Cre (n=3) or CAG-Cre (n=3) plasmids. One-way ANOVA. (D-F) Representative micrograph (D) and quantification (E) of small YFP⁺ colonies formed when Rosa26-stop-EYFP mice were electroporated with hGFAP-Cre and then cultured 7 days post-electroporation in the presence of the indicated growth factor combinations. (F-H) Representative micrographs of neurospheres grown from the SVZ (F) and spinal cord (G) of FoxJ1^{CreERT2}-EYFP knock-in mice when cultured 13 days after tamoxifen administration. Quantification of the proportion of YFP⁺ neurospheres (H).

(I-K) *In vivo* paradigm for generating neurosphere-initiating cells. (I) Schematic of paradigm. (J) 3-month-old Rosa26-stop-EYFP mice electroporated with hGFAP-Cre and cultured after 2 months *in vivo*. No YFP⁺ neurospheres were generated (not shown), but small YFP⁺ again appeared in the presence of EGF alone (n=3), EGF+FGF (n=3), and EGF+FGF+LIF (n=3)(J). (K) Micrograph of a YFP⁺ neurosphere from a 4-month-old FoxJ1^{CreERT2}-EYFP mouse that was tamoxifen-treated and then cultured after an additional 4 months *in vivo*.

Figure 4

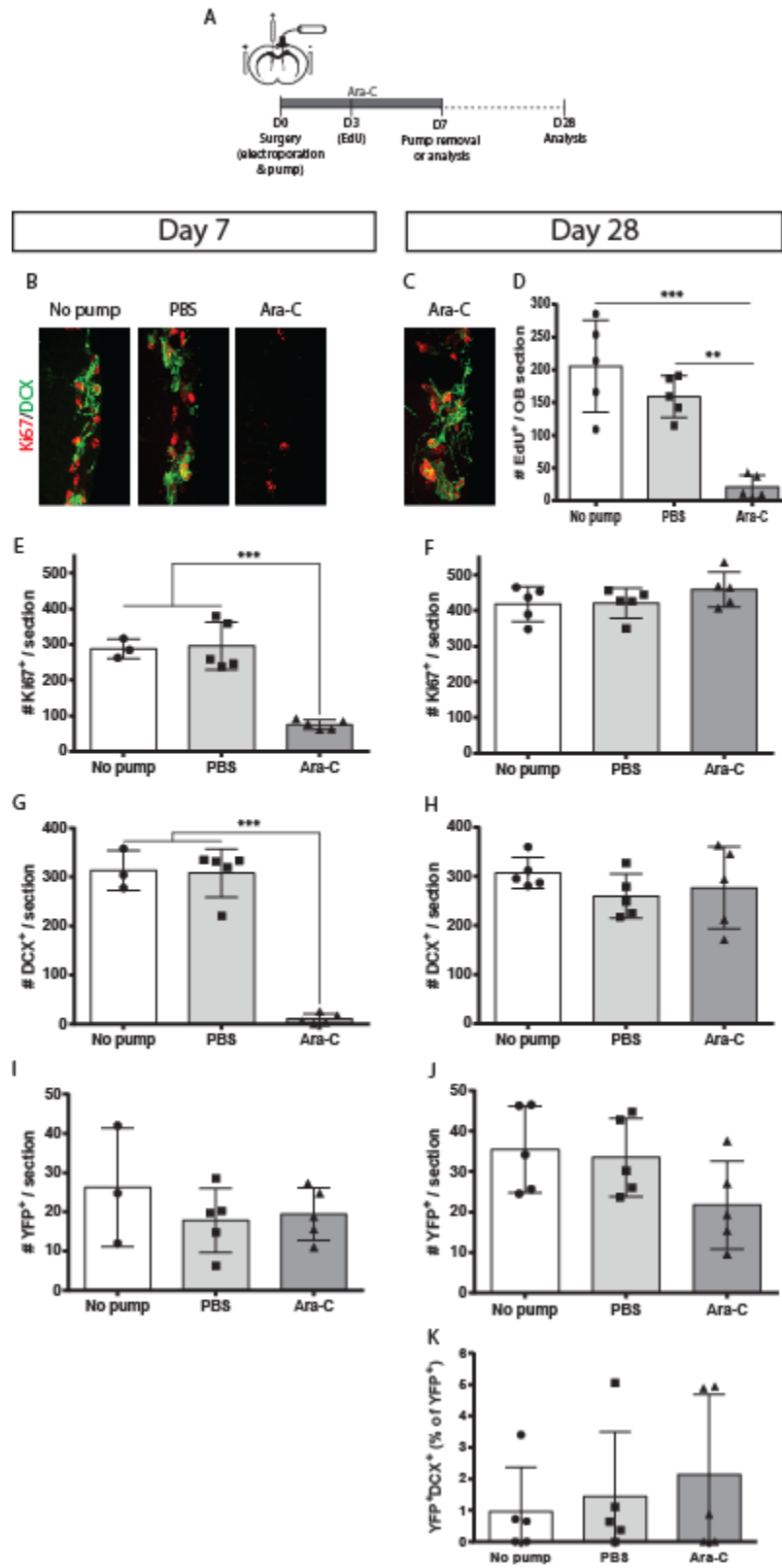


Figure 4: Ventricle-contacting hGFAP⁺ cells are not recruited during Ara-C-induced depletion and repopulation of the SVZ niche

(A) Experimental paradigm. (B,C) Immunostaining for Ki67 and DCX in the SVZ of no pump, PBS, and Ara-C mice at Day 7 (B) and in the Ara-C group following an additional 21 days of repopulation (C). (D) Numbers of EdU⁺ cells in the OB, confirming that SVZ neurogenesis had been ablated in mice having repopulated SVZs. (E-J) Quantifications of the numbers of cells at Day 7 (E,G,I) and Day 28 (F,H,J) that were immunoreactive for Ki67 (E,F), DCX (G,H), or YFP (I,J). (K) Proportion of YFP⁺ cells expressing DCX on day 28.

N=5 per time point and per condition. One-way ANOVA.

Scale bar in (E) represent 20 μ m. **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001

Figure 5

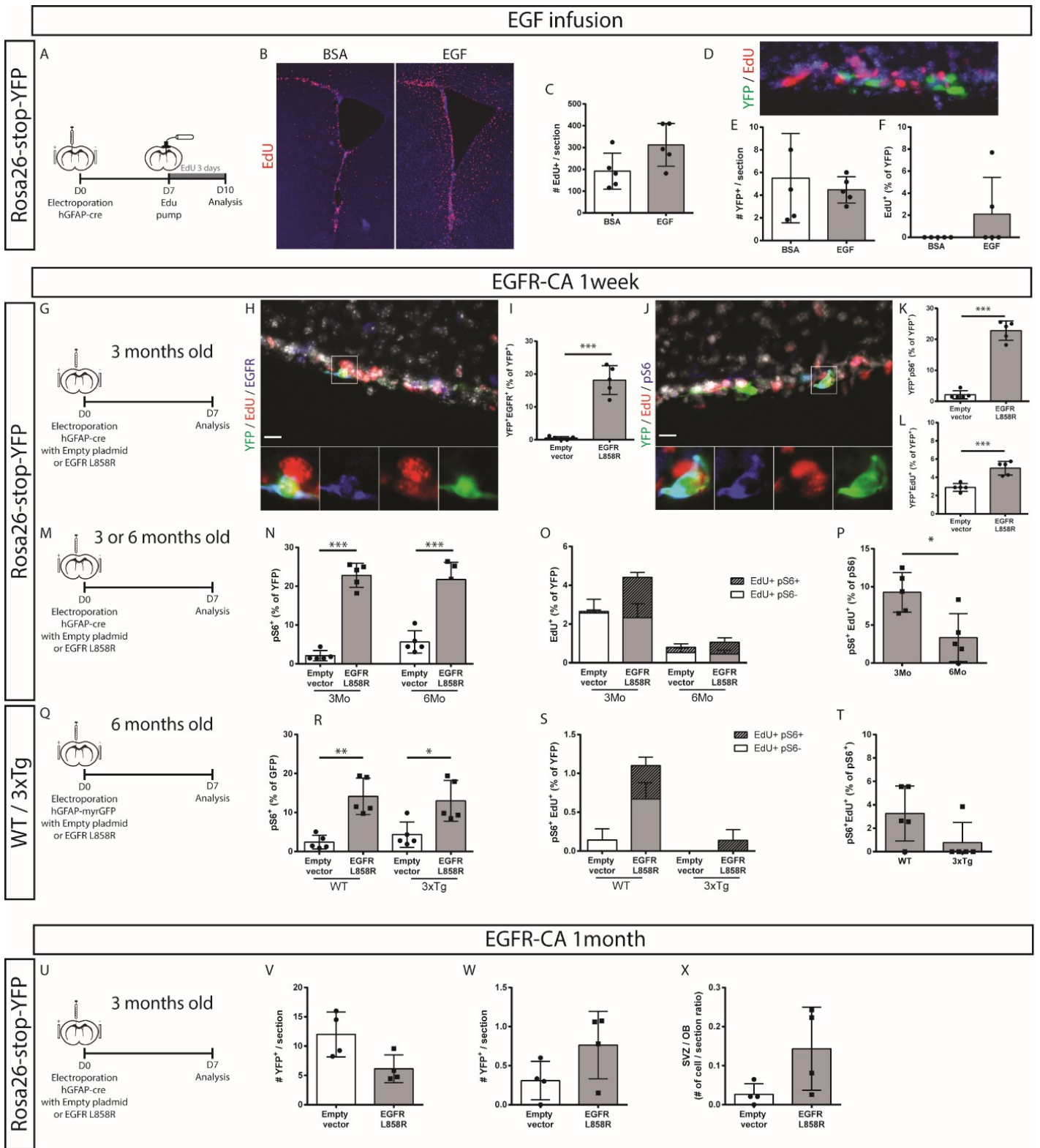


Figure 5: Dormant hGFAP⁺ cells can be recruited by ectopic EGFR signalling: differential responsiveness in the young adult, middle-aged, and 3xTg-AD SVZ

(A-F) hGFAP⁺ cells do not divide in response to EGF infusion. (A) Experimental paradigm. (B,C) Representative micrographs (B) and quantification (C) of EdU incorporation in the SVZ following 3-day infusion of EGF (n=3) or BSA (n=3). (D-F) Representative micrograph (D) and quantifications of total YFP⁺ cells (E) and YFP⁺EdU⁺ cells (F) in the SVZ. Unpaired t-test.

(G-L) EGFR-CA expression in 3-month-old Rosa26-stop-EYFP mice for 1 week primes dormant hGFAP⁺ cells and promotes their proliferation. (G) Experimental paradigm. Representative micrographs (H,J) and quantifications showing that electroporation with EGFR-CA induces EGFR expression (I), EGFR downstream signaling (pS6, K), and cell cycle entry (EdU incorporation, L) in hGFAP⁺ cells. Unpaired t-test.

(M-P) EGFR-CA effects on proliferation are suppressed in 6-month-old Rosa26-stop-EYFP mice. (M) Experimental paradigm. (N-P) Quantification of the percentages of hGFAP⁺ cells in 3-month-old versus 6-month-old reporter mice that are primed (YFP⁺pS6⁺) (N) or dividing (YFP⁺EdU⁺) (O) following electroporation of hGFAP-cre mixed with either empty vector or EGFR-CA plasmids. (P) Proportion of the primed hGFAP⁺ cells that incorporate EdU decreases by 6 months of age. N=5 per condition and age. One-way ANOVA.

(Q-T) EGFR-CA effects on proliferation are blocked in 3xTg-AD mice. (Q) Experimental paradigm. (R-T) Quantification of the percentages of hGFAP⁺ cells in 6-month-old 3xTg-AD mice and their wildtype (WT) strain that are primed (GFP⁺pS6⁺) (R) or dividing (GFP⁺EdU⁺) (S) following electroporation of hGFAP-myrGFP mixed with either empty vector or EGFR-CA plasmids. (T) EdU incorporation by primed hGFAP⁺ cells is blocked in 3xTg-AD mice. N=5 per condition and age. One-way ANOVA.

(U-X) EGFR-CA mobilizes hGFAP⁺ cells to the olfactory bulbs. (U) Experimental paradigm. (V-X) Analysis at 1 month following electroporation with hGFAP mixed with either empty vector (n=5) or EGFR-CA (n=5) plasmids indicates that EGFR-CA causes depletion of YFP⁺ cells in the SVZ (V), an increase in YFP⁺ cells in the OB (W), and a consequent increase in the OB/SVZ ratio (X). Unpaired t-test.

Scale bar represents 200µm in (B), 20µm in (D), (H) and (J). *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001

Figure 6

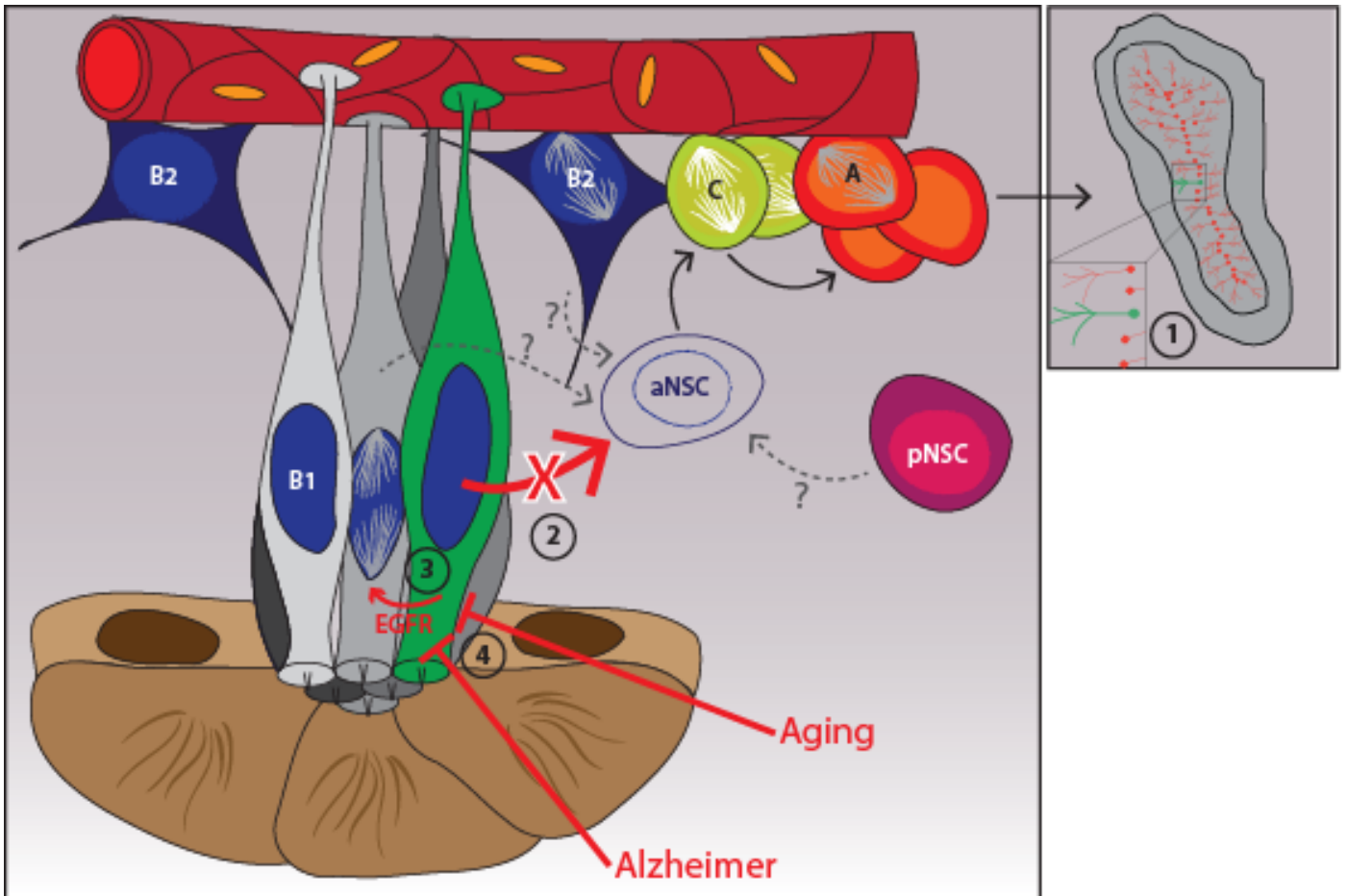


Figure 6: Implications for the model of the adult SVZ niche.

Diagram summarizing main findings and implications. Our electroporation and transgenic approaches indicate that ventricle-contacting hGFAP⁺ cells in the adult mouse brain (1) are neurogenic precursors that contribute only small numbers of neurons to the olfactory bulbs during adulthood; (2) do not participate in the maintenance or regeneration of the neurosphere-forming aNSC population; (3) can, in response to ectopic activation of EGFR signaling, be recruited for cell cycle entry in young adults, but (4) not in models of early aging or AD. In contrast to current models of SVZ function, these data indicate that ventricle-contacting hGFAP⁺ cells are dormant (but potentially recruitable) neurogenic precursors that have only limited contribution to ongoing adult neurogenesis, and that they do so via a non-aNSC-mediated mechanism. As discussed, it remains to be determined whether aNSCs and aNSC-

mediated adult neurogenesis are maintained via B2 astrocytes, pNSCs, or possibly a heterogeneous B1 astrocyte population that includes a subtype resistant to electroporation- and FoxJ1-mediated approaches.

Figure Supplémentaire 1:

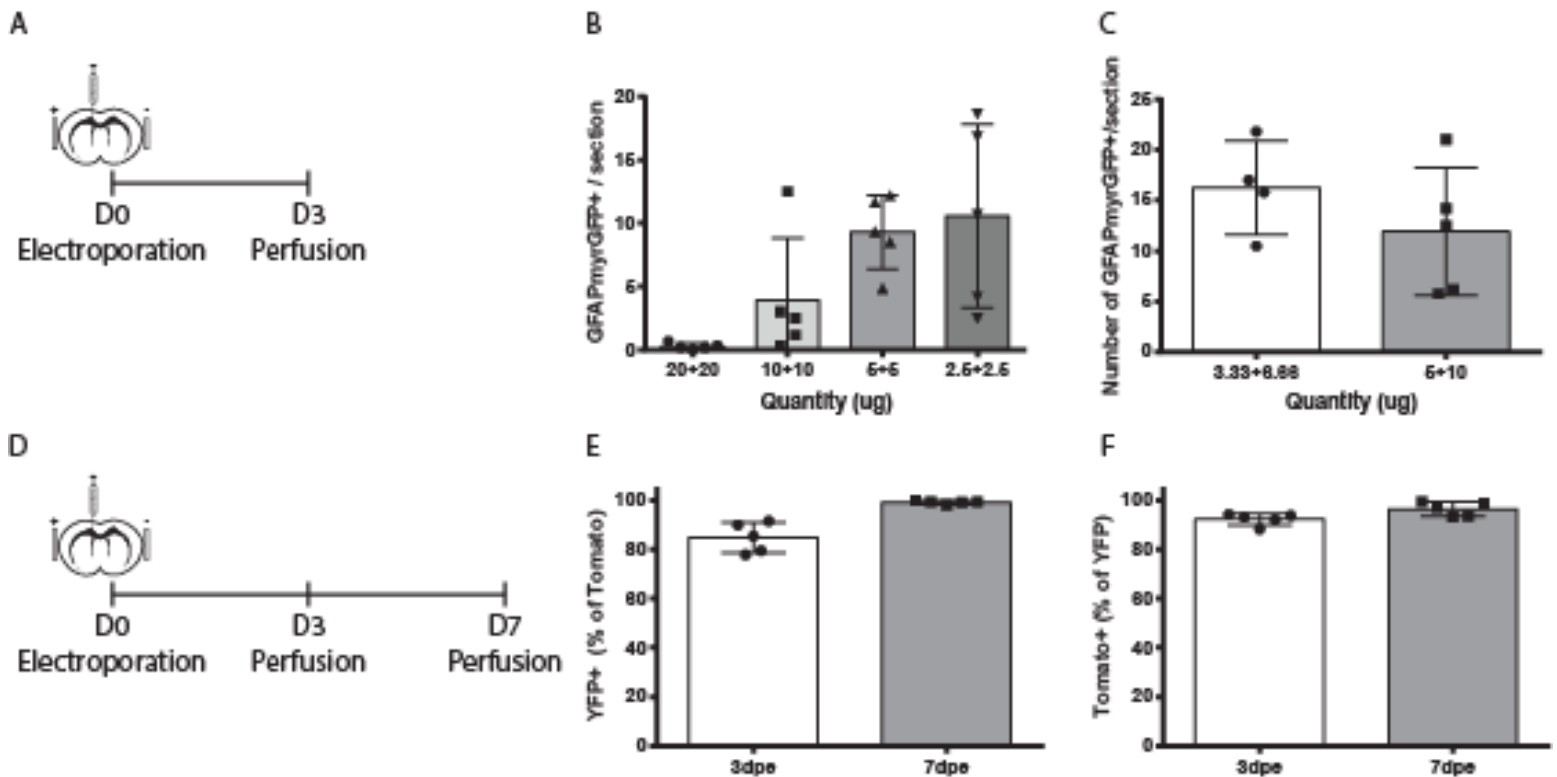


Figure supplémentaire 1

(A-C) Plasmid titration tests. (A) Paradigm. (B) Mice were electroporated following injection of 40, 20, 10, or 5 micrograms of total DNA, consisting of equal amounts of GFAP-myrGFP and empty vector plasmids. (C) Mice were electroporated with either 10 micrograms total DNA (3.33 micrograms of GFAP-myrGFP) or 15 micrograms total DNA (5 micrograms GFAP-myrGFP).

(D-F) Efficiency of hGFAP-cre-mediated recombination. (D) Paradigm. Rosa26-stop-EYFP reporter mice were electroporated with 5 micrograms hGFAP-myrTom and 5 micrograms hGFAP-cre plasmids, and analyzed after 3 or 7 days. (E,F) Quantification of the proportion of Tom⁺ cells that expressed recombinant YFP (E) and recombinant YFP⁺ cells that expressed Tom. Note that cre-induced recombination of YFP expression occurred in the vast majority of Tom⁺ cells by 3 days and virtually all Tom⁺ cells by 7 days (E).

H. Acknowledgements

We thank the cell imaging core facility of the CRCHUM for spinning-disc confocal microscopy. This work was supported by studentships from the Université de Montréal Faculty of Graduate Studies (SJ) and the Alzheimer Society of Canada (LH) and by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Canada Research Chairs (CRC) program (KF).

I. Contribution des auteurs

Conceptualization, S.J., L.C., and K.F. ; Methodology, S.J., L.C., L.-C.L.; Investigation, S.J., L.C., L.-C.L., L.H., C.D., P.A., A.A.; Writing, S.J., L.C., K.F.; Visualization, S.J., L.C., K.F.; Supervision, K.F.; Funding Acquisition, K.F.

Declaration of Interests

The authors declare no competing interests.

IV. Discussion

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a pour objectif l'étude des mécanismes d'activation de la lignée neurale adulte. La neurogenèse adulte peut-être représentée comme une suite d'étapes allant de l'activation des NSC à la différenciation en neurones, en passant par une amplification cellulaire. Mon premier article cherche à comprendre comment les NSC et les progéniteurs intègrent et réagissent à la présence de signaux opposés. Le second est orienté sur les propriétés biologiques des cellules B1, à savoir leur activation et leur rôle dans la neurogenèse adulte.

A. BMP limite les effets prolifératifs induits par EGF

L'article présenté dans le chapitre 2 a pour objectif d'examiner l'intégration de signaux opposés par les cellules prolifératives : les progéniteurs et les NSC. Pour cela, nous avons cherché des facteurs possédant des effets opposables. Nous avons testé six facteurs individuellement : EGF, FGF, BMP, PDGF, VEGF et Shh. Dans ces conditions de différenciation, le facteur EGF se distingue des autres puisqu'il induit une forte augmentation des marqueurs de prolifération (PCNA) et d'une sous-population de précurseurs neuraux (Sox2). L'expérience opposée, à savoir la mise en culture de cellules flottantes dans un milieu de prolifération a permis d'observer la formation de neurosphères. Dans ce cas de figure, le facteur BMP se démarque puisqu'il induit une diminution de 50% du nombre de neurosphères produites ainsi qu'une diminution de 30% de leurs tailles. Ainsi, nous avons défini qu'EGF et BMP sont deux facteurs aux effets complètement opposés, l'un pro-prolifératif et l'autre antiprolifératif, données cohérentes avec la littérature (Doetsch et al., 2002; Lim et al., 2000; Mira et al., 2010; Paliouras et al., 2012).

1. BMP enrayer la prolifération des progéniteurs

Afin de comprendre comment les progéniteurs vont intégrer les deux facteurs EGF et BMP, nous avons réalisé une expérience de dose-réponse. En augmentant individuellement la concentration d'EGF de 5 à 40ng/ml, l'expression des marqueurs de prolifération (PCNA) et de cellules indifférenciées (Sox2 et Olig2) augmente graduellement alors que le marqueur

astrocytaire (GFAP) diminue. À l'opposé, l'augmentation de la concentration de BMP induit une stimulation des marqueurs astrocytaires et neuronaux (GFAP et β III-tubuline). Lorsque celle-ci est augmentée en présence d'EGF, celui-ci supprime graduellement les effets d'EGF puisqu'une diminution de la prolifération, des marqueurs de cellules indifférenciées sont observés avec une augmentation des marqueurs de cellules différenciées. Il est intéressant de noter que l'inverse, c'est-à-dire augmenter la concentration d'EGF en présence de BMP, ne module aucunement l'expression des protéines observées. Ces résultats indiquent que les effets antiprolifératifs et prodifférenciations de BMP sont dominants sur ceux d'EGF.

À concentration égale, nous avons démontré, par immunohistochimie, que BMP seul ou EGF+BMP induisent une diminution de 50% du nombre de cellules en culture, du nombre de cellules en prolifération (Ki67) et du nombre de cellules Olig2 positives. De plus, la présence de BMP, seul ou en combinaison, induit une légère augmentation de l'apoptose de 7%. La diminution de la prolifération cellulaire a été confirmée par cytométrie de flux. La rétention du CFSE est deux fois plus importante dans les conditions contenant du BMP que celle d'EGF seul. De plus, l'analyse du cycle cellulaire, par iodure de propidium, indique que BMP induit un déplacement de 10% des cellules des phases S-G2-M aux phases G0-G1. Enfin, la croissance des neurosphères, en présence de BMP seul ou en combinaison, est diminuée puisque celles-ci sont 40% plus petites. Leur composition est largement modulée puisque celles au contact de BMP présentent une plus faible expression des protéines de prolifération et des précurseurs neuraux (PCNA, Sox2, Olig2) et une augmentation des marqueurs de différenciation (GFAP, β III-tubuline et CNPase). Ces résultats démontrent qu'*in vitro*, la combinaison des facteurs EGF et BMP induit une réponse cellulaire toujours similaire à celle de BMP seul. Ainsi, nous pouvons conclure que BMP est un facteur largement dominant sur EGF.

La prépondérance de BMP permet de supposer qu'il est capable d'inhiber la signalisation en aval d'EGF. Il a été démontré que la prolifération induite par EGF passe par une voie clef, celle de mTOR (Paliouras et al., 2012). Ainsi, nous avons comparé les effets d'un inhibiteur de celle-ci, la Rapamycine, à ceux de BMP. Le traitement de cellules plâtées pendant 24h avec la Rapamycine diminue la prolifération de 50% et inhibe fortement la voie de mTOR, puisque les effecteurs S6 et 4EBP phosphorylés sont quasiment absents. Trois jours après l'arrêt du traitement, l'effecteur p4EBP de la voie de mTOR redevient similaire à celui du contrôle observé au premier jour. Il est intéressant de noter que cet événement précède le retour de la

prolifération au jour 4, ce qui coïncide avec l'augmentation des marqueurs des précurseurs neuraux Sox2 et Olig2. Au contraire, le traitement avec BMP pour 24h ne diminue que faiblement la prolifération, mais celle-ci est réduite de 70% dès le deuxième jour. Que ce soit pendant ou après le traitement, BMP ne module pas la voie de signalisation de mTOR. À l'opposé, lors du traitement et le jour suivant, la voie des SMAD est largement stimulée. Bien que cette dernière retrouve un niveau basal au jour 4, la prolifération cellulaire ne réapparaît pas. Le retour de l'activité mitotique après le traitement au BMP reste limité puisque les cellules se sont différenciées, principalement en astrocytes. Ces résultats démontrent que, bien que la Rapamycine et BMP soient capables d'inhiber la prolifération des progéniteurs, leurs mécanismes d'action sont distincts. BMP empêche la prolifération cellulaire induite par EGF puisqu'il induit une différenciation terminale.

Afin de vérifier que ces résultats sont applicables *in vivo*, nous avons choisi d'infuser les facteurs de façon intracérébrale pour 5 jours. Les immunomarquages, pour l'activation de la voie de mTOR, indiquent qu'EGF seul augmente de façon significative le nombre de cellules pS6+, alors que la combinaison présente une augmentation bien plus faible et non significative. Le nombre de cellules en prolifération est bien plus important dans la condition EGF alors que BMP n'induit aucun changement en comparaison du contrôle. La combinaison des facteurs présente une augmentation non significative, impliquant que BMP limite la prolifération induite par EGF. Puisqu'il est reconnu que le nombre de progéniteurs Olig2 est augmenté en présence d'EGF (Lindberg et al., 2012), nous avons aussi observé cette population : EGF seul ou en combinaison augmente fortement le nombre de cellules Olig2 de 15 et 10 fois respectivement par rapport au contrôle ou BMP. Cependant, les groupes EGF et EGF+BMP sont aussi significativement différents. L'ensemble de ces données démontrent que la prolifération des progéniteurs est stimulée en présence d'EGF. En revanche, l'absence d'effet rapporté pour BMP seul peut être dû à la présence de son inhibiteur Noggin sécrété par les cellules épendymaires au sein de la niche (Lim et al., 2000). Cependant, le signal de BMP reste suffisant pour limiter les effets d'EGF *in vivo*.

2. BMP réfrène l'activation des NSC *in vitro*

L'étude des effets d'un facteur sur les NSC est limitée puisque les cultures de précurseurs neuraux sont majoritairement composées de progéniteurs. Une des rares façons d'observer les NSC *in vitro* est de quantifier leur capacité d'initier la formation de colonies flottantes (Codega et al., 2014; Pastrana et al., 2009). Nous avons donc choisi cette approche pour observer la combinaison des facteurs EGF et BMP. La production de colonies primaires dans les conditions contenant du BMP est diminuée de plus de 60%, ce qui indique que BMP est un régulateur négatif de l'initiation de la formation des colonies, même en présence d'EGF. Ces résultats peuvent être expliqués par deux hypothèses principales : d'une part, il est possible que BMP induise la perte des NSC, que ce soit par leur différenciation, leur mort ou la sénescence, ou qu'il induise la quiescence des NSC. Ce dernier comportement doit par définition être réversible, et donc disparaître lorsque BMP est éliminé. Ainsi, nous avons dissocié les colonies formées en présence de BMP avant de les remettre en culture en l'absence de celui-ci. Le nombre de neurosphères formées est un peu plus faible pour les cultures ayant été prétraitées au BMP de 35%, résultat n'étant pas significativement différent d'EGF seul. Il est intéressant de noter que ces neurosphères formées sont 30% plus larges. Cette variation peut être attribuée à des changements de caractéristiques des neurosphères et des cellules qui la composent. En effet, il a été démontré que le passage, et donc la division répétée des cellules qui initient et composent les neurosphères, peut modifier leurs caractéristiques (Jensen and Parmar, 2006). Ces données *in vitro* démontrent qu'au niveau des NSC, BMP est aussi dominant sur EGF puisqu'il réfrène leur prolifération en favorisant leur quiescence. Afin de pouvoir démontrer l'effet de BMP spécifiquement sur les NSC, nous avons choisi d'utiliser une approche par électroporation avec un plasmide reporteur dirigé par le promoteur GFAP. Cette technique permet de cibler spécifiquement les cellules astrocytaires au contact du LCS, soit les cellules de type B1 (Barnabe-Heider et al., 2008; Mirzadeh et al., 2008). Puisque le nombre de ces cellules activées (EGFR positives) est faible, nous avons choisi de déterminer l'effet de BMP sur cette population cellulaire en inhibant sa signalisation. Pour cela, nous avons utilisé un plasmide contenant SMAD6, un inhibiteur de SMAD1/5/8. L'effet de celui-ci a été testé par des immunomarquages sur l'effecteur de mTORC1, pS6, reconnu pour être présent dans les NSC actives (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015). Trois jours après la chirurgie, le

nombre de cellules pS6 a augmenté de 53% chez les souris électroporées avec SMAD6. Cette donnée indique que BMP limite l'activation des NSC et est donc impliqué dans le maintien des NSC en quiescence.

L'ensemble de ces données démontrent que BMP est dominant sur EGF et qu'il est capable de limiter la prolifération des NSC et des progéniteurs. Cette prépondérance pourrait être une des causes de la diminution de la neurogenèse lors du vieillissement. En effet, il a été démontré que la signalisation de BMP augmente dans la niche neurogénique du gyrus dentelé chez les individus âgés. Cette dérégulation pourrait être responsable de la diminution de la production de neurones en conservant les NSC en quiescence et en augmentant la différenciation des progéniteurs (Yousef et al., 2015).

Cependant, l'inhibition temporaire de la voie des SMAD est suffisante à elle seule pour permettre l'activation de la voie de mTORC1, reconnue pour être en aval d'EGF (Paliouras et al., 2012). Cette donnée est particulièrement importante puisque la voie de mTOR est reconnue pour son implication dans la synthèse de protéine grâce à l'initiation à la traduction des ARNm (Cargnello et al., 2015). Or, plusieurs publications indiquent que les qNSC et les aNSC diffèrent par leur profil transcriptionnel incluant la transcription et la traduction (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015).

Les qNSC sont une sous-population de cellules GFAP+CD133+EGFR- qui possèdent une morphologie radiale lui permettant de contacter le LCS et le système sanguin. Grâce au tri cellulaire, il a été démontré que celles-ci sont capables de produire des neurones après leurs transplantations et de produire des colonies flottantes lors de leur maintien plusieurs semaines en culture (Codega et al., 2014). La seconde sous-population diffère principalement des qNSC par la présence du récepteur EGFR : ce sont les aNSC. Celles-ci sont capables de produire des neurones lorsqu'elles sont transplantées et produisent des neurosphères *in vitro* (Codega et al., 2014; Mich et al., 2014; Pastrana et al., 2009). Ces deux populations fonctionnelles sont largement étudiées grâce aux techniques de FACS permettant de les purifier. Par immunomarquage, il a été démontré que les cellules GFAP+ présentes dans les *pinwheels* expriment CD133 et 11% d'entre elles sont EGFR+ (Codega et al., 2014; Mirzadeh et al., 2008). Les cellules astrocytaires présentes dans les rosaces, sont des cellules de types B1 qui contactent le ventricule et les vaisseaux sanguins. Il a été publié que seulement 2,5% des cellules de type B1 sont mitotiques, ce qui représente approximativement 200 à 250 cellules en division pour

plus de 6000 quiescentes (Mirzadeh et al., 2008; Shook et al., 2012). De plus, ces cellules sont éphémères puisqu'elles ne se divisent qu'une seule fois avant de disparaître. Dans la majorité des cas (80%), celles-ci produisent deux progéniteurs qui vont s'amplifier puis se différencier avant de quitter la SVZ. Les 20% restants vont se diviser de façon symétrique en produisant deux NSC qui vont rester en dormance jusqu'à leur activation future (Obernier et al., 2018). Ainsi, le type cellulaire anatomique (B1) et les fonctionnels (q et aNSC) ont souvent été entrecoupés suggérant que les B1 mitotiques soient les aNSC (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mich et al., 2014; Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008). La présence de cellules voisines B1 non mitotiques, aux caractères morphologiques et antigéniques similaires, sont donc les meilleures candidates de qNSC. Cependant, la cinétique de transition *in vivo* reste non démontrée par manque de moyen technique. En effet, l'approche par les modèles murins transgéniques classiques, tel que les souris GFAP::GFP, ne permet pas de différencier les cellules de types B1, les B2 et les astrocytes différenciés. Les virus, à l'exception des rétrovirus, pourraient convenir pour cibler les cellules astrocytaires contenues dans le mur du ventricule latéral. Cependant, il n'est pas exclu que ceux-ci ne puissent pas se diffuser dans le tissu neural et par conséquent recombinaison d'autres cellules que les B1.

B. Caractérisation d'une sous-population astrocytaire dormante dans les ventricules latéraux grâce à l'électroporation

Lors de l'électroporation, présentée dans l'article ci-dessus, nous avons ciblé spécifiquement les cellules de type B1 et observer que plus de 98% des cellules recombinées étaient non-mitotiques. Cette approche technique nous a ouvert la possibilité de caractériser *in vivo* la transition des cellules de type B1 de l'état de dormance à celle d'activé. Cette dernière, permet l'introduction d'un ou plusieurs plasmides dans une cellule uniquement au moment de l'impulsion électrique, élimine toute possibilité de transfection post-chirurgie même si l'ADN se diffuse. Le risque de recombinaison des cellules présentes plus profondément dans le tissu est donc réduit.

1. L'électroporation une technique permettant l'étude des B1 chez la souris adulte

En 2008, Dr Barnabé-Heider est une des premières à utiliser l'électroporation pour cibler génétiquement les NSC du cerveau adulte de souris (Barnabe-Heider et al., 2008). Puisque les connaissances sur la SVZ sont plus nombreuses et que l'électroporation n'est pas une technique conventionnelle pour l'étude de la biologie des NSC, il a été nécessaire de caractériser la technique. Nous avons démontré que cette approche permet de cibler uniquement les cellules qui composent le ventricule latéral. En effet, nous n'avons pas observé de progéniteurs (Mash1 ou Olig2) ou de neuroblastes (DCX) recombines trois jours après la chirurgie. De plus, cette technique permet l'étude de la neurogenèse adulte puisque l'activité de la niche n'est pas modulée. En effet, le nombre de cellules en prolifération, la production de neuroblastes et de neurones restent constants après l'électroporation. De même, le nombre de neurosphères produit à partir de l'hémisphère injecté reste stable, indiquant le maintien des aNSC dans la SVZ.

L'utilisation d'un plasmide contenant le promoteur GFAP permet de cibler principalement les cellules astrocytaires du ventricule. L'électroporation avec ce type de plasmide démontre que 45 à 48% des cellules recombines expriment les marqueurs des NSC GFAP et Sox2 alors que 16% expriment le marqueur épendymaire S100b. Cependant, l'électroporation d'un plasmide GFAP::MyrTomato dans les souris GFAP::GFP, modèle largement utilisé pour l'étude des NSC, permet d'observer plus de 93% de colocalisation entre la GFP et le Tomato. Afin de prouver que les NSC peuvent être ciblées, nous avons fait le traçage de la lignée cellulaire de ces dernières en électroporant un modèle de souris reporteur Rosa26-stop-YFP avec un plasmide GFAP-cre. Après plusieurs semaines, nous avons été capables d'observer des cellules YFP+ ayant proliféré ou colocalisant avec le marqueur de neuroblastes DCX dans la SVZ ainsi que des cellules YFP+ dans le bulbe olfactif. Ces données démontrent donc que les cellules recombines avec un plasmide dirigé par le promoteur GFAP (par la suite abrégée par hGFAP+) sont des précurseurs neuraux partageant plusieurs marqueurs avec les cellules de type B1. De plus, elles indiquent que l'électroporation plasmidique est une technique permettant l'étude de la neurogenèse.

2. Les cellules hGFAP+ sont largement quiescentes et possèdent des capacités neurogéniques limitées.

Afin de comprendre la fonction biologique des cellules hGFAP+, nous avons commencé par étudier leur cinétique de prolifération. Pour cela, des souris de 3 mois ont été électroporées puis exposées à un agent intercalant à l'ADN : l'EdU. Que ce soit par des injections sur quelques jours ou par son infusion continue par des pompes osmotiques sur 4 semaines, moins de 1% des cellules hGFAP+ sont EdU+, impliquant que celles-ci soient largement quiescentes. De plus, le traçage de lignée cellulaire des cellules hGFAP+ démontre une faible production de neuroblastes par celles-ci puisque moins de 3% des hGFAP+ sont DCX+, même après plus de 5 mois après la chirurgie. Dans les bulbes olfactifs, il est possible de noter la présence de cellules YFP+ issues des hGFAP+. Celles-ci sont peu nombreuses mais semblent augmenter en fonction du temps. Il est intéressant cependant de noter que le nombre de cellules hGFAP+ présentes dans la SVZ reste constant au fil des semaines, confirmant leur dormance. En effet, une publication indique que la division des cellules GFAP+, au contact des ventricules, induit la production de deux progéniteurs ou deux NSC, les premières quittant la SVZ, la seconde y restant (Obernier et al., 2018). Ainsi, si les hGFAP+ étaient mitotiques, leur nombre serait probablement modulé à la hausse ou à la baisse.

Il est cependant possible que le petit nombre de cellules différenciées observées soit dû à la recombinaison d'un nombre faible de hGFAP+. Nous avons donc voulu trouver une approche nous permettant d'observer un plus grand nombre de cellules hGFAP+. Deux publications démontrent que le marqueur FoxJ1 est présent au moins dans les NSC et les cellules épendymaires (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014). Cependant, l'expression de celui-ci est bien plus importante dans les qNSC CD133+ (Codega et al., 2014). Ainsi, nous avons utilisé des souris FoxJ1^{CreERT2} croisées avec des Rosa26-stop-YFP induites au Tamoxifen pour observer la descendance des qNSC. De façon similaire, nous n'avons observé que peu de neuroblastes dans la SVZ et de cellules YFP+ dans les bulbes olfactifs. L'ensemble de ces données démontrent que les cellules astrocytaires au contact du LCS, incluant les hGFAP+, ont des capacités neurogéniques mais que leur contribution à la neurogenèse adulte est minimale.

3. Les cellules hGFAP+ ne sont pas des aNSC et ne les génèrent pas *in vitro*

À la vue de la faible participation des cellules hGFAP+ à la neurogenèse adulte *in vivo*, il est nécessaire de savoir si celles-ci génèrent des aNSC. Ainsi, des SVZ électroporées ont été mises en culture en présence d'EGF, milieu favorable à la croissance des neurosphères, 1 semaine ou 2 mois après la chirurgie. Bien que l'ensemble des cultures présentent des colonies flottantes, aucune d'entre elles n'est YFP+ donc générée à partir d'une cellule hGFAP+. Le même résultat est obtenu lorsque le milieu de culture est additionné des facteurs extrinsèques FGF et LIF, respectivement connus pour améliorer la croissance des neurosphères ou induire la prolifération des pNSC (Mudo et al., 2009; Reeve et al., 2017; Sachewsky et al., 2014; Vescovi et al., 1993). Cependant, dans l'ensemble des cultures effectuées, des petits amas cellulaires YFP+ sont présents après 14 jours de culture. Ces derniers ne forment jamais de neurosphères même s'ils sont maintenus deux semaines supplémentaires dans un milieu prolifératif. Ces résultats ont été confirmés par la mise en culture de souris FoxJ1^{CreERT2} croisées avec des Rosa26-stop-YFP induites au Tamoxifen. Deux semaines après le traitement, aucune neurosphère issue de la SVZ n'est YFP+. Enfin, la mise en culture de cerveau de souris induite quatre mois auparavant permet l'observation de rares neurosphères YFP+, soit moins de 2 par hémisphère.

L'ensemble de ces résultats démontrent que les cellules astrocytaires au contact du LCS, incluant les hGFAP+, ne sont que très rarement capables de générer des neurosphères même lors de longues périodes après l'électroporation ou l'induction. De plus, l'absence de croissance des amas YFP+ observés élimine toute possibilité d'un éventuel retard d'activation/croissance. Ainsi ces cellules ne jouent pas un rôle significatif dans la production des aNSC.

4. Les cellules hGFAP+ ne permettent pas la régénération de la SVZ

Les résultats présentés ci-dessus indiquent que les cellules hGFAP+ sont une population dormante ne générant que très rarement des aNSC dans des conditions physiologiques ou *in vitro*. Cependant, il est toujours envisageable que les cellules hGFAP+ puissent être recrutées dans des conditions pathologiques. Un des modèles les plus utilisés pour observer ce

comportement cellulaire est celui de la régénération de la SVZ (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b). Ainsi, nous avons électroporé des souris auxquelles nous avons implanté des pompes osmotiques contenant de l'antimitotique Ara-C. Juste après le traitement, le nombre de cellules en prolifération et de neuroblastes ont diminué de 75% et 96% respectivement, démontrant l'efficacité de l'Ara-C. De façon peu surprenante, le nombre de cellules YFP+ reste constant, confirmant leur état de quiescence. Lorsque le traitement à l'Ara-C est suivi par 3 semaines de régénération, il est possible d'observer une légère diminution non significative du nombre de cellules YFP+ dans la SVZ. Cependant, le nombre de neuroblastes issus des hGFAP+ (YFP+DCX+) reste similaire au contrôle, soit moins de 3% des cellules YFP+.

Ces données démontrent que les cellules hGFAP+ sont résistantes aux antimitotiques et ne sont pas responsables de la régénération de la SVZ. Puisque le(s) type(s) cellulaire(s) responsable(s) de la restauration de la niche ne sont toujours pas bien définis, il reste envisageable que ce rôle soit rempli par les pNSC, les pré-GEPCOT ou encore les cellules de type B2 (Mich et al., 2014; Obernier et al., 2018; Reeve et al., 2017).

5. Les cellules hGFAP+ peuvent être recrutées grâce à la voie d'EGF

Nous avons démontré que les cellules hGFAP+ sont largement quiescentes *in vitro* et *in vivo* dans des conditions physiologiques et régénératives. Il est donc nécessaire de prouver que celles-ci peuvent être activées. Cet état, contrairement à celui de la quiescence, est majoritairement validé par la présence d'EGFR. Ainsi, nous avons voulu confirmer que les hGFAP+ ne sont pas des cellules activées et ne prolifèrent pas en réponse à EGF *in vivo*. Pour cela, nous avons électroporé des souris dans lesquelles une pompe osmotique a été placée afin d'infuser le facteur pour trois jours. Bien que le nombre de cellules totales s'étant divisées est augmenté de 50% en présence d'EGF, le pourcentage de cellules hGFAP+ mitotiques reste constant. Ce résultat démontre que les cellules électroporées ne sont pas capables de répondre à une stimulation ectopique d'EGF *in vivo*. Nous avons donc voulu savoir si la modulation intrinsèque de cette signalisation produit des résultats différents. Puisque l'électroporation est une technique basée sur l'utilisation de plasmides, il est possible de moduler les voies de signalisation des cellules électroporées grâce à ces ADN double brin. Dans le premier article, nous avons démontré que l'inhibition de la voie de SMAD était suffisante pour induire

l'activation de la voie de mTORC1 puisque son effecteur, pS6, était régulé à la hausse. Malheureusement, dans le cadre de ces chirurgies, nous n'avons pas été capables de détecter une augmentation du nombre de cellules en prolifération. Une des explications possibles serait que BMP, via la migration au noyau du complexe SMAD1/5/8-SMAD4, est un activateur transcriptionnel du promoteur GFAP (Bonaguidi et al., 2005; Nakashima et al., 1999; Yanagisawa et al., 2001). Ainsi, l'inhibition de la voie des SMAD a pu induire une diminution de l'expression du plasmide reporteur GFAP::myrGFP, induisant une non-détection de certaines cellules électroporées, dont possiblement certaines pS6+ ou Ki67+. Cette hypothèse peut être supportée par le fait que le groupe électroporé avec SMAD6 présentait 60% moins de cellules GFP+ que le contrôle. Afin de valider cette théorie, il aurait été nécessaire d'effectuer une analyse de l'activation du promoteur GFAP en présence de SMAD6 par une approche de luciférase par exemple. De plus, il est reconnu que les marqueurs astrocytaires sont moins exprimés dans les aNSC et les progéniteurs que dans les qNSC (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mich et al., 2014). Ainsi, si l'électroporation de SMAD6 a induit l'amorçage et l'activation des cellules électroporées, il est envisageable que le plasmide GFAP::myrGFP ait été moins transcrit.

Bien que notre premier article ne démontre pas l'effet de l'inhibition de la voie de BMP sur la prolifération, il indique que SMAD6 est suffisant pour permettre l'activation de la voie de mTOR. Ainsi, pour démontrer qu'il est possible de recruter les hGFAP+, nous avons choisi de stimuler cette voie de signalisation en aval d'EGFR, reconnue pour être présentes dans les aNSC. L'utilisation du plasmide constitutivement actif EGFR (L858R, abrégé par la suite EGFR-CA) induit une forte stimulation de mTORC1 lors de transfection *in vitro* (données non montrées). Sept jours après l'électroporation d'EGFR-CA, le nombre de cellules hGFAP+ qui exprime EGFR est 37 fois plus important et l'expression de pS6 l'est de 10 fois, induisant une augmentation de la division des cellules hGFAP+ de 1,7 fois. Lorsque les souris sont sacrifiées un mois après l'électroporation avec EGFR-CA, le nombre de cellules YFP+ retrouvé dans les bulbes olfactifs est augmenté de 57%. De plus, le ratio de cellules YFP+ des bulbes sur celui de la SVZ est augmenté de 7 fois. Ces résultats indiquent que l'induction de la voie d'EGFR est suffisante pour provoquer l'activation et la prolifération des cellules hGFAP+.

Nous avons voulu étudier si l'induction de la voie d'EGFR permet aussi l'activation des hGFAP+ dans des contextes où la neurogenèse adulte est affaiblie, soit lors du vieillissement et

lors de la maladie d'Alzheimer. La diminution de la prolifération dans la SVZ n'est que partiellement comprise et semble être une conséquence d'une dérégulation de l'environnement de la niche et/ou de la régulation intracellulaire (Hamilton et al., 2010; Hamilton et al., 2013; Shook et al., 2012). Ainsi, nous avons électroporé des souris Rosa26-stop-YFP de 6 mois avec le plasmide EGFR-CA et observé une activation similaire de la voie de mTOR puisque le nombre de cellules hGFAP+pS6+ est identique aux résultats obtenus chez les souris de 3 mois (18% et 15% respectivement). Bien que les cellules hGFAP+ soient amorcées, celles-ci ne rentrent pas en division en réponse au plasmide EGFR-CA. Afin d'étudier l'activation des cellules électroporées dans le cadre de la MA, nous n'avons pas pu utiliser le plasmide hGFAP-cre puisque les souris de phénotype sauvage (par la suite abrégée WT) et les 3xTg ne sont pas des modèles reporteurs. Ainsi, le plasmide hGFAP::myrGFP a été utilisé comme plasmide reporteur. Chez les souris WT de 6 mois, les cellules hGFAP+ répondent à l'induction d'EGFR-CA puisque l'expression de pS6 est retrouvée dans 10% contre 3% dans le contrôle. Cet amorçage des cellules hGFAP+ permet d'augmenter leur taux de prolifération de plus de 4 fois. Dans les souris 3xTg, l'électroporation d'EGFR-CA permet une plus faible activation de la voie de mTOR (5% de cellules YFP+pS6+ dans le contrôle versus 13% pour EGFR-CA). Aucune cellule hGFAP+ mitotique n'a été observée dans la condition contrôle et seulement 1 cellule sur 504 est YFP+EdU+ pour la condition EGFR-CA. Ces résultats démontrent que, chez l'adulte, l'expression temporaire de la forme constitutivement active d'EGFR dans les hGFAP+ permet d'induire la voie de signalisation de mTOR et d'entrer dans le cycle cellulaire. Cette activation leur permet de produire des cellules différenciées dans les bulbes olfactifs suggérant leur sortie de la quiescence et leur engagement dans la voie neurogénique. Dans des conditions où la neurogenèse est diminuée, tel que le vieillissement ou la MA, l'induction par EGFR-CA permet d'amorcer les cellules hGFAP+ mais celle-ci n'est plus suffisante pour provoquer l'entrée dans le cycle cellulaire.

6. Implications sur la biologie des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire

Lors de l'écriture de cette thèse, les cellules de type B1 sont reconnues pour être présentes sous deux états : les mitotiques et les quiescentes. L'ensemble des analyses par FACS laissent

supposer que ces derniers correspondraient aux aNSC et qNSC (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mich et al., 2014; Mirzadeh et al., 2008; Shook et al., 2012). L'hypothèse majeure est que les cellules dormantes formeraient un réservoir afin de permettre la génération des aNSC tout au long de la vie de l'hôte. Nos données démontrent que, dans les parois du ventricule latéral, il existe une population astrocytaire (hGFAP+) possédant un potentiel neurogénique. Cependant, celles-ci ne semblent pas être responsables de la génération des aNSC que ce soit *in vitro* ou *in vivo* dans des conditions physiologiques ou de régénération. Cette population est présente dans les analyses de séquençage de l'ARN puisque les cellules hGFAP+ colocalisent très fortement avec celles GFP+ dans les souris GFAP::GFP. Les hGFAP+, qui ne répondent pas à une stimulation par EGF, devraient donc être intégrées dans la population des cellules dites « qNSC ».

Nos données suggèrent donc que toutes les B1 dormantes ne sont pas capables de produire des aNSC. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que celles-ci forment une population hétérogène et que seulement une partie d'entre elles contribuent à la génération des aNSC. Dans ce cas de figure, l'électroporation, avec un plasmide dirigé par le promoteur hGFAP, et les souris FoxJ1^{CreERT2} ne permettent pas de cibler cette population fonctionnelle. Cette suggestion est envisageable puisque l'hétérogénéité des cellules de type B1 mitotiques a été démontrée étant donné que la division de certaines induit la production d'une descendance alors que la prolifération des autres permet l'autorenouvellement (Obernier et al., 2018). Ainsi, nos résultats indiquent que l'ensemble des cellules de type B1 ne sont pas équivalentes et ne possèdent pas le même objectif fonctionnel. Il est donc plausible qu'au moins certaines cellules B1 dormantes possèdent un rôle de support pour les cellules mitotiques afin de leur procurer un environnement favorable, par exemple par la sécrétion de molécules ou la communication cellule-cellule. Cette dernière a déjà été identifiée comme caractéristique moléculaire des qNSC (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015). Cette hypothèse est supportée par l'analyse de transcriptome effectué par Shah et ses collègues. En effet, leurs données bio-informatiques indiquent que sur 2696 gènes étudiés, 2375 sont présents dans les cellules épendymaires et les qNSC, ce qui représente 88% de similitude (Shah et al., 2018). De plus, il est intéressant de noter qu'il a d'ores et déjà été publié que la niche subit des modifications physiques lors de la stimulation de la prolifération de la SVZ par EGF. En effet, Doetsch indique qu'après une courte infusion du facteur, le nombre de cellules astrocytaires au contact du LCS augmente (Doetsch

et al., 2002). Il peut donc être concevable que des cellules astrocytaires non-B1 puissent, lors de leur activation, migrer ou étendre des prolongements jusqu'au ventricule, de façon temporaire ou jusqu'à leur division. Cette suggestion est d'autant plus vraisemblable puisqu'il a été récemment démontré que les cellules de type B1 et B2 appartiennent à la même lignée (Obernier et al., 2018).

Les données présentées dans cet article démontrent que toutes les B1 dormantes ne sont pas capables de produire des aNSC et de remplir un rôle majeur dans la production de neurones. Il reste donc essentiel de continuer à comprendre le(s) rôle(s) fonctionnel(s) de l'ensemble des populations cellulaires qui composent la niche de la SVZ chez l'adulte.

C. Conclusions et perspectives futures

De nos jours, de nombreux efforts sont réalisés pour identifier et caractériser les différentes populations cellulaires de la SVZ. La difficulté majeure est la présence d'une hétérogénéité cellulaire dans chaque sous-population. Les marqueurs n'étant pas spécifiques et encore mal définis, de nombreuses études se heurtent à des problèmes d'identification cellulaire. La recherche sur la biologie des cellules souches neurales devient de plus en plus multidisciplinaire : l'apparition d'approches toujours plus nombreuses et spécifiques, telle que le séquençage des ARNm sur des cellules individuelles, apporte de nombreuses informations sur leurs transcriptomes et leurs profils moléculaires. Ces données sont particulièrement importantes puisqu'elles offrent plusieurs pistes de marqueurs qui permettront peut-être un jour de définir spécifiquement les sous-populations cellulaires qui composent la niche neurogénique (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Shah et al., 2018). De plus, ces recherches apportent des suggestions sur le(s) rôle(s) fonctionnel(s) que peuvent posséder les cellules. Chacune de ces théories doit maintenant être confirmée *in vivo* lorsque les cellules sont présentes dans leur milieu naturel. Il est donc nécessaire de définir anatomiquement les NSC actives ou quiescentes. Ainsi, la caractérisation de la lignée cellulaire des précurseurs neurales reste un challenge à relever, que ce soit au niveau anatomique ou fonctionnel. Les récentes publications suggèrent que les cellules mitotiques neurogéniques sont particulièrement éphémères (Calzolari et al., 2015; Obernier et al., 2018). Ainsi, la question de leur remplacement

devient primordiale. Proviennent-elles de l'activation de cellules astrocytaires dormantes ou d'une autre population cellulaire ?

L'ensemble des travaux présenté dans cette thèse repose sur l'étude des mécanismes d'activation de la lignée neurale dans des conditions physiologiques. Nos données démontrent que la quiescence et la différenciation sont des mécanismes dominants sur la prolifération et l'activation des précurseurs neuraux. Ces résultats ont depuis été confirmés, puisque les NSC adultes sont maintenant considérées comme dormantes jusqu'à leur unique activation qui induira leur disparition (Obernier et al., 2018). De plus, lors de la caractérisation de la relation q et aNSC, nous avons obtenu des résultats inespérés, à savoir qu'au moins une partie de la population de B1 dormantes ne sont pas responsables de la production des aNSC sous différentes conditions. Ces conclusions bousculent le modèle actuel de la niche de la SVZ et de sa lignée neurale, bien que ce concept puisse être intégré et supporté par la majorité des publications précédentes (Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Obernier et al., 2018; Shah et al., 2018). Ces expériences ouvrent donc de nouvelles perspectives. Celles-ci ne représentent que le premier pas et doivent être approfondies. En effet, sur le second article, il serait nécessaire d'examiner un plus grand nombre de marqueurs. Sachant qu'il n'existe pas de marqueur(s) spécifique(s) de la lignée neurale, il est nécessaire de combiner un éventail d'immunomarquage pour caractériser précisément la population de cellules électroporées (hGFAP+). Dans ces derniers, on retrouvera des protéines impliquées dans la neurogenèse adulte, tel que VCAM ou CD133, décrites pour être présentes sur les cellules souches (Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Hu et al., 2017; Kokovay et al., 2012; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mirzadeh et al., 2008). L'idéal serait, bien évidemment, d'y associer une analyse de séquençage des ARN sur des cellules individuelles. L'objectif serait de comparer l'identité des hGFAP+ par rapport aux autres populations cellulaire, notamment celles déjà décrites par Codega, Llorens-Bobadilla ou Shah et leurs collègues (Codega et al., 2014; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Shah et al., 2018). Ces analyses de bio-informatiques permettraient de définir le nombre de populations cellulaires ciblées par la technique d'électroporation. Elles pourront ainsi être comparées à celles obtenues par les groupes de recherches des docteurs Doetsch, Martin-Villalba, Brunet et Biernaskie. Est-ce que les cellules hGFAP+ sont des qNSC1 et/ou des qNSC2 ? Celles-ci sont-elles plus proche des cellules astrocytaires EGFR positives ou des cellules épendymaires ?

Par la suite, il est nécessaire de découvrir qui sont les cellules en amont des aNSC : si les hGFAP+ ne le sont pas, il doit y avoir un autre type cellulaire responsable du remplacement. L'hypothèse que les pNSC ou les cellules B2 ou une sous-population de B1 remplisse(nt) ce rôle reste envisageable. Cependant il n'est pas exclu que cette fonction puisse être exécutée par une autre population cellulaire. Pour compléter cet objectif, de nouvelles approches techniques devront être utilisées puisque celles existantes ne permettent pas de répondre à cette question. Ces dernières pourront être basées, par exemple, sur de nouveaux modèles murins créés en fonction des nouveaux marqueurs issus des récentes publications (Dulken et al., 2017; Leeman et al., 2018; Shah et al., 2018). Ce questionnement reste nécessaire si l'on souhaite un jour utiliser les NSC comme potentiel traitement des maladies neurodégénératives et des accidents vasculaires cérébraux. Bien que les NSC ne soient généralement pas responsables de ces pathologies, elles pourraient permettre de limiter les symptômes. En effet, la modulation de la neurogenèse adulte pourrait permettre de produire des neurones dans l'objectif de remplacer ceux détruits lors des maladies. Enfin, bien que nos résultats indiquent que les cellules hGFAP+ ne soient pas les précurseurs des aNSC, il reste essentiel de définir leur rôle dans la régulation de la lignée neurale. En effet, leurs localisations au sein de la SVZ fait de ces cellules des cibles faciles et peuvent être utilisées comme intermédiaires afin de moduler la neurogenèse adulte. En effet, leur modification peut permettre la sécrétion de molécules à proximité des précurseurs neuronaux et la modulation de la communication cellule-cellule.

V. Bibliographie

- Aguirre, A., and Gallo, V. (2007). Reduced EGFR signaling in progenitor cells of the adult subventricular zone attenuates oligodendrogenesis after demyelination. *Neuron glia biology* 3, 209-220.
- Aguirre, A., Rizvi, T.A., Ratner, N., and Gallo, V. (2005). Overexpression of the epidermal growth factor receptor confers migratory properties to nonmigratory postnatal neural progenitors. *J Neurosci* 25, 11092-11106.
- Ahlenius, H., Visan, V., Kokaia, M., Lindvall, O., and Kokaia, Z. (2009). Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci* 29, 4408-4419.
- Altman, J. (1966). Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Experimental neurology* 16, 263-278.
- Altman, J., and Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology* 124, 319-335.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., and Tramontin, A.D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature reviews Neuroscience* 2, 287-293.
- Alvarez-Buylla, A., and Lim, D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683-686.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* 64 pp. 146-148.
- Apple, D.M., Solano-Fonseca, R., and Kokovay, E. (2017). Neurogenesis in the aging brain. *Biochemical pharmacology* 141, 77-85.
- Attems, J., and Jellinger, K.A. (2006). Olfactory tau pathology in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Clin Neuropathol* 25, 265-271.
- Baird, G.S., Nelson, S.K., Keeney, T.R., Stewart, A., Williams, S., Kraemer, S., Peskind, E.R., and Montine, T.J. (2012). Age-dependent changes in the cerebrospinal fluid proteome by slow off-rate modified aptamer array. *Am J Pathol* 180, 446-456.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., and Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet* 377, 1019-1031.
- Bandyopadhyay, A., Yadav, P.S., and Prashar, P. (2013). BMP signaling in development and diseases: a pharmacological perspective. *Biochemical pharmacology* 85, 857-864.
- Barnabe-Heider, F., Goritz, C., Sabelstrom, H., Takebayashi, H., Pfrieger, F.W., Meletis, K., and Frisen, J. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 7, 470-482.
- Barnabe-Heider, F., Meletis, K., Eriksson, M., Bergmann, O., Sabelstrom, H., Harvey, M.A., Mikkers, H., and Frisen, J. (2008). Genetic manipulation of adult mouse neurogenic niches by in vivo electroporation. *Nature methods* 5, 189-196.
- Barres, B.A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430-440.
- Basak, O., and Taylor, V. (2007). Identification of self-replicating multipotent progenitors in the embryonic nervous system by high Notch activity and Hes5 expression. *The European journal of neuroscience* 25, 1006-1022.
- Bath, K.G., Mandairon, N., Jing, D., Rajagopal, R., Kapoor, R., Chen, Z.Y., Khan, T., Proenca, C.C., Kraemer, R., Cleland, T.A., *et al.* (2008). Variant brain-derived neurotrophic factor

- (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. *J Neurosci* 28, 2383-2393.
- Batista-Brito, R., Close, J., Machold, R., and Fishell, G. (2008). The distinct temporal origins of olfactory bulb interneuron subtypes. *J Neurosci* 28, 3966-3975.
- Beckervordersandforth, R., Tripathi, P., Ninkovic, J., Bayam, E., Lepier, A., Stempfhuber, B., Kirchhoff, F., Hirrlinger, J., Haslinger, A., Lie, D.C., *et al.* (2010). In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 744-758.
- Bedard, A., and Parent, A. (2004). Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain research Developmental brain research* 151, 159-168.
- Benner, E.J., Luciano, D., Jo, R., Abdi, K., Paez-Gonzalez, P., Sheng, H., Warner, D.S., Liu, C., Eroglu, C., and Kuo, C.T. (2013). Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature* 497, 369-373.
- Bergmann, O., and Frisen, J. (2013). Neuroscience. Why adults need new brain cells. *Science* 340, 695-696.
- Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M.S., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Landen, M., Druid, H., *et al.* (2012). The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74, 634-639.
- Bergmann, O., Spalding, K.L., and Frisen, J. (2015). Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a018994.
- Bernier, P.J., Vinet, J., Cossette, M., and Parent, A. (2000). Characterization of the subventricular zone of the adult human brain: evidence for the involvement of Bcl-2. *Neuroscience research* 37, 67-78.
- Bigey, P., Bureau, M.F., and Scherman, D. (2002). In vivo plasmid DNA electrotransfer. *Curr Opin Biotechnol* 13, 443-447.
- Bjornsson, C.S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., and Temple, S. (2015). It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Developmental cell* 32, 435-446.
- Bloquel, C., Fabre, E., Bureau, M.F., and Scherman, D. (2004). Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *J Gene Med* 6 *Suppl 1*, S11-23.
- Boekhoorn, K., Joels, M., and Lucassen, P.J. (2006). Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiology of disease* 24, 1-14.
- Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., *et al.* (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22, 589-599 e585.
- Bonaguidi, M.A., McGuire, T., Hu, M., Kan, L., Samanta, J., and Kessler, J.A. (2005). LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development* 132, 5503-5514.
- Bonaguidi, M.A., Peng, C.Y., McGuire, T., Falciglia, G., Gobeske, K.T., Czeisler, C., and Kessler, J.A. (2008). Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* 28, 9194-9204.
- Bond, A.M., Bhalala, O.G., and Kessler, J.A. (2012). The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation. *Developmental neurobiology* 72, 1068-1084.

- Bond, A.M., Peng, C.Y., Meyers, E.A., McGuire, T., Ewaleifoh, O., and Kessler, J.A. (2014). BMP signaling regulates the tempo of adult hippocampal progenitor maturation at multiple stages of the lineage. *Stem cells* 32, 2201-2214.
- Bouab, M., Paliouras, G.N., Aumont, A., Forest-Berard, K., and Fernandes, K.J. (2011). Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* 173, 135-149.
- Boutin, C., Diestel, S., Desoeuvre, A., Tiveron, M.C., and Cremer, H. (2008). Efficient in vivo electroporation of the postnatal rodent forebrain. *PLoS one* 3, e1883.
- Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta, M.R., 3rd, and Saghatelian, A. (2009). Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *J Neurosci* 29, 15245-15257.
- Brill, M.S., Ninkovic, J., Winpenny, E., Hodge, R.D., Ozen, I., Yang, R., Lepier, A., Gascon, S., Erdelyi, F., Szabo, G., *et al.* (2009). Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci* 12, 1524-1533.
- Bugeon, S., de Chevigny, A., Boutin, C., Core, N., Wild, S., Bosio, A., Cremer, H., and Beclin, C. (2017). Direct and efficient transfection of mouse neural stem cells and mature neurons by in vivo mRNA electroporation. *Development* 144, 3968-3977.
- Calzolari, F., Michel, J., Baumgart, E.V., Theis, F., Gotz, M., and Ninkovic, J. (2015). Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci* 18, 490-492.
- Capela, A., and Temple, S. (2002). LeX/sea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35, 865-875.
- Capilla-Gonzalez, V., Cebrian-Silla, A., Guerrero-Cazares, H., Garcia-Verdugo, J.M., and Quinones-Hinojosa, A. (2014). Age-related changes in astrocytic and ependymal cells of the subventricular zone. *Glia* 62, 790-803.
- Cargnello, M., Tcherkezian, J., and Roux, P.P. (2015). The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation. *Mutagenesis* 30, 169-176.
- Carlen, M., Cassidy, R.M., Brismar, H., Smith, G.A., Enquist, L.W., and Frisen, J. (2002). Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol* 12, 606-608.
- Carlen, M., Meletis, K., Barnabe-Heider, F., and Frisen, J. (2006). Genetic visualization of neurogenesis. *Exp Cell Res* 312, 2851-2859.
- Carlen, M., Meletis, K., Goritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabe-Heider, F., Yeung, M.S., Naldini, L., *et al.* (2009). Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* 12, 259-267.
- Carleton, A., Petreanu, L.T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A., and Lledo, P.M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6, 507-518.
- Chaker, Z., Codega, P., and Doetsch, F. (2016). A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5, 640-658.
- Chiasson, B.J., Tropepe, V., Morshead, C.M., and van der Kooy, D. (1999). Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 19, 4462-4471.
- Cipriani, S., Ferrer, I., Aronica, E., Kovacs, G.G., Verney, C., Nardelli, J., Khung, S., Delezoide, A.L., Milenkovic, I., Rasika, S., *et al.* (2018). Hippocampal Radial Glial Subtypes and Their

- Neurogenic Potential in Human Fetuses and Healthy and Alzheimer's Disease Adults. *Cereb Cortex*.
- Cockrell, A.S., and Kafri, T. (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol* *36*, 184-204.
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., Deleo, A.M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* *82*, 545-559.
- Colak, D., Mori, T., Brill, M.S., Pfeifer, A., Falk, S., Deng, C., Monteiro, R., Mummery, C., Sommer, L., and Gotz, M. (2008). Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J Neurosci* *28*, 434-446.
- Coskun, V., Wu, H., Bianchi, B., Tsao, S., Kim, K., Zhao, J., Biancotti, J.C., Hutnick, L., Krueger, R.C., Jr., Fan, G., *et al.* (2008). CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 1026-1031.
- Craig, C.G., Tropepe, V., Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Weiss, S., and van der Kooy, D. (1996). In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* *16*, 2649-2658.
- Crews, L., Adame, A., Patrick, C., Delaney, A., Pham, E., Rockenstein, E., Hansen, L., and Masliah, E. (2010). Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *J Neurosci* *30*, 12252-12262.
- Curtis, M.A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M.F., Axell, M.Z., Wikkelso, C., Holtas, S., van Roon-Mom, W.M., Bjork-Eriksson, T., Nordborg, C., *et al.* (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* *315*, 1243-1249.
- Davidson, B.L., and Bohn, M.C. (1997). Recombinant adenovirus: a gene transfer vector for study and treatment of CNS diseases. *Experimental neurology* *144*, 125-130.
- Daynac, M., Morizur, L., Chicheportiche, A., Mouthon, M.A., and Boussin, F.D. (2016). Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells. *Sci Rep* *6*, 21505.
- Daynac, M., Pineda, J.R., Chicheportiche, A., Gauthier, L.R., Morizur, L., Boussin, F.D., and Mouthon, M.A. (2014). TGFbeta lengthens the G1 phase of stem cells in aged mouse brain. *Stem cells* *32*, 3257-3265.
- De Vry, J., Martinez-Martinez, P., Losen, M., Bode, G.H., Temel, Y., Steckler, T., Steinbusch, H.W., De Baets, M., and Prickaerts, J. (2010a). Low Current-driven Micro-electroporation Allows Efficient In Vivo Delivery of Nonviral DNA into the Adult Mouse Brain. *Mol Ther* *18*, 1183-1191.
- De Vry, J., Martinez-Martinez, P., Losen, M., Temel, Y., Steckler, T., Steinbusch, H.W., De Baets, M.H., and Prickaerts, J. (2010b). In vivo electroporation of the central nervous system: a non-viral approach for targeted gene delivery. *Progress in neurobiology* *92*, 227-244.
- DeCarolis, N.A., Kirby, E.D., Wyss-Coray, T., and Palmer, T.D. (2015). The Role of the Microenvironmental Niche in Declining Stem-Cell Functions Associated with Biological Aging. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* *5*.
- Demars, M., Hu, Y.S., Gadadhar, A., and Lazarov, O. (2010). Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *Journal of neuroscience research* *88*, 2103-2117.

- Dhaliwal, J., and Lagace, D.C. (2011). Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice. *The European journal of neuroscience* *33*, 1025-1036.
- Ding, X.F., Zhao, Y.Q., Hu, Z.Y., Lin, K., Wang, F., Liu, S.H., Wu, Y., Wu, L.Y., Zhao, T., Huang, X., *et al.* (2012). Efficient gene transfer into neonatal mouse brain using electroporation. *Neurochemical research* *37*, 1392-1398.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999a). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* *97*, 703-716.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* *17*, 5046-5061.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999b). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 11619-11624.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* *36*, 1021-1034.
- Dulken, B.W., Leeman, D.S., Boutet, S.C., Hebestreit, K., and Brunet, A. (2017). Single-Cell Transcriptomic Analysis Defines Heterogeneity and Transcriptional Dynamics in the Adult Neural Stem Cell Lineage. *Cell reports* *18*, 777-790.
- Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L., and Ge, S. (2015). Viral and transgenic reporters and genetic analysis of adult neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*, a018804.
- Enwere, E., Shingo, T., Gregg, C., Fujikawa, H., Ohta, S., and Weiss, S. (2004). Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* *24*, 8354-8365.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* *4*, 1313-1317.
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisen, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* *156*, 1072-1083.
- Ernst, A., and Frisen, J. (2015). Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals. *PLoS Biol* *13*, e1002045.
- Faiz, M., Sachewsky, N., Gascon, S., Bang, K.W., Morshead, C.M., and Nagy, A. (2015). Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell* *17*, 624-634.
- Feliciano, D.M., Su, T., Lopez, J., Platel, J.C., and Bordey, A. (2011). Single-cell Tsc1 knockout during corticogenesis generates tuber-like lesions and reduces seizure threshold in mice. *J Clin Invest* *121*, 1596-1607.
- Ferron, S.R., Charalambous, M., Radford, E., McEwen, K., Wildner, H., Hind, E., Morante-Redolat, J.M., Laborda, J., Guillemot, F., Bauer, S.R., *et al.* (2011). Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis. *Nature* *475*, 381-385.
- Fillat, C., Carrio, M., Cascante, A., and Sangro, B. (2003). Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther* *3*, 13-26.

- Fletcher, R.B., Das, D., Gadye, L., Street, K.N., Baudhuin, A., Wagner, A., Cole, M.B., Flores, Q., Choi, Y.G., Yosef, N., *et al.* (2017). Deconstructing Olfactory Stem Cell Trajectories at Single-Cell Resolution. *Cell Stem Cell* *20*, 817-830 e818.
- Fuchs, E., Tumber, T., and Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* *116*, 769-778.
- Fuentealba, L.C., Rompani, S.B., Parraguez, J.I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C.L., and Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* *161*, 1644-1655.
- Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K.I., Hirabayashi, Y., *et al.* (2015). Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* *18*, 657-665.
- Gabay, L., Lowell, S., Rubin, L.L., and Anderson, D.J. (2003). Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro. *Neuron* *40*, 485-499.
- Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* *287*, 1433-1438.
- Garcia, A.D., Doan, N.B., Imura, T., Bush, T.G., and Sofroniew, M.V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* *7*, 1233-1241.
- Geraerts, M., Eggermont, K., Hernandez-Acosta, P., Garcia-Verdugo, J.M., Baekelandt, V., and Debyser, Z. (2006). Lentiviral vectors mediate efficient and stable gene transfer in adult neural stem cells in vivo. *Hum Gene Ther* *17*, 635-650.
- Gheusi, G., Cremer, H., McLean, H., Chazal, G., Vincent, J.D., and Lledo, P.M. (2000). Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 1823-1828.
- Giachino, C., Basak, O., Lugert, S., Knuckles, P., Obernier, K., Fiorelli, R., Frank, S., Raineteau, O., Alvarez-Buylla, A., and Taylor, V. (2014). Molecular diversity subdivides the adult forebrain neural stem cell population. *Stem cells* *32*, 70-84.
- Gobeske, K.T., Das, S., Bonaguidi, M.A., Weiss, C., Radulovic, J., Disterhoft, J.F., and Kessler, J.A. (2009). BMP signaling mediates effects of exercise on hippocampal neurogenesis and cognition in mice. *PloS one* *4*, e7506.
- Gonzalez-Perez, O., Romero-Rodriguez, R., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2009). Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem cells* *27*, 2032-2043.
- Goritz, C., and Frisen, J. (2012). Neural stem cells and neurogenesis in the adult. *Cell Stem Cell* *10*, 657-659.
- Gotz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* *293*, 1491-1495.
- Gould, E., Reeves, A.J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C.G., and Fuchs, E. (1999). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 5263-5267.
- Graziadei, P.P., and Graziadei, G.A. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* *8*, 1-18.

- Gregoire, C.A., Bonenfant, D., Le Nguyen, A., Aumont, A., and Fernandes, K.J. (2014). Untangling the influences of voluntary running, environmental complexity, social housing and stress on adult hippocampal neurogenesis. *PLoS one* 9, e86237.
- Guo, W., Zhang, L., Christopher, D.M., Teng, Z.Q., Fausett, S.R., Liu, C., George, O.L., Klingensmith, J., Jin, P., and Zhao, X. (2011). RNA-binding protein FXR2 regulates adult hippocampal neurogenesis by reducing Noggin expression. *Neuron* 70, 924-938.
- Hack, M.A., Sugimori, M., Lundberg, C., Nakafuku, M., and Gotz, M. (2004). Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Molecular and cellular neurosciences* 25, 664-678.
- Hadjantonakis, A.K., Dickinson, M.E., Fraser, S.E., and Papaioannou, V.E. (2003). Technicolour transgenics: imaging tools for functional genomics in the mouse. *Nat Rev Genet* 4, 613-625.
- Hamilton, L.K., Aumont, A., Julien, C., Vadnais, A., Calon, F., and Fernandes, K.J. (2010). Widespread deficits in adult neurogenesis precede plaque and tangle formation in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. *The European journal of neuroscience* 32, 905-920.
- Hamilton, L.K., Dufresne, M., Joppe, S.E., Petryszyn, S., Aumont, A., Calon, F., Barnabe-Heider, F., Furtos, A., Parent, M., Chaurand, P., *et al.* (2015). Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell* 17, 397-411.
- Hamilton, L.K., and Fernandes, K.J.L. (2018). Neural stem cells and adult brain fatty acid metabolism: Lessons from the 3xTg model of Alzheimer's disease. *Biol Cell* 110, 6-25.
- Hamilton, L.K., Joppe, S.E., L, M.C., and Fernandes, K.J. (2013). Aging and neurogenesis in the adult forebrain: what we have learned and where we should go from here. *The European journal of neuroscience* 37, 1978-1986.
- Hansen, D.V., Lui, J.H., Parker, P.R., and Kriegstein, A.R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464, 554-561.
- Hardy, D., and Saghatelian, A. (2017). Different forms of structural plasticity in the adult olfactory bulb. *Neurogenesis (Austin)* 4, e1301850.
- Hartman, N.W., Lin, T.V., Zhang, L., Paquelet, G.E., Feliciano, D.M., and Bordey, A. (2013). mTORC1 targets the translational repressor 4E-BP2, but not S6 kinase 1/2, to regulate neural stem cell self-renewal in vivo. *Cell reports* 5, 433-444.
- Hata, A., Lagna, G., Massague, J., and Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes & development* 12, 186-197.
- Heo, C., Chang, K.A., Choi, H.S., Kim, H.S., Kim, S., Liew, H., Kim, J.A., Yu, E., Ma, J., and Suh, Y.H. (2007). Effects of the monomeric, oligomeric, and fibrillar Aβ42 peptides on the proliferation and differentiation of adult neural stem cells from subventricular zone. *Journal of neurochemistry* 102, 493-500.
- Hu, H., and Rutishauser, U. (1996). A septum-derived chemorepulsive factor for migrating olfactory interneuron precursors. *Neuron* 16, 933-940.
- Hu, X.L., Chen, G., Zhang, S., Zheng, J., Wu, J., Bai, Q.R., Wang, Y., Li, J., Wang, H., Feng, H., *et al.* (2017). Persistent Expression of VCAM1 in Radial Glial Cells Is Required for the Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Neuron* 95, 309-325 e306.
- Ihrle, R.A., Shah, J.K., Harwell, C.C., Levine, J.H., Guinto, C.D., Lezameta, M., Kriegstein, A.R., and Alvarez-Buylla, A. (2011). Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron* 71, 250-262.

- Imamura, F., Nagao, H., Naritsuka, H., Murata, Y., Taniguchi, H., and Mori, K. (2006). A leucine-rich repeat membrane protein, 5T4, is expressed by a subtype of granule cells with dendritic arbors in specific strata of the mouse olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology* *495*, 754-768.
- Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Metzger, D., Chambon, P., and Kageyama, R. (2006). Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. *Genesis* *44*, 233-238.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itoharu, S., and Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* *11*, 1153-1161.
- Imura, T., Kornblum, H.I., and Sofroniew, M.V. (2003). The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci* *23*, 2824-2832.
- Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.M., Xiao, J.H., Chambon, P., and Metzger, D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* *27*, 4324-4327.
- Jacquet, B.V., Muthusamy, N., Sommerville, L.J., Xiao, G., Liang, H., Zhang, Y., Holtzman, M.J., and Ghashghaei, H.T. (2011). Specification of a Foxj1-dependent lineage in the forebrain is required for embryonic-to-postnatal transition of neurogenesis in the olfactory bulb. *J Neurosci* *31*, 9368-9382.
- Jankovski, A., and Sotelo, C. (1996). Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *The Journal of comparative neurology* *371*, 376-396.
- Jensen, J.B., and Parmar, M. (2006). Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol Neurobiol* *34*, 153-161.
- Jin, K., Galvan, V., Xie, L., Mao, X.O., Gorostiza, O.F., Bredesen, D.E., and Greenberg, D.A. (2004a). Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw},Ind) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 13363-13367.
- Jin, K., Peel, A.L., Mao, X.O., Xie, L., Cottrell, B.A., Henshall, D.C., and Greenberg, D.A. (2004b). Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 343-347.
- Johansson, C.B., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A.M., and Frisen, J. (1999). Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res* *253*, 733-736.
- Joppe, S.E., Hamilton, L.K., Cochard, L.M., Levros, L.C., Aumont, A., Barnabe-Heider, F., and Fernandes, K.J. (2015). Bone morphogenetic protein dominantly suppresses epidermal growth factor-induced proliferative expansion of adult forebrain neural precursors. *Front Neurosci* *9*, 407.
- Kanki, H., Shimabukuro, M.K., Miyawaki, A., and Okano, H. (2010). "Color Timer" mice: visualization of neuronal differentiation with fluorescent proteins. *Mol Brain* *3*, 5.
- Katakura, M., Hashimoto, M., Shahdat, H.M., Gamoh, S., Okui, T., Matsuzaki, K., and Shido, O. (2009). Docosahexaenoic acid promotes neuronal differentiation by regulating basic helix-loop-helix transcription factors and cell cycle in neural stem cells. *Neuroscience* *160*, 651-660.

- Katsimpardi, L., Litterman, N.K., Schein, P.A., Miller, C.M., Loffredo, F.S., Wojtkiewicz, G.R., Chen, J.W., Lee, R.T., Wagers, A.J., and Rubin, L.L. (2014). Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science* *344*, 630-634.
- Kempermann, G., Gage, F.H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M.A., Thuret, S., Kuhn, H.G., Jessberger, S., Frankland, P.W., Cameron, H.A., *et al.* (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell*.
- Kennedy, B.K., and Lamming, D.W. (2016). The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand ConducTOR of Metabolism and Aging. *Cell metabolism* *23*, 990-1003.
- Kheirbek, M.A., Klemenhagen, K.C., Sahay, A., and Hen, R. (2012). Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci* *15*, 1613-1620.
- Kohwi, M., Petryniak, M.A., Long, J.E., Ekker, M., Obata, K., Yanagawa, Y., Rubenstein, J.L., and Alvarez-Buylla, A. (2007). A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci* *27*, 6878-6891.
- Kokovay, E., Wang, Y., Kusek, G., Wurster, R., Lederman, P., Lowry, N., Shen, Q., and Temple, S. (2012). VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell Stem Cell* *11*, 220-230.
- Kolb, B., Morshead, C., Gonzalez, C., Kim, M., Gregg, C., Shingo, T., and Weiss, S. (2007). Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats. *J Cereb Blood Flow Metab* *27*, 983-997.
- Kornack, D.R., and Rakic, P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 5768-5773.
- Kornack, D.R., and Rakic, P. (2001). The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 4752-4757.
- Kosaka, K., Aika, Y., Toida, K., Heizmann, C.W., Hunziker, W., Jacobowitz, D.M., Nagatsu, I., Streit, P., Visser, T.J., and Kosaka, T. (1995). Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neuroscience research* *23*, 73-88.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* *32*, 149-184.
- Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L.B., O'Brien, T.F., Kusakabe, M., and Steindler, D.A. (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Experimental neurology* *156*, 333-344.
- Lagace, D.C., Whitman, M.C., Noonan, M.A., Ables, J.L., DeCarolis, N.A., Arguello, A.A., Donovan, M.H., Fischer, S.J., Farnbauch, L.A., Beech, R.D., *et al.* (2007). Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. *J Neurosci* *27*, 12623-12629.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., and Gordon, S. (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* *48*, 405-415.
- Lazarini, F., and Lledo, P.M. (2011). Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends in neurosciences* *34*, 20-30.

- Lazarini, F., Mouthon, M.A., Gheusi, G., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C., Lamarque, S., Abrous, D.N., Boussin, F.D., and Lledo, P.M. (2009). Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PloS one* 4, e7017.
- Lazarov, O., and Marr, R.A. (2010). Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Experimental neurology* 223, 267-281.
- Lazarov, O., Mattson, M.P., Peterson, D.A., Pimplikar, S.W., and van Praag, H. (2010). When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends in neurosciences* 33, 569-579.
- Leeman, D.S., Hebestreit, K., Ruetz, T., Webb, A.E., McKay, A., Pollina, E.A., Dulken, B.W., Zhao, X., Yeo, R.W., Ho, T.T., *et al.* (2018). Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging. *Science* 359, 1277-1283.
- Leonard, B.W., Mastroeni, D., Grover, A., Liu, Q., Yang, K., Gao, M., Wu, J., Pootrakul, D., van den Berge, S.A., Hol, E.M., *et al.* (2009). Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *The Journal of comparative neurology* 515, 269-294.
- Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7526-7531.
- Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.
- Lim, D.A., Huang, Y.C., and Alvarez-Buylla, A. (2007). The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurg Clin N Am* 18, 81-92, ix.
- Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726.
- Lindberg, O.R., Brederlau, A., Jansson, A., Nannmark, U., Cooper-Kuhn, C., and Kuhn, H.G. (2012). Characterization of epidermal growth factor-induced dysplasia in the adult rat subventricular zone. *Stem Cells Dev* 21, 1356-1366.
- Lledo, P.M., Merkle, F.T., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends in neurosciences* 31, 392-400.
- Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., and Martin-Villalba, A. (2015). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell* 17, 329-340.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.
- Luo, J., Daniels, S.B., Lenington, J.B., Notti, R.Q., and Conover, J.C. (2006). The aging neurogenic subventricular zone. *Aging cell* 5, 139-152.
- Luo, J., Shook, B.A., Daniels, S.B., and Conover, J.C. (2008). Subventricular zone-mediated ependyma repair in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 28, 3804-3813.
- Luo, Y., Coskun, V., Liang, A., Yu, J., Cheng, L., Ge, W., Shi, Z., Zhang, K., Li, C., Cui, Y., *et al.* (2015). Single-cell transcriptome analyses reveal signals to activate dormant neural stem cells. *Cell* 161, 1175-1186.
- Mackay-Sim, A., and Kittel, P. (1991). Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. *J Neurosci* 11, 979-984.
- Magri, L., Cambiaghi, M., Cominelli, M., Alfaro-Cervello, C., Cursi, M., Pala, M., Bulfone, A., Garcia-Verdugo, J.M., Leocani, L., Minicucci, F., *et al.* (2011). Sustained activation of

- mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions. *Cell Stem Cell* 9, 447-462.
- Mamber, C., Kozareva, D.A., Kamphuis, W., and Hol, E.M. (2013). Shades of gray: The delineation of marker expression within the adult rodent subventricular zone. *Progress in neurobiology* 111, 1-16.
- Maresh, A., Rodriguez Gil, D., Whitman, M.C., and Greer, C.A. (2008). Principles of glomerular organization in the human olfactory bulb--implications for odor processing. *PLoS one* 3, e2640.
- Maslov, A.Y., Barone, T.A., Plunkett, R.J., and Pruitt, S.C. (2004). Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci* 24, 1726-1733.
- McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* 276, 66-71.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26, 7907-7918.
- Merkle, F.T., Mirzadeh, Z., and Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317, 381-384.
- Merkle, F.T., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17528-17532.
- Mich, J.K., Signer, R.A., Nakada, D., Pineda, A., Burgess, R.J., Vue, T.Y., Johnson, J.E., and Morrison, S.J. (2014). Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *Elife* 3, e02669.
- Michell-Robinson, M.A., Touil, H., Healy, L.M., Owen, D.R., Durafourt, B.A., Bar-Or, A., Antel, J.P., and Moore, C.S. (2015). Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* 138, 1138-1159.
- Mignone, J.L., Kukekov, V., Chiang, A.S., Steindler, D., and Enikolopov, G. (2004). Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *The Journal of comparative neurology* 469, 311-324.
- Ming, G.L., and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687-702.
- Mira, H., Andreu, Z., Suh, H., Lie, D.C., Jessberger, S., Consiglio, A., San Emeterio, J., Hortiguera, R., Marques-Torres, M.A., Nakashima, K., *et al.* (2010). Signaling through BMPRII regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7, 78-89.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3, 265-278.
- Mitchell, R.S., Beitzel, B.F., Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C.C., Ecker, J.R., and Bushman, F.D. (2004). Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* 2, E234.
- Morell, M., Tsan, Y., and O'Shea, K.S. (2014). Inducible expression of noggin selectively expands neural progenitors in the adult SVZ. *Stem Cell Res* 14, 79-94.
- Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132, 598-611.

- Morshead, C.M., Craig, C.G., and van der Kooy, D. (1998). In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development* *125*, 2251-2261.
- Morshead, C.M., Garcia, A.D., Sofroniew, M.V., and van Der Kooy, D. (2003). The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *The European journal of neuroscience* *18*, 76-84.
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S., and van der Kooy, D. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* *13*, 1071-1082.
- Morshead, C.M., and van der Kooy, D. (1992). Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci* *12*, 249-256.
- Mouret, A., Gheusi, G., Gabellec, M.M., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C., and Lledo, P.M. (2008). Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J Neurosci* *28*, 11511-11516.
- Mudo, G., Belluardo, N., Mauro, A., and Fuxe, K. (2007). Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation. *Neuroscience* *145*, 470-483.
- Mudo, G., Bonomo, A., Di Liberto, V., Frinchi, M., Fuxe, K., and Belluardo, N. (2009). The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain. *J Neural Transm (Vienna)* *116*, 995-1005.
- Nakamura, H., Watanabe, Y., and Funahashi, J. (2000). Misexpression of genes in brain vesicles by in ovo electroporation. *Dev Growth Differ* *42*, 199-201.
- Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Taga, T. (1999). Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* *284*, 479-482.
- Nam, H.S., and Benezra, R. (2009). High levels of Id1 expression define B1 type adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* *5*, 515-526.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Picard-Riera, N., Tessier-Lavigne, M., Baron-Van Evercooren, A., Sotelo, C., and Chedotal, A. (2004). Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci* *24*, 1497-1506.
- Niidome, T., Taniuchi, N., Akaike, A., Kihara, T., and Sugimoto, H. (2008). Differential regulation of neurogenesis in two neurogenic regions of APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice. *Neuroreport* *19*, 1361-1364.
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.K., Kirchhoff, F., and Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* *33*, 72-86.
- Nowakowski, T.J., Pollen, A.A., Sandoval-Espinosa, C., and Kriegstein, A.R. (2016). Transformation of the Radial Glia Scaffold Demarcates Two Stages of Human Cerebral Cortex Development. *Neuron* *91*, 1219-1227.
- Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, J.I., Anderson, R., Guinto, C., Rodas Rodriguez, J., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2018). Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* *22*, 221-234 e228.
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., and Kitano, H. (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* *1*, 2005 0010.

- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., and LaFerla, F.M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24, 1063-1070.
- Ono, K., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., and Rutishauser, U. (1994). N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13, 595-609.
- Ottone, C., Krusche, B., Whitby, A., Clements, M., Quadrato, G., Pitulescu, M.E., Adams, R.H., and Parrinello, S. (2014). Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nat Cell Biol* 16, 1045-1056.
- Paliouras, G.N., Hamilton, L.K., Aumont, A., Joppe, S.E., Barnabe-Heider, F., and Fernandes, K.J. (2012). Mammalian target of rapamycin signaling is a key regulator of the transit-amplifying progenitor pool in the adult and aging forebrain. *J Neurosci* 32, 15012-15026.
- Pastrana, E., Cheng, L.C., and Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 6387-6392.
- Pathania, M., Yan, L.D., and Bordey, A. (2010). A symphony of signals conducts early and late stages of adult neurogenesis. *Neuropharmacology* 58, 865-876.
- Peretto, P., Dati, C., De Marchis, S., Kim, H.H., Ukhanova, M., Fasolo, A., and Margolis, F.L. (2004). Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. *Neuroscience* 128, 685-696.
- Perry, E.K., Johnson, M., Ekonomou, A., Perry, R.H., Ballard, C., and Attems, J. (2012). Neurogenic abnormalities in Alzheimer's disease differ between stages of neurogenesis and are partly related to cholinergic pathology. *Neurobiology of disease* 47, 155-162.
- Pessoa, L. (2017). A Network Model of the Emotional Brain. *Trends Cogn Sci* 21, 357-371.
- Petreanu, L., and Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22, 6106-6113.
- Piccin, D., Tufford, A., and Morshead, C.M. (2014). Neural stem and progenitor cells in the aged subependyma are activated by the young niche. *Neurobiol Aging* 35, 1669-1679.
- Piccin, D., Yu, F., and Morshead, C.M. (2013). Notch signaling imparts and preserves neural stem characteristics in the adult brain. *Stem Cells Dev* 22, 1541-1550.
- Platel, J.C., Gordon, V., Heintz, T., and Bordey, A. (2009). GFAP-GFP neural progenitors are antigenically homogeneous and anchored in their enclosed mosaic niche. *Glia* 57, 66-78.
- Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., and Alvarez-Buylla, A. (2013). Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E1045-1054.
- Price, J.L., and Powell, T.P. (1970). The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *Journal of cell science* 7, 631-651.
- Privat, A., and Leblond, C.P. (1972). The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat. *The Journal of comparative neurology* 146, 277-302.
- Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *The Journal of comparative neurology* 494, 415-434.

- Redzic, Z.B., Preston, J.E., Duncan, J.A., Chodobski, A., and Szmydynger-Chodobska, J. (2005). The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging. *Curr Top Dev Biol* 71, 1-52.
- Reeve, R.L., Yammine, S.Z., Morshead, C.M., and van der Kooy, D. (2017). Quiescent Oct4(+) Neural Stem Cells (NSCs) Repopulate Ablated Glial Fibrillary Acidic Protein(+) NSCs in the Adult Mouse Brain. *Stem cells* 35, 2071-2082.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Developmental biology* 175, 1-13.
- Ribak, C.E., Shapiro, L.A., Perez, Z.D., and Spigelman, I. (2009). Microglia-associated granule cell death in the normal adult dentate gyrus. *Brain structure & function* 214, 25-35.
- Rocheffort, C., Gheusi, G., Vincent, J.D., and Lledo, P.M. (2002). Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 22, 2679-2689.
- Rodgers, J.T., King, K.Y., Brett, J.O., Cromie, M.J., Charville, G.W., Maguire, K.K., Brunson, C., Mastey, N., Liu, L., Tsai, C.R., *et al.* (2014). mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(Alert). *Nature* 510, 393-396.
- Rodriguez, J.J., Jones, V.C., Tabuchi, M., Allan, S.M., Knight, E.M., LaFerla, F.M., Oddo, S., and Verkhratsky, A. (2008). Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one* 3, e2935.
- Rodriguez, J.J., Jones, V.C., and Verkhratsky, A. (2009). Impaired cell proliferation in the subventricular zone in an Alzheimer's disease model. *Neuroreport* 20, 907-912.
- Rojczyk-Golebiewska, E., Palasz, A., and Wiaderkiewicz, R. (2014). Hypothalamic subependymal niche: a novel site of the adult neurogenesis. *Cell Mol Neurobiol* 34, 631-642.
- Rosen, W.G., Mohs, R.C., and Davis, K.L. (1984). A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 141, 1356-1364.
- Sachewsky, N., Leeder, R., Xu, W., Rose, K.L., Yu, F., van der Kooy, D., and Morshead, C.M. (2014). Primitive neural stem cells in the adult mammalian brain give rise to GFAP-expressing neural stem cells. *Stem cell reports* 2, 810-824.
- Saito, T., and Nakatsuji, N. (2001). Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Developmental biology* 240, 237-246.
- Sakamoto, M., Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2011). Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 8479-8484.
- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., *et al.* (2008). Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132, 487-498.
- Salic, A., and Mitchison, T.J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2415-2420.
- Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.M., *et al.* (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478, 382-386.

- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-Garcia Verdugo, J., *et al.* (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* *427*, 740-744.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., *et al.* (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* *301*, 805-809.
- Saunders, N.R., Daneman, R., Dziegielewska, K.M., and Liddelow, S.A. (2013). Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult. *Molecular aspects of medicine* *34*, 742-752.
- Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J.A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N.S., Garcia-Verdugo, J.M., Marin, O., Rubenstein, J.L., *et al.* (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* *311*, 629-632.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* *4*, 7-25.
- Seaberg, R.M., and van der Kooy, D. (2002). Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci* *22*, 1784-1793.
- Selkoe, D.J., and Wolfe, M.S. (2000). In search of gamma-secretase: presenilin at the cutting edge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 5690-5692.
- Shah, P.T., Stratton, J.A., Stykel, M.G., Abbasi, S., Sharma, S., Mayr, K.A., Koblinger, K., Whelan, P.J., and Biernaskie, J. (2018). Single-Cell Transcriptomics and Fate Mapping of Ependymal Cells Reveals an Absence of Neural Stem Cell Function. *Cell* *173*, 1045-1057 e1049.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* *3*, 289-300.
- Shook, B.A., Manz, D.H., Peters, J.J., Kang, S., and Conover, J.C. (2012). Spatiotemporal changes to the subventricular zone stem cell pool through aging. *J Neurosci* *32*, 6947-6956.
- Siegenthaler, J.A., Sohet, F., and Daneman, R. (2013). 'Sealing off the CNS': cellular and molecular regulation of blood-brain barrierogenesis. *Current opinion in neurobiology* *23*, 1057-1064.
- Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* *7*, 483-495.
- Silva-Vargas, V., Maldonado-Soto, A.R., Mizrak, D., Codega, P., and Doetsch, F. (2016). Age-Dependent Niche Signals from the Choroid Plexus Regulate Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* *19*, 643-652.
- Slezak, M., Goritz, C., Niemiec, A., Frisen, J., Chambon, P., Metzger, D., and Pfrieger, F.W. (2007). Transgenic mice for conditional gene manipulation in astroglial cells. *Glia* *55*, 1565-1576.
- Smart (1961). The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection. *JCN* *116*, 325-347.

- Sorrells, S.F., Paredes, M.F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K.W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K.I., *et al.* (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*.
- Sotthibundhu, A., Li, Q.X., Thangnipon, W., and Coulson, E.J. (2009). Abeta(1-42) stimulates adult SVZ neurogenesis through the p75 neurotrophin receptor. *Neurobiol Aging* 30, 1975-1985.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Bostrom, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., *et al.* (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219-1227.
- Suh, H., Deng, W., and Gage, F.H. (2009). Signaling in adult neurogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 253-275.
- Sun, Y., Goderie, S.K., and Temple, S. (2005). Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells. *Neuron* 45, 873-886.
- Suslov, O.N., Kukekov, V.G., Ignatova, T.N., and Steindler, D.A. (2002). Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14506-14511.
- Tanaka, S., Uehara, T., and Nomura, Y. (2000). Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *The Journal of biological chemistry* 275, 10388-10393.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., and Doetsch, F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 279-288.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A., and Kay, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4, 346-358.
- Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D., Thompson, C., Goridis, C., Rutishauser, U., and Magnuson, T. (1993). Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 11, 1163-1174.
- Tropepe, V., Craig, C.G., Morshead, C.M., and van der Kooy, D. (1997). Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 17, 7850-7859.
- Trounson, A., and McDonald, C. (2015). Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell* 17, 11-22.
- Urist, M.R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.
- Valcourt, J.R., Lemons, J.M., Haley, E.M., Kojima, M., Demuren, O.O., and Collier, H.A. (2012). Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle* 11, 1680-1696.
- Vescovi, A.L., Reynolds, B.A., Fraser, D.D., and Weiss, S. (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11, 951-966.
- Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., *et al.* (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90-94.
- Vink, M., Kahn, R.S., Raemaekers, M., van den Heuvel, M., Boersma, M., and Ramsey, N.F. (2005). Function of striatum beyond inhibition and execution of motor responses. *Hum Brain Mapp* 25, 336-344.
- Walker, M.R., Patel, K.K., and Stappenbeck, T.S. (2009). The stem cell niche. *The Journal of pathology* 217, 169-180.

- Wang, C., Liu, F., Liu, Y.Y., Zhao, C.H., You, Y., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Ma, T., Zhang, Q., *et al.* (2011). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res* 21, 1534-1550.
- Weickert, C.S., Webster, M.J., Colvin, S.M., Herman, M.M., Hyde, T.M., Weinberger, D.R., and Kleinman, J.E. (2000). Localization of epidermal growth factor receptors and putative neuroblasts in human subependymal zone. *The Journal of comparative neurology* 423, 359-372.
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., and Reynolds, B.A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16, 7599-7609.
- Winner, B., Cooper-Kuhn, C.M., Aigner, R., Winkler, J., and Kuhn, H.G. (2002). Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *The European journal of neuroscience* 16, 1681-1689.
- Winner, B., and Winkler, J. (2015). Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a021287.
- Yager, L.M., Garcia, A.F., Wunsch, A.M., and Ferguson, S.M. (2015). The ins and outs of the striatum: role in drug addiction. *Neuroscience* 301, 529-541.
- Yamaguchi, M., and Mori, K. (2005). Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9697-9702.
- Yamashita, T., Ninomiya, M., Hernandez Acosta, P., Garcia-Verdugo, J.M., Sunabori, T., Sakaguchi, M., Adachi, K., Kojima, T., Hirota, Y., Kawase, T., *et al.* (2006). Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26, 6627-6636.
- Yanagisawa, M., Nakashima, K., Takizawa, T., Ochiai, W., Arakawa, H., and Taga, T. (2001). Signaling crosstalk underlying synergistic induction of astrocyte differentiation by BMPs and IL-6 family of cytokines. *FEBS letters* 489, 139-143.
- Yousef, H., Morgenthaler, A., Schlesinger, C., Bugaj, L., Conboy, I.M., and Schaffer, D.V. (2015). Age-Associated Increase in BMP Signaling inhibits Hippocampal Neurogenesis. *Stem cells* 33, 1577-1588.
- Yu, C.R., and Wu, Y. (2017). Regeneration and rewiring of rodent olfactory sensory neurons. *Experimental neurology* 287, 395-408.
- Zhang, J., Ji, F., Liu, Y., Lei, X., Li, H., Ji, G., Yuan, Z., and Jiao, J. (2014). Ezh2 regulates adult hippocampal neurogenesis and memory. *J Neurosci* 34, 5184-5199.
- Zhuo, L., Sun, B., Zhang, C.L., Fine, A., Chiu, S.Y., and Messing, A. (1997). Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. *Developmental biology* 187, 36-42.
- Ziabreva, I., Perry, E., Perry, R., Minger, S.L., Ekonomou, A., Przyborski, S., and Ballard, C. (2006). Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of psychosomatic research* 61, 311-316.
- Zlokovic, B.V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178-201.
- Zou, D.J., Greer, C.A., and Firestein, S. (2002). Expression pattern of alpha CaMKII in the mouse main olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology* 443, 226-236.

VI. Annexes

A. Annexe A

Mammalian Target of Rapamycin Signaling Is a Key Regulator of the Transit-Amplifying Progenitor Pool in the Adult and Aging Forebrain

Mammalian Target of Rapamycin Signaling Is a Key Regulator of the Transit-Amplifying Progenitor Pool in the Adult and Aging Forebrain

Grigorios N. Paliouras,¹ Laura K. Hamilton,¹ Anne Aumont,¹ Sandra E. Joppé,¹ Fanie Barnabé-Heider,² and Karl J. L. Fernandes¹

¹Department of Pathology and Cell Biology, Groupe de recherche sur le système nerveux central and Center of Excellence in Neuroscience of the Université de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4, and ²Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, S-17177 Stockholm, Sweden

Adult forebrain neurogenesis is dynamically regulated. Multiple families of niche-derived cues have been implicated in this regulation, but the precise roles of key intracellular signaling pathways remain vaguely defined. Here, we show that mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling is pivotal in determining proliferation versus quiescence in the adult forebrain neural stem cell (NSC) niche. Within this niche, mTOR complex-1 (mTORC1) activation displays stage specificity, occurring in transiently amplifying (TA) progenitor cells but not in GFAP+ stem cells. Inhibiting mTORC1 depletes the TA progenitor pool *in vivo* and suppresses epidermal growth factor (EGF)-induced proliferation within neurosphere cultures. Interestingly, mTORC1 inhibition induces a quiescence-like phenotype that is reversible. Likewise, mTORC1 activity and progenitor proliferation decline within the quiescent NSC niche of the aging brain, while EGF administration reactivates the quiescent niche in an mTORC1-dependent manner. These findings establish fundamental links between mTOR signaling, proliferation, and aging-associated quiescence in the adult forebrain NSC niche.

Introduction

Adult neural stem cells (NSCs) balance between two seemingly contradictory biological states. While most of their time is spent in a state of quiescence, a mechanism for preserving genomic stability and extending cellular lifespan, they must simultaneously generate sufficient numbers of differentiated progeny to preserve tissue integrity, function, and regenerative capacity (Li and Clevers, 2010; Nakada et al., 2011). In the forebrain, NSCs reconcile these disparate functions by maintaining a large pool of highly proliferative transiently amplifying (TA) progenitors within the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles (Morshead et al., 1994; Chojnacki et al., 2009; Ihrle and Alvarez-Buylla, 2011). TA progenitors undergo rapid proliferative expansion, producing differentiating neuroblasts that migrate to the olfactory bulbs and that are recruited to other brain regions following injury, such as stroke (Arvidsson et al., 2002; Kolb et al., 2007; Thored et al., 2007). Maintenance of the TA progenitor pool is essential for dynamic modulation of cell genesis in response to physiological or pathophysiological changes. However,

the majority of TA progenitors disappear with aging (Maslov et al., 2004; Luo et al., 2006; Molofsky et al., 2006; Bouab et al., 2011), including in humans (Knoth et al., 2010), potentially contributing to aging-associated deficits in neural functions and brain maintenance. Thus, understanding how TA progenitors expand from a small number of stem cells has widespread therapeutic relevance.

Expansion of the TA progenitor pool is regulated by many families of extracellular “extrinsic” factors within the NSC niche (Tropepe et al., 1997; Palma et al., 2005; Colak et al., 2008; Aguirre et al., 2010; Ihrle and Alvarez-Buylla, 2011). In particular, epidermal growth factor (EGF)-related ligands play particularly prominent roles. The EGF receptor (EGF-R) is expressed by TA progenitors and a subpopulation of stem cells (Doetsch et al., 2002; Pastrana et al., 2009), and EGF is routinely used in culture to isolate and expand tripotential neural progenitors from the adult brain (Reynolds and Weiss, 1992; Doetsch et al., 2002). Mice deficient in transforming growth factor α , another EGF-R ligand, have significantly reduced SVZ neurogenesis (Tropepe et al., 1997), emphasizing the importance of EGF-R signaling for adult neurogenesis. However, less is known about the exact functions of intracellular signaling pathways activated downstream of niche-derived signals. These signaling pathways represent potential therapeutic targets for modulating adult neurogenesis during aging, disease, and injury.

Here, we define novel biological functions of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway within the adult and aging NSC niche. mTOR is a highly conserved, serine–threonine kinase that regulates numerous essential cellular processes, including transcription, translation, ribosome biogenesis, autophagy, cyto-

Received May 5, 2012; revised Aug. 2, 2012; accepted Aug. 28, 2012.

Author contributions: G.N.P., F.B.-H., and K.J.L.F. designed research; G.N.P., L.K.H., A.A., S.E.J., and F.B.-H. performed research; G.N.P., L.K.H., F.B.-H., and K.J.L.F. analyzed data; G.N.P. and K.J.L.F. wrote the paper.

This work was supported by a fellowship from the Groupe de recherche sur le système nerveux central (G.N.P.) and a Canada Research Chair in Stem Cell Neurobiology (K.J.L.F.). Operating funds were provided by the Canadian Institutes of Health Research. We thank members of the Fernandes laboratory for helpful discussions and technical assistance.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Dr. Karl J. L. Fernandes, Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, CP. 6128, succursale Centre-ville, Montréal, QC, Canada H3C 3J7. E-mail: karl.j.l.fernandes@umontreal.ca.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2248-12.2012

Copyright © 2012 the authors 0270-6474/12/3215012-15\$15.00/0

skeletal dynamics, and cell survival (Zoncu et al., 2011). In various cell types, mTOR signaling can be modulated downstream of multiple growth factor receptors and sensors of nutrients, energy, and stress (Zoncu et al., 2011). Moreover, upstream mutations that hyperactivate mTOR signaling in embryonic neural precursors result in tuberous sclerosis complex-associated CNS lesions (Magri et al., 2011). We now demonstrate that mTOR signaling in the adult forebrain NSC niche is critical for TA progenitor expansion and aging-associated quiescence.

Materials and Methods

Tissue collection. All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and were approved by the University of Montreal animal care committee. Pregnant C57BL/6 mice (Charles River), 2-, 10-, and 18-month-old male C57BL/6 mice (Taconic), and GFAP-GFP mice (stock #003257, The Jackson Laboratory) were used in these experiments. Freshly dissected embryonic tissues and formaldehyde perfusion-fixed adult tissues were postfixed overnight in 4% formaldehyde. Adult tissues were cut into 40 μ m coronal sections using a vibratome (Leica VT1000S) and stored at -20°C in antifreeze solution (Bouab et al., 2011), while embryonic tissues were cryoprotected in 30% sucrose, cryostat sectioned at 15 μ m thickness and stored at -80°C .

Microdissected SVZ and striatal samples were obtained from freshly dissected adult mouse brains as follows. Brains were placed in a brain mold and straight-edge razor blades were used to cut a 2-mm-thick coronal section through the forebrain (corresponding to the region between 3 and 5 mm posterior to the anterior edge of the olfactory bulbs). Using a dissecting microscope, fine-tipped tungsten needles were then used to dissect out a block of SVZ tissue, by first making lateral cuts through the corpus callosum (dorsally) and above the anterior commissures (ventrally), and then tracing the gray-white boundaries at the SVZ/striatum and SVZ/septum borders. A block of striatal tissue of similar size was cut from the center of the adjacent striatum for biochemical comparison and to provide a control for SVZ microdissection purity.

Neurosphere cultures and neural differentiation. Neurosphere cultures were generated at clonal density in DMEM/F-12 (3:1; both from Invitrogen) supplemented with 2% B27 (Invitrogen), 1 μ g/ml fungizone (Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Wisent), 20 ng/ml EGF (Sigma), and 25 ng/ml fibroblast growth factor-2 (FGF2; Sigma) as described previously (Bouab et al., 2011). Primary neurospheres were grown for 7 d before quantification of number and diameter. The self-renewal properties of primary neurospheres were assessed by passaging the primary cultures in the above proliferation medium at a cell density of 0.5 cells/ μ l to ensure the growth of clonally derived secondary spheres (Coles-Takabe et al., 2008). DMSO, rapamycin (Invitrogen), or KU0063794 (chemical formula C₂₅H₃₁N₅O₄; Tocris Bioscience) were used at the concentrations indicated and were replenished every 2 d. The number and diameter of secondary neurospheres was quantified after 7 d *in vitro*.

To assess the effects of acute stimulation with EGF on mTOR signaling, neurosphere cells plated in proliferation medium were deprived of EGF, FGF2, and the insulin-containing B27 supplement for one night and were then stimulated with 100 ng/ml of EGF for 0, 15, and 30 min. Cells were analyzed by Western blotting (see below).

Primary neurospheres were differentiated as described previously (Bouab et al., 2011). After the indicated times, cells were either lysed for analysis by Western blotting or fixed in 4% formaldehyde for 15 min for immunocytochemistry. To assess the effects of mTOR inhibition on differentiation of neurospheres, DMSO, rapamycin (20 nM), or KU0063794 (100 nM) were added to the differentiation medium and replenished every 2 d.

Immunostaining. Immunohistochemistry and immunofluorescence were performed on tissue sections and cultured cells as detailed previously (Bouab et al., 2011). Working dilutions and sources of antibodies used in this study were as follows: mouse anti-rat β III tubulin (1:500; Covance); mouse anti-human CNPase (1:500); guinea pig anti-mouse doublecortin (DCX; 1:1000), and rabbit anti-mouse Olig2 (1:500; Millipore), rabbit anti-cow S100 β (1:1000; Sigma); rabbit anti-cow glial fibril-

lary acidic protein (GFAP; 1:1000; Dako Diagnostics); chicken anti-GFP (1:500; Aves); mouse anti-human Ki67 (1:200), mouse anti-rat mammalian achaete scute homolog 1 (Mash1; 1:100), and mouse anti-rat Nestin (1:400; BD Biosciences); and rabbit anti-human phospho-S6 ribosomal protein (P-S6-RP; Ser240/Ser244; 1:300) and rabbit anti-mouse phospho-4EBP1 (Thr37/46; 1:500; Cell Signaling Technology). For fluorescence detection, secondary antibodies were diluted in PBS and incubated with sections/cells for 45 min at room temperature, and nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (0.2 μ M, Sigma-Aldrich) for 2 min. For peroxidase-based detection using 3,3'-diaminobenzidine, sections were incubated in the appropriate biotinylated secondary antibody for 90 min at room temperature and the signal revealed using the avidin-biotin-peroxidase system (VectaStain ABC Kit, Vector Laboratories) according to the manufacturer's instructions. Secondary antibodies used included CY3 goat anti-mouse (1:400), CY3 goat anti-rabbit (1:400), biotin goat anti-mouse IgG (H+L; 1:1000), biotin goat anti-rabbit IgG (H+L; 1:1000; Jackson ImmunoResearch), goat anti-rabbit Alexa 488/647, goat anti-mouse Alexa 488, donkey anti-rabbit Alexa 488, goat anti-guinea pig Alexa 555, and goat anti-mouse IgG Alexa 555 (all diluted to 1:1000; Invitrogen).

Western blotting. Protein samples were prepared and separated by Western blotting as described previously (Bouab et al., 2011). Fifty micrograms of protein from each sample were run per lane. Working dilutions and sources of antibodies used in this study included rabbit anti-human phospho-Akt (Ser473; D9E) XP (1:1000), rabbit anti-human Akt (1:1000), rabbit anti-human cleaved caspase-3 (Asp175; 1:500), rabbit anti-human phospho-mTOR (Ser2448; 1:1000), rabbit anti-mouse mTOR (1:1000), rabbit anti-human phospho-S6-ribosomal protein (Ser240/Ser244; 1:1000), mouse anti-human S6 ribosomal protein (1:1000), rabbit anti-mouse phospho-4EBP1 (Thr37/46; 236B4; 1:500), rabbit anti-mouse 4EBP1 (1:1000), rabbit anti-human P-Rictor (Thr1135; D30A3; 1:500), and rabbit anti-human Rictor (53A2; 1:500; Cell Signaling Technology); rabbit anti-mouse cactinin (1:5000; Swant); mouse anti-human CNPase (1:1000), rabbit anti-human Sox2 (1:500), rabbit anti-human tyrosine hydroxylase (1:1000; Millipore); rabbit anti-cow GFAP (1:5000; Dako Diagnostics); mouse anti-human proliferating cell nuclear antigen (PCNA; 1:1000; BD Biosciences); and mouse anti-rat β III tubulin (1:1000; Covance). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:5000; Bio-Rad) or anti-rabbit IgG (1:5000; Millipore) secondary antibodies were used. Secondary antibodies were detected using the enhanced chemiluminescence reagent kit following manufacturer's instruction (GE Healthcare) and X-Omat Blue film (Kodak). Membranes were subsequently stripped with Re-Blot Plus Mild (Millipore), reblocked, and reprobed appropriately. Densitometric quantifications were performed using NIH ImageJ 64-bit Java Software for Mac.

Transfection and DNA constructs. The transfection reagent Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used according to the manufacturer's instructions for HEK293 cells. For neurosphere experiments, primary neurospheres were gently triturated and 1×10^5 cells were plated into 8-well chamber slides coated with poly-L-lysine. A concentration of 0.5 μ g of wild-type (WT) mTOR (Addgene plasmid 1861) or kinase-dead (KD) mTOR (Addgene plasmid 8482) were cotransfected with 0.5 μ g of red fluorescence protein-expressing vector. Cells were incubated in the DNA/Lipofectamine mix for 4 h, and the medium then changed to proliferation medium for 2 d. Following 2 d of proliferation, cells were induced to differentiate by EGF withdrawal.

Intracerebroventricular infusions. Mice were operated under isoflurane anesthesia. Stereotaxic coordinates for implantation of Alzet brain infusion cannulae (Brain infusion kit 3, 3 mm depth; Durect) were 0.0 mm anteroposterior and 0.9 mm lateral relative to Bregma. Cannulae were attached to 7 d Alzet osmotic pumps (model 1007D; Durect), which delivered 0.5 μ l/h. Growth factor or inhibitor solutions were prepared in 1% albumin at the following concentrations: EGF, 20 μ g/ml; rapamycin, 0.5 mM. DMSO was used as the vehicle control.

Microscopy. Fluorescence and light microscopy were performed using a motorized Olympus IX81 epifluorescence microscope equipped with a black and white CCD camera and an Olympus BX43F light microscope equipped with a DP21 color digital camera. Confocal microscopy was performed using a Leica SP1 laser-scanning system or an Olympus IX61

spinning disc laser system. Image manipulations were limited to brightness/contrast and were performed in a standardized manner for all images.

Quantifications and statistical analyses. For anti-P-S6-RP double-labeling experiments, two to three sections (four to six ventricles per animal) between the stereotaxic coordinates of bregma 0.0 and +1.2 mm were analyzed from each of three animals, and the percentage of P-S6-RP+ cells that were double labeled is reported.

For quantification of Ki67+ and Mash1+ cells in 2-month-old and 10-month-old mice following intracerebroventricular (ICV) infusion of DMSO, rapamycin, EGF or EGF plus rapamycin, quantifications were limited to the side ipsilateral to pump implantation, as P-S6-RP staining showed that the effects of rapamycin were restricted to the side of infusion. Two to three sections between bregma 0.0 and +1.2 mm (i.e., the region of efficient P-S6-RP inhibition) were used from each of three animals to obtain a total of 18–24 fields of view (40× magnification). Nuclear size measurements showed no significant differences in diameter across treatment groups (2 months, DMSO, $7.60 \pm 0.13 \mu\text{m}$; 2 months, rapamycin, $7.98 \pm 0.19 \mu\text{m}$; 10 months, DMSO, $7.55 \pm 0.41 \mu\text{m}$; 10 months, EGF, $7.41 \pm 0.14 \mu\text{m}$; 10 months, EGF plus rapamycin, $7.88 \pm 0.14 \mu\text{m}$). Quantifications from 40- μm -thick sections are therefore presented as uncorrected cell counts per mm of SVZ length, providing an estimation of relative changes in cell numbers in each group.

Two-tailed unpaired *t* tests were used to compare the means between pairs of groups and statistical significance was set at $p \leq 0.05$. Error bars depict the SEM. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism for Windows (version 5.02).

Results

mTOR signaling is activated within zones of developing and adult neurogenesis

The biological functions of mTOR are mediated by two known mTOR-containing signaling complexes, mTORC1 and mTORC2, whose activation can be monitored by phosphorylation of distinct downstream substrates, including S6-RP, 4EBP1, and Rictor (for mTORC1) or Akt (for mTORC2) (Sarbasov et al., 2005; Zoncu et al., 2011; Laplante and Sabatini, 2012). Phosphorylated S6-RP (P-S6-RP^{Ser240/244}), in particular, is a sensitive and highly specific indicator of mTOR signaling.

We first used P-S6-RP^{Ser240/244} immunoreactivity to compare the distribution of mTOR activation in the developing and the adult CNS. At embryonic day 15 (E15), P-S6-RP immunoreactivity was abundant throughout the neural tube, including in the germinal ventricular zones and the expanding parenchyma of both the brain and spinal cord (Fig. 1A–D). P-S6-RP+ cells in the ventricular zone of the E15 telencephalon represented a subpopulation of the Nestin+ neural stem/progenitors (Fig. 1A,B). Similarly, in the caudal neural tube, P-S6-RP+ cells were a subpopulation of the Vimentin+ cells within the ventricular zone of the developing spinal cord (Fig. 1C,D).

P-S6-RP^{Ser240/244} cells were likewise distributed widely throughout the parenchyma of the adult brain and spinal cord; however, in contrast to the embryonic CNS, P-S6-RP+ cells were largely absent from adult ventricular zones (Fig. 1E–H). The exception to this was the SVZ bordering the striatal wall of the lateral ventricles, notable for its ongoing adult neurogenesis, where P-S6-RP+ cells represented a subpopulation of the Nestin+ cells (Fig. 1E,F). P-S6-RP+ cells were virtually absent from the medial and dorsal walls of the lateral ventricles (Fig. 1E), where neurogenesis is less common. Likewise, P-S6-RP+ cells were absent from the Vimentin+ ependymal layer of the spinal cord, which is also nonneurogenic (Fig. 1G,H). P-S6-RP+ cells within the parenchyma of the adult brain and spinal cord corresponded to mature neurons, while GFAP+ astrocytes were notably negative (data not shown).

Biochemical analyses confirmed the activation of mTOR-induced signaling pathways in the adult forebrain SVZ niche (Fig.

1I–K). Lysates were generated from microdissections of the lateral ventricle SVZ and from the adjacent striatal tissue (Fig. 1I). The purity of these microdissections was confirmed by Western blotting for region-specific markers, including tyrosine hydroxylase (striatum specific) and Sox2, PCNA, and calretinin (SVZ enriched) (Fig. 1J). Compared to the adjacent striatum, SVZ lysates were found to be enriched for phosphorylated mTOR itself (P-mTOR^{Ser2448}), for downstream substrates of mTORC1 (P-S6-RP^{Ser240/244}, P-4EBP1^{Thr37/46}, and P-Rictor^{Thr135}), and for the mTORC2-dependent Ser473 phosphorylation site of Akt (P-Akt^{S473}) (Sarbasov et al., 2005) (Fig. 1J). Quantification by densitometry indicated that the relative phosphorylation levels of mTOR, S6-RP, and Akt were all two to four times higher in the SVZ than in the adjacent striatum (Fig. 1K); moreover, since these SVZ microdissections included the medial and dorsal walls of the ventricles, this is likely an underestimation of the enrichment of mTOR activity within the neurogenic lateral SVZ.

Thus, mTOR-associated signaling pathways are widely activated in ventricular zones during developmental neurogenesis and are selectively maintained within the adult forebrain SVZ neurogenic niche.

mTORC1 activation occurs in TA progenitors and is required to maintain the endogenous TA progenitor pool

The four principal cell types within the SVZ niche of the adult mouse forebrain are ependymal cells, astrocytes (including the astrocyte-like stem cells), TA progenitors, and neuroblasts, whose lineage relationships and markers have been well characterized (Fig. 2A) (Doetsch et al., 1997, 1999). Since only a fraction of SVZ cells were immunoreactive for P-S6-RP^{Ser240/244} (Fig. 2B), we performed multilabel immunofluorescence for P-S6-RP^{Ser240/244} and cell type-specific markers (Fig. 2C–H). Quantification revealed that $94.7 \pm 2.0\%$ of P-S6-RP+ cells were immunoreactive for the proliferation marker Ki67, $81.1 \pm 3.7\%$ expressed Mash1 (neuronally specified TA progenitors), $7.6 \pm 4.3\%$ expressed Olig2 (TA progenitors and oligodendrocyte-lineage cells), and $15 \pm 6.9\%$ expressed the neuroblast marker DCX (Fig. 2C–I). P-S6-RP^{Ser240/244} cells represented $16.1 \pm 2.7\%$ of the total Ki67+ cells and $25.1 \pm 6.0\%$ of the total Mash1+ cells (Fig. 2J). Immunostaining for a second mTORC1 target, P-4EBP1^{Thr37/46}, showed a qualitatively similar labeling pattern, with the majority of P-4EBP1+ cells coexpressing Mash1 (Fig. 2K).

Notably, P-S6-RP staining was absent in both GFAP+ astrocytes/stem cells (Fig. 2D) and S100 β + ependymal cells (Fig. 2C), suggesting that mTORC1 activation *in vivo* does not occur in cells having stem cell potential. In particular, the GFAP+ stem cell compartment is thought to be comprised of both quiescent (GFAP+Ki67⁻) and rarer “activated” (GFAP+Ki67⁺) subpopulations. We therefore exhaustively analyzed >600 P-S6-RP+ cells in *z*-stacks through the SVZ using a 60× objective (data not shown) and never detected P-S6-RP immunoreactivity in GFAP+ cells. Furthermore, immunostaining of sections from the SVZ of GFAP-GFP transgenic mice likewise revealed no colocalization between P-S6-RP and GFP (Fig. 2L). Together, these data indicate that activation of mTORC1 signaling does not occur to any significant extent in GFAP+ NSCs, and that mTORC1 signaling within the adult SVZ neurogenic lineage first occurs within the TA progenitor compartment.

To gain insight into the potential role(s) of mTOR signaling within the TA progenitor population, we next used osmotic pumps to infuse 0.5 $\mu\text{l/hr}$ of 500 μM rapamycin continuously into the lateral ventricles for 7 d. Rapamycin is a widely tested, clinically approved,

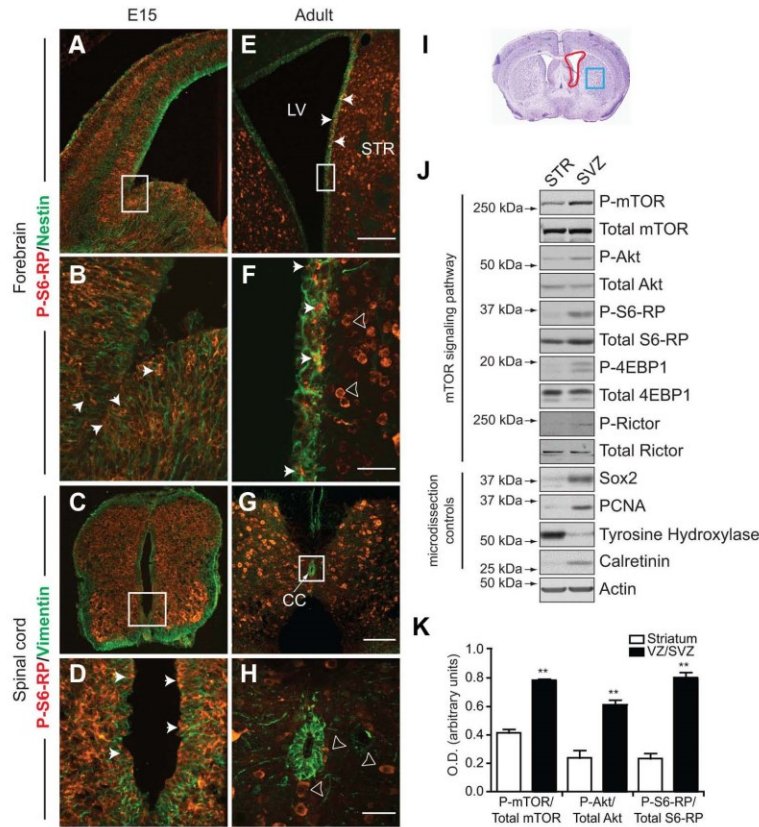


Figure 1. Activation of mTOR signaling pathways in neurogenic zones of the developing and adult CNS. *A–D*, Confocal images of immunofluorescence for P-S6-RP (red) within the Nestin-expressing (green) ventricular zone of the E15 telencephalon (*A*, enlarged in *B*) and within the Vimentin-expressing (green) ventricular zone of the E15 spinal cord (*C*, enlarged in *D*). Cells immunoreactive for P-S6-RP are widespread in the ventricular zones and expanding parenchyma throughout the E15 CNS. *E–H*, Confocal images of immunofluorescence for P-S6-RP (red) and Nestin (green) in the SVZ of the 2-month-old adult forebrain lateral ventricles (LV; *E*, enlarged in *F*), and for P-S6-RP (red) and Vimentin (green) surrounding the 2-month-old spinal cord central canal (*G*, enlarged in *H*). CC, Central canal. Cells immunoreactive for P-S6-RP remain detectable within the neurogenic striatal SVZ (arrows; *E, F*), but are no longer present within the ependymal layer of the spinal cord. Arrowheads in *F* and *H* point out strong P-S6-RP immunoreactivity in mature neurons throughout the CNS. *I–K*, Biochemical detection of mTOR signaling activity in the adult forebrain striatal SVZ. *I*, Schematic showing the SVZ (red box) and striatum (STR, blue box) regions that were microdissected from 2 mm sections of the adult mouse forebrain. *J*, Representative Western blots of SVZ and STR lysates probed with a variety of microdissection controls (Sox2, PCNA, tyrosine hydroxylase, and calretinin) and for components of mTOR signaling pathways (mTOR, Akt, S6-RP, 4EBP1, and Rictor). Levels of P-mTOR, P-Akt, P-S6-RP, P-4-EBP1, and P-Rictor are all elevated within the SVZ relative to the adjacent striatum. *K*, Average densitometry ratios for P-mTOR/mTOR, P-S6-RP/S6-RP, and P-Akt/Akt ($n = 6$ separate experiments). ** $p < 0.01$. Scale bars: (in *E, A, E*, 200 μm); (in *F, B, F*, 40 μm); (in *G, C, G*, 400 μm); (in *H, D, H*, 40 μm).

and highly specific allosteric inhibitor that operates by binding FKBP12 to inhibit mTORC1 activation. Immunostaining confirmed that ICV infusion of rapamycin was effective in abolishing P-S6-RP^{Ser240/244} within a 1–2 mm span of the ipsilateral SVZ and surrounding striatal tissue (Fig. 3*A, D*). Immunostaining for Ki67 on adjacent tissue sections revealed that *in vivo* administration of rapamycin reduced the pool of constitutively proliferating SVZ cells to $48.47 \pm 3.5\%$ of that found in DMSO-infused animals (Fig. 3*B, E, G*). This was primarily due to a reduction in TA progenitors, as the number of Mash1+ cells likewise decreased to $64.70 \pm 1.7\%$ compared to DMSO infusion (Fig. 3*C, F, H*). Furthermore, this decrease was attributable to reduced proliferation rather than increased apoptosis, as immunostaining for cleaved caspase-3 showed that regardless of treatment, apoptotic cells could be seen surrounding the cortical cannula tract but were only rarely detectable within

the SVZ (Fig. 3*I*). No obvious effects on astrocyte-associated GFAP immunoreactivity were observed (data not shown), consistent with the lack of astrocyte-associated mTORC1 activity described previously (Fig. 2). DCX+ neuroblasts were still present following rapamycin infusion, but changes in their number could not be reliably assessed owing to significant changes in neuroblast migration patterns toward the cortical pump implantation site (data not shown).

Together, these results indicate that endogenous mTOR signaling is important for maintaining the size of the proliferating TA progenitor pool *in vivo*.

mTOR activity mediates EGF-induced expansion of adult neurosphere cultures

The above findings suggested that mTOR signaling mediates the proliferative effects of endogenous niche-derived signals. Since

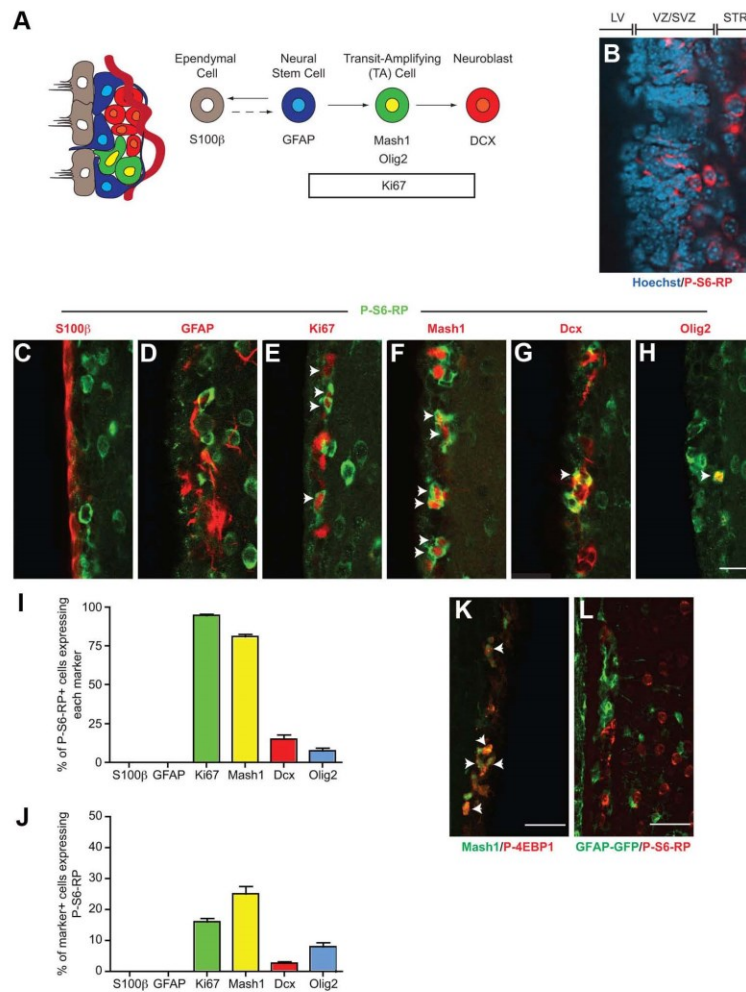


Figure 2. mTOR signaling occurs in TA progenitor cells but not GFAP+ cells within the adult forebrain SVZ niche. **A**, Illustration of the principal cell types in the SVZ neurogenic lineage and their associated cell type-specific markers. **B**, Immunostaining for P-S6-RP (red) reveals expression in only a discrete subset of SVZ cells. Nuclei are counterstained with Hoechst. **C–H**, Multilabel immunofluorescence for P-S6-RP (green) and cell type-specific markers (red). The vast majority of P-S6-RP-positive cells are proliferating TA progenitors as defined by expression of Ki67 (**E**), Mash1 (**F**) and/or Olig2 (**H**). **I, J**, Quantification of immunofluorescence experiments, expressed as a percentage of P-S6-RP cells (**I**) or as a percentage of marker-positive cells (**J**). **K**, Immunofluorescence staining for Mash1 (green) and P-4EBP1 (red) in the SVZ. **L**, Immunofluorescence staining for GFP (green) and P-S6-RP (red) in the SVZ of GFAP-GFP transgenic mice. Scale bars: (in **H**) **C–H**, 25 μm; **K, L**, 40 μm. Arrows indicate double-labeled cells.

(1) EGF-family ligands are major proliferative signals in the SVZ niche and (2) EGF can be used to generate neurosphere cultures of tripotential neural progenitors from the adult brain, we next used multiple *in vitro* paradigms to directly study the role of mTOR signaling during EGF-induced proliferative expansion of neural precursors.

First, serum-free suspension cultures of tripotential neural progenitors were generated with EGF and FGF2 for 7 d using the colony-forming neurosphere method (Reynolds and Weiss, 1992). Following overnight deprivation of serum and growth factors (EGF, FGF2, and insulin-containing B27 supplement) from dissociated and plated neurosphere cells, acute stimulation with EGF triggered a

rapid increase in P-mTOR^{Ser2448}, in the mTORC1 downstream targets P-S6-RP^{Ser240/244} and P-Rictor^{Thr1135}, and in the mTORC2 downstream target P-Akt^{Ser473} (Fig. 4A), which were all detectable biochemically within 15 min. To determine the consequences of blocking EGF-induced mTOR activation, we then used two mechanistically distinct pharmacological inhibitors of the mTOR signaling cascade, the mTORC1 inhibitor rapamycin and a more recently developed dual mTORC1/mTORC2 inhibitor, KU0063794 (Garcia-Martinez et al., 2009; Malagu et al., 2009). Unlike the allosteric inhibitor rapamycin, KU0063794 is a highly selective ATP-competitive mTOR inhibitor that blocks both mTORC1 and mTORC2 activity with an IC50 of ~10 nM. The specificity and ef-

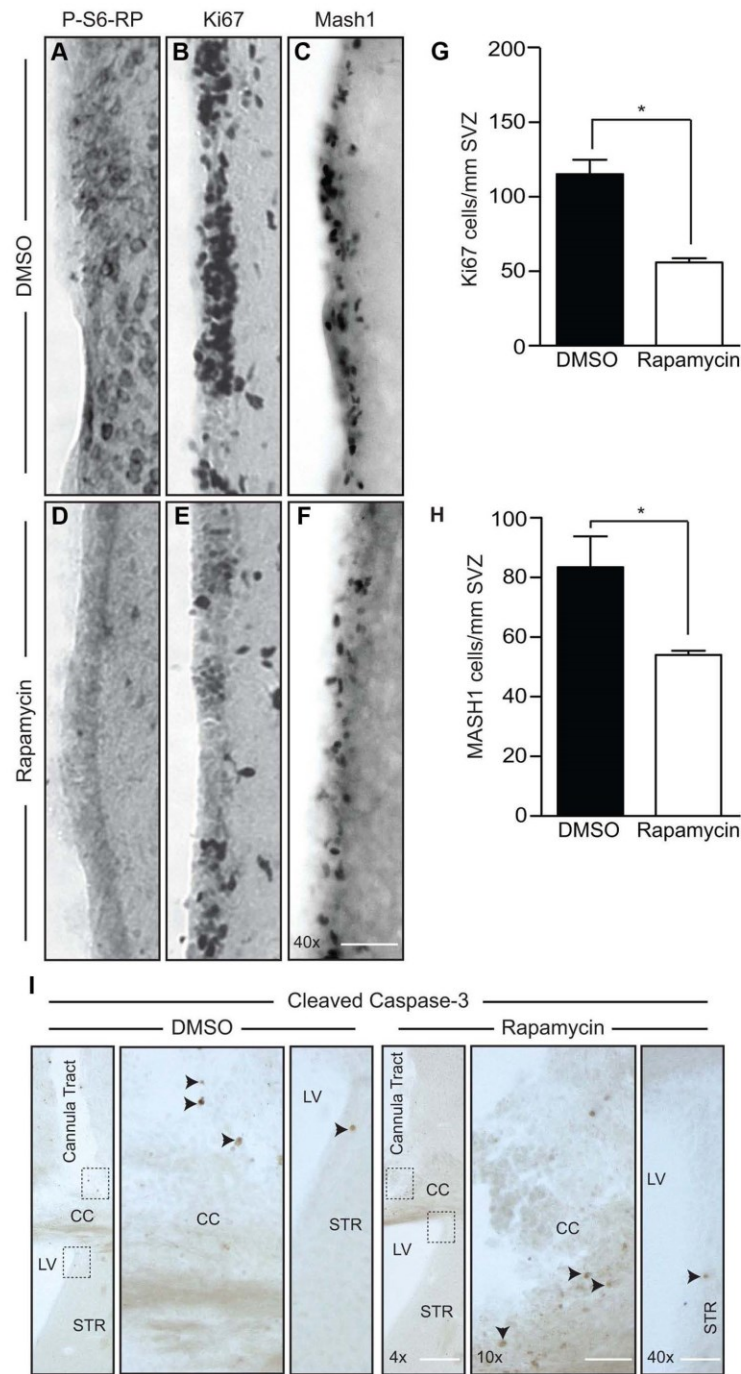


Figure 3. *In vivo* inhibition of mTORC1 with rapamycin decreases the proliferating TA progenitor pool in the SVZ. **A–F**, Immunostaining of SVZ sections from 2-month-old mice receiving 7 d ICV infusions of DMSO (**A–C**) or rapamycin (**D–F**). **A–C, D–F**, Images of the striatal SVZ showing that immunoreactivity for P-S6-RP (**A, D**), Ki67 (**B, E**), and Mash1 (**C, F**) (Figure legend continues.)

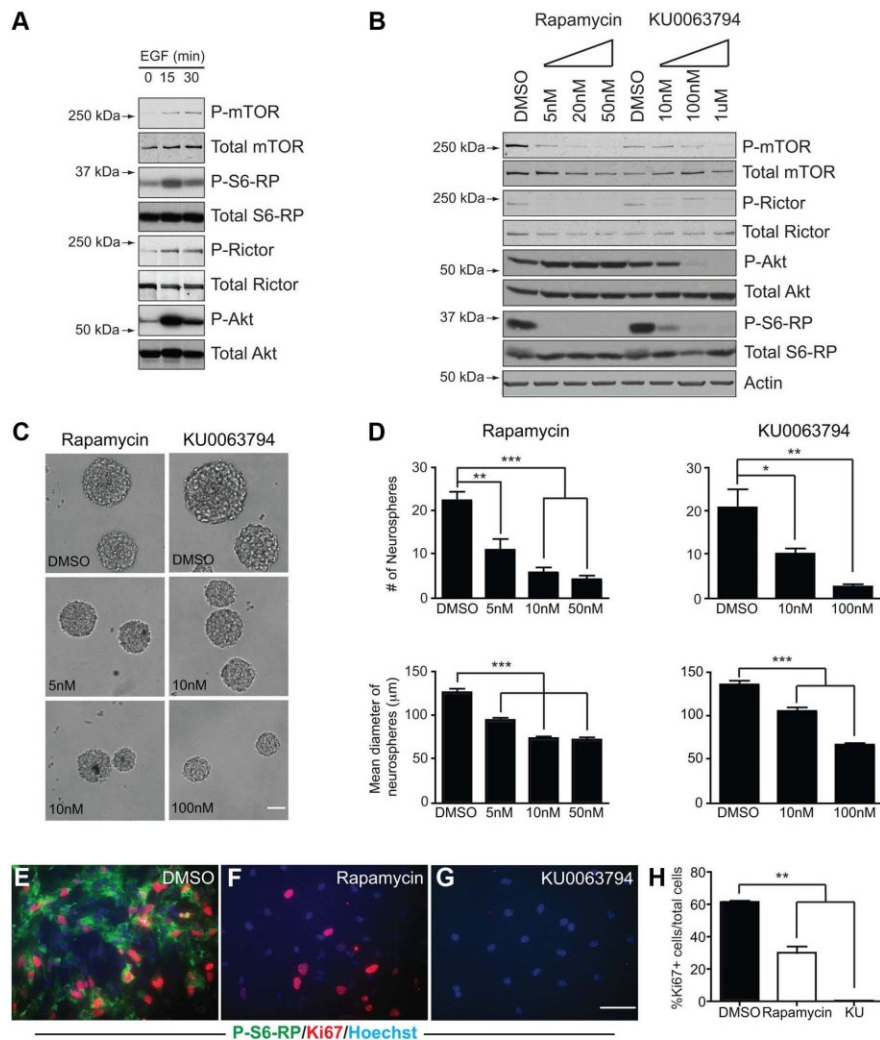


Figure 4. mTOR signaling is an essential mediator of EGF-induced proliferation in neurosphere cultures of tripotential neural progenitors. **A**, Time course of mTOR, S6-RP, Rictor, and Akt phosphorylation in adult SVZ neurosphere cultures upon acute stimulation with 100 ng/ml EGF. Neurospheres were dissociated, plated overnight in medium containing EGF and 1% serum, and then deprived of EGF, serum, and insulin overnight before EGF stimulation. **B**, Effects of the mTORC1 inhibitor, rapamycin, or the mTORC1/2 inhibitor KU0063794 on activation of mTOR signaling pathways. Primary neurospheres were dissociated and plated in the presence of EGF and B27 for 2 d, and then the inhibitors were added at the indicated doses for 30 min before cell lysis. **C, D**, Images of the effects of rapamycin and KU0063794 on growth of secondary neurospheres in the presence by EGF, FGF2, and B27 (**C**). Quantifications show that rapamycin and KU0063794 cause a dose-dependent decrease in neurosphere number (upper graphs) and size (lower graphs) (**D**). **E–H**, Effects of rapamycin and KU0063794 on EGF-induced proliferation of adherent monolayer cultures of SVZ-derived neural precursors. Immunofluorescence for P-S6-RP (green) and Ki67 (red) following 3 d of stimulation with EGF with and without inhibitors shows that both inhibitors efficiently block S6-RP phosphorylation, and this is associated with partial (rapamycin) or complete (KU0063794) inhibition of cell proliferation. Quantification of Ki67 is shown in **H**. Graphs show the mean \pm SEM from $n = 4–6$ independent cultures. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. Scale bars: **C**, (in **G**) **E–G**, 50 μ m.

←
(Figure legend continued.) are all reduced by rapamycin infusion. **G, H**, Quantification of Ki67+ proliferating cells (**G**) and Mash1+ progenitors (**H**). Graphs show the mean and SEM from $n = 3$ mice per treatment. * $p < 0.05$. **I**, Cleaved caspase-3 immunostaining of DMSO or rapamycin ICV infusions. In both cases, some cells immunoreactive for activated caspase-3 could be seen surrounding the cortical cannula tract, but such cells were only rarely detectable within the SVZ (arrowheads). LV, Lateral ventricle; STR, striatum; CC, corpus callosum. Scale bars: 4 \times and 10 \times images, 200 μ m; 40 \times images, 50 μ m.

fective dosages of these inhibitors on neurospheres (both in the nanomolar range) were established in preliminary experiments, which demonstrated that both rapamycin and KU0063794 reduce P-mTOR^{Ser2448} and the mTORC1 downstream targets P-S6-RP^{Ser240/244} and P-Rictor^{Thr1135}, but that only KU0063794 reduces the level of the mTORC2 readout, P-Akt^{Ser473} (Fig. 4B). Rapamycin-mediated inhibition of mTORC1 was also associated

with consistent increases in P-Akt^{Ser473}; this is in agreement with mTORC1's reported cross-inhibition of mTORC2 activity (Julien et al., 2010) and, importantly, confirms that rapamycin treatment did not suppress mTORC2 activity as has been reported in some cell types under certain circumstances (Sarbasov et al., 2005; Zeng et al., 2007; Lamming et al., 2012). To assess the effects of these inhibitors on neurosphere growth, primary neurospheres were dissociated and grown into secondary neurospheres in EGF-containing medium supplemented with rapamycin, KU0063794 or DMSO (Fig. 4C,D). Quantification revealed that rapamycin and KU0063794 had similar effects on neurosphere growth: compared to DMSO, both inhibitors significantly reduced the number and size of neurosphere colonies grown in the presence of EGF in a dose-dependent fashion (Fig. 4D), indicating that mTORC1 activation is required for normal growth factor-induced expansion of tripotential neural progenitors.

Second, adherent cultures of proliferating tripotential neural progenitors were generated by dissociating primary neurospheres and plating the cells onto a poly-L-lysine-coated substrate in medium containing serum and EGF (Fig. 4E–H). Adherent cultures grown in the presence of EGF with or without mTOR inhibitors were immunostained for P-S6-RP^{Ser240/244} after 3 d. Both rapamycin and KU0063794 treatments completely abolished the high basal levels of mTORC1 activity (Fig. 4E–G). This was associated with significantly reduced numbers of Ki67+ proliferating cells, which fell to $51 \pm 13.1\%$ in the presence of rapamycin and were entirely eliminated with KU0063794 (Fig. 4E–H). Cell density in the presence of rapamycin and KU0063794 was lower than with DMSO treatment; this was mainly due to reduced proliferation rather than increased cell death, as mTOR inhibition with these inhibitors did not induce caspase-3 activation by immunostaining (data not shown). In the case of KU0063794, occasional pyknotic nuclei were observed, which might indicate that prolonged mTORC1/2 inhibition eventually diminishes neural precursor survival; this would not be surprising given that the mTORC2 target, Akt, is also a well known mediator of survival-promoting growth factors (Barnabé-Heider and Miller, 2003).

Together, these *in vitro* experiments establish mTOR signaling as a major mediator of EGF-induced proliferative expansion of adult SVZ-derived neural precursors.

mTOR inhibition in the absence of EGF induces a reversible, quiescence-like phenotype

Withdrawal of EGF from cultures of SVZ-derived neural precursors normally triggers a stereotyped differentiation of neurons (β III-tubulin+), astrocytes (GFAP+), and oligodendrocytes (CNPase+), as can be shown by Western blotting (Fig. 5A). Western blot time course analysis showed that this neuronal and glial differentiation is accompanied by a steady decline in overall P-S6-RP^{Ser240/244} and P-Akt^{Ser473} levels (Fig. 5A). Immunostaining confirmed that while both P-S6-RP^{Ser240/244}+ and Ki67+ cells were maintained at high levels in the presence of EGF, P-S6-RP immunoreactivity was greatly reduced following 7 d of EGF withdrawal (Fig. 5B). Strong P-S6-RP immunoreactivity was retained only in a subpopulation of β III-tubulin-expressing neurons and some CNPase-expressing oligodendrocytes; moreover, consistent with its expression pattern in the SVZ, P-S6-RP was virtually undetectable in GFAP-expressing astrocytes (Fig. 5B). Thus, mTORC1 activation is high in undifferentiated neural precursors, declines during EGF withdrawal-induced differentiation, and is then reexpressed in maturing neurons and oligodendrocytes.

To assess the consequences of mTOR inhibition on the pattern of NSC differentiation, cultures were differentiated for 7 d in the continuous presence of DMSO, rapamycin or KU0063794 (Fig. 5C,D). Inhibitor specificity was maintained after 7 d, as rapamycin-treated cells showed reductions in mTORC1 targets P-S6-RP^{Ser240/244} and P-Rictor^{Thr1135}, but not in the mTORC2 target P-Akt^{Ser473}, while KU0063794-treated cells showed a reduction in targets of both mTORC1 and mTORC2 (Fig. 5C). Similar to their effects in EGF-treated cultures, both rapamycin and KU0063794 treatments further reduced the low level of cell proliferation found in differentiating cultures, as shown by decreased expression of PCNA (Fig. 5C). Unexpectedly, however, rapamycin and KU0063794 treatments also attenuated differentiation into all three neural lineages (neuronal, oligodendrocytic, and astrocytic) as measured both by Western blotting (Fig. 5C) and immunostaining (Fig. 5D) for β III-tubulin, GFAP, and CNPase. Inhibitor-treated cells still retained a low level of Nestin expression (Fig. 5D). Despite the unusual lack of differentiation and proliferation, and concurrent low expression of Nestin, the inhibitor-treated cells remained healthy: baseline apoptosis in the cultures (as measured by cleaved caspase-3) was decreased (Fig. 5C) rather than increased, pyknotic nuclei were not visible with Hoechst labeling (Fig. 5E), and the overall cellular morphology was normal (Fig. 5E). Thus, mTOR inhibition leads to a nonproliferating, nondifferentiating phenotype, which is reminiscent of aging-associated neural precursor quiescence.

These findings were independently supported by transiently transfecting neurosphere cells with plasmids encoding WT versus KD mTOR constructs. In control experiments, HEK293 cells transfected with mTOR(KD) showed detectable reductions in overall levels of P-S6-RP^{Ser240/244} and P-4EBP1^{Thr37/46} when compared to mTOR(WT) transfection, confirming inhibition of mTOR signaling (Fig. 5F). We therefore transfected dissociated primary neurosphere cells, plated them for 6 d in differentiation conditions, and analyzed the fate of the transfected cells on a cell-by-cell basis by immunostaining (Fig. 5G,H). Quantification showed a 44% reduction in the proportion of transfected cells that differentiated into GFAP+ astrocytes with mTOR(KD) [from $42.83 \pm 4.5\%$ (WT) to $24.68 \pm 1.59\%$ (KD); $n = 4$ experiments]. In the case of neuronal differentiation, only $0.8 \pm 0.33\%$ of mTOR(WT) cells became β III-tubulin+ neurons under these conditions, and this declined to $0.2 \pm 0.12\%$ with mTOR(KD) but did not reach statistical significance ($p = 0.19$). An increase in Mash1+ cells was not detected, but weak Nestin immunoreactivity was maintained, suggesting that mTOR(KD)-transfected cells retained immature qualities.

To further test the idea that mTOR-inhibited cells retain undifferentiated properties, we assessed whether the inhibition of differentiation observed by rapamycin treatment was a reversible process. Specifically, we asked whether subsequent withdrawal of rapamycin from "quiescent" cultures would permit neurogenesis and gliogenesis to resume (Fig. 6). As previously, rapamycin treatment of differentiating NSC cultures for 5 d abolished P-S6-RP immunoreactivity and inhibited immunoreactivity for β III-tubulin+ neurons and GFAP+ astrocytes (Fig. 6A). Following an additional 4–5 d of differentiation with rapamycin withdrawal, β III-tubulin+ neurons and GFAP+ astrocytes reappeared in the quiescent cultures, as shown by immunostaining and counts of β III-tubulin+ cells (Fig. 6A,B). We confirmed and extended the analysis of this recovery of differentiation in parallel biochemical experiments: rapamycin withdrawal was associated with recovery of phosphorylation of the mTORC1 downstream targets P-S6-RP^{Ser240/244}, P-4EBP1^{Thr37/46}, and P-Rictor^{Thr1135},

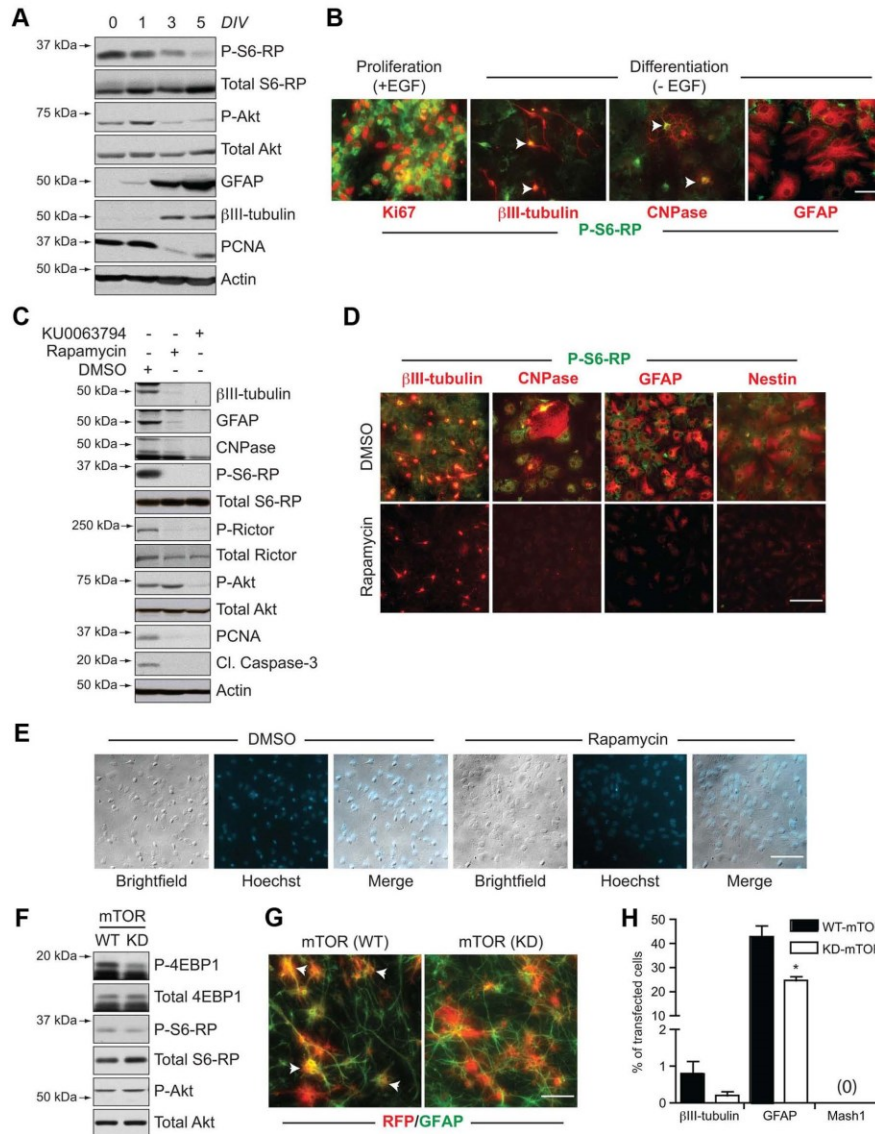


Figure 5. mTOR inhibition in the absence of EGF induces a quiescence-like phenotype in neurosphere cultures. **A, B.** Differentiation-induced changes in mTOR signaling. Western blot analysis of biochemical changes in adult neurosphere cultures differentiating from 0 to 5 d *in vitro* (DIV) (**A**), showing declining phosphorylation of S6-RP and Akt concomitant to generation of differentiated neurons (β III-tubulin) and astrocytes (GFAP). **B.** Immunocytochemistry showing the reduction in P-S6-RP immunoreactivity following EGF withdrawal-induced differentiation. Whereas high levels of P-S6-RP immunoreactivity are present during EGF-induced proliferation (left), strong P-S6-RP is maintained in only β III-tubulin+ neurons and CNPase+ oligodendrocytes during differentiation (arrows), while GFAP+ astrocytes are only weakly positive. **C, D.** mTOR inhibitors elicit a quiescence-like phenotype. **C.** Western blots showing biochemical changes in adult neurosphere cultures differentiated for 7 d in the presence of DMSO, rapamycin (20 nM), or KU0063794 (100 nM). Both mTOR inhibitors reduced expression of markers for proliferation (PCNA), differentiated neurons (β III-tubulin), astrocytes (GFAP), and oligodendrocytes (CNPase), and eliminated phosphorylation of the mTORC1 targets S6-RP and Rictor. Only KU0063794 also blocked mTORC2-associated phosphorylation at Akt^{Ser473}. **D.** Immunocytochemistry changes in neurosphere cultures differentiated with DMSO versus rapamycin for 7 d. Rapamycin treatment decreased expression of markers for differentiated neurons, oligodendrocytes, and astrocytes, as well as the expression of the neural precursor marker Nestin (representative results from 1 of 4 independent experiments). **E.** Brightfield and fluorescent images of DMSO and rapamycin-treated cultures from **D** showing the absence of obvious morphological or nuclear signs of cell death, consistent with the inhibitor-induced reduction in cleaved caspase-3 in **C, F, G.** *In vitro* transfections with WT or KD forms of mTOR. **F.** Western blotting of lysates from HEK293 cells transfected for 2 d with mTOR(WT) or mTOR(KD) plasmids. Phosphorylation of 4-EBP1 and S6-RP are decreased by mTOR(KD). **G.** Immunocytochemistry for red fluorescent protein (RFP) and GFAP+ astrocytes following transfection of dissociated neurospheres and 6 d of differentiation (arrows identify double-labeled cells). **H.** Quantification following immunocytochemical analysis of transfected cells. Cells transfected with mTOR(KD) differentiate into fewer neurons and astrocytes and do not upregulate Mash1. Graph shows the mean and SEM from $n = 4$ independent experiments (200–400 transfected cells analyzed per marker per experiment). * $p < 0.05$. Scale bars: **B, G**, 50 μ m; **D, E**, 25 μ m.

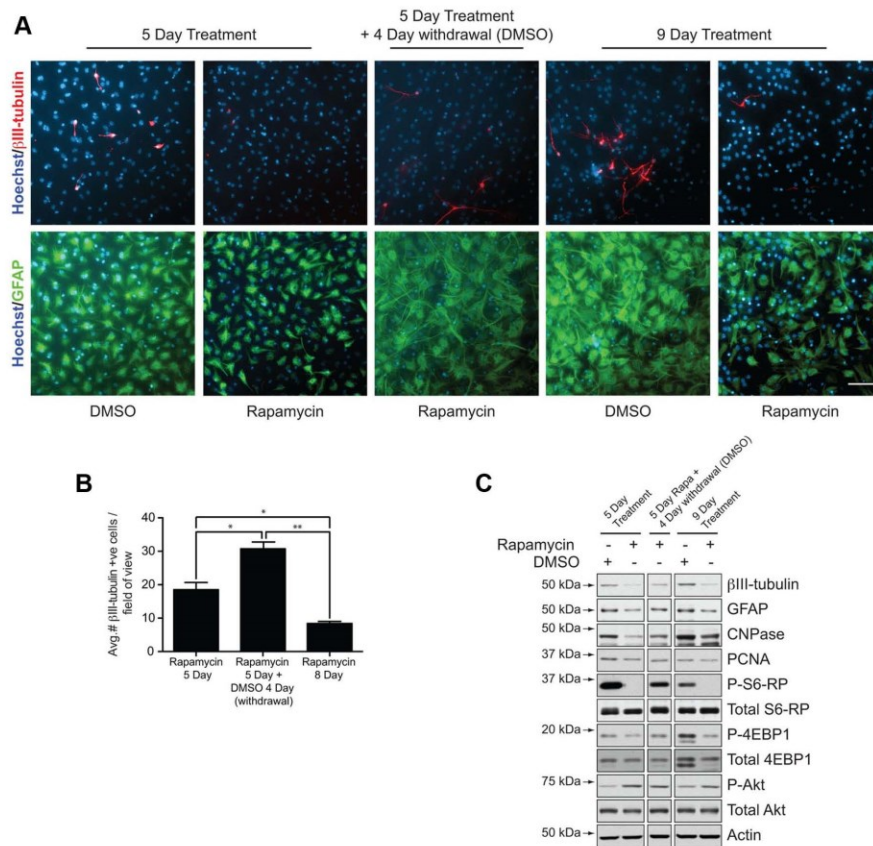


Figure 6. Rapamycin-induced quiescence of cultured neurosphere cells is reversible. Primary neurospheres were dissociated and plated in differentiation conditions for either (1) 5 d (supplemented with DMSO or rapamycin), (2) 9 d (5 d with rapamycin plus 4 d of rapamycin withdrawal), or (3) 9 d (DMSO or rapamycin for the entire period) as indicated. **A**, Immunocytochemistry for β III-tubulin + neurons and GFAP + astrocytes; note the reappearance of neurons and GFAP immunoreactivity following rapamycin withdrawal. **B**, Quantification shows that β III-tubulin + neuron number increases following rapamycin withdrawal. **C**, Western blotting of lysates from a parallel experiment; note the recovery in P-S6-RP and P-4EBP1 levels following rapamycin withdrawal and the associated increases in β III-tubulin, GFAP, and CNPase levels. Five micrograms of protein were loaded per lane, and all bands for each probe were obtained from the same blot. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Scale bar, 25 μ m.

and resulted in an increase in β III-tubulin, GFAP and CNPase levels (Fig. 6C).

Together, these findings demonstrate that, in the absence of exogenous EGF proliferative signals, inhibiting mTOR activity leads neural precursors to adopt a reversible, quiescence-like phenotype.

mTOR signaling and cell proliferation decline in parallel in the quiescent SVZ of the aging brain

The phenotypic similarity between the effects of mTOR suppression *in vitro* and aging-associated SVZ quiescence *in vivo* prompted us to investigate the fate of the mTOR+ TA progenitors in the aging brain. The NSC lineage in the adult SVZ becomes increasingly quiescent between early adulthood (2–3 months) and middle-age (10–12 months); over this period, the number of neurosphere-forming stem cells remains stable (Tropepe et al., 1997; Bouab et al., 2011), but the *in vivo* populations of TA progenitors and neuroblasts decline by 60–85% (Luo et al., 2006;

Bouab et al., 2011). We used immunofluorescence to identify P-S6-RP+ cells and Ki67+ cells in the SVZ of 2-, 12-, and 18-month-old mice (Fig. 7A). Quantifications revealed a coordinate decline in P-S6-RP+ cells, Ki67+ cells, and double-labeled cells (P-S6-RP+Ki67+) (Fig. 7B). Consistent with our earlier results in 2-month-old mice, the vast majority of P-S6-RP+ cells remained Ki67+ at all ages, and these P-S6-RP+Ki67+ cells always constituted $18.8 \pm 5.9\%$ of the entire Ki67+ cell population (Fig. 7C). Thus, there is a strong correlation between decreasing mTOR activity and declining cell proliferation within the aging SVZ.

Quiescent neural precursors in the aging SVZ are reactivated by EGF-induced mTOR stimulation

We next asked whether EGF administration could be used to reactivate proliferation in the aging SVZ niche, and whether EGF-induced mTOR activation (Fig. 4) would be involved and/or necessary in this process. Osmotic pumps were used for

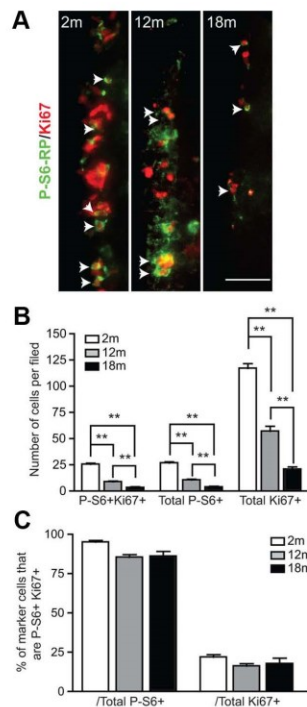


Figure 7. P-S6-RP immunoreactivity and cell proliferation decrease in parallel in the aging SVZ. **A**, Immunostaining for Ki67-positive proliferating cells and P-S6-RP-positive cells in the SVZ of 2-month-old (2m), 12-month-old (12m), and 18-month-old (18m) mice (arrows identify double-labeled cells). **B**, **C**, Quantifications of Ki67-positive and P-S6-RP-positive cells, expressed either as numbers of single or double-labeled cells per field (2 ventricles per mouse; $n = 3$ mice per age; **B**) or as percentage of the single-labeled populations that are double labeled (**C**). At all ages, the percentage of the P-S6-RP+ proliferating cells remains stable at ~16–22%. Graphs show the mean and SEM. ** $p < 0.01$. Scale bar, 25 μ m.

7 d ICV infusions of DMSO, EGF, or EGF plus rapamycin into the lateral ventricles of 10-month-old mice (Fig. 8). Compared to 2-month-old mice, 10-month-old mice receiving DMSO infusions possessed fewer P-S6-RP+, Ki67+ and Mash1+ cells (compare Figs. 3A–C, 8A–C). Aging neural precursors indeed remained responsive to EGF-induced mTOR activation, as EGF infusion stimulated the reappearance of P-S6-RP throughout the SVZ of 10-month-old mice (Fig. 8D). Remarkably, this was associated with a complete restoration of SVZ cell proliferation, as the numbers of both Ki67+ proliferating cells (Fig. 8E) and Mash1+ TA progenitors (Fig. 8F) were normalized to the levels found in 2-month-old mice (Fig. 8J,K). To assess the involvement of EGF-induced upregulation of mTOR signaling during this reactivation of the SVZ, we analyzed mice that received coinjection of rapamycin with EGF. Importantly, rapamycin coinjection completely eliminated the EGF-induced increases in P-S6-RP, Ki67+ cells and Mash1+ cells (Fig. 8G–K). Together, these *in vivo* experiments reveal that quiescent SVZ neural precursors in the aging brain can be reactivated by EGF in an mTOR-dependent manner, identifying mTOR signaling as a potential target for reversing aging-associated SVZ quiescence.

Discussion

The ability of neural stem cells to maintain a pool of proliferating TA progenitors is critical for efficiently controlling neural cell production in the adult brain. In this regard, our investigation of the mTOR signaling pathway allows us to draw three novel and important conclusions. First, mTORC1 signaling is specifically activated in the TA progenitor cells of the SVZ niche. This cell type specificity is unexpected given the wide array of cellular functions mTOR has been shown to regulate (Zoncu et al., 2011) and identifies the mTOR signaling pathway as a novel, stage-specific molecular target for modulating activity of the SVZ niche. Second, mTOR signaling is important for the proliferation of the TA progenitor pool in response to exogenous EGF or endogenous proliferative signals, acting as a critical mediator of proliferative expansion in the adult SVZ neurogenic niche. Third, our experiments demonstrate important links between down-regulation of mTOR signaling and quiescence of the SVZ during aging. These findings reveal the mTOR signaling pathway is a key regulator of neurogenesis in the adult and aging brain.

mTOR: a stage-specific signaling pathway in the forebrain NSC lineage

The complexity of intercellular regulation within the SVZ is highlighted by a growing list of secreted and membrane-bound extrinsic factors within this niche, including (but not limited to) the EGF, Notch, Ephrin, Sonic Hedgehog (SHH), BMP, platelet-derived growth factor, Wnt, and vascular endothelial growth factor systems (Ihrig and Alvarez-Buylla, 2011). For instance, BMP-induced Smad signaling can promote stem cell quiescence, but is also important for neurogenesis, depending on the cell type expression patterns of type I and type II BMP receptors (Lim et al., 2000; Colak et al., 2008; Mira et al., 2010). The Notch–Delta system regulates the activity of both astrocytic stem cells and ependymal niche cells (Carlén et al., 2009; Aguirre et al., 2010). Eph–Ephrin signaling influences multiple aspects of the SVZ niche, including the ability of ependymal niche cells to acquire stem cell properties (Conover et al., 2000; Nomura et al., 2010). These families activate diverse signaling events, generally across overlapping subpopulations of SVZ cell types, making it challenging to interpret, define, and ultimately manipulate cell type-specific signaling pathways to achieve specific biological outcomes.

In the present study, we found that mTOR-associated signaling pathways were specifically activated within the constitutively proliferating pool of TA progenitors in the SVZ niche. Less than 10% of SVZ cells exhibited P-S6-RP immunoreactivity, and the vast majority of these expressed Ki67 with Mash1 and/or Olig2, a marker profile characteristic of the TA progenitor population. P-S6-RP immunoreactivity was never observed in GFAP-expressing SVZ cells, including in GFAP+Ki67+ cells; this indicates that the mTORC1 branch of mTOR signaling is not activated within the quiescent or activated pools of neural stem cells, although it should be noted that mTOR may still have basal or mTORC2-mediated functions in these cells. Moreover, in the context of therapeutic approaches, it also should be recognized that prolonged activation of the TA progenitor population might conceivably lead to a secondary effect on the stem cell pool. Nevertheless, these findings identify mTOR signaling as a potential target pathway for specifically modulating the biologically crucial TA progenitor population of the SVZ niche. It will be of great interest to evaluate whether mTOR activity is also specifically enriched within the TA progenitor populations of other adult tissues as well.

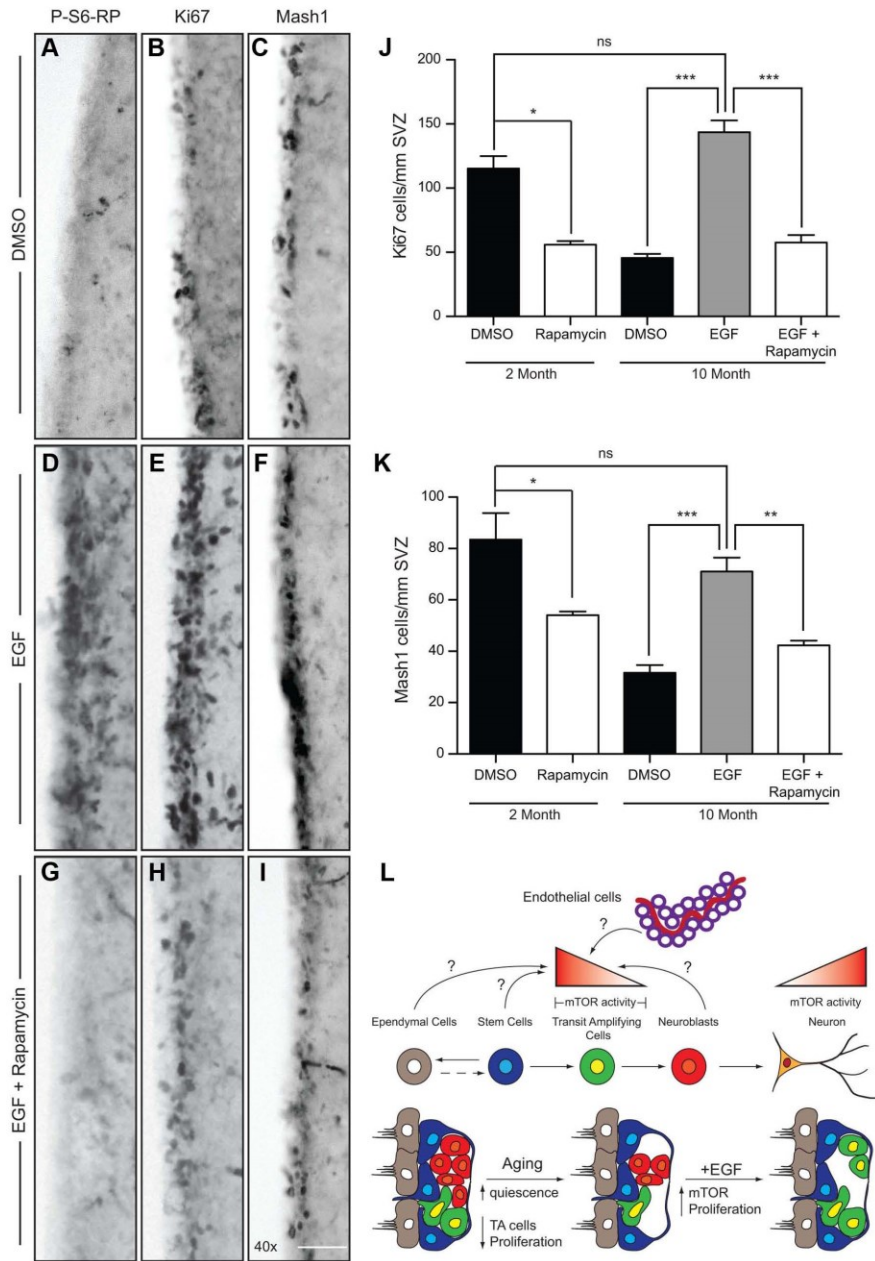


Figure 8. EGF infusion stimulates an mTOR-dependent reactivation of proliferation in the aging brain. *A–I*, Immunostaining of the SVZ on sections from 10-month-old mice that had received ICV infusions of DMSO (*A–C*), EGF (*D–F*), or EGF plus rapamycin (*G–I*) for 7 d. Shown is immunoreactivity for P-S6-RP (*A, D, G*), Ki67 + proliferating cells (*B, E, H*), and Mash1 + progenitors (*C, F, I*). Note that EGF treatment enhances the levels of all three markers in the aged brain, and these effects are blocked by rapamycin coinjection. *J, K*, Quantification of Ki67 + proliferating cells (*J*) or Mash1 + progenitors (*K*). For reference, the 2 month results quantified in Figure 3 are included to show the impact of aging on the Ki67 + and Mash1 + populations. Note that Ki67 + and Mash1 + cells in 10-month-old mice recovered to the levels found in 2-month-old mice as a result of EGF infusion, and that this effect was entirely blocked by rapamycin. Graphs show the mean and SEM of $n = 3$ mice per treatment group. *L*, mTOR activity is present within the TA population (defined as Ki67 + Mash1 + or Ki67 + Olig2 +) and modulates their proliferation, differentiation, and quiescence. Brain aging is associated with a decrease in mTOR activity and reduction in the size of the proliferating TA progenitor pool, while the size of the stem (Figure legend continues.)

mTOR: a key player in the dynamic regulation of the TA progenitor pool in the adult SVZ

Previous studies have implicated the mTOR signaling pathway in regulating the proliferation and/or self-renewal capacity of neural stem/progenitors in the rapidly developing embryonic and early postnatal brain (Sinor and Lillien, 2004; Sato et al., 2010; Magri et al., 2011; Raman et al., 2011). Our data indicate that mTOR signaling continues to play a role in neural precursors of the mature brain, where activation of mTOR signaling in TA progenitor cells is necessary for the maintenance and proliferation of the TA progenitor pool *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, while only ~20% of Ki67+ cells were found to be P-S6-RP+ at any given time in the SVZ, mTOR inhibition caused an ~50% decline in the Ki67+ cell population; this may indicate that P-S6-RP activation is dependent on cell cycle stage or, alternatively, that the P-S6-RP+ cells represent a subpopulation of more primitive TA progenitor cells.

A complex issue that will require further studies is the precise reasons for the reduction in mTOR activity with aging (Fig. 8L). While we focused on EGF-R signaling in our experiments, niche factors such as SHH, Wnts, and FGFs likewise exert proliferative effects within the SVZ, and potentially act through mTOR modulation as well. Besides the ligands themselves, age-related changes also may occur at the level of receptor expression, as the EGF-R is reportedly downregulated during aging (Enwere et al., 2004). Finally, there is an added layer of complexity arising from the previous demonstration that systemically derived circulating signals also contribute to aging-associated changes in neurogenesis (Villeda et al., 2011). On this complex backdrop, mTOR signaling potentially serves as a readout of proliferative stimuli and a target for intervention.

Clues to the regulation of mTOR activity in TA progenitors may be provided by the anatomical localization of TA progenitor cells within their niche. TA progenitor cells are found closely aligned along the SVZ plexus of blood vessels, directly contacting blood vessel endothelial cells at sites where the blood–brain barrier is absent (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). This localization of TA progenitors means they are ideally positioned to be regulated by blood vessel endothelial cells (Rosa et al., 2010; Galan-Moya et al., 2011) or by blood nutrient status (Zoncu et al., 2011). Thus, mTOR signaling in TA progenitors represents a tantalizing potential node of signaling integration between cell surface growth factor receptors, such as EGF-R, and nutrient regulation of stem/progenitor activity.

mTOR, aging, and reactivation of the quiescent SVZ niche

The present study identifies a new and fundamental role for mTOR signaling in the regulation of TA progenitor quiescence. mTOR inhibition yielded a quiescence-like phenotype *in vitro*, while EGF-induced upregulation of mTOR activity enabled the reactivation of the quiescent SVZ niche within the aging brain. EGF infusion had remarkable effects on the aged SVZ niche, restoring levels of P-S6-RP+ cells, proliferating cells, and Mash1+ TA progenitor cells to the levels found in the young

adult. Interestingly, previous studies have shown that EGF-induced proliferation, at least in the young adult SVZ, eventually leads to a major expansion of the oligodendrocyte lineage (Gonzalez-Perez et al., 2009; Gonzalez-Perez and Alvarez-Buylla, 2011). Furthermore, the mTOR signaling pathway has been implicated in both oligodendrocyte differentiation and later stages of myelination (Tyler et al., 2009; Zou et al., 2011; Guardiola-Diaz et al., 2012). Thus, whether mTOR signaling affects expansion of the TA progenitor population in a generalized or more lineage-specific fashion remains to be established.

Importantly, the involvement of mTOR signaling in EGF-induced reactivation of the quiescent SVZ leads to the hypothesis that aging-induced quiescence of the NSC lineage may be largely due to regulatory changes occurring at the level of the TA progenitors rather than the stem cell population. In line with this idea, the aging SVZ undergoes a reduction in TA progenitor cells but not astrocyte-like stem cells (Luo et al., 2006). Moreover, we have shown previously that equal numbers of cells having stem cell potential can be isolated from the SVZ between early and mid-adulthood, despite the fact that proliferation and the TA progenitor pool is reduced by >50% (Bouab et al., 2011). Our findings suggest that specifically targeting the TA progenitor pool may be an effective approach for reversing quiescence in the SVZ; it will therefore be essential to evaluate how the regulatory mechanisms specifically controlling mTOR activity and TA progenitor proliferation are altered during the aging process.

Interestingly, it has been well established that mTOR is a powerful regulator of an organism's longevity across a variety of invertebrate and vertebrate model systems. In mice, significant lifespan extensions are produced by chronic mTOR suppression with rapamycin, by knock-out of the mTORC1 effector S6 kinase, or by nutrient deprivation (Harrison et al., 2009; Selman et al., 2009; Kapahi et al., 2010; Kenyon, 2010; Zoncu et al., 2011). Given the central role of adult tissue stem cells in tissue maintenance and repair, the fact that mTOR inhibition induces a quiescence-like phenotype in neural precursors and promotes lifespan extension seems somewhat counterintuitive. This may be due to differences between ICV treatment with rapamycin and the systemic approaches used in lifespan studies, or might suggest that the longevity-promoting effects are primarily mediated through effects on differentiated cell types and/or suppression of the immune system. Alternatively, if SVZ stem cells have a finite lifetime or are capable of only a limited number of divisions as suggested previously in the hippocampus (Encinas et al., 2011), mTOR inhibition could conceivably contribute to long-term tissue maintenance by enabling neural precursors to persist further into old age. Such questions are of prime interest, considering the hopes for NSC-based regenerative therapies, and await further analysis.

References

- Aguirre A, Rubio ME, Gallo V (2010) Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature* 467:323–327. CrossRef Medline
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963–970. CrossRef Medline
- Barnabé-Heider F, Miller FD (2003) Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci* 23:5149–5160. Medline
- Bouab M, Paliouras GN, Aumont A, Forest-Bérard K, Fernandes KJ (2011) Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* 173:135–149. CrossRef Medline
- Carlén M, Meletis K, Görz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola

←

(Figure legend continued.) cell population remains stable. Growth factors such as EGF can reactivate proliferative expansion of the TA progenitor population in the aging SVZ, and stimulation of mTOR activity is essential for this effect. The endogenous signals that stimulate mTOR activity in the young adult brain and that decrease in the aging brain are currently unknown, and might normally originate from the neural precursors themselves (i.e., stem cells, progenitors, or neuroblasts) or from supportive niche cells such as ependymal or blood vessel endothelial cells. ns, Not significant. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. Scale bar: (in G) A–I, 50 μm .

- M, Barnabé-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisén J (2009) Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* 12:259–267. [CrossRef Medline](#)
- Chojnacki AK, Mak GK, Weiss S (2009) Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat Rev Neurosci* 10:153–163. [CrossRef Medline](#)
- Colak D, Mori T, Brill MS, Pfeifer A, Falk S, Deng C, Monteiro R, Mummery C, Sommer L, Götz M (2008) Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J Neurosci* 28:434–446. [CrossRef Medline](#)
- Coles Takabe BL, Brain I, Purpura KA, Karpowicz P, Zandstra PW, Morshead CM, van der Kooy D (2008) Don't look: growing clonal versus nonclonal neural stem cell colonies. *Stem Cells* 26:2938–2944. [CrossRef Medline](#)
- Conover JC, Doetsch F, García-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A (2000) Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 3:1091–1097. [CrossRef Medline](#)
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046–5061. [Medline](#)
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11619–11624. [CrossRef Medline](#)
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021–1034. [CrossRef Medline](#)
- Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G (2011) Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 8:566–579. [CrossRef Medline](#)
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004) Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24:8354–8365. [CrossRef Medline](#)
- Galan-Moya EM, Le Guelle A, Lima Fernandes E, Thirant C, Dwyer J, Bidere N, Couraud PO, Scott MG, Junier MP, Chneiweiss H, Gavad J (2011) Secreted factors from brain endothelial cells maintain glioblastoma stem-like cell expansion through the mTOR pathway. *EMBO Rep* 12:470–476. [CrossRef Medline](#)
- García-Martínez JM, Moran J, Clarke RG, Gray A, Cosulich SC, Chresta CM, Alessi DR (2009) Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J* 421:29–42. [CrossRef Medline](#)
- Gonzalez-Perez O, Alvarez-Buylla A (2011) Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev* 67:147–156. [CrossRef Medline](#)
- Gonzalez-Perez O, Romero-Rodriguez R, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2009) Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells* 27:2032–2043. [CrossRef Medline](#)
- Guardiola-Díaz HM, Ishii A, Bansal R (2012) Erk1/2 MAPK and mTOR signaling sequentially regulates progression through distinct stages of oligodendrocyte differentiation. *Glia* 60:476–486. [CrossRef Medline](#)
- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460:392–395. [CrossRef Medline](#)
- Ihrig RA, Alvarez-Buylla A (2011) Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron* 70:674–686. [CrossRef Medline](#)
- Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP (2010) mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol* 30:908–921. [CrossRef Medline](#)
- Kapahi P, Chen D, Rogers AN, Katewa SD, Li PW, Thomas EL, Kockel L (2010) With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab* 11:453–465. [CrossRef Medline](#)
- Kenyon CJ (2010) The genetics of ageing. *Nature* 464:504–512. [CrossRef Medline](#)
- Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G (2010) Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 5:e8809. [CrossRef Medline](#)
- Kolb B, Morshead C, Gonzalez C, Kim M, Gregg C, Shingo T, Weiss S (2007) Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:983–997. [Medline](#)
- Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, Davis JG, Salmon AB, Richardson A, Ahima RS, Guertin DA, Sabatini DM, Baur JA (2012) Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* 335:1638–1643. [CrossRef Medline](#)
- Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274–293. [CrossRef Medline](#)
- Li L, Clevers H (2010) Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 327:542–545. [CrossRef Medline](#)
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713–726. [CrossRef Medline](#)
- Luo J, Daniels SB, Lennington JB, Notti RQ, Conover JC (2006) The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* 5:139–152. [CrossRef Medline](#)
- Magri L, Cambiaghi M, Cominelli M, Alfaro-Cervello C, Corsi M, Pala M, Bulfone A, García-Verdugo JM, Leocani L, Minicucci F, Poliani PL, Galli R (2011) Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions. *Cell Stem Cell* 9:447–462. [CrossRef Medline](#)
- Malagu K, Duggan H, Mener K, Hummersone M, Gomez S, Bailey C, Edwards P, Drzewiecki J, Leroux F, Quesada MJ, Hermann G, Maine S, Molyneux CA, Le Gall A, Pullen J, Hickson I, Smith L, Maguire S, Martin N, Smith G, et al. (2009) The discovery and optimisation of pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4-diamines as potent and selective inhibitors of mTOR kinase. *Bioorg Med Chem Lett* 19:5950–5953. [CrossRef Medline](#)
- Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC (2004) Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci* 24:1726–1733. [CrossRef Medline](#)
- Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortigüela R, Marqués-Torrejón MA, Nakashima K, Colak D, Götz M, Fariñas I, Gage FH (2010) Signaling through BMP-1A regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7:78–89. [CrossRef Medline](#)
- Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Morrison SJ (2006) Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 443:448–452. [CrossRef Medline](#)
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morastutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071–1082. [CrossRef Medline](#)
- Nakada D, Levi BP, Morrison SJ (2011) Integrating physiological regulation with stem cell and tissue homeostasis. *Neuron* 70:703–718. [CrossRef Medline](#)
- Nomura T, Göritz C, Catchpole T, Henkemeyer M, Frisen J (2010) EphB signaling controls lineage plasticity of adult neural stem cell niche cells. *Cell Stem Cell* 7:730–743. [CrossRef Medline](#)
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132:335–344. [CrossRef Medline](#)
- Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F (2009) Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6387–6392. [Medline](#)
- Raman L, Kong X, Gilley JA, Kernie SG (2011) Chronic hypoxia impairs murine hippocampal development and depletes the postnatal progenitor pool by attenuating mammalian target of rapamycin signaling. *Pediatr Res* 70:159–165. [CrossRef Medline](#)
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707–1710. [CrossRef Medline](#)
- Rosa AI, Goncalves J, Cortes L, Bernardino L, Malva JO, Agasse F (2010) The angiogenic factor angiopoietin-1 is a proneurogenic peptide on subventricular zone stem/progenitor cells. *J Neurosci* 30:4573–4584. [CrossRef Medline](#)
- Sarbasov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation

- and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098–1101. CrossRef Medline
- Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Tachibana K, Sakurada K, Tomiyama A, Kayama T, Kitanaka C (2010) Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR. *Neurosci Lett* 470:115–120. CrossRef Medline
- Selman C, Tullet JM, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI, Claret M, Al-Qassab H, Carmignac D, Ramadani F, Woods A, Robinson IC, Schuster E, Batterham RL, Kozma SC, Thomas G, Carling D, Okkenhaug K, Thornton JM, Partridge L, et al. (2009) Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science* 326:140–144. CrossRef Medline
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3:289–300. CrossRef Medline
- Sinor AD, Lillien L (2004) Akt-1 expression level regulates CNS precursors. *J Neurosci* 24:8531–8541. CrossRef Medline
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3:279–288. CrossRef Medline
- Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O (2007) Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38:3032–3039. CrossRef Medline
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D (1997) Transforming growth factor- α null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 17:7850–7859. Medline
- Tyler WA, Gangoli N, Gokina P, Kim HA, Covey M, Levison SW, Wood TL (2009) Activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) is essential for oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* 29:6367–6378. CrossRef Medline
- Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Després S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, et al. (2011) The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477:90–94. CrossRef Medline
- Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ, Yee KW, Munsell MF, Ellen Jackson C, Giles FJ, Sabatini DM, Andreeff M, Konopleva M (2007) Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* 109:3509–3512. CrossRef Medline
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:21–35. CrossRef Medline
- Zou J, Zhou L, Du XX, Ji Y, Xu J, Tian J, Jiang W, Zou Y, Yu S, Gan L, Luo M, Yang Q, Cui Y, Yang W, Xia X, Chen M, Zhao X, Shen Y, Chen PY, Worley PF, Xiao B (2011) Rheb1 is required for mTORC1 and myelination in postnatal brain development. *Dev Cell* 20:97–108. CrossRef Medline

B. Annexe B

**Review: Aging and neurogenesis in the adult forebrain:
what we have learned and where we should go from here**

Aging and neurogenesis in the adult forebrain: what we have learned and where we should go from here

Laura K. Hamilton, Sandra E. Joppé, Loïc M. Cochard and Karl J. L. Fernandes

Department of Pathology and Cell Biology, Groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC), Centre of Excellence in Neuroscience of the Université de Montréal (CENUM), Université de Montréal, Montréal, Canada

Keywords: Alzheimer's disease, neural stem cells, neurospheres, quiescence, rodent, senescence

Abstract

In the brains of adult vertebrates, including humans, neurogenesis occurs in restricted niches where it maintains cellular turnover and cognitive plasticity. In virtually all species, however, aging is associated with a significant decline in adult neurogenesis. Moreover, an acceleration of neurogenic defects is observed in models of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases, suggesting an involvement in aging- and disease-associated cognitive deficits. To gain insights into when, how and why adult neurogenesis decreases in the aging brain, we critically reviewed the scientific literature on aging of the rodent subventricular zone, the neurogenic niche of the adult forebrain. Our analysis revealed that deficits in the neurogenic pathway are largely established by middle age, but that there remains striking ambiguity in the underlying mechanisms, especially at the level of stem and progenitor cells. We identify and discuss several challenging issues that have contributed to these key gaps in our current knowledge. In the future, addressing these issues should help untangle the interactions between neurogenesis, aging and aging-associated diseases.

Introduction

Aging is associated with a generalized reduction in the ability of adult tissues to maintain and repair themselves. At the cellular level, this decline in homeostatic and regenerative capacity can be attributed to both time-dependent ('chronological aging') and division-dependent ('replicative aging') mechanisms (Rando, 2006; Liu & Rando, 2011). Adult stem cells are unique in that they need to resist both chronological and long-term replicative aging processes. In the adult brain, the subventricular zone (SVZ) of the forebrain lateral ventricles represents the principal reservoir of neural stem cells (NSCs). NSCs of the SVZ continue to generate new neurons and glial cells during adulthood, contributing to the ongoing turnover of olfactory bulb interneurons and forebrain glial cell populations (Menn *et al.*, 2006; Lledo *et al.*, 2008; Imayoshi *et al.*, 2010). In response to brain injury, migrating NSC-derived progeny are also re-routed to areas of degeneration, where they can serve as a target for therapeutic manipulations (Kolb *et al.*, 2007; de Chevigny *et al.*, 2008; Erlandsson *et al.*, 2011). However, NSC-derived neurogenesis undergoes a marked decline over the course of aging, resulting in reduced tissue function; in rodents, for instance, olfactory bulb neuronal replacement is an early target of aging, affecting olfactory recognition, discrimination and identification tasks (Enwere *et al.*, 2004; Rey *et al.*, 2012). Furthermore, certain neurodegenerative conditions such as Alzheimer's and Parkinson's disease also show defective SVZ neurogenesis and an acceleration of aging-associated

olfactory deficits, suggesting that declining neurogenesis may ultimately contribute to age-related cognitive diseases (Mesholam *et al.*, 1998; Winner *et al.*, 2011). To increase the ability of NSCs to maintain and repair the aging brain, it is essential to achieve a clearer understanding of when, how and why the aging process intersects with the regulation of adult neurogenesis.

Development and aging of the neurogenic lineage

Prior to adopting their mature adult phenotype, NSCs evolve through several distinct developmental stages during which they possess different properties and perform different biological functions (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001) (see Fig. 1).

During embryonic development of the central nervous system (CNS), the main biological function of the early precursors of NSCs is tissue growth. In their first phase, the precursors of NSCs correspond to primitive neuroepithelial cells (NEPs). NEPs span the one-cell-layer thick neural tube, contacting both the inner ventricular surface and the outer pial surface, and they divide symmetrically to rapidly expand their population. The onset of asymmetric cell divisions initiates a second phase, when the accumulation of differentiated progeny and consequent thickening of the neural tube cause NEPs to transition into radial glial cells (RGCs). Once thought to mainly serve a scaffolding function, it is now recognized that RGCs generate the neurons, oligodendrocytes and astrocytes of the developing CNS, either directly or indirectly via intermediate progenitor cells (IPCs) (Noctor *et al.*, 2004; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Hansen *et al.*, 2010). In the final stages of development, a subpopulation of RGCs begins assembling the SVZ niche that will

Correspondence: Dr K. Fernandes, as above.
E-mail: karl.jl.fernandes@umontreal.ca

Received 14 December 2012, revised 20 February 2013, accepted 28 February 2013

© 2013 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd

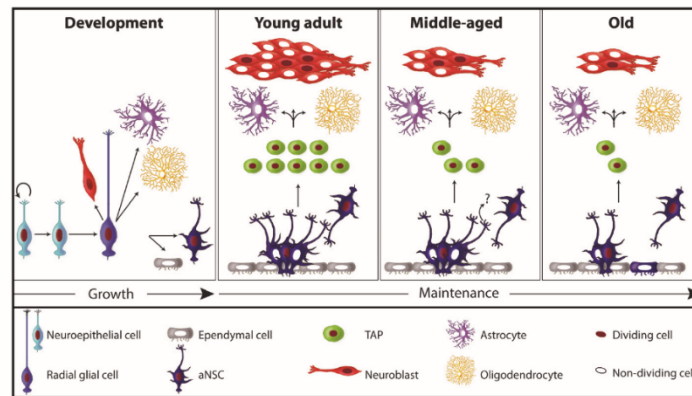


FIG. 1. Changes in neural stem cells and neurogenesis during development and aging. Prior to adulthood and during the developmental period of central nervous system (CNS) growth, adult neural stem cells (aNSCs) pass through three morphologically and functionally distinct phases. Initially, neuroepithelial stem cells are dividing symmetrically to expand their numbers. When neuroepithelial cells begin dividing asymmetrically to generate neurons and glial cells, they transition into radial glial cells. As formation of the main populations of differentiated neural cell types nears completion, forebrain radial glial cells retract their peripheral radial process and differentiate into either ventricle-contacting subventricular zone (SVZ) astrocytes or ventricle-lining ependymal cells, setting up the SVZ niche. SVZ astrocytes are aNSCs of the postnatal and adult forebrain. During adulthood, aNSC function shifts to forebrain maintenance; aNSCs primarily divide asymmetrically, maintaining the size of the stem cell pool while generating new neuroblasts and glioblasts. As adulthood continues into Middle-age and Old age, neurogenic output decreases dramatically. Visible changes include alterations within the aNSC pool (comprising fewer ventricle-contacting SVZ astrocytes and some conversion of astrocytes into ependymal cells), a reduction of total numbers of transiently amplifying progenitors (TAPs), neuroblasts, and proliferating cells (including aNSCs, TAPs, and some neuroblasts). The question mark reflects that it is unknown whether ventricle-contacting astrocytes disappear or simply withdraw their ventricle contacting process.

maintain NSCs during adulthood. They do so by retracting their apical processes while maintaining ventricular contact at their basal surface, subsequently converting into either ventricle-lining ependymal cells or ventricle-contacting SVZ astrocytes (Merkle *et al.*, 2004; Spassky *et al.*, 2005).

The biological function of NSCs undergoes a major change when they begin shifting into a mode dedicated to tissue maintenance. This maintenance phase begins in the postnatal period and continues throughout adulthood. In the forebrain, SVZ astrocytes continue functioning as postnatal and adult NSCs (aNSCs) (Doetsch *et al.*, 1999; Imura *et al.*, 2003; Morshead *et al.*, 2003). These aNSCs are highly quiescent, dividing only once every 2–3 weeks (Morshead *et al.*, 1994) to generate highly proliferative, transiently amplifying progenitors (TAPs) that give rise to migratory, fate-committed neuroblasts and glioblasts (Suzuki & Goldman, 2003). Neuroblasts born in the SVZ migrate along the rostral migratory stream and differentiate into olfactory bulb interneurons (Lois & Alvarez-Buylla, 1994) that are critical for odour recognition (Breton-Provencher *et al.*, 2009; Mouret *et al.*, 2009) and short-term olfactory memory (Breton-Provencher *et al.*, 2009). Forebrain ependymal cells rarely divide, but remain capable of neurogenesis under pathological conditions (Carlen *et al.*, 2009).

aNSCs are ideally positioned within the niche to be dynamically regulated by environmental signals. Their basal processes contact the lateral ventricle at the center of spirals of ependymal cells termed pinwheels (Mirzadeh *et al.*, 2008; Nam & Benezra, 2009), while their apical processes contact SVZ blood vessels (Shen *et al.*, 2008; Tavaoie *et al.*, 2008). Combinatorial extrinsic signals arising from adjacent aNSCs, TAPs, neuroblasts, ependymal cells, extracellular matrix molecules, the cerebrospinal fluid (CSF) and the vasculature interact with cell-intrinsic mechanisms to control proliferation, self-renewal capacity, fate determination, migration, differentiation and survival (Fuchs *et al.*, 2004; Morrison & Spradling, 2008; Suh

et al., 2009; Walker *et al.*, 2009). Under basal conditions, aNSCs mainly divide asymmetrically, allowing them to maintain the stem cell pool while also generating rapidly dividing TAPs (Morshead *et al.*, 1998). Moreover, aNSCs also retain the ability to return to a symmetric mode of division to expand stem cell numbers after injury (Parent *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2004; Lugert *et al.*, 2010). In spite of having this ability, adult neurogenesis still declines during aging (Fig. 1). A significant number of studies have investigated this decline—so what have we learned about the underlying mechanisms of SVZ aging?

Aging and SVZ neurogenesis: what do we really know?

We surveyed the scientific literature for published peer-reviewed studies on the topic of age-related impairments in forebrain neurogenesis, and found 20 articles that have investigated this issue using rodent models. Comparison of the assumptions, experimental designs, methods, primary data, interpretations and conclusions revealed considerable heterogeneity and inconsistencies across these parameters. To begin developing a clearer picture, we therefore divided adulthood into three age ranges, identified here as *Young adult* (2–6 months of age), *Middle-aged* (6–14 months), and *Old* (greater than 14 months) (see Fig. 2). According to these criteria, we found that of the 20 studies examining age-related changes in SVZ neurogenesis, 15/20 compared Young adult with Old stages (Kuhn *et al.*, 1996; Tropepe *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 2003; Enwere *et al.*, 2004; Maslov *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006; Belluardo *et al.*, 2008; Ahlenius *et al.*, 2009; Acosta *et al.*, 2010; Frinchi *et al.*, 2010; Stoll *et al.*, 2011a,b; McGinn *et al.*, 2012; Shook *et al.*, 2012), 8/20 made Young adult to Middle-age comparisons (Kippin *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2007; Medrano *et al.*, 2009; Bouab *et al.*, 2011; Shook *et al.*, 2012), and 3/20 compared

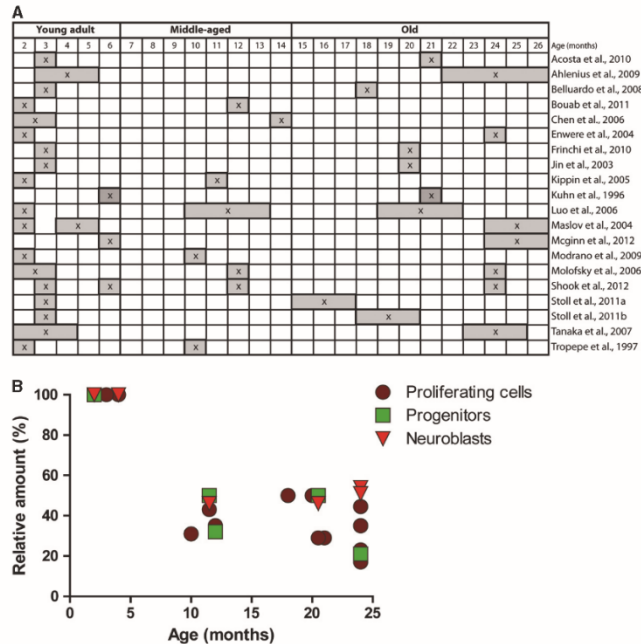


FIG. 2. Survey of published studies on aging-associated changes in neurogenesis in the rodent SVZ. (A) Table summarizing the 20 articles that have studied SVZ neurogenesis in adult to aged rodents. Rodent ages are divided into Young adult (2–6 months), Middle-aged (7–14 months) and Old (15 months and greater) age groups. There were 15/20 studies that examined Young adult to Old time-points, 8/20 that examined Young adult to Middle-aged time-points, and only three studies compared all three age groups. (B) Graph of the data compiled from the studies listed in A, plotted as the amount relative to the young adult age group. Categories of data are Proliferating cells (PH3⁺, BrdU⁺ or Ki67⁺), transiently amplifying progenitors (TAPs) (Mash1⁺) and Neuroblasts (DCX⁺ or PSA-NCAM⁺). Note that for all of these stages of the neurogenic pathway, the main decrease occurs by Middle-age and is only slightly worsened by Old age.

Young adult, Middle-aged and Old stages in parallel (Luo *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006; Shook *et al.*, 2012). Analysing the data in this manner allowed us to draw three main conclusions.

Forebrain neurogenesis is drastically reduced in the brains of Old rodents

Compared with Young adults, Old rodents exhibit a marked decrease in virtually all stages of SVZ neurogenesis. Cell proliferation is reduced by 50–80% as measured by acute incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) or staining for phospho-histone-3 (PH3) or Ki67 (Tropepe *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 2003; Enwere *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2006; Ahlenius *et al.*, 2009; Acosta *et al.*, 2010). This results in a 40–80% reduction in neuroblasts labeled with PSA-NCAM (Enwere *et al.*, 2004), doublecortin (DCX) (Ahlenius *et al.*, 2009) or BrdU⁺Tbr2 (Stoll *et al.*, 2011b), and a downstream 50–80% decrease in BrdU⁺ cells within the rostral migratory stream and olfactory bulbs (Enwere *et al.*, 2004). Collectively, the entire SVZ-olfactory bulb neurogenesis pathway is found to be decreased by at least 50%.

At the level of the aNSCs and TAPs themselves, alterations that have been reported include (i) a 50% reduction in expression of Nestin (expressed by both aNSCs and TAPs) (Ahlenius *et al.*, 2009); (ii) a 45% reduction in long-term BrdU-retaining cells (Shook *et al.*, 2012) (a measure of the number of surviving aNSCs

that divided within the time frame of BrdU treatment); (iii) a 78% decrease in pinwheels along the surface of the lateral ventricles (Shook *et al.*, 2012) and (iv) a 86% decrease in the number of ventricle-contacting SVZ astrocytes (Shook *et al.*, 2012). Results of the widely used colony-forming neurosphere assay (used as a measure of cells having stem cell potential) were inconclusive, as one study found no change (Tropepe *et al.*, 1997) and three studies reported 22–77% decreases (Enwere *et al.*, 2004; Maslov *et al.*, 2004; Ahlenius *et al.*, 2009). Cell cycle alterations in the aging SVZ are complex and remain only partially understood. Shook *et al.* (2012) identified a decrease in the total number of ventricle-contacting GFAP⁺ aNSCs, but no change in the number that are proliferating. TAPs exhibit a decreased cell cycle length *in vivo* (as measured by BrdU²H-thymidine double-labelling) (Tropepe *et al.*, 1997) but an increased propensity to divide *in vitro* (CldU/IdU incorporation experiments) (Stoll *et al.*, 2011b); this suggests that TAPs either become increasingly resistant to proliferative signals *in vivo* or that the surrounding niche becomes less supportive.

The steepest decline in neurogenesis occurs between Young adult and Middle-age

Interestingly, the major neurogenic defects observed in Old rodents were found to have already taken place by middle-age. For example, there is good consensus that SVZ cell proliferation is decreased by

50–70% (Ki67, BrdU) at 10–14 months of age (Luo *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2007; Beluardo *et al.*, 2008; Bouab *et al.*, 2011), resulting in a downstream 76% decrease in BrdU+ neurons that are contributed to the olfactory bulbs (Bouab *et al.*, 2011), and both these results match findings obtained using Old mice (above).

At the level of aNSCs and TAPs, (i) immuno-labelling and electron microscopy studies indicate a 65–75% reduction in TAPs (Luo *et al.*, 2006; Bouab *et al.*, 2011); (ii) the number of label-retaining slowly dividing cells decreases by about 67% (Bouab *et al.*, 2011); (iii) the number of pinwheels decreases by about 68% (Shook *et al.*, 2012) and (iv) the number of ventricle-contacting astrocytes (GFAP/gamma-tubulin-expressing cells) decreases by 73% (Shook *et al.*, 2012). In the case of the neurosphere assay, the data generally indicate that there is no major difference in numbers of neurosphere-forming cells. However, as discussed further in the following section, experimental differences such as neurosphere assay parameters and mouse strains that were used preclude reliable comparison of data across these studies (Tropepe *et al.*, 1997; Kippin *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Medrano *et al.*, 2009; Bouab *et al.*, 2011).

Collectively, comparison of the Middle-age and Old data reveals that all the neurogenesis parameters tested remained relatively stable after Middle-age in rodents. This is illustrated in Fig. 2B, which shows a compilation of the age-related differences in numbers of proliferating cells, TAPs and neuroblasts described above.

We still do not know what is occurring at the aNSC and TAP stages

Despite the compelling data showing that adult forebrain neurogenesis is highly diminished between Young adult and Middle-age time-points (above), the causes, mechanisms and exact nature of the changes occurring at the levels of the aNSC and TAP populations remain strikingly nebulous. For example: Are aNSCs decreased in number or is their activity compromised? Are TAPs not produced or are they generated but fail to amplify in number? Are changes in the aNSC and/or TAP populations caused by cell-autonomous mechanisms or are they the result of aging of the local and systemic environments? There are numerous reasons for the continued uncertainty surrounding such key questions, as discussed further in the following section.

Why haven't we learned more about the causes of neurogenic impairments during aging?

Our review of the literature revealed at least two recurrent and problematic issues in the field of aging and neurogenesis. These issues have made it impossible to extract a more complete picture of the cellular events taking place in the aging SVZ (and particularly at the level of the aNSCs and TAPs) using the currently published data.

Problem 1: the assumption that aging = old

The first obvious problem stems from the fact that aging is a vaguely defined process for which there are few known measurable features, leading to a wide disparity in study conditions. This can be contrasted with disorders such as Alzheimer's disease, which is defined by specific pathological hallmarks, spatial and temporal patterns of progression, and functional criteria, facilitating consensus on key study parameters. To study aging in a rigorous scientific manner, it is therefore essential to define its biological features more clearly.

A principal biological feature of aging is a reduction in the ability of adult tissues to maintain and repair themselves. When does this reduced capacity for adult tissue homeostasis begin? On the one

hand, some aspects of the aging process may start the moment our first cell is born. However, considering the overwhelming importance of proper embryonic development for organismal survival, it is likely that strong evolutionary pressure ensures homeostatic integrity during the critical development period. Moreover, it would be challenging to distinguish deleterious aging-associated events from the rapid and profound cellular changes that normally occur during development (i.e. Fig. 1). To establish a more practical framework for studying the aging process, it is therefore useful to define it as a process that (i) begins once a cell has completed its rapid developmental changes and first reaches the stable phenotype that it will maintain throughout adulthood; (ii) occurs at a rate related to chronological age but is also regulated by factors such as epigenetics and cell-cell interactions and (iii) continues progressing until death. Three informative predictions emerge when these criteria are applied to the study of adult neurogenesis.

(i) Aging of aNSCs may begin very early

As illustrated in Fig. 1, adult neurogenesis is compromised long before reaching an Old age. Interestingly, cognitive decline in humans may also begin as early as the 20s (Salthouse, 2009). If a biological 'clock' controls aNSC replicative aging and the onset of the decline in neurogenesis, it is likely that we would be able to detect it even as soon as the early postnatal period, when aNSCs have transitioned through their developmental neuroepithelial and radial glial stages and have begun adopting their quiescent adult phenotype, i.e. when their biological function shifts from tissue *growth* to tissue *maintenance* (Fig. 1).

(ii) Aging may occur at different rates across tissues and cell types

There are large variations in both the basal rates of cell production and the lifespan of differentiated cells across different tissues, particularly between high turnover tissues such as the epidermis, intestinal epithelium and hematopoietic system, and low turnover tissues such as the brain and spinal cord. To avoid being misled, aging-related studies should be designed using tissue-specific criteria.

(iii) Focusing on Old time-points could be deceptive

As aging is a progressive process, the most logical approach to analysing it would be to study multiple time-points that are prior to or within the actual period of neurogenic decline. The tendency to study Old time-points has allowed us to identify the *consequences* of the aging process; however, focusing on the remnants of neurogenesis that are left after decline has already occurred does not provide insight into the *causes* of the process, and could incorporate additional sources of variability, such as aging-related diseases and 'survivor bias'.

As seen in the previous section, it is clear that aging does *not* equal Old in terms of adult neurogenesis. If we are to successfully identify the mechanisms that are responsible for the age-related decline in neurogenesis, it will be essential to define the cellular and molecular events that are occurring prior to the appearance of age-related declines in neurogenesis.

Problem 2: the blurred line between NSCs and progenitors

Accurate interpretation of many of the studies cited here required careful re-evaluation of the primary data, due to an unfortunate

tendency in the literature to interchangeably use such terms as stem cells, progenitor cells, stem-progenitors and precursors (Seaberg & van der Kooy, 2003). This problem originates largely from the current inability to accurately identify aNSCs and to precisely delineate between the early aNSC and TAP stages of neurogenesis.

aNSCs *in vivo* are rare in the adult, and spend most of their time in quiescence, rendering them a challenge to detect and study even in young adults. aNSCs are found within the GFAP-expressing astrocyte population (Doetsch *et al.*, 1999; Imura *et al.*, 2003; Morshead *et al.*, 2003) and TAPs express Dlx2, Mash1 and/or Olig2 (Doetsch *et al.*, 2002; Aguirre & Gallo, 2004; Parras *et al.*, 2004; Menn *et al.*, 2006); however, these markers are not *specific*, and there is a lack of widely accepted markers that can enable discrimination of the early lineage stages. Division-based labeling approaches, such as cell cycle-based markers and long-term label retention approaches, will be inherently imprecise in the context of aging as there are changes in cell cycle lengths or the frequency of exit from quiescence. Furthermore, changes in S-phase nucleotide incorporation are a reflection of changes in proliferative activity rather than cell numbers. Even changes in the number of morphologically defined cell types (such as ventricle-contacting GFAP⁺ astrocytes, putative aNSCs) are complicated by the caveat that the cells may remain present and retain aNSC function or capability, but have simply retracted their ventricle-contacting process.

Evidence for aNSCs initially came from *in vitro* studies showing that isolated cells from the adult CNS can respond to growth factors to generate neurospheres, which can then be induced to differentiate into neuronal and glial lineages upon growth factor withdrawal (Reynolds & Weiss, 1992). The neurosphere assay subsequently emerged as an informative and powerful approach for gaining insights into the biology of aNSCs and TAPs; however, it requires meticulous care and attention to technical details to obtain results that are valid, reproducible and interpretable (Coles-Takabe *et al.*, 2008; Pastrana *et al.*, 2011). As described earlier, however, there has been little consensus among studies concerning changes in neurosphere numbers with aging, and this variability probably stems from the methodological inconsistencies evident in the experimental protocols used. Moreover, there are important questions pertaining to the interpretation of results obtained with the neurosphere assay, particularly in aging studies. For instance, to what extent can non-aNSCs (such as early TAP cells) be reprogrammed to generate self-renewing neurospheres *in vitro* (Doetsch *et al.*, 2002)? And will aNSCs always grow into neurospheres *in vitro*, regardless of their state *in vivo* (activated vs. quiescent vs. senescent)?

In light of the current technical limitations and challenges, great care should be taken to make precise conclusions that take into account the limitations of the methods used, and to avoid using all-encompassing terms that mis-identify or blur the cell types implicated (Seaberg & van der Kooy, 2003). Thus, at present, our understanding of the changes occurring to aNSCs vs. TAPs during aging remains limited.

Possible mechanisms leading to age-related decline in neurogenesis

Tissue aging is mediated by at least two forms of cellular aging. *Chronological aging* affects all cells and refers to the time-dependent deterioration in cellular functioning that occurs as a result of normal 'wear and tear'. Proliferating cells are additionally subject to *replicative aging*, the deterioration in proliferative capacity resulting from division-coupled telomere shortening and DNA damage (Rando, 2006; Liu & Rando, 2011; Longo *et al.*, 2012). Such aging pro-

cesses lead to a mitotic 'clock', a finite number of possible cell divisions after which cells become senescent (the 'Hayflick limit'; Hayflick, 1965). In the case of adult neurogenesis, age-related impairments could therefore be the result of (i) cell-autonomous aging mechanisms occurring within the aNSC lineage itself; (ii) non-cell-autonomous aging mechanisms occurring within the local and systemic regulatory environments, or a combination of these two processes. Cell-autonomous and/or non-cell-autonomous aging processes can then ultimately impact upon any level(s) of the multi-step neurogenic pathway, such as (i) cell cycle properties of aNSCs and TAPs; (ii) expansion capacity of the TAP population; (iii) cell death at any stage of the neurogenic pathway and (iv) lineage specification and fate choice (Fig. 3).

Cell autonomous causes?

Cells are generally believed to possess two main control systems to restrict their proliferative potential: telomere shortening and cyclin-dependent kinase inhibitors (Mandal *et al.*, 2011). These control systems act by increasing the cell cycle length and by promoting entry into reversible quiescence or irreversible senescence. Such cell cycle control is likely to be particularly beneficial at younger ages, preventing oncogenic transformation within the stem cell population, but may be detrimental for neurogenic plasticity at later ages. In particular, as described below, there is striking evidence that circumventing these systems can help to prevent and/or reverse the effects of aging on adult neurogenesis.

Telomerase is a reverse transcriptase that is highly expressed in immortal embryonic stem cells and whose enzymatic activity counteracts the telomere-shortening effects of cell division. Increasing telomerase activity in cultured cells confers the ability for unlimited proliferation, enabling them to avoid senescence (Bodnar *et al.*, 1998). Telomerase is generally absent within the adult brain, but it remains detectable in the SVZ olfactory system (Caporaso *et al.*, 2003). In late-generation telomerase knockout mice, there is widespread acceleration of tissue aging, including suppression of SVZ neurogenesis (Wong *et al.*, 2003; Ferron *et al.*, 2004). Remarkably, these changes (including deficits in SVZ neurogenesis and olfaction) can actually be *reversed* by restoring telomerase expression in the knockout mice (Jaskeliouff *et al.*, 2011).

Cyclin-dependent kinase inhibitors are classified into two branches: the INK4 family (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}) and the Cip/Kip family (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} and p57^{Kip2}) (Sherr & Roberts, 1999; Kim & Sharpless, 2006). The INK4 tumour suppression pathway is activated during aging in many tissues including the bone marrow, liver, heart and renal cortex (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Burd *et al.*, 2013) and brain (Molofsky *et al.*, 2006). Studies have used p16^{INK4a}-deficient and p16^{INK4a}-overexpressing mice to assess the impact on self-renewal in hematopoietic stem cells, neural stem cells and pancreatic islets and have concluded that p16^{INK4a} expression is one cause of aging in these tissues (Janzen *et al.*, 2006; Krishnamurthy *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006). In all three cell types, p16^{INK4a} deficiency partially abrogated the age-induced decline in proliferation. Expression of the INK4 family is normally repressed by factors such Bmi1 and Hmga2. The transcription factor Bmi1 promotes cell proliferation and self-renewal by inhibiting INK4a/Arf, and Bmi-1-deficient mice show widespread deficits, including inhibited proliferation in the postnatal SVZ (Molofsky *et al.*, 2003, 2006). The transcriptional modulator Hmga2 is a negative regulator of p16^{INK4a} and p19^{ARF} during development, but is itself negatively regulated by the let-7 family of microRNAs, whose expression increases during aging (Nishino *et al.*, 2008).

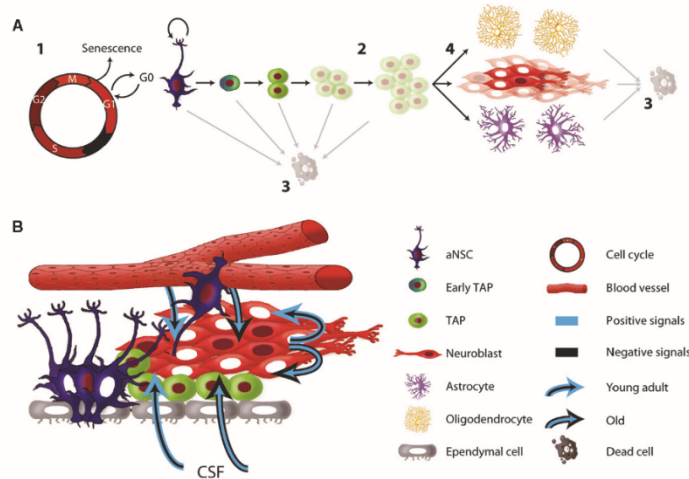


FIG. 3. Possible mechanisms underlying impaired neurogenesis during aging. (A) Reduced neurogenic output could occur by alterations occurring at multiple stages of the neurogenic pathway, including (1) changes in cell cycle dynamics that cause irreversible senescence, reversible quiescence or lengthening of the cell cycle, (2) decreased expansion of the transiently amplifying progenitor (TAP) pool, (3) increased cell death and/or (4) altered neuronal lineage specification. (B) The above mechanisms of neurogenesis impairment could be due to aging of the adult neural stem cell (aNSC) lineage itself (cell-autonomous), aging of the local or systemic environment (non-cell-autonomous), or both. In the case of non-cell-autonomous changes, the underlying causes would be a decrease in neurogenesis-promoting factors or an increase in neurogenesis-inhibiting factors (arrows). The sources of such factors could be the systemic milieu [via blood or cerebrospinal fluid (CSF)], support cells of the subventricular zone niche (such as ventricle-lining ependymal cells or blood vessel endothelial cells) or cells of the neurogenic lineage themselves (aNSCs, TAPs or neuroblasts).

Expression of the Cip/Kip family member, p21, is likewise elevated during aging in the cerebellum (Legrier *et al.*, 2001), and p21-knockout mice show an initial increase in proliferation followed by a premature exhaustion of proliferation (Kippen *et al.*, 2005).

One caveat to the interpretation of these studies on telomerase and cell cycle regulators is that, although they demonstrate a role in preventing and/or reversing aging-related changes in proliferation and neurogenesis, it nevertheless remains uncertain whether age-related changes to these systems are themselves involved in the aging process (Burd *et al.*, 2013). Studies have yet to provide direct evidence for which cell types express altered levels of these proteins during aging, as changes in cell cycle dynamics could impact expansion of aNSCs and/or the TAP cells (Fig. 3A). Also, studies that have looked at the effects of over-expressing or inhibiting these pathways have rarely used more recently developed tissue-specific or temporally controlled methods, and thus induce widespread deficits that make it difficult to interpret the exact mechanism of the observed effects.

Non-cell-autonomous causes?

The potential non-cell-autonomous causes of neurogenesis impairments can conceptually be divided into reduced neurogenesis-promoting signals and increased neurogenesis-inhibiting signals (Fig. 3B). Within the young adult SVZ, a growing list of secreted factor families has now been implicated in stem cell regulation and neurogenesis, including (but not limited to) Ephrins (Conover *et al.*, 2000), Shh (Ahn & Joyner, 2005; Balordi & Fishell, 2007a,b), EGFs (Kuhn *et al.*, 1997; Doetsch *et al.*, 2002; Pastrana *et al.*, 2009), FGFs (Kuhn *et al.*, 1997; Frinchi *et al.*, 2008), TNF- α (Tropepe *et al.*, 1997), Notch-Delta (Carlen *et al.*, 2009; Imayoshi

et al., 2010), Noggin (Lim *et al.*, 2000; Peretto *et al.*, 2004), BMPs (Lim *et al.*, 2000; Peretto *et al.*, 2004; Colak *et al.*, 2008) and Wnts (Adachi *et al.*, 2007), making it easy to envisage that a de-regulation of such factors could lead to impaired neurogenesis with age. Exogenous application of some of these factors has been shown to increase neurogenesis in older brains (Jin *et al.*, 2003; Enwere *et al.*, 2004; Paliouras *et al.*, 2012), showing that the ability of the SVZ to respond to extrinsic signals is at least partially preserved during aging. However, this does not prove that altered levels of these factors play a role during aging. To the contrary, the data investigating whether endogenous quantities of these factors actually changes in the SVZ during aging are mixed (Enwere *et al.*, 2004; Frinchi *et al.*, 2010; Werry *et al.*, 2010). Moreover, although declining receptor levels for some factors have been reported (Enwere *et al.*, 2004), such reductions are probably secondary to the age-related loss of the SVZ cells themselves.

Given the lack of information concerning actual changes occurring with age, it appears that greater emphasis should be placed on identifying aging-associated changes that take place within the neurogenic environment and assessing their significance for adult neurogenesis. For example, some insight has recently been provided by a study using a parabiosis approach to link the circulatory systems of young adult and old mice, demonstrating that age-related changes in blood-borne factors contribute to decreasing neurogenesis (Villeda *et al.*, 2011). Several other changes have also recently been documented within the aging neurogenic environment, including alterations in the composition of the CSF (Zhang *et al.*, 2005; Baird *et al.*, 2012), ependymal cell loss from stenosis of the ventricle walls (Shook *et al.*, 2012) and accumulation of lipid droplets within the aging ependyma (Bouab *et al.*, 2011). Importantly, aging of neural precursors and of their

surrounding SVZ niche are likely to be inter-related events, and it remains to be established whether such changes within the niche contribute to, or are themselves caused by, age-related decreases in neurogenesis.

Does irreversible stem cell exhaustion/loss/senescence occur in the aging SVZ?

This key question remains to be answered due to the lack of consensus amongst published findings and the current technical hurdles in reliably identifying aNSCs described earlier. It is noteworthy, however, that alterations in the proliferation and/or cell cycle properties of aNSCs and TAPs have been identified (Tropepe *et al.*, 1997; Ahlenius *et al.*, 2009; Bouab *et al.*, 2011; Shook *et al.*, 2012) and that experiments de-regulating either cell-autonomous or non-cell-autonomous control mechanisms have shown that functional exhaustion of SVZ stem cell activity can in principle occur (Kippin *et al.*, 2005; Imayoshi *et al.*, 2010). Interestingly, radial glial-like neurogenic precursors in the dentate gyrus have been found to undergo a terminal astrocytic differentiation, leading to the proposal of a 'disposable' model of neural stem cell (Encinas *et al.*, 2011).

The implications of when, how and why SVZ neurogenesis declines with age

Evolutionary theories of aging make the distinction between chronological age (measured in time) and biological age (measured in terms of cellular function). Until now, studies of age-related declines in adult neurogenesis have focused on chronological aging, and have clearly established many of the *consequences* of the aging process on adult neurogenesis: reduced cellular proliferation in the niche, decreased numbers of progenitors and neuroblasts, and reduced olfactory function. While these studies have left unresolved the issue of upstream changes in aNSC and progenitor biology, they have nevertheless established that the *when* of the biological aging of adult neurogenesis occurs sometime between early adulthood and middle-age, and significantly before rodents are 'old'. To uncover the upstream cellular events and molecular mechanisms (i.e. the *how* of declining neurogenesis), the experimental design of future studies will need to be significantly re-oriented towards younger ages, so that more light is shed on the *process* of aging rather than its consequences.

Given the functional importance of adult neurogenesis for cognitive plasticity and brain maintenance, the *why* of age-related declines in neurogenesis remains unknown. Evolutionarily, because natural selection is largely geared towards improving reproductive fitness, one possibility is that there is simply insufficient evolutionary pressure to select for individuals that maintain high levels of adult neurogenesis after reproductive age; indeed, in the hippocampus of various species, proliferation declines rapidly after the age of first reproduction (Kirkwood & Rose, 1991; Amrein *et al.*, 2011). A second possibility is that the cellular mechanisms restricting neurogenesis as we get older are actually protective, preventing tumor development and/or stem cell exhaustion from occurring at earlier ages. Thus, different therapeutic objectives may ultimately be desirable depending on one's biological age: reducing aNSC activity to the minimal amount necessary at early ages to preserve the replicative life and genomic integrity of aNSCs, vs. activating aNSCs at later ages to restore a minimal level of adult neurogenesis in the old brain. The answers to these questions may have significant implications for the design of future therapeutic strategies.

Acknowledgements

We thank members of the Fernandes laboratory for helpful discussion and critiques. L.H. is funded by studentships from the Alzheimer Society of Canada and the Fonds de recherche de Québec en Santé (FRQS). K.F. is the recipient of a Canada Research Chair in Neural Stem Cell Biology. This work has been supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). The authors declare no competing interests.

Abbreviations

aNSC, adult neural stem cell; BrdU, 2-bromodeoxyuridine; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; DCX, doublecortin; IPC, intermediate progenitor cells; NEP, neuroepithelial cell; NSC, neural stem cell; RGC, radial glial cell; SVZ, subventricular zone; TAP, transiently amplifying progenitor.

Reference

- Acosta, S., Jernberg, J., Sanberg, C.D., Sanberg, P.R., Small, B.J., Gemma, C. & Bickford, P.C. (2010) NT-020, a natural therapeutic approach to optimize spatial memory performance and increase neural progenitor cell proliferation and decrease inflammation in the aged rat. *Rejuven. Res.*, **13**, 581–588.
- Adachi, K., Mirzadeh, Z., Sakaguchi, M., Yamashita, T., Nikolcheva, T., Gotoh, Y., Peltz, G., Gong, L., Kawase, T., Alvarez-Buylla, A., Okano, H. & Sawamoto, K. (2007) Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells*, **25**, 2827–2836.
- Aguirre, A. & Gallo, V. (2004) Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J. Neurosci.*, **24**, 10530–10541.
- Ahlenius, H., Visan, V., Kokaia, M., Lindvall, O. & Kokaia, Z. (2009) Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J. Neurosci.*, **29**, 4408–4419.
- Aln, S. & Joyner, A.L. (2005) In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature*, **437**, 894–897.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M. & Tramontin, A.D. (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 287–293.
- Amrein, I., Isler, K. & Lipp, H.P. (2011) Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. *Eur. J. Neurosci.*, **34**, 978–987.
- Baird, G.S., Nelson, S.K., Keeney, T.R., Stewart, A., Williams, S., Kraemer, S., Peskind, E.R. & Montine, T.J. (2012) Age-dependent changes in the cerebrospinal fluid proteome by slow off-rate modified aptamer array. *Am. J. Pathol.*, **180**, 446–456.
- Balordi, F. & Fishell, G. (2007a) Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J. Neurosci.*, **27**, 5936–5947.
- Balordi, F. & Fishell, G. (2007b) Mosaic removal of hedgehog signaling in the adult SVZ reveals that the residual wild-type stem cells have a limited capacity for self-renewal. *J. Neurosci.*, **27**, 14248–14259.
- Belluardo, N., Mudo, G., Bonomo, A., Di Liberto, V., Frinchi, M. & Fuxe, K. (2008) Nicotine-induced fibroblast growth factor-2 restores the age-related decline of precursor cell proliferation in the subventricular zone of rat brain. *Brain Res.*, **1193**, 12–24.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. & Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**, 349–352.
- Bouab, M., Paliouras, G.N., Aumont, A., Forest-Berard, K. & Fernandes, K.J. (2011) Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience*, **173**, 135–149.
- Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta, M.R. 3rd, & Saghatelian, A. (2009) Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *J. Neurosci.*, **29**, 15245–15257.
- Burd, C.E., Sorrentino, J.A., Clark, K.S., Darr, D.B., Krishnamurthy, J., Deal, A.M., Bardeesy, N., Castrillon, D.H., Beach, D.H. & Sharpless, N.E. (2013) Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16 (INK4a)-luciferase model. *Cell*, **152**, 340–351.

- Caporaso, G.L., Lim, D.A., Alvarez-Buylla, A. & Chao, M.V. (2003) Telomerase activity in the subventricular zone of adult mice. *Mol. Cell. Neurosci.*, **23**, 693–702.
- Carlen, M., Meleis, K., Goritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabe-Heider, F., Yeung, M.S., Naldini, L., Honjo, T., Kokaia, Z., Shupliakov, O., Cassidy, R.M., Lindvall, O. & Frisen, J. (2009) Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat. Neurosci.*, **12**, 259–267.
- Chen, J., Zacharek, A., Li, Y., Li, A., Wang, L., Katakowski, M., Roberts, C., Lu, M. & Chopp, M. (2006) N-cadherin mediates nitric oxide-induced neurogenesis in young and retired breeder neurospheres. *Neuroscience*, **140**, 377–388.
- de Chevigny, A., Cooper, O., Vinuela, A., Reske-Nielsen, C., Lagace, D.C., Eisch, A.J. & Isacson, O. (2008) Fate mapping and lineage analyses demonstrate the production of a large number of striatal neuroblasts after transforming growth factor alpha and noggin striatal infusions into the dopamine-depleted striatum. *Stem Cells*, **26**, 2349–2360.
- Colak, D., Mori, T., Brill, M.S., Pfeifer, A., Falk, S., Deng, C., Monteiro, R., Mummery, C., Sommer, L. & Gotz, M. (2008) Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J. Neurosci.*, **28**, 434–446.
- Coles-Takabe, B.L., Brain, I., Purputra, K.A., Karpowicz, P., Zandstra, P.W., Morshead, C.M. & van der Kooy, D. (2008) Don't look: growing clonal versus nonclonal neural stem cell colonies. *Stem Cells*, **26**, 2938–2944.
- Conover, J.C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D. & Alvarez-Buylla, A. (2000) Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat. Neurosci.*, **3**, 1091–1097.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, **97**, 703–716.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, **36**, 1021–1034.
- Encinas, J.M., Michurina, T.V., Peunova, N., Park, J.H., Tordo, J., Peterson, D.A., Fishell, G., Koulakov, A. & Enikolopov, G. (2011) Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, **8**, 566–579.
- Enwere, E., Shingo, T., Gregg, C., Fujikawa, H., Ohta, S. & Weiss, S. (2004) Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J. Neurosci.*, **24**, 8354–8365.
- Erlandsson, A., Lin, C.H., Yu, F. & Morshead, C.M. (2011) Immunosuppression promotes endogenous neural stem and progenitor cell migration and tissue regeneration after ischemic injury. *Exp. Neurol.*, **230**, 48–57.
- Ferron, S., Mira, H., Franco, S., Cano-Jaimez, M., Bellmunt, E., Ramirez, C., Farinas, I. & Blasco, M.A. (2004) Telomere shortening and chromosomal instability abrogates proliferation of adult but not embryonic neural stem cells. *Development*, **131**, 4059–4070.
- Frinchi, M., Bonomo, A., Trovato-Salinaro, A., Condorelli, D.F., Fuxe, K., Spampinato, M.G. & Mudo, G. (2008) Fibroblast growth factor-2 and its receptor expression in proliferating precursor cells of the subventricular zone in the adult rat brain. *Neurosci. Lett.*, **447**, 20–25.
- Frinchi, M., Di Liberto, V., Olivieri, M., Fuxe, K., Belluardo, N. & Mudo, G. (2010) FGF-2/FGFR1 neurotrophic system expression level and its basal activation do not account for the age-dependent decline of precursor cell proliferation in the subventricular zone of rat brain. *Brain Res.*, **1358**, 39–45.
- Fuchs, E., Tumber, T. & Guasch, G. (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, **116**, 769–778.
- Hansen, D.V., Lui, J.H., Parker, P.R. & Kriegstein, A.R. (2010) Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*, **464**, 554–561.
- Hayflick, L. (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, **37**, 614–636.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K. & Kageyama, R. (2010) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J. Neurosci.*, **30**, 3489–3498.
- Imura, T., Kornblum, H.I. & Sofroniew, M.V. (2003) The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J. Neurosci.*, **23**, 2824–2832.
- Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H.E., Saito, Y., Waring, M.T., Dombkowski, D.M., Cheng, T., DePinho, R.A., Sharpless, N.E. & Scadden, D.T. (2006) Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, **443**, 421–426.
- Jaskelioff, M., Muller, F.L., Paik, J.H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A.C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadinanos, J., Horner, J.W., Maratos-Flier, E. & Depinho, R.A. (2011) Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*, **469**, 102–106.
- Jin, K., Sun, Y., Xie, L., Bateur, S., Mao, X.O., Smelick, C., Logvinova, A. & Greenberg, D.A. (2003) Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell*, **2**, 175–183.
- Kim, W.Y. & Sharpless, N.E. (2006) The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, **127**, 265–275.
- Kippin, T.E., Martens, D.J. & van der Kooy, D. (2005) p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Gene Dev.*, **19**, 756–767.
- Kirkwood, T.B. & Rose, M.R. (1991) Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos. T. Roy. Soc. B.*, **332**, 15–24.
- Kolb, B., Morshead, C., Gonzalez, C., Kim, M., Gregg, C., Shingo, T. & Weiss, S. (2007) Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats. *J. Cerebr. Blood F. Met.*, **27**, 983–997.
- Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla, A. (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.*, **32**, 149–184.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L. & Sharpless, N.E. (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.*, **114**, 1299–1307.
- Krishnamurthy, J., Ramsey, M.R., Ligon, K.L., Torrice, C., Koh, A., Bonner-Weir, S. & Sharpless, N.E. (2006) p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*, **443**, 453–457.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F.H. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.*, **16**, 2027–2033.
- Kuhn, H.G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L.J. & Gage, F.H. (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.*, **17**, 5820–5829.
- Legrier, M.E., Ducray, A., Propper, A. & Kastner, A. (2001) Region-specific expression of cell cycle inhibitors in the adult brain. *NeuroReport*, **12**, 3127–3131.
- Lim, D.A., Tramoncin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, **28**, 713–726.
- Liu, L. & Rando, T.A. (2011) Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J. Cell Biol.*, **193**, 257–266.
- Lledo, P.M., Merkle, F.T. & Alvarez-Buylla, A. (2008) Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci.*, **31**, 392–400.
- Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, **264**, 1145–1148.
- Longo, V.D., Shadel, G.S., Kaerberlein, M. & Kennedy, B. (2012) Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab.*, **16**, 18–31.
- Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Gotz, M., Haas, C.A., Kempermann, G., Taylor, V. & Giachino, C. (2010) Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, **6**, 445–456.
- Luo, J., Daniels, S.B., Lenington, J.B., Notti, R.Q. & Conover, J.C. (2006) The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell*, **5**, 139–152.
- Mandal, P.K., Blanpain, C. & Rossi, D.J. (2011) DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, **12**, 198–202.
- Maslov, A.Y., Barone, T.A., Plunkett, R.J. & Pruitt, S.C. (2004) Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J. Neurosci.*, **24**, 1726–1733.
- McGinn, M.J., Colello, R.J. & Sun, D. (2012) Age-related proteomic changes in the subventricular zone and their association with neural stem/progenitor cell proliferation. *J. Neurosci. Res.*, **90**, 1159–1168.
- Medrano, S., Burns-Cusato, M., Atienza, M.B., Rahimi, D. & Scrabble, H. (2009) Regenerative capacity of neural precursors in the adult mammalian brain is under the control of p53. *Neurobiol. Aging*, **30**, 483–497.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yachine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D. & Alvarez-Buylla, A. (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J. Neurosci.*, **26**, 7907–7918.
- Merkle, F.T., Tramoncin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17528–17532.

- Meshulam, R.I., Moberg, P.J., Mahr, R.N. & Doty, R.L. (1998) Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Arch. Neurol.*, **55**, 84–90.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*, **3**, 265–278.
- Molofsky, A.V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.K., Clarke, M.F. & Morrison, S.J. (2003) Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*, **425**, 962–967.
- Molofsky, A.V., Slutsky, S.G., Joseph, N.M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N.E. & Morrison, S.J. (2006) Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*, **443**, 448–452.
- Morrison, S.J. & Spradling, A.C. (2008) Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, **132**, 598–611.
- Morshead, C.M., Craig, C.G. & van der Kooy, D. (1998) In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development*, **125**, 2251–2261.
- Morshead, C.M., Garcia, A.D., Sofroniew, M.V. & van der Kooy, D. (2003) The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 76–84.
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S. & van der Kooy, D. (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*, **13**, 1071–1082.
- Mouret, A., Lepousez, G., Gras, J., Gabelle, M.M. & Lledo, P.M. (2009) Turnover of newborn olfactory bulb neurons optimizes olfaction. *J. Neurosci.*, **29**, 12302–12314.
- Nam, H.S. & Benezra, R. (2009) High levels of Id1 expression define B1 type adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*, **5**, 515–526.
- Nishino, J., Kim, I., Chada, K. & Morrison, S.J. (2008) Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf expression. *Cell*, **135**, 227–239.
- Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. & Kriegstein, A.R. (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.*, **7**, 136–144.
- Paliouras, G.N., Hamilton, L.K., Aumont, A., Joppe, S.E., Barnabe-Heider, F. & Fernandez, K.L. (2012) Mammalian target of rapamycin signaling is a key regulator of the transit-amplifying progenitor pool in the adult and aging forebrain. *J. Neurosci.*, **32**, 15012–15026.
- Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H., Sloviter, R.S. & Lowenstein, D.H. (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, **17**, 3727–3738.
- Parras, C.M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J.E., Nakafuku, M., Vecovici, A. & Guillemot, F. (2004) Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J.*, **23**, 4495–4505.
- Pastrana, E., Cheng, L.C. & Doetsch, F. (2009) Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 6387–6392.
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V. & Doetsch, F. (2011) Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*, **8**, 486–498.
- Peretto, P., Dati, C., De Marchis, S., Kim, H.H., Ukhanova, M., Fasolo, A. & Margolis, F.L. (2004) Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. *Neuroscience*, **128**, 685–696.
- Rando, T.A. (2006) Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*, **441**, 1080–1086.
- Rey, N.L., Sacquet, J., Veyrac, A., Jourdan, F. & Didier, A. (2012) Behavioral and cellular markers of olfactory aging and their response to enrichment. *Neurobiol. Aging*, **33**, 626.e9–626.e23.
- Reynolds, B.A. & Weiss, S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, **255**, 1707–1710.
- Salthouse, T.A. (2009) When does age-related cognitive decline begin? *Neurobiol. Aging*, **30**, 507–514.
- Seaberg, R.M. & van der Kooy, D. (2003) Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci.*, **26**, 125–131.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B. & Temple, S. (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell*, **3**, 289–300.
- Sherr, C.J. & Roberts, I.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Gene Dev.*, **13**, 1501–1512.
- Shook, B.A., Manz, D.H., Peters, J.J., Kang, S. & Conover, J.C. (2012) Spatiotemporal changes to the subventricular zone stem cell pool through aging. *J. Neurosci.*, **32**, 6947–6956.
- Spassky, N., Merkle, F.T., Flames, N., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J. Neurosci.*, **25**, 10–18.
- Stoll, E.A., Cheung, W., Mikheev, A.M., Sweet, I.R., Bielas, J.H., Zhang, J., Rostomily, R.C. & Horner, P.J. (2011a) Aging neural progenitor cells have decreased mitochondrial content and lower oxidative metabolism. *J. Biol. Chem.*, **286**, 38592–38601.
- Stoll, E.A., Habibi, B.A., Mikheev, A.M., Lasiene, J., Massey, S.C., Swanson, K.R., Rostomily, R.C. & Horner, P.J. (2011b) Increased re-entry into cell cycle mitigates age-related neurogenic decline in the murine subventricular zone. *Stem Cells*, **29**, 2005–2017.
- Suh, H., Deng, W. & Gage, F.H. (2009) Signaling in adult neurogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.*, **25**, 253–275.
- Suzuki, S.O. & Goldman, J.E. (2003) Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J. Neurosci.*, **23**, 4240–4250.
- Tanaka, A., Watanabe, Y., Kato, H. & Araki, T. (2007) Immunohistochemical changes related to ageing in the mouse hippocampus and subventricular zone. *Mech. Ageing Dev.*, **128**, 303–310.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaić, B., Garcia-Verdugo, J.M. & Doetsch, F. (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*, **3**, 279–288.
- Tropepe, V., Craig, C.G., Morshead, C.M. & van der Kooy, D. (1997) Transforming growth factor- α null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J. Neurosci.*, **17**, 7850–7859.
- Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K.M., Cziri, E., Park, J.S., Couillard-Despres, S., Aigner, L., Li, G., Peskind, E.R., Kaye, J.A., Quinn, J.F., Galasko, D.R., Xie, X.S., Rando, T.A. & Wyss-Coray, T. (2011) The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, **477**, 90–94.
- Walker, M.R., Patel, K.K. & Stappenbeck, T.S. (2009) The stem cell niche. *J. Pathol.*, **217**, 169–180.
- Werry, E.L., Enjeti, S., Halliday, G.M., Sachdev, P.S. & Double, K.L. (2010) Effect of age on proliferation-regulating factors in human adult neurogenic regions. *J. Neurochem.*, **115**, 956–964.
- Winner, B., Kohl, Z. & Gage, F.H. (2011) Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.*, **33**, 1139–1151.
- Wong, K.K., Maser, R.S., Bachoo, R.M., Menon, J., Carrasco, D.R., Gu, Y., Alt, F.W. & DePinho, R.A. (2003) Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature*, **421**, 643–648.
- Zhang, J., Goodlett, D.R., Peskind, E.R., Quinn, J.F., Zhou, Y., Wang, Q., Pan, C., Yi, E., Eng, J., Aebersold, R.H. & Montine, T.J. (2005) Quantitative proteomic analysis of age-related changes in human cerebrospinal fluid. *Neurobiol. Aging*, **26**, 207–227.
- Zhang, R., Zhang, Z., Wang, L., Wang, Y., Goussev, A., Zhang, L., Ho, K.L., Morshead, C. & Chopp, M. (2004) Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J. Cerebr. Blood F. Met.*, **24**, 441–448.

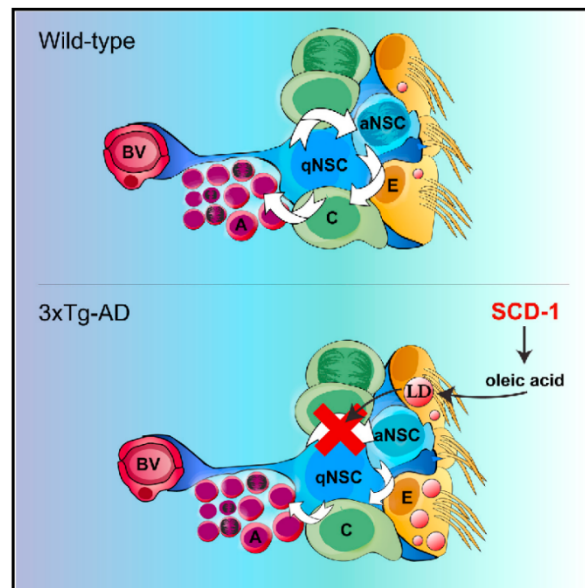
C. Annexe C

Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease

Cell Stem Cell

Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease

Graphical Abstract



Authors

Laura K. Hamilton, Martin Dufresne, Sandra E. Joppé, ..., Martin Parent, Pierre Chaurand, Karl J.L. Fernandes

Correspondence

karl.jl.fernandes@umontreal.ca

In Brief

Hamilton et al. identify deregulation of niche fatty acid metabolism as a mechanism of disease-induced stem cell impairment. They show that interfering with oleic acid signaling or synthesis rescues NSC proliferation in a mouse model of Alzheimer's, revealing a potential approach to promote NSC-mediated brain function and repair.

Highlights

- Early NSC impairment in 3xTg-AD mice correlates with SVZ niche lipid accumulations
- Similar lipid accumulations are found in the SVZ in postmortem human AD brains
- Accumulating SVZ lipids are locally generated, oleic acid-enriched triglycerides
- Inhibiting oleic acid signaling or synthesis rescues NSC defects in 3xTg-AD mice



Hamilton et al., 2015, Cell Stem Cell 17, 397–411
 October 1, 2015 ©2015 Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.001>

CellPress

Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease

Laura K. Hamilton,^{1,2,3} Martin Dufresne,⁴ Sandra E. Joppé,^{1,2,3} Sarah Petryszyn,⁵ Anne Aumont,^{1,2,3} Frédéric Calon,^{6,7} Fanie Barnabé-Heider,⁸ Alexandra Furtos,⁴ Martin Parent,⁵ Pierre Chaurand,⁴ and Karl J.L. Fernandes^{1,2,3,*}

¹Research Center of the University of Montreal Hospital (CRCHUM), Montreal, QC H2X 0A9, Canada

²CNS Research Group (GRSNC), Montreal, QC H3T 1J4, Canada

³Department of Neurosciences, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

⁴Department of Chemistry, Faculty of Arts and Sciences, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

⁵Department of Psychiatry and Neuroscience, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, QC G1V 2G3, Canada

⁶Faculty of Pharmacy, Université Laval, Quebec City, QC G1V 0A6, Canada

⁷CHU-Q Research Center, Quebec City, QC G1V 4G2, Canada

⁸Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden

*Correspondence: karl.j.fernandes@umontreal.ca

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.001>

SUMMARY

Lipid metabolism is fundamental for brain development and function, but its roles in normal and pathological neural stem cell (NSC) regulation remain largely unexplored. Here, we uncover a fatty acid-mediated mechanism suppressing endogenous NSC activity in Alzheimer's disease (AD). We found that postmortem AD brains and triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTg-AD) mice accumulate neutral lipids within ependymal cells, the main support cell of the forebrain NSC niche. Mass spectrometry and microarray analyses identified these lipids as oleic acid-enriched triglycerides that originate from niche-derived rather than peripheral lipid metabolism defects. In wild-type mice, locally increasing oleic acid was sufficient to recapitulate the AD-associated ependymal triglyceride phenotype and inhibit NSC proliferation. Moreover, inhibiting the rate-limiting enzyme of oleic acid synthesis rescued proliferative defects in both adult neurogenic niches of 3xTg-AD mice. These studies support a pathogenic mechanism whereby AD-induced perturbation of niche fatty acid metabolism suppresses the homeostatic and regenerative functions of NSCs.

INTRODUCTION

Preservation of stem cell activity within adult tissues is essential for maintaining tissue structure and function. In the brain, experimental inhibition of neural stem cell (NSC) activity leads to deficits in learning and memory, mood, and stress regulation (Imayoshi et al., 2008; Sakamoto et al., 2014; Sakamoto et al., 2011; Snyder et al., 2001). In addition, following neural damage, NSC-derived progeny are re-directed to areas of degeneration, where they are involved in wound healing and cell replacement

and can serve as a target for therapeutic manipulations (Benner et al., 2013; de Chevigny et al., 2008; Erlandsson et al., 2011; Kolb et al., 2007). NSC activity decreases naturally during aging and is dysregulated in models of neurodegenerative diseases, suggesting an involvement in aging- and disease-associated cognitive deficits (Bouab et al., 2011; Demars et al., 2010; Hamilton et al., 2010; Hamilton et al., 2013; Lazarov and Marr, 2010; Lazarov et al., 2010). Consistent with this, disturbances in neurogenesis have been reported in Alzheimer's disease (AD) patients (Crews et al., 2010; Perry et al., 2012; Ziabreva et al., 2006) and a range of AD transgenic mouse models (Chuang, 2010; Hamilton et al., 2010). Neural precursor activity can be regulated by gene products involved in both sporadic AD (i.e., ApoE4) (Levi and Michaelson, 2007; Li et al., 2009; Yang et al., 2011) and familial AD (i.e., beta-amyloid, soluble amyloid precursor protein) (Lazarov and Marr, 2010; Smukler et al., 2011). Furthermore, genetic polymorphisms affecting NSC activity can influence AD risk (Nho et al., 2015), while neurogenesis-related genes were identified as a prominently over-represented class of AD risk genes in a recent analysis of published genome-wide linkage, association, and expression studies (Talwar et al., 2014). Thus, dissecting the mechanisms involved in NSC dysregulation could provide new opportunities for preventive and regenerative therapeutic strategies for neurodegeneration.

Recently, lipids have gained attention in the regulation of NSC behavior. In the forebrain subventricular zone (SVZ) niche, lipid metabolism genes are among the major classes of transcriptional differences between quiescent and activated NSCs (Codega et al., 2014). Moreover, in both SVZ and hippocampal dentate gyrus (DG) niches, neural precursors require fatty acid oxidation for proliferation (Chorna et al., 2013; Knobloch et al., 2013; Matsumata et al., 2012; Stoll et al., 2015). NSCs are positioned particularly well in the SVZ to be regulated by environmental lipid signals. Systemic signals can reach NSCs via their contacts with the cerebrospinal fluid (CSF) and SVZ blood vessels (Codega et al., 2014; Mirzadeh et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Ependymal cells are a major source of local signals, constituting approximately 25% of cells within the SVZ niche (Doetsch et al., 1997) and surrounding NSCs in pinwheel



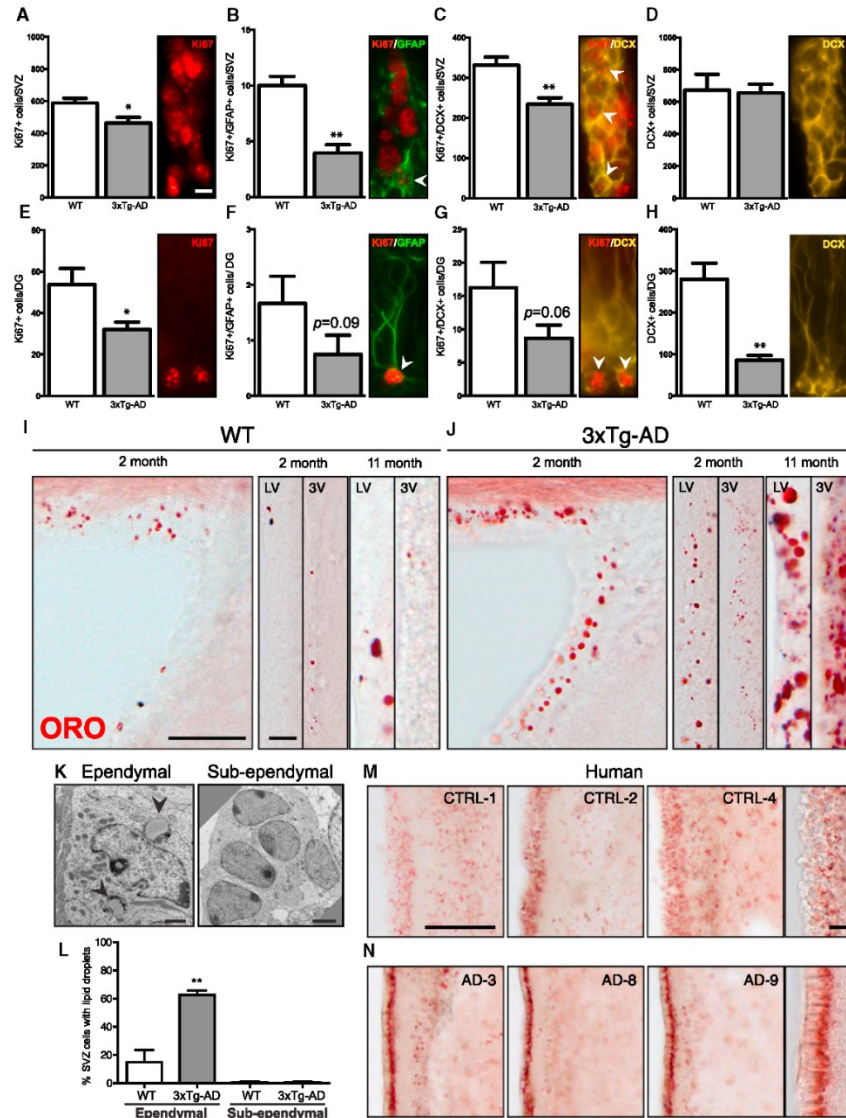


Figure 1. Early Onset of Neurogenesis Defects Correlates with Neutral Lipid Accumulations within Ependymal Niche Cells in the SVZ of AD Mice and Patients

(A–D) Quantification and representative micrographs of Ki67+ proliferating cells (A), Ki67+/GFAP+ proliferating NSCs (B), Ki67+/DCX+ proliferating neuroblasts (C), and DCX+ neuroblasts (D) in the SVZ niche of 2-month-old WT and 3xTg-AD mice (n = 4). Same fields shown in (C) and (D). Unpaired t test. (E–H) Quantification and representative micrographs of Ki67+ proliferating cells (E), Ki67+/GFAP+ proliferating NSCs (F), Ki67+/DCX+ proliferating neuroblasts (G), and DCX+ neuroblasts (H) in the DG niche of 2-month-old WT and 3xTg-AD mice (n = 4). Same fields shown in (E) and (G). Unpaired t test. (I and J) ORO staining of coronal sections containing the lateral ventricle (LV) and third ventricle (3V) of 2-month-old WT (I) and 3xTg-AD (J) mice.

(legend continued on next page)

structures within the walls of the lateral ventricles (Mirzadeh et al., 2008). Ependymal cells provide a critical interface for the exchange of ions, macromolecules, and immune cells between the brain and the circulating CSF, secrete a variety of molecules that regulate NSC activity, and have been identified as sites of lipid synthesis and storage (Bouab et al., 2011; Etschmaier et al., 2011; Hamilton et al., 2010).

Interestingly, AD is associated with both declines in neurogenesis-regulated cognitive processes and aberrations in lipid metabolism. Indeed, lipid accumulations were one of the five original AD-associated tissue pathologies reported by Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907). More recently, links have strengthened between aberrant lipid metabolism and neurodegeneration in AD (Astarita et al., 2011; Fraser et al., 2010; Hussain et al., 2013; Podtelezhnikov et al., 2011; Tanzi, 2012), while epidemiological studies have demonstrated that AD risk factors include peripheral metabolic conditions such as insulin resistance, obesity, and dyslipidemia (Pasinetti and Eberstein, 2008). However, deeper mechanistic insights into the role of abnormal lipid metabolism in AD have been hindered by the technical complexity involved with localizing, identifying, and determining the biological functions of individual lipid species in the brain.

In the present study, we developed methodologies to overcome these limitations, allowing us to uncover a new pathological mechanism in AD. Our results reveal that lipid metabolism defects originating within a major neurogenic niche can disrupt NSC-mediated regeneration and plasticity.

RESULTS

Early Onset of Neurogenesis Defects and AD-Associated Neutral Lipid Accumulations at the Brain-CSF Interface

The triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTg-AD) mouse is a unique AD model that accumulates both amyloid plaques and neurofibrillary tangles with age (Oddo et al., 2003). We have previously shown that neural precursor proliferation and neurogenic output are decreased in 3xTg-AD mice at both 11 and 18 months of age (Hamilton et al., 2010). We hypothesized that if suppression at the level of NSCs underlies the defects in neurogenic output, then it should be possible to identify an earlier time window when only proliferating precursors are affected. Consistent with this, multi-stage analysis of SVZ neurogenesis in 2-month-old mice revealed that 3xTg-AD mice already have significant decreases in total Ki67+ cell proliferation (Figure 1A), Ki67+/glial fibrillary acidic protein (GFAP+) proliferating NSCs (Figure 1B), and Ki67+/DCX+ proliferating neuroblasts (Figure 1C), without alterations in the total number of DCX+ neuroblasts (Figure 1D), number of pinwheel units (Figure S1A), or neurospheres (Figure S1B). There was also no significant difference in Ki67+/-Iba1+ proliferating microglia (Figure S1C). In the hippocampal

DG niche, total Ki67+ (Figure 1E) and total DCX+ (Figure 1H) populations were both significantly decreased, while Ki67+/GFAP+ proliferating NSCs (Figure 1F) and Ki67+/DCX+ proliferating neuroblasts (Figure 1G) showed trends toward decreases that approached statistical significance. The number of Ki67+/-Iba1+ proliferating microglia was unchanged (Figure S1D).

Neurogenesis impairments in 3xTg-AD mice occur before amyloid plaques and neurofibrillary tangles (Hamilton et al., 2010), suggesting the involvement of other pathogenic mechanisms. We observed that NSC suppression in 2-month-old 3xTg-AD mice occurred concomitant to a highly specific accumulation of oil red O (ORO)-positive neutral lipid droplets along the entire brain-CSF interface, including the lateral ventricle of the forebrain SVZ niche and the third ventricle of the hypothalamus (Figures 1I and 1J). At 2 months of age, SVZ lipid droplets were statistically significantly increased in 3xTg-AD mice compared to wild-type (WT) mice (Figure S1E), and lipid droplet numbers correlated well with the observed declines in SVZ neurogenesis markers (Figures S1F–S1I). ORO-positive lipid droplets continued increasing with age in 3xTg-AD mice; however, even at 11 months of age, they were never detected outside of the ventricular zone in either WT or 3xTg-AD mice (Figures 1I and 1J). SVZ lipid droplets were found uniquely in ventricle-contacting ependymal cells and did not accumulate in the sub-ependymal populations of neural precursors (Figures 1K and 1L). These data reveal a buildup of lipid droplets within the SVZ niche during the window of preferential NSC inhibition.

We then tested whether aberrant lipid accumulations are present in the SVZ of postmortem human AD brains (Figures 1M and 1N). Remarkably, we found similar lipid accumulations along the lateral ventricles in post-mortem brain tissues from nine AD patients (78.0 ± 2.89 years old) and five age-matched cognitively normal individuals (79.6 ± 5.88 years old) (Figures 1M and 1N; Figures S1E and S1F; Table S1 for patient information). Four of the five controls presented sparse ORO staining of the ependymal layer along the majority of the ventricular wall (Figures 1M and S1J). In contrast, the majority of AD brains showed dense accumulations of ORO at the basal surface of the ependyma (Figures 1N and S1K), with four of the nine presenting a mixture of dense and sparse areas. These data collectively reveal a selective accumulation of lipid droplets along the brain-CSF interface of both human AD brains and 3xTg-AD mice, and at least in 3xTg-AD mice, this accumulation coincides with impaired NSC function during early adulthood.

Accumulating AD-Associated Lipids Are Triglycerides Enriched with Oleic Acid

Lipid droplets are lipid-rich organelles composed of neutral lipids such as fatty acids, triglycerides, and sterols (Martin and Parton, 2006). To identify the classes of lipids accumulating within the SVZ niche, we developed an imaging mass spectrometry (IMS)-based lipidomics strategy. IMS is a unique form of mass

(K and L) Representative micrographs (K) and quantifications (L) of lipid droplets (arrowheads) in 3xTg-AD ependymal versus sub-ependymal cells (n = 3). One-way ANOVA.

(M and N) ORO staining of transverse sections containing the LV and the SVZ of normal individuals (CTRL) (M) and AD patients (N). Panels at the right show representative higher-magnification images.

The scale bar in (A) (for A–H) represents 5 μm, in (I) (for I and J) and (M) (for M and N) represents 100 and 10 μm, in (K) represents 1 and 2 μm. Error bars represent mean ± SEM. *p ≤ 0.05 and **p ≤ 0.005. See also Figure S1 and Table S1.

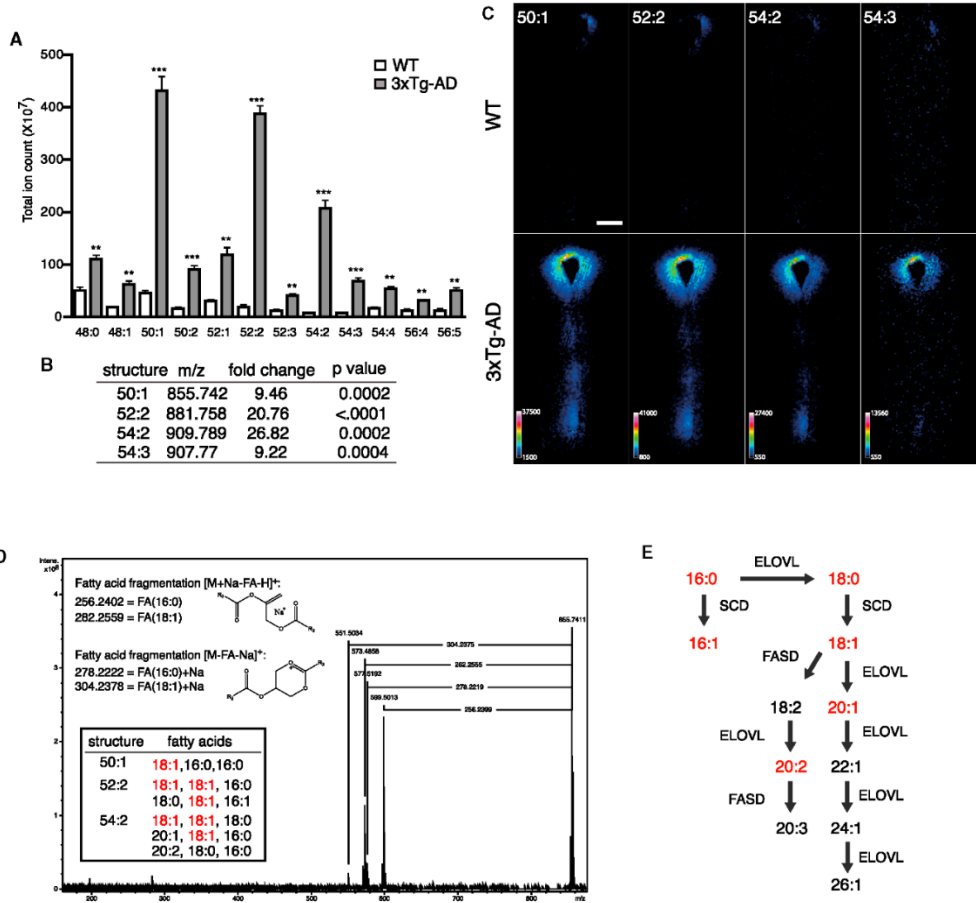


Figure 2. Accumulating AD-Associated Lipids Are Triglycerides Enriched in OA

(A–C) IMS showing the 12 triglycerides that accumulate surrounding the lateral ventricle of 5-month-old 3xTg-AD mice. (A) Structures (total carbon-to-unsaturation ratio) of the 12 enriched triglycerides with their associated total ion counts. (B) Table of m/z ratios and fold changes of the 4 most enriched triglycerides (50:1, 52:2, 54:2, and 54:3). (C) Representative ion density maps. Unpaired t test.

(D) Tandem mass spectrometry of the three major triglycerides (50:1, 52:2, and 54:2) to identify their fatty acid side chains. The fractionation pattern from the sodium-adducted triglyceride 50:1 is shown. The inset table summarizes the combined fractionation patterns of the three major triglycerides, showing a predominant enrichment of OA (red).

(E) Fatty acid biosynthesis pathway involved in the production and subsequent processing of OA (18:1). Fatty acids identified as enriched in the 3xTg-AD SVZ are shown in red. Enzymes involved at each step are shown, and include the SCD, ELOVL, and FASD gene families.

The scale bar in (C) represents 200 μ m. Error bars represent mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, and *** $p \leq 0.0005$. See also Figure S2.

spectrometry that employs laser desorption-ionization to collect mass spectra data at high-resolution intervals across a tissue section, thereby revealing the spatial distribution of individual biomolecules within the unperturbed tissue architecture. IMS revealed that lipid accumulations in the SVZ niche are selectively enriched in triglycerides. Twelve distinct triglycerides were found to be increased by 2- to 27-fold in the SVZ niche of 3xTg-AD

mice compared to strain controls (Figure 2A). The four largest increases occurred in triglycerides having structures of 50:1, 52:2, 54:2, and 54:3 (total carbon-to-unsaturation ratio) (Figure 2B), and IMS ion density maps illustrated a specific enrichment of these triglycerides along the ventricular borders (Figures 2C and S2A). Conversely, cholesterol content in the SVZ was unchanged (Figure S1B).

Triglycerides are composed of a glycerol head group with three fatty acid side chains. Because individual fatty acids have distinctive effects on energy metabolism, intra- and inter-cellular signaling, gene expression, and membrane properties, we identified the constituent fatty acids of the accumulating ependymal triglycerides using tandem mass spectrometry. Ionization of the three most increased triglycerides yielded predictions of oleic acid (OA) (18:1), palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), palmitoleic acid (16:1), eicosenoic acid (20:1), and eicosadienoic acid (20:2) side chains in an approximately 7:5:3:1:1:1 ratio (Figure 2D). Interestingly, these fatty acids are closely related within a common fatty acid biosynthetic pathway (Figure 2E). Together, these data reveal a panel of AD-associated triglycerides that accumulate at the brain-CSF interface and that are enriched in OA.

Short-Term ICV Infusion of OA Recapitulates Lipid Droplets and AD-Associated Triglycerides but Does Not Affect SVZ Neurogenesis

Because OA was the major fatty acid accumulating in the SVZ niche, we investigated the consequences of increasing local OA levels in the SVZ of WT mice. OA administration to WT mice for 7 days by direct intracerebroventricular (ICV) infusion resulted in the formation of ORO-positive ependymal lipid droplets that closely resembled those of 3xTg-AD mice and human AD patients (Figures 3A and 3B). Moreover, IMS showed a concomitant increase in AD-associated triglycerides (Figure 3C). To determine whether this was a direct or indirect consequence of OA administration, we traced the incorporation of the infused OA with a sensitive *in vivo* metabolic labeling procedure that uses OA comprised entirely of heavy ^{13}C (^{13}C OA) (Figures 3D–3F). Comparison of IMS spectra between ^{13}C OA and regular ^{12}C OA revealed that OA infusion into WT mice is sufficient to generate virtually all AD-associated triglycerides. For example, ^{13}C OA shifted the triglyceride 50:1 by exactly 18,060 atomic units (incorporation of one OA side chain), the triglyceride 52:2 by 18,060 and 36,120 atomic units (incorporation of up to two OA side chains) (Figures 3D–3F), the triglyceride 54:2 by 18,060 and 36,120 atomic units (incorporation of up to two OA side chains) and the species 54:3 by 18,060, 36,120, and 54,180 atomic units (incorporation of up to three OA side chains). Uptake of ^{13}C OA into each of the 12 AD-associated triglycerides is summarized in Figure 3F and shows that 11 of the 12 AD-associated triglycerides are replicated in WT mice simply by ICV infusion of OA. These metabolic labeling experiments also demonstrated that some AD-associated triglycerides contained ^{13}C OA that had been elongated (56:4 and 56:5), reduced (52:2 and 52:3), saturated (52:2 and 54:2), and/or desaturated (54:4, 56:4, and 56:5), revealing that OA at the brain-CSF interface can be used as a substrate to locally generate longer chain and polyunsaturated fatty acids.

We then assessed OA's effects on SVZ neurogenesis following this 7-day ICV infusion. Multi-stage analysis of SVZ neurogenesis revealed that there were no changes in any of the SVZ cell populations analyzed (Figures 3G–3M), including total cell proliferation (Figure 3G), proliferating NSCs (Figure 3H), number of pinwheel units (Figure 3I), number of neurospheres grown (Figure 3J), proliferating neuroblasts (Figure 3K), total neuroblasts (Figure 3L), and proliferating microglia or macrophages (Figure 3M). Thus, short-term elevation of a single fatty acid, OA,

is sufficient to induce ependymal lipid droplet accumulation and to replicate the AD-associated triglyceride phenotype, but it does not have a generalized inhibitory or toxic effect on the SVZ.

OA Treatment Selectively Suppresses NSC Activity

Little is known about the impact of fatty acids on NSC function. Because the 2- to 3-week *in vivo* division frequency of NSCs is much longer than the 7-day OA infusion paradigm used earlier, we employed more targeted *in vitro* and *in vivo* assays to specifically test whether excess OA negatively regulates NSC activity.

We found that OA concentration is a critical determinant of NSC colony formation in the *in vitro* neurosphere assay, because doubling the OA concentration was sufficient to convert it from a positive to a negative regulator of neurosphere formation (Figures 4A–4F and S3A–S3D). Neural precursors exposed to elevated OA at the time of initial plating (when neurosphere growth requires NSC activation) generated 50% fewer neurosphere colonies (Figures 4A and 4B). In contrast, neural precursors exposed to the same OA concentration after 4 days *in vitro* (when neurosphere growth is driven by proliferation of progenitors) were unaffected (Figures 4C and 4D). Consistent with a specific effect on NSCs, neurosphere self-renewal assays showed that when OA and vehicle-treated spheres of equal sizes were dissociated and re-plated under identical neurosphere-forming conditions, there were 20% fewer neurosphere-initiating NSCs in OA-treated neurospheres (Figures 4E and 4F). Flow cytometry (Figure 4G) and immunocytochemistry (Figures 4H and 4I) confirmed that 100 μM OA inhibits division of a sub-population of neural precursors but does not have a generalized impact on either proliferation or cell death. Thus, *in vitro*, elevated OA levels selectively inhibit NSC proliferation.

The previous data suggested a model in which OA accumulating in ependymal cells acts in a paracrine manner to dysregulate NSC activity. To begin exploring this idea, we first tested whether the SVZ of 3xTg-AD mice releases anti-neurogenic factors by growing WT NSCs in the presence of either 3xTg-AD or WT SVZ whole mounts. We found a 50% decrease in neurosphere number after whole mount co-culture from 3xTg-AD mice (Figure 4J), revealing that the SVZ of 3xTg-AD mice contains factors that inhibit NSC proliferation. Conditioned media from 3xTg-AD whole mounts likewise inhibited the neurosphere number by more than 50% when compared to WT whole mounts (Figure 4J), indicating that this AD-associated inhibitory activity is mediated by soluble rather than contact-mediated mechanisms. Interestingly, the decline in the neurosphere number is similar in magnitude to that observed following 100 μM OA treatment (Figures 4A and 4B). This confirms that soluble factors released from the 3xTg-AD niche inhibit NSC activity.

NSCs only divide once every several weeks *in vivo*, making it difficult to assess treatment-induced changes in their activity. We therefore employed a well-characterized SVZ regeneration assay to evaluate whether excess OA can suppress NSC activation *in vivo*. In this model, elimination of proliferating SVZ cells (primarily progenitors and neuroblasts) with the anti-mitotic agent cytosine arabinoside (AraC) results in more synchronized activation of the quiescent NSC pool, which then rapidly repopulates the SVZ niche (Doetsch et al., 1999). After 6 days of infusion of AraC with either OA or vehicle, pumps were removed and the animals were sacrificed 24-hr post-AraC withdrawal (Figures

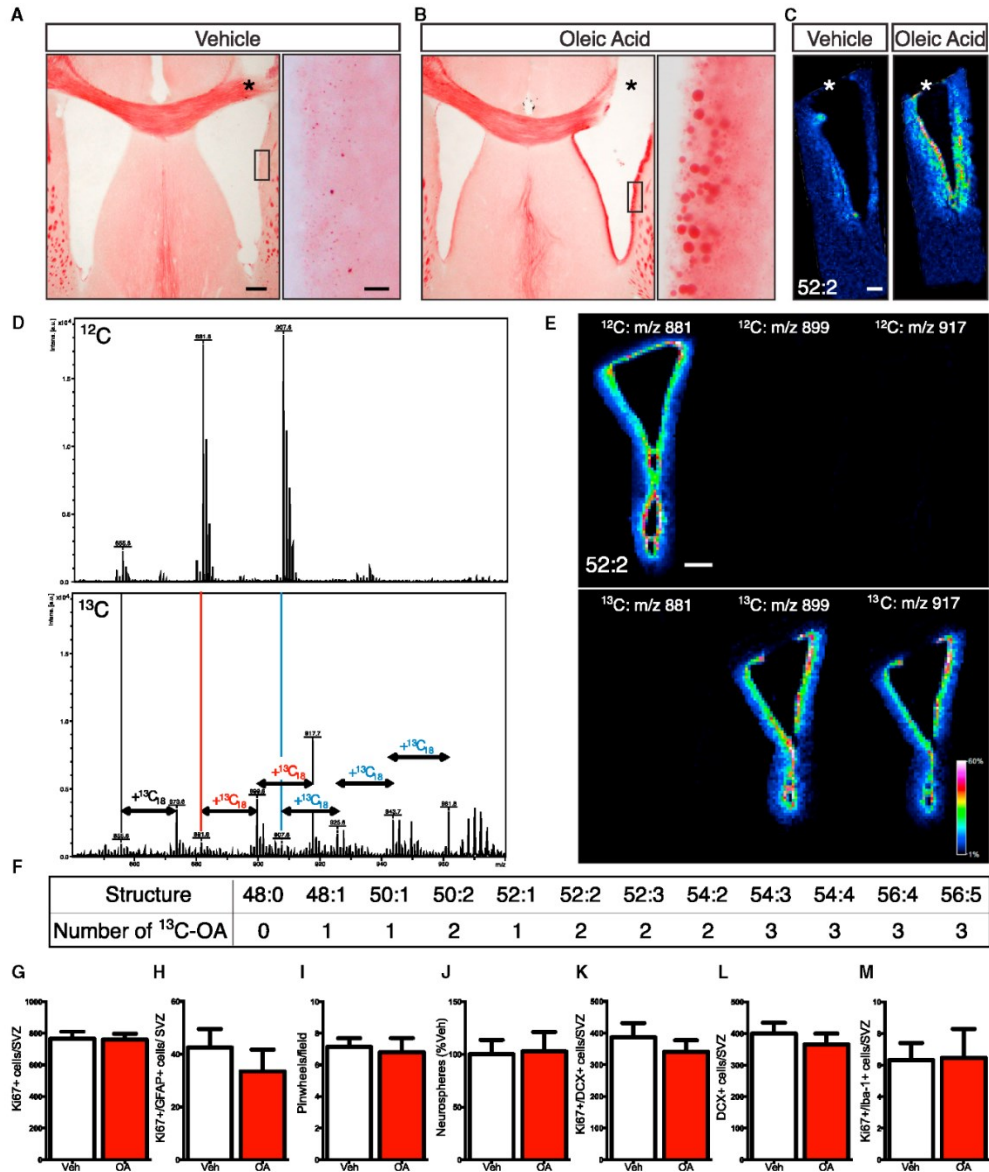


Figure 3. Short-Term ICV Infusion of OA Recapitulates Lipid Droplets and AD-Associated Triglycerides but Does Not Significantly Affect SVZ Neurogenesis

(A and B) ICV infusion of vehicle (n = 4) (A) or OA (n = 4) (B) for 7 days, with boxed areas magnified at the right.
(C) Representative IMS ion density maps following vehicle or OA infusion showing an AD-associated triglyceride that is induced by OA infusion.
(D and E) IMS following metabolic labeling with ¹²C OA (n = 3) versus ¹³C OA (n = 3) (D), with sample ion density maps of 52:2 (E).

(legend continued on next page)

4K–4N). No proliferating or post-mitotic neuroblasts were present in the SVZ (data not shown), consistent with previous findings (Doetsch et al., 1999) and validating that the AraC treatment was effective. Quantification revealed that OA inhibited the NSC-mediated recovery, significantly decreasing the total numbers of Ki67+ proliferating cells (Figure 4L) and Ki67+/GFAP+ proliferating NSCs (Figure 4M) when compared to vehicle. There was no significant impact on the numbers of proliferating microglia or macrophages within the SVZ (Figure 4N). Thus, increased OA within the SVZ niche can suppress proliferation of NSCs, adversely impacting their ability to maintain niche homeostasis.

Lipid Metabolism Alterations Occur within the SVZ Niche

The previous data suggested that OA accumulation at the brain-CSF interface is a key mediator of AD-associated NSC impairment. To identify a possible systemic origin of the accumulating OA, we studied the plasma and CSF of 3xTg-AD mice using a liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS)-based lipidomic approach (see Experimental Procedures and Figures S4 and S5). However, concentrations of the 12 AD-associated triglycerides and their associated free fatty acids were unchanged between 3xTg-AD mice and their WT controls in both these circulating fluids (Figures 5A and 5B). Moreover, the central versus peripheral lipid profiles of 3xTg-AD mice exhibited differential changes as cholesterol was increased in the 3xTg-AD plasma (Figure S5E) but not within the 3xTg-AD SVZ (Figure S2B). We therefore explored whether lipid metabolism was altered within the SVZ niche.

Gene expression in the microdissected SVZ of 3xTg-AD versus WT mice was compared using a 55,681-probe genome-wide microarray and revealed 993 significantly up- or downregulated genes (fold change ≥ 1.4 and $p \leq 0.005$) (Figure 5C). Functional analysis of this dataset identified cellular metabolism (comprising carbohydrate, nucleic acid, amino acid, and lipid metabolism) as one of the top five significantly altered categories, along with neurogenesis-related categories such as cognitive function, cell cycle, and proliferation and cellular differentiation (Figure 5D and Table S2). Manual and database-mediated extraction of lipid-related genes revealed that 142 of the 993 significantly modulated changes (14.3%) were lipid related (Figure 5E and Table S3), including genes implicated in various aspects of fatty acid metabolism (i.e., PLA2, SCD-1, ELOVL7, FABP5, LIPIN2, and NPC1).

Together, these data show that AD-associated triglycerides accumulating in SVZ ependymal cells are unlikely to originate in the periphery, and they identify the SVZ niche as a site of AD-associated alterations in lipid metabolism gene expression.

Hyper-Activation of AKT Signaling Mediates OA-Induced Impairment of NSC Activity

We next investigated ways of interfering with OA-induced NSC impairments. Studies of several peripheral cell types indicate

that OA release can modulate AKT activity in target cells (Lee et al., 2014; Shibata et al., 2013; Yun et al., 2006). Consistent with AKT being a possible mediator of OA's effects on NSCs, a single ICV injection of OA into WT mice led to hyper-phosphorylation of AKT within the ipsilateral SVZ within 4 hr (Figures 6A–6C). Similarly, when SVZ neural precursors were cultured using the neurosphere assay, acutely treated with OA, and then lysed after 15 min, 30 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr, and 24 hr, an increase in AKT signaling was observed beginning at the 4-hr point (Figures 6D and 6E and data not shown).

To begin testing whether OA-induced hyper-activation of AKT inhibits NSC activity, we used a pharmacological approach to suppress AKT phosphorylation in cultured neurosphere-derived cells (Figures 6D and 6E). This experiment showed that OA on its own increased phosphorylated AKT (pAKT), 12.5 μ M of the PI3-kinase inhibitor LY294002 eliminated basal pAKT, and when OA was combined with LY294002, OA normalized pAKT toward control levels (Figures 6D and 6E). OA treatment and LY inhibition did not have a statistically significant effect on phosphorylated extracellular signal-related kinase (pERK) (Figure 6D). Based on these biochemical data, we hypothesized that if OA-induced hyper-phosphorylation of AKT mediates its inhibition of NSCs, then simultaneous inhibition of pAKT with LY294002 should rescue OA's inhibition of neurosphere formation. Indeed, when neurospheres were passaged into the medium containing OA, LY294002, or OA+ LY294002, OA reduced the neurosphere number by 50% (as in our previous experiments), LY294002 dose-dependently inhibited the neurosphere number, and remarkably, OA's negative effect on neurosphere formation was converted to a positive effect when combined with LY294002 (i.e., an increased neurosphere number compared to vehicle) (Figures 6F and 6G). These data implicate AKT signaling as an important effector of OA's effects on NSCs *in vitro* and suggest that NSCs require an optimal level of AKT signaling: excess OA under normal conditions leads to a detrimental hyper-stimulation of AKT activity, whereas excess OA under conditions of insufficient AKT signaling leads to a beneficial normalization of AKT activity.

We then used an adult brain electroporation approach (Barnabé-Heider et al., 2008) to genetically target ventricle contacting GFAP-expressing NSCs, allowing us to determine whether AKT also mediates OA's effects on NSC proliferation *in vivo*. A plasmid encoding GFAP-cre was electroporated into the ventricle walls of adult R26-flox-stop-flox-EYFP mice to induce the expression of EYFP in GFAP+ NSCs and their progeny. The GFAP-cre plasmid was co-electroporated with plasmids encoding either kinase-dead AKT (KD-AKT) or empty vector (EV). Immediately following electroporation, 7-day mini-osmotic pumps were implanted for ICV infusion of either vehicle or OA to test the effects of OA on the electroporated ventricle-contacting NSCs (Figures 6H and 6I). Consistent with our previous data, quantification of the EYFP+ cells after 7 days showed that OA

(F) Table summarizing the number of ^{13}C OA chains incorporated into each AD-associated triglyceride.

(G–M) 7-day vehicle ($n = 5$) or OA ($n = 5$) infusion for quantification of Ki67+ proliferating cells (G), Ki67+/GFAP+ proliferating NSCs (H), whole-mount pinwheel units per field ($n = 3$ vehicle or $n = 4$ OA) (I), neurosphere number ($n = 3$ vehicle or $n = 4$ OA) (J), Ki67+/DCX+ proliferating neuroblasts (K), DCX+ neuroblasts (L), and Ki67+/Iba-1+ proliferating microglia (M) in the SVZ niche. Unpaired *t* test.

Scale bars in (A) (for A and B) represent 200 and 10 μ m and in (C) and (E) represent 200 μ m. Error bars represent mean \pm SEM. * in (A)–(C) denotes the ipsilateral injection side.

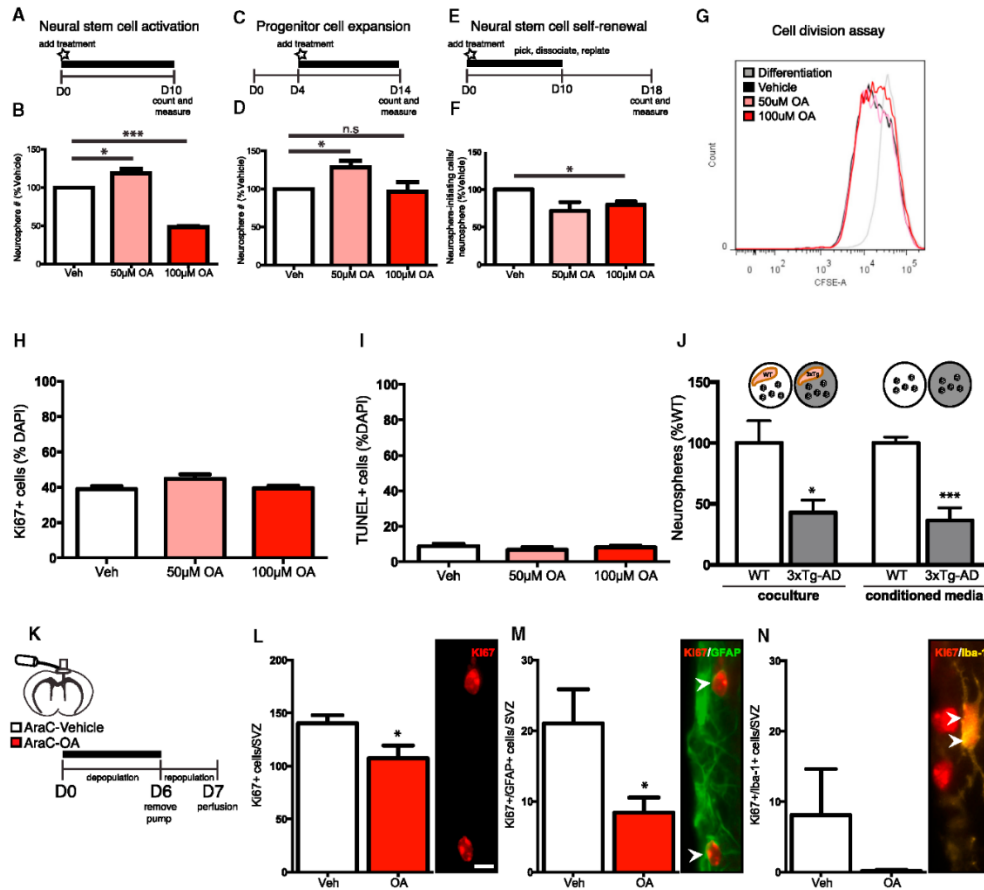


Figure 4. OA Treatment Selectively Suppresses NSC Activity In Vitro and In Vivo

(A–D) Primary neurospheres from C57BL/6 mice were dissociated and re-plated under neurosphere-forming conditions and treated with either vehicle or OA (50 or 100 µM) on the day of plating (D0, NSC activation) (A and B) or 4 days later (D4, progenitor expansion) (C and D) (n = 3 per condition). One-way ANOVA. (E and F) NSC self-renewal was assessed in dissociated secondary neurospheres plated in identical conditions after 10 days of continuous treatment with OA or vehicle (n = 6 per condition). One-way ANOVA.

(G) Dissociated primary neurospheres from C57BL/6 mice plated in the presence of EGF and treated on the day of plating with vehicle or 50 or 100 µM OA conjugated to the vehicle for 2–3 days (n = 3 per condition). Quantification by flow cytometry analysis of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), a cell division assay. Cells were differentiated without EGF as a positive control for differentiation. One-way ANOVA.

(H and I) Quantification of immunocytochemistry for Ki67 (proliferation) (H) and terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL, cell death) (I) (n = 3 per condition). One-way ANOVA.

(J) Neurosphere growth in the presence of 3xTg-AD or WT SVZ whole mounts (co-culture) (n = 4) or in the presence of filtered conditioned media from 3xTg-AD (n = 3) or WT (n = 5) whole mounts (conditioned media). Unpaired t test.

(K–N) ICV infusion of AraC with vehicle (n = 3) or OA (n = 4). Schematic of AraC SVZ regeneration assay (K) with quantification and representative micrographs of Ki67+ proliferating cells (L), Ki67+/GFAP+ proliferating NSCs (M), and Ki67+/Iba-1+ proliferating microglia (N) in the SVZ. Unpaired t test. Scale bars in (L) for L–N) represent 5 µm. *p ≤ 0.05 and ***p ≤ 0.0005. See also Figure S3.

infusion in the EV group resulted in a 37.6% decrease in EYFP+ cells relative to vehicle that approached statistical significance (p = 0.08) (Figure 6I). Importantly, this OA-induced suppression

of NSC proliferative expansion was attenuated in the KD-AKT group (Figure 6I), which exhibited only a 21.2% decrease relative to vehicle (p = 0.2). Together, these in vitro and in vivo rescue

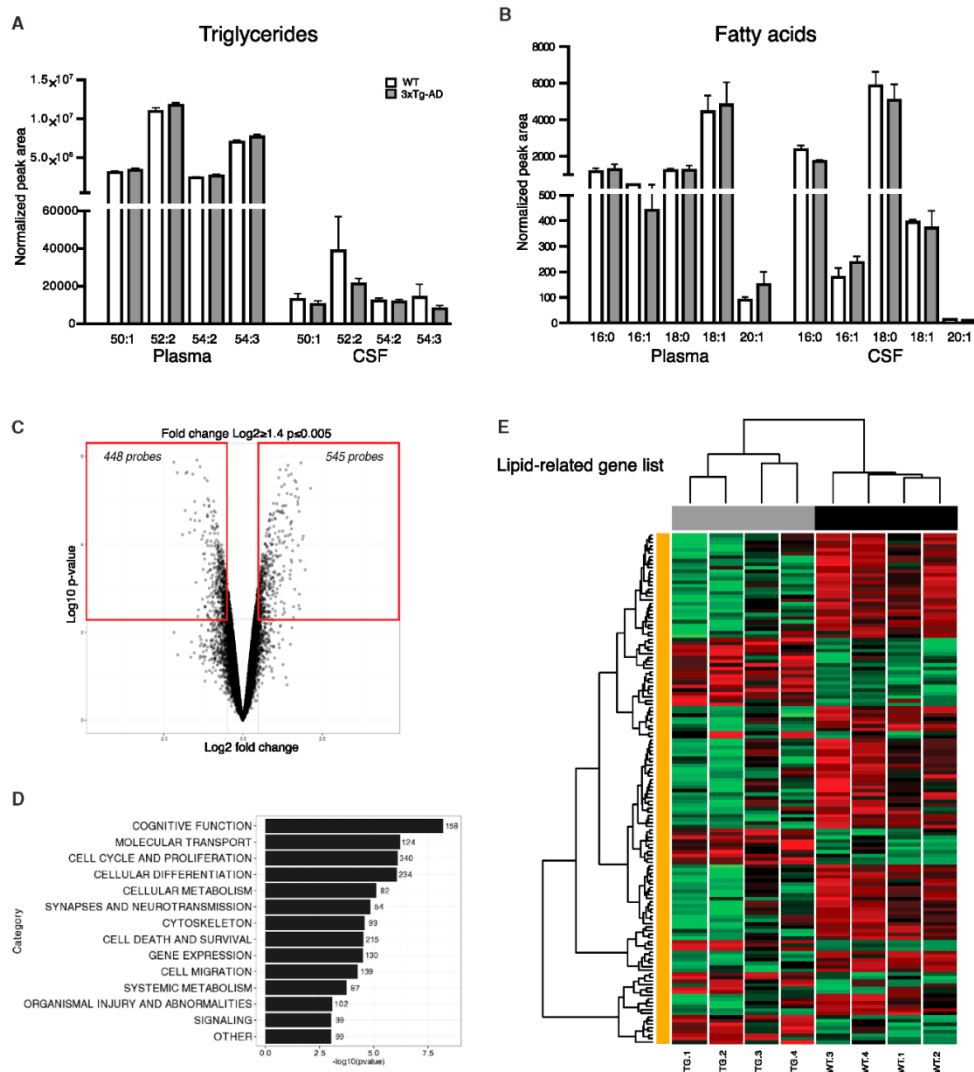


Figure 5. Lipid Metabolism Is Altered within the SVZ of 3xTg-AD Mice (A and B) LC-MS analysis of lipid species within plasma and CSF of WT and 3xTg-AD mice (n = 4). The normalized peak area for the four major AD-associated triglycerides (A) and their associated fatty acids (B) shows no significant differences. Unpaired t test. (C–E) Microarray of microdissected SVZs of 7-month-old WT and 3xTg-AD mice (n = 4). (C) Volcano plot. (D) Ingenuity pathway analysis of differentially regulated categories, hand-curated into thematic categories. (E) Heatmap of differentially regulated lipid-related genes, grouped hierarchically. Lipid-related genes were extracted from the list of 993 modulated genes manually and cross-referenced with the Gene Ontology terms lipid, lipoprotein, triglyceride, and fatty acid. Error bars represent mean \pm SEM. See also [Figures S4 and S5](#) and [Tables S2 and S3](#).

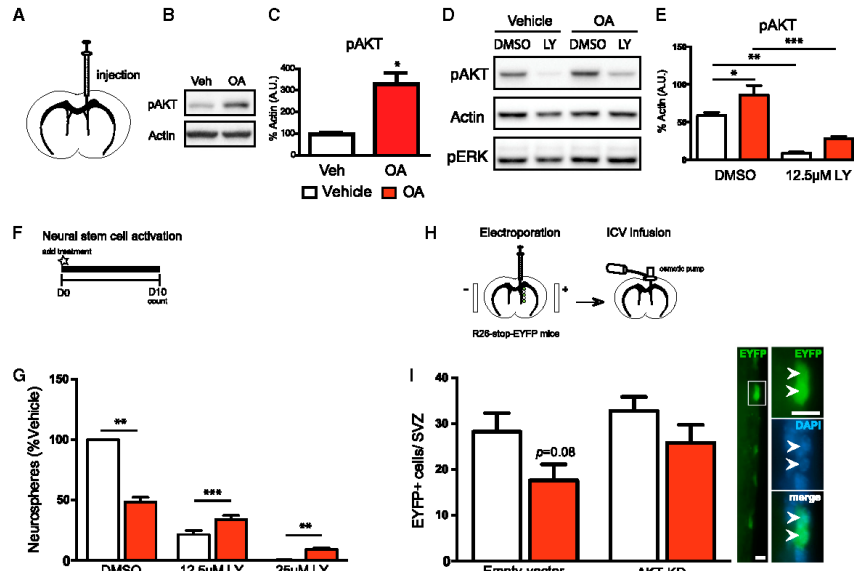


Figure 6. Hyper-Activation of AKT Signaling Mediates OA-Induced Impairment of NSC Activity

(A–C) Acute regulation of the AKT signaling pathway by OA in vivo. Representative western blot of ipsilateral SVZ microdissections 4 hr after ICV injection of vehicle (n = 4) or OA (n = 4) (B) with densitometric quantification of pAKT (C). Unpaired t test.

(D and E) Dissociated primary neurospheres from C57BL6 mice plated and grown in the presence of EGF for 2 days and acutely treated for 4 hr with either vehicle or 100 μ M OA alone or combined with 12.5 μ M of LY294002 (n = 3). Representative western blot (D) and densitometric quantifications for pAKT (E). One-way ANOVA.

(F and G) Neurospheres grown in the presence of vehicle or 100 μ M OA alone or combined with 12.5 or 25 μ M of LY294002 (n = 4). Paired t test.

(H and I) Electroporation of a plasmid encoding GFAP-cre into the ventricle walls of adult R26-flox-stop-flox-EYFP mice to induce the expression of EYFP in GFAP+ NSCs and their progeny. The GFAP-cre plasmid was co-electroporated with plasmids overexpressing either KD-AKT or EV. Immediately following electroporation, 7-day osmotic pumps were implanted for ICV infusion of either vehicle or OA (n = 6 animals per condition). Quantification and representative micrograph of the number of EYFP+ cells per ventricle, providing a measure of the proliferative expansion of the electroporated GFAP+ NSCs (I). Unpaired t test. Scale bars in (I) represent 25 μ m. Error bars represent mean \pm SEM. *p \leq 0.05, **p \leq 0.005, and ***p \leq 0.0005.

experiments provide evidence that exogenous OA suppresses NSC activity via hyper-activation of AKT signaling.

Inhibition of SCD-1 Activity Rescues NSC Impairment in 3xTg-AD Mice

To establish whether NSC suppression in 3xTg-AD mice is due to elevated endogenous OA levels, we tested whether pharmacological inhibition of the OA-producing enzyme, stearyl-CoA desaturase (SCD), could attenuate the NSC dysfunction. SCD-1 was identified in our microarray analysis of the 3xTg-AD SVZ and is increased in the brains of human AD patients, where levels of SCD-1-derived unsaturated fatty acids correlate negatively with memory performance (Astarita et al., 2011; Cunnane et al., 2012; Fraser et al., 2010). Thus, SCD-1 represents a mechanistically relevant target for NSC modulation in AD.

28-day ICV mini-osmotic pumps containing either vehicle or SCD-1 inhibitor ab142089 were implanted into 3xTg-AD mice at 2 months of age (i.e., the onset of NSC impairments in the SVZ). Analysis of brain sections of these mice by IMS confirmed that infusion of the SCD-1 inhibitor resulted in a generalized

reduction of the OA-enriched AD-associated triglycerides in the SVZ (Figure 7A). Remarkably, stage-specific neurogenesis analysis (Figures 7B–7E) revealed that SCD-1 inhibition prevented the decline in the total number of Ki67+ proliferating cells (Figure 7B) and in the Ki67+/GFAP+ NSC subpopulation (Figure 7C) in the SVZ of these 3xTg-AD mice, maintaining levels found in WT animals. Proliferating and total DCX+ neuroblast populations were not decreased in these mice (Figures 7D and 7E). SCD inhibition also caused a small increase in proliferating Iba1+ microglia in both WT and 3xTg-AD mice (WT, 0.0; 3xTg-AD, 3.22 \pm 1.834 for vehicle versus WT, 30.07 \pm 8.926; 3xTg-AD, 16.47 \pm 4.92 cells/SVZ for inhibitor). We also analyzed the DG niche of these mice (which is more distant from the ICV infusion site) and found a complete rescue of total cell proliferation (Figure 7F) and proliferating neuroblasts (Figure 7H), a partial rescue of NSC activity (Figure 7G) and total neuroblasts (Figure 7I), and no change in proliferating microglia (data not shown). This in vivo rescue experiment directly implicates aberrant OA metabolism in AD-associated NSC dysfunction, confirming the central hypothesis of this study and identifying a strategy for rescuing NSC activity in AD.

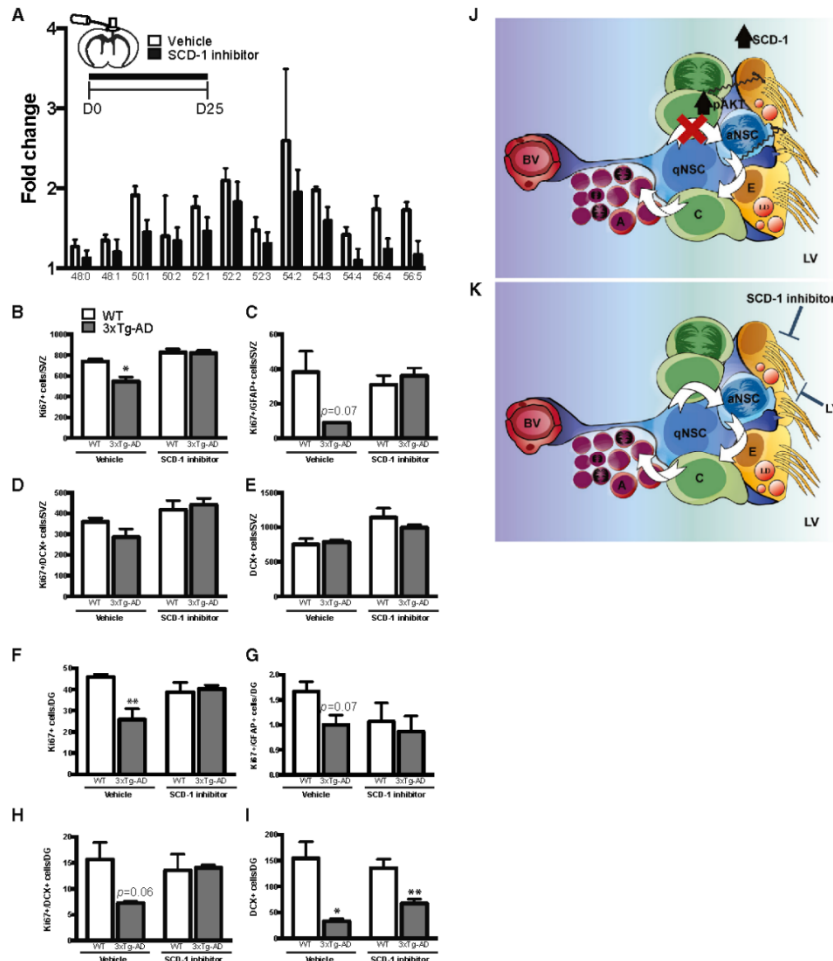


Figure 7. Inhibition of SCD-1 Activity In Vivo Counteracts NSC Impairment in 3xTg-AD Mice

(A) Cohorts of 2-month-old WT or 3xTg-AD mice were implanted with ICV osmotic pumps containing either vehicle (n = 3) or SCD-1 inhibitor (n = 5) for 25 days. The fold change summary of IMS on brain sections shows that SCD-1 inhibitor decreased the accumulation of AD-associated OA-enriched triglycerides in the SVZ. (B–E) Quantification of Ki67+ proliferating cells (B), Ki67+/GFAP+ proliferating NSCs (C), Ki67+/DCX+ proliferating neuroblasts (D), and DCX+ neuroblasts (E) in the SVZ. Unpaired t test.

(F–I) Quantification of Ki67+ proliferating cells (F), Ki67+/GFAP+ proliferating NSCs (G), Ki67+/DCX+ proliferating neuroblasts (H), and DCX+ neuroblasts (I) in the DG. Unpaired t test.

(J and K) Summary figure. (J) Elevated OA-enriched triglycerides within ependymal cells of 3xTg-AD mice leads to inhibition of NSC proliferation by OA-induced hyper-activation of AKT signaling. (K) Pharmacological inhibition of hyper-activated AKT signaling using a PI3K inhibitor (LY) or inhibition of SCD-1 alleviates OA's inhibitory effects on NSC activation and increases proliferation and neurogenesis. Error bars represent mean ± SEM. *p ≤ 0.05 and **p ≤ 0.005.

DISCUSSION

We identified lipid metabolism abnormalities within the NSC niche of AD mice and patients and used recently developed

methodologies to dissect their impact on NSC activity. Our results reveal a mechanism of stem cell dysregulation in which disease-induced perturbations of niche fatty acid metabolism suppress adult NSC activity. Moreover, they provide new

support for the notion that AD is, at least in part, a metabolic disease of the brain.

Niche Lipid Metabolism: A Regulator of NSCs

The complexity of identifying and localizing individual brain lipid species represents a major obstacle to deciphering the roles of specific lipids under normal and pathological conditions. Under normal conditions, SVZ neural precursors depend on fatty acid oxidation for proliferation (Stoll et al., 2015), while baseline and exercise-induced hippocampal neurogenesis and cognitive enhancement require brain fatty acid synthesis (Chorna et al., 2013; Knobloch et al., 2013). However, alterations in lipid metabolism are associated with many cognitive disorders, including Huntington's, Parkinson's, and Niemann-Pick's diseases, as well as AD (Adibhatla and Hatcher, 2008; de la Monte and Tong, 2014; Guschina et al., 2011; Martinez-Vicente et al., 2010; Merlo et al., 2010; Sharon et al., 2003). Using imaging techniques, we identified 12 triglycerides that are associated with lipid droplet accumulations in AD, that are enriched with OA side chains, and that selectively accumulate in ependymal cells of the SVZ niche. This accumulation occurred in the absence of changes in circulating triglycerides or fatty acids in either plasma or CSF. However, it was associated with extensive changes in local lipid metabolism gene expression within the SVZ, including in the OA-producing enzyme SCD, which is prominently expressed in peri-ventricular cells (Polo-Hernández et al., 2010; Polo-Hernández et al., 2014). Local OA elevation was sufficient to recapitulate the AD-associated triglyceride profile and selectively suppress NSC expansion *in vitro* and *in vivo*. Mechanistically, OA hyper-stimulated the critical AKT-signaling pathway involved in long-term NSC preservation. NSC proliferation impairments could be rescued (1) by inhibiting AKT hyper-activation (with kinase-dead AKT) in OA-treated WT mice or (2) by suppressing endogenous OA synthesis (with an SCD inhibitor) in 3xTg-AD mice. Thus, like many other niche signals, specific fatty acids produced within the NSC niche can influence NSC maintenance via regulation of NSC activation, quiescence, or both.

Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease

Neurogenesis occurs in both the human SVZ and the human hippocampus (Ernst and Frisén, 2015). In other vertebrates, hippocampal neurogenesis has been implicated in learning, memory, and mood regulation, and it is likely to have an analogous role in modulating function of the human hippocampus (Spalding et al., 2013). However, human SVZ neurogenesis exhibits a marked evolutionary divergence. Long-distance migration of SVZ-derived neuroblasts to the adult human olfactory bulbs is virtually non-existent (Bergmann et al., 2012), while neurogenesis in the SVZ-adjacent striatum is significantly increased (Ernst et al., 2014). Interestingly, the human striatum has profuse connections with the cortex, and the emergence of human striatal neurogenesis parallels the evolutionarily increased importance of this structure in higher cognitive functions such as cognitive flexibility and mesolimbic functions associated with regulation of reward, motivation, and pleasure (Bergmann et al., 2015).

Our data lead to the predictions that abnormalities in brain lipid metabolism suppress neurogenesis early during pathogen-

esis of human AD and that this suppression contributes to striatal and hippocampal dysfunction. Consistent with these ideas, atrophy of the hippocampus is a well-established occurrence in AD, and recent analyses of the deep brain gray matter have revealed that striatal abnormalities are more prominent than previously appreciated. Changes to the gross structure and size of the striatum occur early during progression of both familial (early onset) and more common sporadic (late onset) forms of AD (Cho et al., 2013; de Jong et al., 2011; de Jong et al., 2008; Pievani et al., 2013). Indeed, brain imaging has revealed that structural changes of both the striatum and the hippocampus are evident at pre- and early-symptomatic stages in carriers of familial AD-causing mutations (Cash et al., 2013; Lee et al., 2013; Ryan et al., 2013) and that the striatum in particular is the site of the earliest amyloid accumulations in familial AD (Klunk et al., 2007; Knight et al., 2011). In view of the major roles of the human striatum and hippocampus in higher cognition, testing the hypothesis that neurogenesis defects contribute to the early striatal and hippocampal changes occurring in human AD represents an important challenge. This will require the development of innovative diagnostic and imaging tools that can allow *in vivo* measurement of neurogenesis and ependymal fatty acid levels with high spatial resolution in pre-AD individuals.

Because the hippocampal NSC niche does not directly contact ependymal cells, the partial normalization of hippocampal neurogenesis in 3xTg-AD mice treated with SCD inhibitor suggests that accumulating ependymal lipids penetrate deeper into the brain parenchyma. In this regard, the principal genetic risk factor for sporadic AD is the ApoE4 polymorphism of ApoE, the main lipid transporting apolipoprotein produced in the brain. Inheritance of a single ApoE4 allele increases AD risk by a factor of 4, and two ApoE4 alleles increase the risk by a factor of 20 (Corder et al., 1994; Corder et al., 1993; Strittmatter and Roses, 1996). Furthermore, ApoE polymorphism affects adult neurogenesis (Levi and Michaelson, 2007; Li et al., 2009; Yang et al., 2011). It will therefore be of great interest to know whether the lipid metabolism changes in the SVZ niche have more widespread effects on other aspects of AD pathogenesis, such as gliosis, amyloid plaques, neurofibrillary tangles, cerebrovascular amyloidosis, or synaptic dysfunction.

Collectively, this work shows that excessive levels of OA at the ependymal surface of the brain result in the deterioration of neurogenic niches in AD. Besides directly contributing to cognitive decline, the observed suppression of NSC activity may explain why the brain's stem cell system does not mount a more robust protective or regenerative response in AD. Future work focused on fatty acid metabolism within the brain may lead to new therapeutic approaches to prevent cognitive decline and improve stem cell-mediated brain repair during AD.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and were approved by the institutional animal care committee of the Research Center of the University of Montreal Hospital.

Mouse Strains

Female 3xTg-AD PS1^{M148V}, APP^{Swe}, and Tau^{P301L}; their littermate WT strain (Oddo et al., 2003); and male C57BL6 mice were used in this study.

ICV Infusions

Alzet osmotic pumps (Durect) were stereotaxically implanted according to manufacturer's instructions. Pumps contained vehicle (fatty acid-free BSA), 500 μ M OA, 10 mM 12 C OA conjugated to vehicle, or 10 mM 13 C OA conjugated to vehicle (the latter for metabolic labeling studies). 2% AraC was ICV infused with vehicle or 500 μ M OA for 6 days, pumps were cut out, and mice sacrificed 24 hr later. Vehicle or 40 μ M SCD-1 inhibitor was ICV infused for 25 days in 2-month-old WT or 3xTg-AD mice.

ICV Acute Injections

A 10- μ l Hamilton syringe was used to inject 2 μ l (1 μ l/min) of vehicle or 500 μ M OA into the lateral ventricle of C57BL6 mice. Mice were sacrificed 4 hr later.

Adult Brain Electroporations

Electroporations were performed as described (Barnabé-Heider et al., 2008). Plasmids were stereotaxically injected into the left lateral ventricle (coordinates: 0-mm anterior-posterior, 0.9-mm medial-lateral, and 1.5-mm dorsoventral, relative to Bregma). Each animal received an ICV injection of 2 μ l, delivered over 1.5–2 min, containing 10 μ g of each plasmid (20 μ g total). Human GFAP-cre (Michael Brenner, Raul Torres, and Klaus Rajewsky, cat# 40591, Addgene) with either KD-AKT (AKT-K179N) (William Sellers, cat# 9007, Addgene) or pECE EV (William Rutter, cat# 26453, Addgene) plasmids was co-electroporated.

Neurosphere Assays

Neurospheres were generated using 20 ng/ml of epidermal growth factor (EGF) (Sigma) as described previously (Bouab et al., 2011), according to a procedure modified from Reynolds and Weiss (1992). Clonal neurospheres were grown at a density of 1.5 cells/ μ l in 24-well plates.

Laser Desorption Ionization Imaging Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry

Spectral acquisitions were performed on either a MALDI-TOF/TOF Ultraflex-treme mass spectrometer equipped with a SmartBeam II Nd:YAG/355-nm laser or a Solarix XR 7T ParaCell Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR). IMS data were acquired using 100 shots per pixel using a 10- μ m lateral resolution and with a spectral resolution of 80,000 μ m at a mass-to-charge (m/z) ratio of 881.7569.

LC-MS

Plasma and CSF lipid extractions were carried out on a Synapt G2-S instrument coupled to an Acquity UPLC Class I system both from waters.

Microarray

Microdissected SVZs from 7-month-old WT and 3xTg-AD mice were hybridized to the SurePrint G3 Mouse GE 8x60K microarray (Agilent Technologies). Microarray data are deposited in the GEO under accession number GEO: GSE60460.

Statistical Analysis

Two-tailed unpaired t test, paired Student's t test, or one-way ANOVA with Tukey post hoc test was used as indicated in figure legends. All error bars represent mean \pm SEM. The significance level was set at $p \leq 0.05$.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, five figures, and three tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.001>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.K.H. developed the concept, carried out experiments, analyzed data, and co-wrote the paper. M.D. and P.C. developed and carried out IMS experiments and analyzed data. S.E.J. contributed to neurogenesis experiments and flow cytometry. S.P. and M.P. carried out the human studies. A.A. contributed to neurogenesis experiments. F.B.-H. provided expertise with the in vivo electroporations. A.F. performed the LC-MS experiments and analyzed data.

F.C. provided the 3xTg-AD mice. K.J.L.F. developed the concept, performed surgeries, analyzed data, and co-wrote the paper. All authors revised the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. S. Lacroix and N. Fortin for CSF and plasma extractions; Bruker Daltonics for access to the FT-ICR; K. Kellersberger for assistance with all FT-ICR-related data acquisition; the Genomics platform at The Institute for Research on Immunology and Cancer (IRIC) for microarray and bio-informatics analyses; and D. Gauchat at the CRCHUM cytometry core facility for assistance with flow cytometry. L.K.H. is funded by studentships from the Alzheimer Society of Canada and the Fonds de recherche de Québec en Santé (FRQS). K.J.L.F. holds a Canada Research Chair in neural stem cell biology. This work has been supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

Received: October 5, 2014

Revised: June 9, 2015

Accepted: August 2, 2015

Published: August 27, 2015

REFERENCES

- Adibhatla, R.M., and Hatcher, J.F. (2008). Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell. Biochem.* **49**, 241–268.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* **64**, 146–148.
- Astarita, G., Jung, K.M., Vasilevko, V., Dipatrizio, N.V., Martin, S.K., Cribbs, D.H., Head, E., Cotman, C.W., and Piomelli, D. (2011). Elevated stearoyl-CoA desaturase in brains of patients with Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **6**, e24777.
- Barnabé-Heider, F., Meletis, K., Eriksson, M., Bergmann, O., Sabelström, H., Harvey, M.A., Mikkers, H., and Frisén, J. (2008). Genetic manipulation of adult mouse neurogenic niches by in vivo electroporation. *Nat. Methods* **5**, 189–196.
- Benner, E.J., Luciano, D., Jo, R., Abdi, K., Paez-Gonzalez, P., Sheng, H., Warner, D.S., Liu, C., Eroglu, C., and Kuo, C.T. (2013). Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature* **497**, 369–373.
- Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M.S., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Landén, M., Druid, H., et al. (2012). The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* **74**, 634–639.
- Bergmann, O., Spalding, K.L., and Frisén, J. (2015). Adult neurogenesis in humans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 1–12.
- Bouab, M., Paliouras, G.N., Aumont, A., Forest-Bérard, K., and Fernandes, K.J. (2011). Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* **173**, 135–149.
- Cash, D.M., Ridgway, G.R., Liang, Y., Ryan, N.S., Kinnunen, K.M., Yeatman, T., Malone, I.B., Benzinger, T.L., Jack, C.R., Jr., Thompson, P.M., et al.; Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN) (2013). The pattern of atrophy in familial Alzheimer disease: volumetric MRI results from the DIAN study. *Neurology* **81**, 1425–1433.
- Cho, H., Seo, S.W., Kim, J.H., Kim, C., Ye, B.S., Kim, G.H., Noh, Y., Kim, H.J., Yoon, C.W., Seong, J.K., et al. (2013). Changes in subcortical structures in early- versus late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **34**, 1740–1747.
- Chorna, N.E., Santos-Soto, I.J., Carballeira, N.M., Morales, J.L., de la Nuez, J., Cátala-Valentín, A., Chorny, A.P., Vázquez-Montes, A., and De Ortiz, S.P. (2013). Fatty acid synthase as a factor required for exercise-induced cognitive enhancement and dentate gyrus cellular proliferation. *PLoS ONE* **8**, e77845.
- Chuang, T.T. (2010). Neurogenesis in mouse models of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 872–880.
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., Deleo, A.M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* **82**, 545–559.

- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Jr., Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., Schmechel, K.E., et al. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 7, 180–184.
- Crews, L., Adame, A., Patrick, C., Delaney, A., Pham, E., Rockenstein, E., Hansen, L., and Masliah, E. (2010). Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *J. Neurosci.* 30, 12252–12262.
- Cunnane, S.C., Schneider, J.A., Tangney, C., Tremblay-Mercier, J., Fortier, M., Bennett, D.A., and Morris, M.C. (2012). Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 29, 691–697.
- de Chevigny, A., Cooper, O., Vinuela, A., Reske-Nielsen, C., Lagace, D.C., Eisch, A.J., and Isacson, O. (2008). Fate mapping and lineage analyses demonstrate the production of a large number of striatal neuroblasts after transforming growth factor alpha and noggin striatal infusions into the dopamine-depleted striatum. *Stem Cells* 26, 2349–2360.
- de Jong, L.W., van der Hiele, K., Veer, I.M., Houwing, J.J., Westendorp, R.G., Bollen, E.L., de Bruin, P.W., Middelkoop, H.A., van Buchem, M.A., and van der Grond, J. (2008). Strongly reduced volumes of putamen and thalamus in Alzheimer's disease: an MRI study. *Brain* 131, 3277–3285.
- de Jong, L.W., Ferrarini, L., van der Grond, J., Milles, J.R., Reiber, J.H., Westendorp, R.G., Bollen, E.L., Middelkoop, H.A., and van Buchem, M.A. (2011). Shape abnormalities of the striatum in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 23, 49–59.
- de la Monte, S.M., and Tong, M. (2014). Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* 88, 548–559.
- Demars, M., Hu, Y.S., Gadadhar, A., and Lazarov, O. (2010). Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 88, 2103–2117.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 17, 5046–5061.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11619–11624.
- Erlundsson, A., Lin, C.H., Yu, F., and Morshead, C.M. (2011). Immunosuppression promotes endogenous neural stem and progenitor cell migration and tissue regeneration after ischemic injury. *Exp. Neurol.* 230, 48–57.
- Ernst, A., and Frisén, J. (2015). Adult neurogenesis in humans—common and unique traits in mammals. *PLoS Biol.* 13, e1002045.
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156, 1072–1083.
- Etschmaier, K., Becker, T., Eichmann, T.O., Schweinzer, C., Scholler, M., Tam-Amersdorfer, C., PoECK, M., Schuligoi, R., Kober, A., Chirackal Manavalan, A.P., et al. (2011). Adipose triglyceride lipase affects triacylglycerol metabolism at brain barriers. *J. Neurochem.* 119, 1016–1028.
- Fraser, T., Tayler, H., and Love, S. (2010). Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 35, 503–513.
- Guschina, I., Millership, S., O'Donnell, V., Ninkina, N., Harwood, J., and Buchman, V. (2011). Lipid classes and fatty acid patterns are altered in the brain of γ -synuclein null mutant mice. *Lipids* 46, 121–130.
- Hamilton, L.K., Aumont, A., Julien, C., Vadnais, A., Calon, F., and Fernandes, K.J. (2010). Widespread deficits in adult neurogenesis precede plaque and tangle formation in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.* 32, 905–920.
- Hamilton, L.K., Joppé, S.E., Cochard, L.M., and Fernandes, K.J.L. (2013). Aging and neurogenesis in the adult forebrain: what we have learned and where we should go from here. *Eur. J. Neurosci.* 37, 1978–1986.
- Hussain, G., Schmitt, F., Loeffler, J.P., and Gonzalez de Aguilar, J.L. (2013). Fattening the brain: a brief of recent research. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 144.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., and Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat. Neurosci.* 11, 1153–1161.
- Klunk, W.E., Price, J.C., Mathis, C.A., Tsopelas, N.D., Lopresti, B.J., Ziolko, S.K., Bi, W., Hoge, J.A., Cohen, A.D., Ikonomic, M.D., et al. (2007). Amyloid deposition begins in the striatum of presenilin-1 mutation carriers from two unrelated pedigrees. *J. Neurosci.* 27, 6174–6184.
- Knight, W.D., Okello, A.A., Ryan, N.S., Turkheimer, F.E., Rodriguez Martinez de Llano, S., Edison, P., Douglas, J., Fox, N.C., Brooks, D.J., and Rossor, M.N. (2011). Carbon-11-Pittsburgh compound B positron emission tomography imaging of amyloid deposition in presenilin 1 mutation carriers. *Brain* 134, 293–300.
- Knobloch, M., Braun, S.M., Zurkirchen, L., von Schoutz, C., Zamboni, N., Araúzo-Bravo, M.J., Kovacs, W.J., Karalay, O., Suter, U., Machado, R.A., et al. (2013). Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature* 493, 226–230.
- Kolb, B., Morshead, C., Gonzalez, C., Kim, M., Gregg, C., Shingo, T., and Weiss, S. (2007). Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 983–997.
- Lazarov, O., and Marr, R.A. (2010). Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp. Neurol.* 223, 267–281.
- Lazarov, O., Mattson, M.P., Peterson, D.A., Pimplikar, S.W., and van Praag, H. (2010). When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci.* 33, 569–579.
- Lee, G.J., Lu, P.H., Medina, L.D., Rodriguez-Agudelo, Y., Melchor, S., Coppola, G., Braskie, M.N., Hua, X., Apostolova, L.G., Leow, A.D., et al. (2013). Regional brain volume differences in symptomatic and presymptomatic carriers of familial Alzheimer's disease mutations. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 154–162.
- Lee, S.M., Choi, H., Yang, G., Park, K.C., Jeong, S., and Hong, S. (2014). MicroRNAs mediate oleic acid-induced acute lung injury in rats using an alternative injury mechanism. *Mol. Med. Rep.* 10, 292–300.
- Levi, O., and Michaelson, D.M. (2007). Environmental enrichment stimulates neurogenesis in apolipoprotein E3 and neuronal apoptosis in apolipoprotein E4 transgenic mice. *J. Neurochem.* 100, 202–210.
- Li, G., Bien-Ly, N., Andrews-Zwilling, Y., Xu, Q., Bernardo, A., Ring, K., Halabisky, B., Deng, C., Mahley, R.W., and Huang, Y. (2009). GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell Stem Cell* 5, 634–645.
- Martin, S., and Parton, R.G. (2006). Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 373–378.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., and Cuervo, A.M. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat. Neurosci.* 13, 567–576.
- Matsumata, M., Sakayori, N., Maekawa, M., Owada, Y., Yoshikawa, T., and Osumi, N. (2012). The effects of Fabp7 and Fabp5 on postnatal hippocampal neurogenesis in the mouse. *Stem Cells* 30, 1532–1543.
- Merlo, S., Spampinato, S., Canonico, P.L., Copani, A., and Sortino, M.A. (2010). Alzheimer's disease: brain expression of a metabolic disorder? *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 537–544.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3, 265–278.
- Nho, K., Kim, S., Risacher, S.L., Shen, L., Comeveaux, J.J., Swaminathan, S., Lin, H., Ramanan, V.K., Liu, Y., Foroud, T.M., et al.; MIRAGE (Multi-Institutional

- Research on Alzheimer Genetic Epidemiology Study; AddNeuroMed Consortium; Indiana Memory and Aging Study; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2015). Protective variant for hippocampal atrophy identified by whole exome sequencing. *Ann. Neurol.* 77, 547–552.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., and LaFerla, F.M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 1063–1070.
- Pasinetti, G.M., and Eberstein, J.A. (2008). Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 106, 1503–1514.
- Perry, E.K., Johnson, M., Ekonomou, A., Perry, R.H., Ballard, C., and Attems, J. (2012). Neurogenic abnormalities in Alzheimer's disease differ between stages of neurogenesis and are partly related to cholinergic pathology. *Neurobiol. Dis.* 47, 155–162.
- Pievani, M., Bocchetta, M., Boccardi, M., Cavedo, E., Bonetti, M., Thompson, P.M., and Frisoni, G.B. (2013). Striatal morphology in early-onset and late-onset Alzheimer's disease: a preliminary study. *Neurobiol. Aging* 34, 1728–1739.
- Podtelezhnikov, A.A., Tanis, K.Q., Nebozhyn, M., Ray, W.J., Stone, D.J., and Loboda, A.P. (2011). Molecular insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease and its relationship to normal aging. *PLoS ONE* 6, e29610.
- Polo-Hernández, E., De Castro, F., García-García, A.G., Tabemero, A., and Medina, J.M. (2010). Oleic acid synthesized in the periventricular zone promotes axonogenesis in the striatum during brain development. *J. Neurochem.* 114, 1756–1766.
- Polo-Hernández, E., Tello, V., Arroyo, A.A., Domínguez-Prieto, M., de Castro, F., Tabemero, A., and Medina, J.M. (2014). Oleic acid synthesized by stearoyl-CoA desaturase (SCD-1) in the lateral periventricular zone of the developing rat brain mediates neuronal growth, migration and the arrangement of prospective synapses. *Brain Res.* 1570, 13–25.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Ryan, N.S., Keihaninejad, S., Shakespeare, T.J., Lehmann, M., Crutch, S.J., Malone, I.B., Thornton, J.S., Mancini, L., Hyare, H., Youssry, T., et al. (2013). Magnetic resonance imaging evidence for presymptomatic change in thalamus and caudate in familial Alzheimer's disease. *Brain* 136, 1399–1414.
- Sakamoto, M., Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2011). Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 8479–8484.
- Sakamoto, M., Ieki, N., Miyoshi, G., Mochimaru, D., Miyachi, H., Imura, T., Yamaguchi, M., Fishell, G., Mori, K., Kageyama, R., and Imayoshi, I. (2014). Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. *J. Neurosci.* 34, 5788–5799.
- Sharon, R., Bar-Joseph, I., Frosch, M.P., Walsh, D.M., Hamilton, J.A., and Selkoe, D.J. (2003). The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. *Neuron* 37, 583–595.
- Shibata, E., Kanno, T., Tsuchiya, A., Kuribayashi, K., Tabata, C., Nakano, T., and Nishizaki, T. (2013). Free fatty acids inhibit protein tyrosine phosphatase 1B and activate Akt. *Cell. Physiol. Biochem.* 32, 871–879.
- Smukler, S.R., Amtfield, M.E., Razavi, R., Bikopoulos, G., Karpowicz, P., Seaberg, R., Dai, F., Lee, S., Ahrens, R., Fraser, P.E., et al. (2011). The adult mouse and human pancreas contain rare multipotent stem cells that express insulin. *Cell Stem Cell* 8, 281–293.
- Snyder, J.S., Kee, N., and Wojtowicz, J.M. (2001). Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* 85, 2423–2431.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., et al. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219–1227.
- Stoll, E.A., Makin, R., Sweet, I.R., Trevelyan, A.J., Miwa, S., Horner, P.J., and Turnbull, D.M. (2015). Neural stem cells in the adult subventricular zone oxidize fatty acids to produce energy and support neurogenic activity. *Stem Cells* 33, 2306–2319.
- Strittmatter, W.J., and Roses, A.D. (1996). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 53–77.
- Talwar, P., Silla, Y., Grover, S., Gupta, M., Agarwal, R., Kushwaha, S., and Kukreti, R. (2014). Genomic convergence and network analysis approach to identify candidate genes in Alzheimer's disease. *BMC Genomics* 15, 199.
- Tanzi, R.E. (2012). The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1–10.
- Tavazoei, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., and Doetsch, F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 279–288.
- Yang, C.P., Gilley, J.A., Zhang, G., and Kerner, S.G. (2011). ApoE is required for maintenance of the dentate gyrus neural progenitor pool. *Development* 138, 4351–4362.
- Yun, M.R., Lee, J.Y., Park, H.S., Heo, H.J., Park, J.Y., Bae, S.S., Hong, K.W., Sung, S.M., and Kim, C.D. (2006). Oleic acid enhances vascular smooth muscle cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Pharmacol. Res.* 54, 97–102.
- Ziabreva, I., Perry, E., Perry, R., Minger, S.L., Ekonomou, A., Przyborski, S., and Ballard, C. (2006). Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *J. Psychosom. Res.* 61, 311–316.