

Université de Montréal

**L'effet du vieillissement sur les cellules souches neurales  
adultes**

par

Meriem Bouab

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en pathologie et biologie cellulaires

option système nerveux

Mai, 2010

© Meriem Bouab, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**L'effet du vieillissement sur les cellules souches neurales adultes**

Présenté par :  
Meriem Bouab

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Laurent Descarries, président-rapporteur  
Dr Karl Fernandes, directeur de recherche  
Dre Nicole Leclerc, membre du jury



## Résumé

La neurogenèse persiste à l'âge adulte dans deux régions du système nerveux central (SNC) des mammifères : la zone sous-ventriculaire (SVZ) du cerveau antérieur et la zone sous-granulaire (SGZ) de l'hippocampe. Cette neurogenèse est possible grâce à la capacité de prolifération des cellules souches présentes dans les niches de la SVZ et la SGZ, mais en vieillissant, le cerveau subit une diminution dramatique du nombre de cellules souches neurales adultes (CSNa), une diminution de la prolifération cellulaire et une altération des niches de neurogenèse. Cependant, une importante question reste sans réponse : comment la perte tardive des CSNa est temporellement reliée aux changements de l'activité de prolifération et de la structure de la principale niche de neurogenèse (la SVZ)? Afin d'avoir un aperçu sur les événements initiaux, nous avons examiné les changements des CSNa et de leur niche dans la SVZ entre le jeune âge et l'âge moyen. La niche de la SVZ des souris d'âge moyen (12 mois) subit une réduction de l'expression des marqueurs de plusieurs sous-populations de précurseurs neuraux en comparaison avec les souris jeunes adultes (2 mois). Anatomiquement, cela est associé avec des anomalies cytologiques, incluant une atrophie générale de la SVZ, une perte de la couche de cellules sous-épendymaires par endroit et l'accumulation de gouttelettes lipidiques de grande taille dans l'épendyme. Fonctionnellement, ces changements sont corrélés avec une diminution de l'activité de la SVZ et une réduction du nombre de nouveaux neurones arrivant aux bulbes olfactifs. Pour déterminer si les CSNa de la SVZ ont subi des changements visibles, nous avons évalué les paramètres clés des CSNa *in vivo* et *in vitro*. La culture cellulaire montre qu'un nombre équivalent de CSNa ayant la capacité de former des neurosphères peut être isolé du cerveau du jeune adulte et d'âge moyen. Cependant, à l'âge moyen, les précurseurs neuraux semblent moins sensibles aux facteurs de croissance durant leur différenciation *in vitro*. Les CSNa donnent des signes de latence *in vivo* puisque leur capacité d'incorporation et de rétention du BrdU diminue. Ensemble, ces données démontrent que, tôt dans le

processus du vieillissement, les CSNa et leur niche dans la SVZ subissent des changements significatifs, et suggèrent que la perte de CSNa liée au vieillissement est secondaire à ces événements.

**Mots-clés :** Cellule souche neurale, progéniteur, neuroblaste, neurone, cellule épendymaire, neurogenèse, prolifération, neurosphère, gouttelette lipidique, vieillissement du cerveau, âge moyen, zone sous-ventriculaire, bulbe olfactif.

## Abstract

Neurogenesis persists throughout the adulthood in two regions of the mammalian central nervous system (SNC): the sub-ventricular zone (SVZ) of the forebrain and the sub-granular zone (SGZ) of the hippocampus. Neurogenesis is possible due to the proliferation capacity of stem cells present within both the SVZ and SGZ niches, but with aging, the forebrain undergoes a drastic reduction in its number of adult neural stem cells (aNSCs), a decrease of cell proliferation and an alteration of the neurogenic niches. However, a key unresolved question remains: how the onset of aNSC loss is temporally related to changes of proliferating activity and to structural alterations within the principal stem cell niche (the SVZ)? To gain insights into the initial events leading to aging-associated aNSC loss, we investigated the changes occurring to aNSCs and the SVZ niche between young adulthood and middle-age. The SVZ niche of middle-aged mice (12-months-old) was found to display reduced expression of markers for multiple neural precursor sub-populations when compared to young adult mice (2-months-old). Anatomically, this was associated with significant cytological aberrations, including an overall atrophy of the SVZ, loss of sub-ependymal cells, and accumulation of large lipid droplets within the ependyma. Functionally, these changes correlated with diminished SVZ activity and reduced number of newly born neurons reaching the principal target tissue: the olfactory bulbs. To determine whether changes were evident at the level of the SVZ stem cells, we evaluated key *in vitro* and *in vivo* parameters of aNSCs. Tissue culture experiments showed that equal numbers of neurosphere-forming aNSCs could be isolated from young adult and middle-aged forebrains. However, at middle-age, neural precursors seemed to be less sensitive to growth factors during their *in vitro* differentiation and displayed signs of increased quiescence *in vivo*. Collectively, these findings demonstrate that, with early aging, aNSCs and their SVZ niche go through significant changes, and suggest that aging-associated aNSC loss is secondary to these events.

**Keywords:** Neural stem cell, progenitor, neuroblast, neuron, ependymal cell, neurogenesis, proliferation, neurosphere, lipid droplet, brain aging, middle-age, sub-ventricular zone, olfactory bulbs.

## Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	iii
Liste des figures.....	vii
Liste des acronymes et abréviations .....	viii
Introduction .....	1
1. Définition de la cellule souche : toti-, pluri- et multipotentialité .....	2
2. La cellule souche neurale .....	5
2.1. La cellule souche neurale en développement .....	5
2.1.1. La cellule neuroépithéliale.....	5
2.1.2. La glie radiaire.....	6
2.2. La cellule souche neurale adulte.....	9
2.2.1. Présence de cellules souches dans le cerveau adulte .....	9
2.2.2. Localisation des cellules souches neurales adultes.....	11
2.2.2.1. La zone sous-ventriculaire.....	12
2.2.2.2. L'hippocampe.....	17
2.2.3. Importance de la neurogenèse adulte.....	18
3. Le vieillissement.....	19
3.1. Le vieillissement du système nerveux central .....	19
3.2. Le vieillissement des niches des cellules souches neurales.....	21
3.2.1. La zone sous-ventriculaire.....	21
3.2.2. L'hippocampe .....	23
Problématique.....	24
Objectifs.....	25
Manuscrit.....	26
1. Identification de l'article .....	27
2. Contribution des auteurs.....	28
3. Contenu du manuscrit.....	29

Abbreviations.....	30
Summary.....	31
1. Introduction .....	32
2. Experimental procedures .....	34
3. Results .....	41
4. Discussion.....	57
Acknowledgements .....	63
Reference list.....	64
Discussion.....	68
1. La perte des cellules épendymaires .....	69
2. Le contrôle de la prolifération .....	71
3. Latence et activation des cellules souches.....	72
4. Freiner ou accélérer le vieillissement .....	75
4.1. L'effet de l'environnement sur l'équilibre du SNC.....	76
4.1.1. L'effet de la nutrition sur l'équilibre du système nerveux central.....	77
Réflexion... ..	82
Bibliographie .....	i
Annex I .....	xv
Clonalité des neurosphères .....	xv

# Liste des figures

## *Figures du mémoire*

Figure 1 : La formation du tube neural.....	4
Figure 2 : La migration nucléaire intercinétique.....	8
Figure 3 : La neurogenèse persiste à l'âge adulte dans deux niches.....	15
Figure 4 : Les marqueurs moléculaires des cellules neurales.....	16
Figure 5 : Liens de causalité possibles .....	25
Figure 6 : L'importance de Noggin dans le processus de la neurogenèse .....	74
Figure 7 : Causes de la latence des CSNa de la SVZ.....	74
Figure 8 : Les voies de signalisation possiblement impliquées dans le vieillissement.....	81
Figure 9 : La clonalité des neurosphères.....	xvi

## *Figures du manuscrit*

Figure M1: Relationship between proliferation and cell lineage markers in the SVZ of young adult mice .....	44
Figure M2: Age-related changes in expression of SVZ precursor markers between early adulthood and middle-age .....	47
Figure M3: Cytological changes within the SVZ niche between early and mid-adulthood .....	49
Figure M4: BrdU-retaining cells are decreased in the middle-aged SVZ and OB.....	53
Figure M5: The number and <i>in vitro</i> proliferative capacity of middle-aged SVZ neural precursors are unchanged but their responses to growth factors are altered .....	56
Figure M6: Summary of age-associated changes occurring in the SVZ stem cell niche between early adulthood and middle-age.....	58

# Liste des acronymes et abréviations

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**aNSC** : *adult neural stem cell* (Texte anglais)

**ARN** : acide ribonucléique

**BDNF** : facteur neurotrophique dérivé du cerveau (*brain-derived neurotrophic factor*)

**BLBP** : *brain lipid-binding protein*

**BMP** : *bone morphogenetic protein*

**BrdU** : 5-Bromo-2'-deoxyuridine

**CA3** : corne d'Ammon 3

**CC** : corpus callosum

**CNS** : *central nervous system* (Texte anglais)

**CSH** : cellule souche hématopoïétique

**CSN** : cellule souche neurale

**CSNa** : cellule souche neurale adulte

**DAB** : 3,3-diaminobenzidine

**DCX** : doublecortin

**DG** : gyrus dentelé (*dentate gyrus*)

**EGF** : facteur de croissance épithélial (*epithelial growth factor*)

**FGF2** : facteur de croissance fibroblastique-2 (*fibroblast growth factor-2*)

**GCL** : couche de cellules granulaires (*granular cell layer*)

**GFAP**: *glial fibrillary acidic protein*

**GFP** : protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*)



**GLAST** : transporteur de glutamate spécifique aux astrocytes

**IHC** : *immunohistochemistry*

**LV** : lateral ventricle ((Texte anglais)

**Mash1** : *mammalian achaete scute homolog 1*

**OB** : bulbe olfactif (*olfactory Bulb*)

**Olig2** : *oligodendrocyte transcription factor 2*

**PECAM** : *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*

**RMS** : courant de migration rostrale (*rostral migratory stream*)

**SGZ** : zone sous-granulaire (*sub-granular zone*)

**SNC** : système nerveux central

**St** : Striatum

**SVZ** : zone sous-ventriculaire (*sub-ventricular zone*)

**TOR** : cible de rapamycine (*target of Rapamycin*)

**VL** : ventricule latéral

**VZ** : zone ventriculaire

*Je dédie ce travail*

*À ma chère mère, mon exemple de courage  
qui m'inspire à chaque instant,  
À mon cher père, qui m'a toujours poussé  
jusqu'au bout de mes capacités,  
À mon époux, pour son soutien et ses  
encouragements continus,  
À mon trésor Zafia Shaymaa,  
qui a subi les conséquences de mon absence  
durant ses deux premières années de vie,  
À toutes les personnes qui m'ont  
encouragée à compléter mes études.*

*Merci Bon Dieu pour votre Aide.*

*Meriem Bouab*

## Remerciements

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, le Dr Karl Fernandes, pour m'avoir donné la possibilité de travailler sur ce projet, pour le temps qu'il m'a généreusement accordé, ainsi que pour son encadrement et ses conseils pertinents.*

*Je remercie Anne Aumont qui m'a encadrée depuis mon arrivée au laboratoire, qui m'a enseigné plusieurs méthodes expérimentales et qui m'a aidée à réaliser plusieurs expériences qui figurent dans ce mémoire.*

*Je remercie tous les membres du laboratoire pour leurs commentaires et leurs conseils durant les longues heures de réunions hebdomadaires.*

*Je remercie mes marraines, les Dres Nicole Leclerc et Adriana Di Polo, et les membres du département de pathologie et biologie cellulaire, dont le Dr Laurent Descarries, président-rapporteur du jury de mon mémoire, pour leur support matériel et intellectuel.*

*Meriem Bouab*

# **Introduction**

# 1. Définition de la cellule souche : toti-, pluri- et multipotentialité

La cellule souche est une cellule peu ou pas différenciée présente dans tous les organismes pluricellulaires. Elle est capable de se diviser pour se reproduire et/ou produire des cellules plus différenciées. Les cellules souches sont classées selon leur degré de différenciation en cellules souches totipotentes, cellules souches pluripotentes et cellules souches multipotentes.

La cellule souche totipotente est la cellule la moins différenciée de l'organisme. Elle est capable de former l'organisme au complet. Elle est produite durant la reproduction sexuelle (zygote) ou asexuelle (spore). Chez les métazoaires, la fusion des deux gamètes forme l'ovule fécondé. Cette cellule est la **cellule souche totipotente** absolue, puisqu'elle est capable de former tout le tissu embryonnaire et extra-embryonnaire. D'un zygote à un fœtus, l'embryogenèse passe par quatre phases : la segmentation, la gastrulation, la neurulation et l'organogenèse. Dans la phase de segmentation, le zygote, présentant déjà un début de spécialisation lors de sa première division asymétrique (Bischoff et al., 2008, Schneider and Bowerman, 2003, Antczak and Van Blerkom, 1997), passe par des mitoses successives pour former la morula puis le blastocyste. À ce stade, les cellules sont **pluripotentes**, car chacune est capable de former tous les tissus de l'embryon, mais pas le tissu extra-embryonnaire dont le placenta, donc pas l'organisme au complet. L'embryon passe par la phase de gastrulation, où se forment les trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme, l'endoderme et plus tard le mésoderme. La neurulation commence par la prolifération et la migration de cellules mésodermiques au pôle crânial pour former la chorde (notochorde) qui induit la formation de la plaque neurale par l'ectoderme. Les cellules épithéliales de la plaque neurale (cellules neuroépithéliales) se replient vers l'intérieur pour former la gouttière neurale, laquelle va se fermer pour devenir le tube

neural (Figure 1). Jusqu'à cette étape de développement, les cellules du tube neural sont pluripotentes, mais elles deviendront rapidement **multipotentes**. Au début de l'organogenèse, marquée par le bourgeonnement des principaux organes, survient la segmentation (i) du tube neural, qui deviendra le système nerveux central : cerveau et moelle épinière et (ii) des crêtes neurales, lesquelles donneront le système nerveux périphérique, somatique et végétatif (Delhay-Bouchaud, 2001). Lors de cette étape, les cellules souches sont déjà multipotentes, c'est-à-dire capable de produire tous les types cellulaires présents dans le tissu, mais non ceux d'autres tissus.

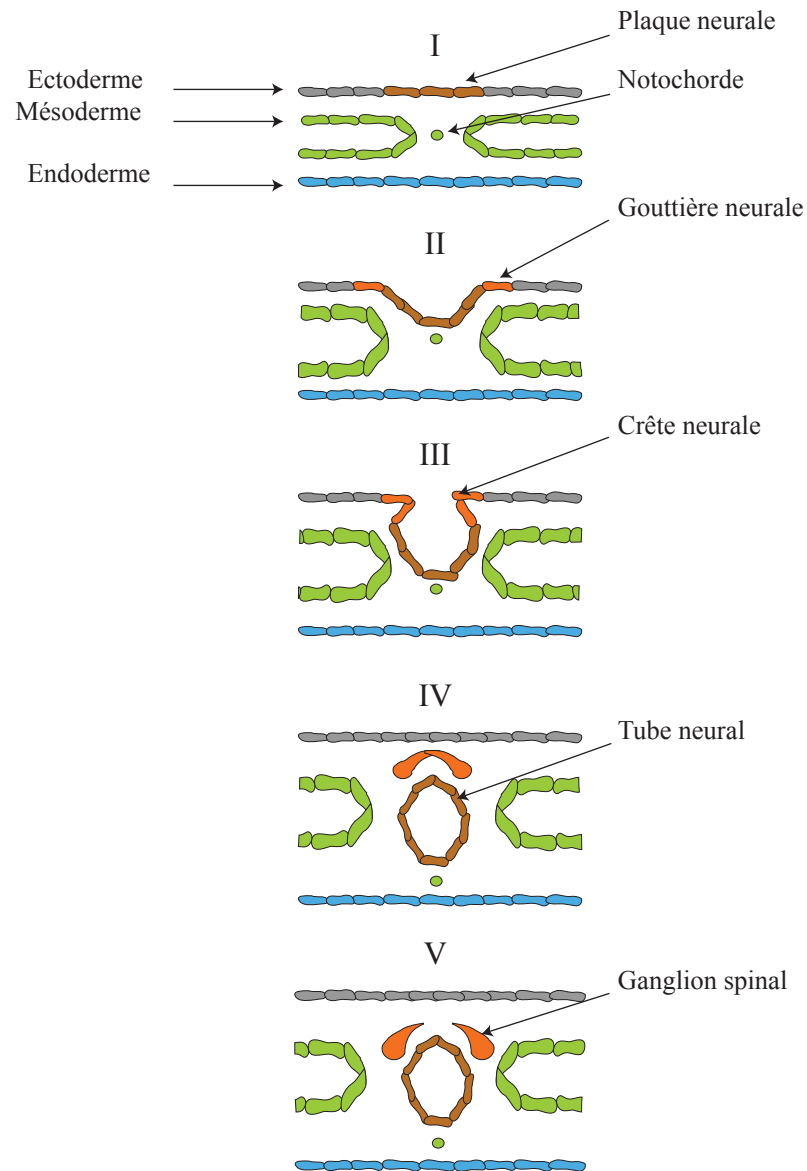


Figure 1: **La formation du tube neural.** La prolifération des cellules mésodermiques et leur migration au pôle cranial forme la notochorde. Les signaux libérés par la notochorde induisent la différenciation des cellules ectodermiques adjacentes pour former la plaque neurale (I). Les cellules de la plaque neurale prolifèrent et s'invaginent pour former la gouttière neurale (II). Les cellules des extrémités de la gouttière neurale se différencient en cellules de la crête neurale (III). La gouttière poursuit sa fermeture pour former le tube neural (IV), et les cellules de la crête neurale se séparent et migrent pour devenir les ganglions spinaux et les futurs nerfs périphériques (V).

## **2. La cellule souche neurale**

Les cellules souches neurales (CSN) sont des cellules multipotentes capables de produire tous les types de cellules des lignées neuronale et gliale. Elles sont présentes dans le système nerveux central (SNC) depuis le développement embryonnaire jusqu'à la mort de l'organisme. Selon le stade de développement, la CSN change d'identité et de rôle pour accomplir diverses fonctions.

### **2.1. La cellule souche neurale en développement**

Les neurones et les cellules de la macroglie (astrocytes, oligodendrocytes et cellules épendymaires) sont tous dérivés du neuroépithélium pseudo-stratifié d'origine ectodermique, mais leur production est espacée dans le temps selon le stade de développement embryonnaire ou postnatal (Delhaye-Bouchaud, 2001, Farkas and Huttner, 2008, Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

#### **2.1.1. La cellule neuroépithéliale**

Chez l'embryon, le tube neural (futur SNC) est formé d'une couche de cellules neuroépithéliales, dont la surface apicale borde la cavité ventriculaire et la surface piaie est en contact avec la zone marginale. Ces cellules se divisent de manière symétrique pour augmenter leur nombre (Figure 2a) (Fujita, 1964, 1970, Delhaye-Bouchaud, 2001, Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Elles ont une apparence pseudo-stratifiée grâce au phénomène de migration nucléaire intercinétique liée à leur cycle cellulaire : un mouvement des noyaux entre la surface piaie, où a lieu la synthèse d'ADN (la phase S du cycle cellulaire), et la surface apicale, où a lieu la division cellulaire (la phase M du cycle cellulaire) (Delhaye-Bouchaud, 2001, Farkas and Huttner, 2008). Au début de la neurogenèse corticale, vers le 9<sup>e</sup> jour



embryonnaire chez la souris, les cellules neuroépithéliales entrent en division asymétrique, avec le même type de mouvement nucléaire, pour donner une cellule neuroépithéliale et un neurone (Figure 2a). Durant le processus de maturation, les neurones s'accumulent dans une couche interne, qui va devenir la substance grise, alors que leurs axones (prolongements cytoplasmiques spécialisés) forment une couche marginale, qui va devenir la substance blanche (Delhay-Bouchaud, 2001). À mesure que le cortex s'épaissit par accumulation des neurones, les cellules neuroépithéliales allongent leurs prolongements piaux pour garder contact avec la zone marginale et se transforment graduellement en glie radiaux (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

### **2.1.2. La glie radiaire**

La transformation en glie radiaire commence par l'expression de marqueurs gliaux par les cellules neuroépithéliales, comme les filaments intermédiaires, nestine, vimentine et GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), et les protéines gliales GLAST (transporteur de glutamate spécifique aux astrocytes) et BLBP (*brain lipid-binding protein*) (Choi and Lapham, 1978, Choi, 1988, Campbell and Gotz, 2002, Kriegstein and Gotz, 2003, Gotz and Huttner, 2005, Mori et al., 2005, Farkas and Huttner, 2008). À ce stade, les interactions cellulaires sont importantes pour le processus de transformation. Par exemple, les cellules neuronales déjà présentes sécrètent la neuréguline (le facteur de croissance glial : GGF), laquelle induit l'expression de BLBP par les glies radiaires (Anton et al., 1997). Or, il est démontré que l'expression précoce de BLBP au cours du développement des glies radiaires est essentielle à la migration des neurones nouvellement produits le long des prolongements radiaux jusqu'à leur position finale (Feng et al., 1994, Hatten, 1999).

Comme les cellules neuroépithéliales, les glies radiaires conservent leurs prolongements apical et pial : le côté apical uni-ciliaire borde le ventricule et le côté pial maintient son contact avec la lame basale, mais de nouveaux contacts sont établis avec les vaisseaux sanguins. Les glies radiaires vont aussi garder leur capacité de division asymétrique, caractérisée par le phénomène de migration nucléaire intercinétique, mais celle-ci va se limiter à la zone ventriculaire (Noctor et al., 2001, Noctor et al., 2004, Farkas and Huttner, 2008, Noctor et al., 2008). La division asymétrique d'une glie radiaire est nécessaire à son autorenouvellement, ainsi qu'à la production d'une cellule fille qui peut être soit un neurone soit une cellule progénitrice de neurones (Figure 2b) (Noctor et al., 2004, Noctor et al., 2007). Plus tard au cours du développement embryonnaire, une sous-population de glies radiaires va subir une rétraction de ses prolongements apical puis pial pour se transformer en astrocytes ou progéniteurs gliaux (précurseurs d'astrocytes et/ou oligodendrocytes) (Noctor et al., 2008). Par la suite (en période néonatale chez les rongeurs), seront produits les oligodendrocytes et les cellules épendymaires.

Les glies radiaires persistent durant la période postnatale et chez l'adulte dans plusieurs espèces de vertébrés, comme les oiseaux (Goldman et al., 1996, Alvarez-Buylla et al., 1998), les poissons (Stevenson and Yoon, 1981, Kalman, 1998) et les reptiles (Garcia-Verdugo et al., 2002). Par contre, chez les mammifères, les glies radiaires prolifératives vont disparaître avec la maturation du SNC, même si des cellules gliales dotées de caractéristiques morphologiques similaires, sont retrouvées dans certaines régions, comme les tanocytes qui lient l'hypothalamus avec le troisième ventricule et celle qui lient le canal central avec la surface de la moelle épinière.

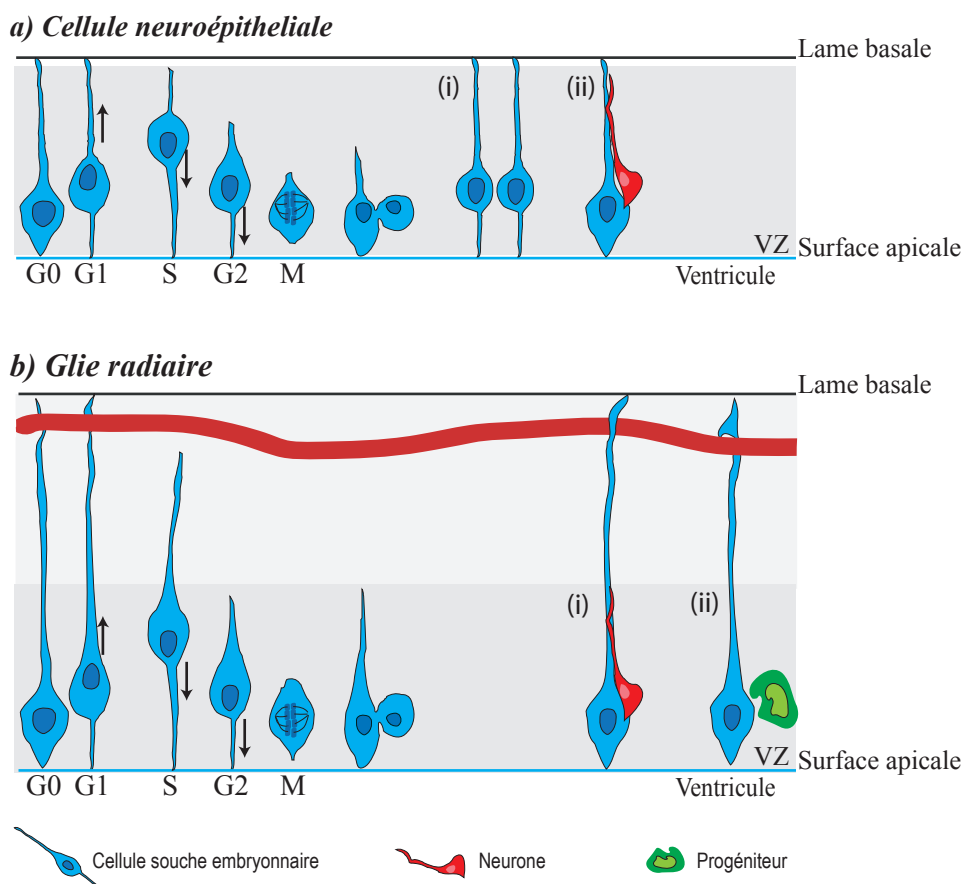


Figure 2: **La migration nucléaire intercinétique.** Les CSN embryonnaires (bleu) sont caractérisées par la migration de leurs noyaux entre la surface apicale (ventriculaire) et la surface piale (marginale) selon les différentes phases du cycle cellulaire. **a)** Les cellules neuroépithéliales se divisent de façon symétrique pour se multiplier **(i)**, ou de façon asymétrique pour s'auto-renouveler et donner un neurone (rouge) **(ii)**. **b)** Les cellules de la glie radiaire se divisent de façon asymétrique pour s'auto-renouveler et donner soit un neurone (rouge) **(i)** soit un progéniteur de neurone (vert) **(ii)**. La migration des noyaux des glies radiaires se limite à la zone ventriculaire (VZ) durant toutes les phases du cycle cellulaire, alors que leurs prolongements forment des contacts avec les vaisseaux sanguins dans la zone marginale adjacente.

## 2.2. La cellule souche neurale adulte

Par définition, dans n'importe quel tissu, la cellule souche adulte est une cellule indifférenciée capable a) de proliférer, b) de s'autorenouveler pour la durée de vie de l'organisme, c) de produire différents types de progéniteurs fonctionnels et d) de régénérer le tissu après une blessure (Potten and Loeffler, 1990). Les mammifères perdent leurs cellules souches neurales embryonnaires (glies radiaires) avec la maturation du système nerveux : toutes les glies radiaires vont se transformer directement ou indirectement (via des progéniteurs intermédiaires) en astrocytes, oligodendrocytes et cellules épendymaires (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Ce large spectre de différenciation rend le traçage des cellules souches neurales adultes (CSNa) difficile. Si elles persistent réellement à l'âge adulte, elles peuvent être une sous-population des astrocytes, des oligodendrocytes ou même des cellules épendymaires.

### 2.2.1. Présence de cellules souches dans le cerveau adulte

*«Once development was ended, the fonts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In adult centres, the nerve paths are something fixed and immutable: everything may die, nothing may be regenerated. It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree.»* **Ramon y Cajal S. 1913-1914** (Colucci-D'Amato and di Porzio, 2008)

C'était le dogme émis par le neuroanatomiste Ramon y Cajal au début du 20<sup>e</sup> siècle. Cette croyance a été acceptée par la communauté scientifique durant des décennies, malgré les observations d'Allen qui a trouvé des cellules en mitose dans le SNC de rats adultes (Allen, 1912). Au cours des années 1960, diverses preuves ont été apportées, révélant l'existence d'une prolifération cellulaire conduisant à la production de nouveaux neurones dans le cerveau des rongeurs adultes.

Par incorporation de thymidine [ $H^3$ ], détectable par autoradiographie, Altman a observé des cellules en prolifération dans la région ventriculaire du cerveau de rongeurs adultes et des neurones matures [ $H^3$ ]<sup>+</sup> dans les bulbes olfactifs. Il a aussi détecté des cellules en division dans l'hippocampe. Ses conclusions sont les suivantes : persistance de la prolifération dans le cerveau antérieur autour des ventricules latéraux et dans l'hippocampe; migration des cellules vers les bulbes olfactifs, et production de nouveaux neurones dans les bulbes olfactifs et dans l'hippocampe. Malgré leur constance chez diverses espèces (les rats, les cochons d'inde et même les chats) (Altman, 1963, 1969a, 1969b, Altman and Das, 1965, 1966, 1967), les conclusions d'Altman sont restées lettre-morte, jusqu'à la fin des années soixante-dix, lorsque des observations de microscopie électronique, effectuées par Kaplan et Hinds (Kaplan and Hinds, 1977) sont venues confirmer la présence de neurogenèse dans le cerveau du rat adulte.

La notion de persistance d'une production de neurones dans le SNC de différentes espèces de non-primates était intéressante, mais elle n'a pas empêché Rakic de conclure, dans les années quatre-vingt, que le cerveau des primates adultes était dépourvu de neurogenèse (Rakic, 1985). Après une ou plusieurs injections de thymidine [ $H^3$ ]<sup>+</sup>, et une période de latence de 3 jours à 6 ans, Rakic n'a observé qu'une faible gliogenèse, mais n'a trouvé aucun neurone marqué avec la thymidine tritiée. Est-ce là une limite de la neurogenèse chez le primate et donc l'humain? Les études chez le rongeur mèneront-elles à des conclusions inapplicables à l'Homme?

La démonstration d'une neurogenèse adulte chez l'humain, dans l'hippocampe (Eriksson et al., 1998) et, les bulbes olfactifs (Bedard and Parent, 2004) à renouvelé l'espoir et relancé la recherche sur la biologie des CSNa, en soulignant ses applications possibles à des fins thérapeutiques.

À cette époque, de nombreux travaux ont décrit la production de neurones à l'âge adulte, mais il n'était pas encore question de la présence de cellules souches dans le SNC adulte. Les travaux de Reynolds et Weiss, au début des années quatre-vingt dix, ont fourni la première preuve indiscutable de l'existence de cellules souches dans le cerveau adulte. Par hasard, ils ont découvert la formation de colonies cellulaires, à partir de préparations de striatum de souris adulte. Après investigation, ils ont développé le *neurosphere assay*, qui est devenu la technique la plus utilisée pour isoler des CSN *in vitro*. Dans leur publication en 1992, Reynolds et Weiss ont réussi, pour la première fois, d'isoler, à partir de striatum de souris adulte, des CSN (1) capables de former des colonies (neurosphères) en présence du facteur de croissance épithélial (EGF) et (2) capables de se différencier en neurones et en astrocytes en absence d'EGF. Cette étude a ouvert la voie à de nombreuses publications portant sur l'identification des cellules souches : leur localisation, leur identité, leurs marqueurs et leurs rôles.

### **2.2.2. Localisation des cellules souches neurales adultes**

Des cellules souches neurales adultes (CSNa) ont été isolées de différentes régions du SNC (Taupin and Gage, 2002) : (1) zone sous ventriculaire (SVZ) de la souris (Lois and Alvarez-Buylla, 1993), du rat (Palmer et al., 1995) et de l'humain (Kirschenbaum et al., 1994), (2) zone sous-granulaire (SGZ) de l'hippocampe du rat (Gage et al., 1995) et de l'humain (Kukekov et al., 1999), (3) septum et striatum du rat (Palmer et al., 1995), (4) cortex de l'humain (Arsenijevic et al., 2001), (5) bulbes olfactifs de la souris (Gritti et al., 2002) et de l'humain (Pagano et al., 2000), (6) courant de migration rostral (RMS) de la souris (Gritti et al., 2002) et (7) différents niveaux de la moelle épinière de la souris (Weiss et al., 1996) et du rat (Shihabuddin et al., 1997). La présence de cellules souches est nécessaire mais non suffisante pour rendre compte du phénomène de la neurogenèse chez l'adulte (production de

nouveaux neurones et leur intégration dans le complexe réseau du système nerveux adulte). Seules les cellules souches organisées dans des niches spécialisées produisent des neurones dans un tissu sain *in vivo*. La principale niche de neurogenèse est celle de la SVZ, autour des ventricules latéraux, suivie de la SGZ du gyrus dentelé (DG) de l'hippocampe.

### **2.2.2.1. La zone sous-ventriculaire**

Depuis l'isolation de CSNa en 1992, plusieurs articles ont décrit leur rôle et leur organisation en niche dans la SVZ. Les cellules en prolifération ont été marquées par incorporation de thymidine [ $H^3$ ] (Lois and Alvarez-Buylla, 1993), ou de BrdU (Corotto et al., 1993) ou encore par infection de rétrovirus (Luskin, 1993), et leurs descendants retracés dans le RMS, de même que leur différenciation en neurones dans les couches granulaire et périglomérulaire des bulbes olfactifs.

Puisqu'à ce jour on ne connaît pas de marqueur moléculaire spécifique des CSNa, leur identité a fait l'objet d'un important débat. On sait que les glias radiaires embryonnaires se transforment en astrocytes et en cellules épendymaires dans la SVZ. Une étude de microscopie électronique a mené à l'identification de 6 types de cellules dans la SVZ adulte, désignées : A (neuroblastes), B1 et B2 (astrocytes), C (précurseurs putatifs), D (tanocytes), et E (épendymocytes : la barrière entre le tissu et le liquide cérébro-spinal) (Doetsch et al., 1997). Cette étude a éliminé la possibilité que les cellules de type A, B2, C, D ou E soient des cellules souches à cause de (1) la division rapide des cellules de type A, B2 et C, (2) du stade de différenciation avancé des cellules de type D, et (3) de l'absence de prolifération des cellules de type E.

En 1999, une autre étude a démontré que chez le rat et la souris, les CSNa sont les cellules épendymaires (type E) (Johansson et al., 1999). Ces auteurs ont utilisé le

colorant DiI qui est incorporé par les cellules touchant le ventricule, ainsi qu'un adénovirus exprimant Lac-Z dont le récepteur CXADR est exprimé par les cellules épendymaires. Avec ces deux méthodes, ils ont constaté (1) un marquage des cellules autour des ventricules (cellules épendymaires), (2) une multiplication du nombre de cellules sous-épendymaires par suite de la division des cellules souches (cellules épendymaires), (3) la migration des cellules marquées dans le RMS, et (4) la maturation des neurones marqués dans les bulbes olfactifs. De plus, ils ont cultivé et différencié des neurosphères à partir des cellules épendymaires DiI+. Finalement, leur expérience d'incorporation de BrdU a montré une prolifération des cellules de la SVZ, mais seulement des cellules épendymaires qui avaient la capacité de retenir le BrdU à long-terme (méthode utilisée pour marquer les cellules souches de différents tissus dont les CSNa (Morshead et al., 1994) en se basant sur leur propriété de prolifération lente). Or, il est bien connu que les astrocytes de la SVZ (cellules de type B) ont des prolongements qui atteignent les ventricules latéraux (Tavazoie et al., 2008, Shen et al., 2008, Mirzadeh et al., 2008). Cette seule réalité met en question les méthodes de marquage utilisées par Johansson et ses collègues, puisque leurs conclusions peuvent s'appliquer aussi bien aux cellules de type B qu'aux cellules épendymaires.

Durant la même année, une autre équipe a conclu que : (1) les CSNa sont sous-épendymaires, et (2) les cellules épendymaire prolifèrent en culture mais les sphères produites ne sont pas autoreouvelables ni multipotentes (Chiasson et al., 1999). En utilisant le *neurosphere assay*, l'équipe d'Alvarez-Buylla a démontré que les CSNa sont une sous-population d'astrocytes (Doetsch et al., 1999). Ces auteurs ont infecté les ventricules latéraux avec un adénovirus exprimant une protéine fluorescente verte (GFP) sous le contrôle du promoteur de la GFAP pour marquer les astrocytes de la SVZ. Ainsi, toutes leurs neurosphères multipotentes se sont révélées GFP+, c'est-à-dire, d'origine astrocytaire. En utilisant le même modèle, ces auteurs



ont conclu que les cellules GFAP<sup>+</sup> produisent les cellules qui migrent dans le RMS pour se différencier en neurones dans les bulbes olfactifs. De plus, dans cette même étude, ils ont montré par microscopie électronique et à fluorescence que ce sont les astrocytes (GFAP<sup>+</sup>) et non pas les cellules épendymaires (mCD24<sup>+</sup>) qui ont la capacité de rétention du BrdU et de la thymidine [<sup>3</sup>H] à long-terme. Finalement, ces mêmes auteurs ont utilisé une méthode d'élimination des cellules prolifératives pour tracer la lignée de neurogenèse. Ils ont administré l'Ara-C (Arabinofuranosyl Cytidine), qui est incorporée dans la phase S du cycle cellulaire, pour endommager l'ADN et tuer les cellules en prolifération. Ensuite, ils ont tracé les cellules en prolifération et les cellules nouvellement produites en utilisant le BrdU. Ainsi, ils ont proposé leur modèle de niche de CSNa dans la SVZ, où les astrocytes (cellules de type B) sont les cellules souches qui produisent les progéniteurs (cellules de type C). Ces derniers, à prolifération rapide, donnent des neuroblastes (cellules de type A), qui migrent jusqu'aux bulbes olfactifs via le RMS pour se différencier en neurones dans les bulbes olfactifs (Figure 3a-b). Une autre étude du même groupe a aussi montré que les cellules souches prolifèrent rapidement pour régénérer les cellules de la niche, en moins de cinq jours après la fin du traitement avec l'Ara-C (Doetsch et al., 2002).

La composition cellulaire de la niche de la SVZ est de mieux en mieux caractérisé après la découverte d'une gamme de marqueurs cellulaires spécifiques (Figure 4). Son environnement complexe, riche en vascularisation, reste cependant à l'étude (Tavazoie et al., 2008, Shen et al., 2008, Mirzadeh et al., 2008). Aujourd'hui, le modèle établi par Doetsch et ses collègues est bien accepté, ayant été validé par différentes techniques comme la cytométrie en flux (FACs : *Fluorescence Activated Cell sorting*) (Pastrana et al., 2009) et l'imagerie *in vivo* (Platel et al., 2009).

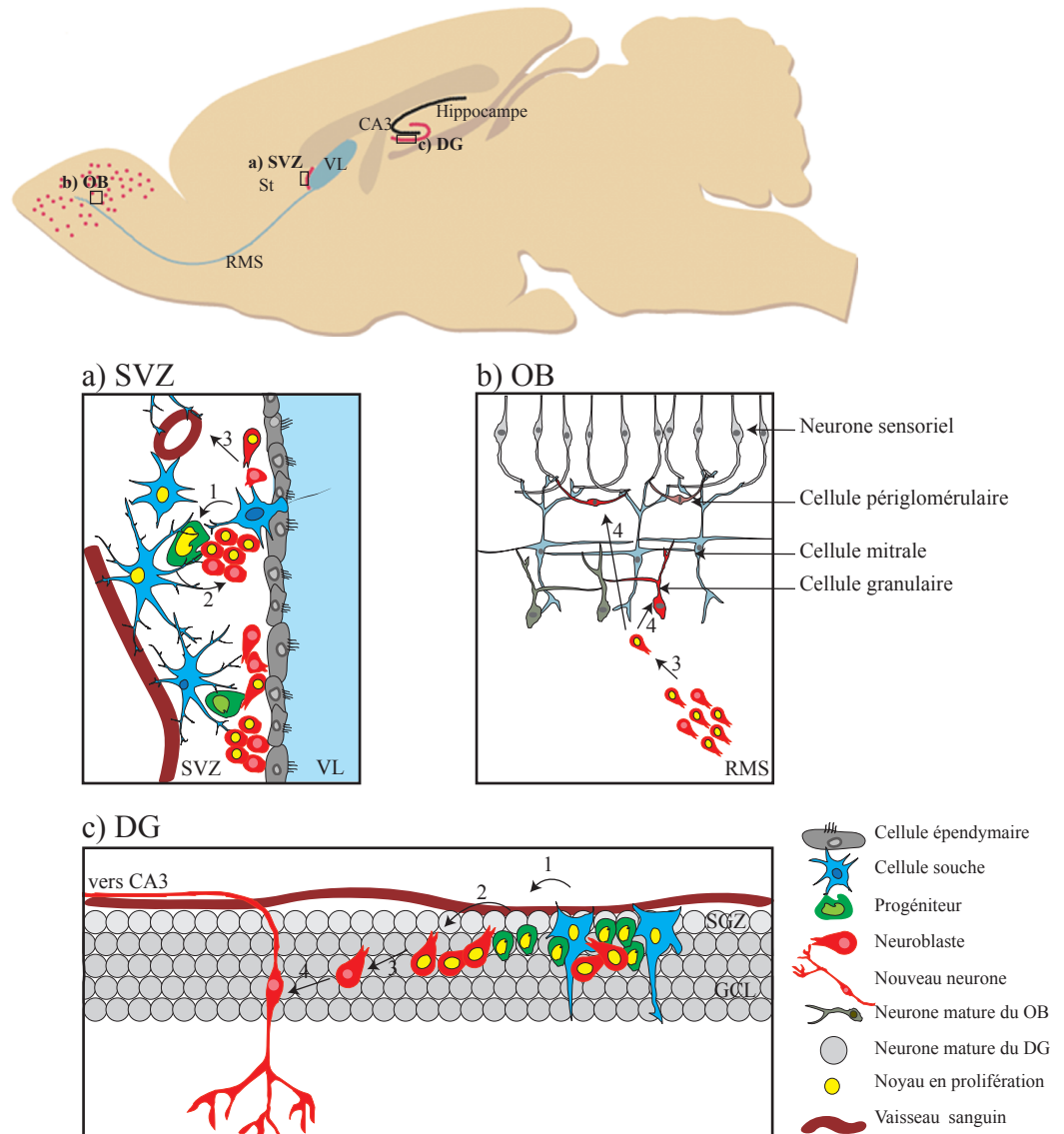


Figure 3: **La neurogenèse persiste à l'âge adulte dans deux niches.** Les CSNa sont actives dans deux régions: la SVZ autour des VL et la SGZ du DG. Les CSNa de la SVZ sont adjacentes aux cellules épendymaires qui entourent les VL (a). Les CSNa (bleu) prolifèrent (noyau jaune) pour produire des progéniteurs (vert) à grande capacité de prolifération. Ces derniers produisent les neuroblastes (rouges), qui migrent via le RMS jusqu'aux OB. Arrivés aux OB, les neuroblastes quittent le RMS pour se différencier en interneurons granulaires ou périglomérulaires (b). Dans l'hippocampe, les cellules souches (bleu) de la SGZ prolifèrent (noyau jaune) pour donner des progéniteurs (vert), dont la prolifération et la différenciation produisent des neuroblastes (rouge) (c). Les neuroblastes post-mitotiques migrent dans la GCL pour se différencier en neurones, dont les axones forment des synapses dans le CA3. En a-c, (1) représente la différenciation des cellules souches en progéniteurs, (2) la différenciation des progéniteurs en neuroblastes, (3) la migration des neuroblastes et (4) la maturation des neuroblastes en neurones. CA3: corne d'Ammon 3, CSNa: cellule souche neurale adulte, DG: gyrus dentelé, GCL: couche de cellules granulaires, OB: bulbe olfactif, RMS: courant de migration rostrale, SGZ: zone sous-granulaire, St: striatum, SVZ: zone sous-ventriculaire, VL: ventricule latéral.

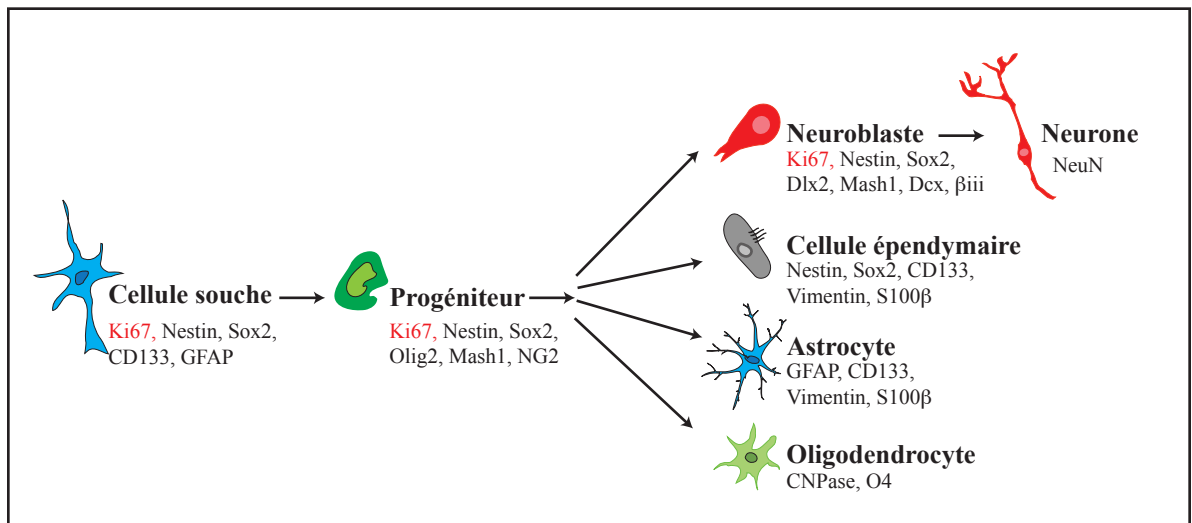


Figure 4: **Les marqueurs moléculaires des cellules neurales.** Illustration des marqueurs moléculaires communément utilisés pour l'identification des cellules neurales. Ki67 (rouge) est exprimé seulement par les cellules en division durant les phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire. Les références à chacun des marqueurs spécifiques sont: Aguirre et al., 2004, Ming and Song, 2005, Menn et al., 2006, Coskun et al., 2008 et Sun et al., 2009.

### 2.2.2.2. L'hippocampe

La deuxième plus importante niche de neurogenèse dans le cerveau adulte est celle du gyrus dentelé (DG) de l'hippocampe. De nouveaux neurones sont produits dans cette région chez les rongeurs (Altman and Das, 1965, Kaplan and Bell, 1983, 1984), les primates non-humains (Kornack and Rakic, 1999, Gould et al., 1999), et même chez l'humain (Eriksson et al., 1998). Cette neurogenèse persiste dans le DG durant toute la vie adulte et les neurones produits s'accumulent dans la couche granulaire de l'hippocampe (Bayer et al., 1982). Dans la zone sous-granulaire (SGZ), située entre la couche de cellules granulaires et le hile du DG, les CSNa, entourées par une riche vascularisation spécialisée (Palmer et al., 2000), prolifèrent pour produire des cellules progénitrices de neurones (Cameron et al., 1993). Ces dernières se multiplient et se différencient en neuroblastes. Après un certain nombre de divisions, les neuroblastes post-mitotiques migrent et redifférencient en neurones dans la couche granulaire du DG. Dès 10 jours post-mitose (Hastings and Gould, 1999), les nouveaux neurones projettent leur axones jusqu'à la région CA3 de l'hippocampe (Markakis and Gage, 1999). Même si la niche de la SGZ est bien définie (Figure 3c), il faut mentionner l'existence d'un débat concernant l'identité des précurseurs de cette zone : cellules souches ou cellules progénitrices? En pratique, après une dissection appropriée de l'hippocampe (sans contamination par la SVZ adjacente), il s'avère difficile d'isoler des cellules souches en culture (Roy et al., 2000, Seaberg and van der Kooy, 2002). Dans nos mains, moins de 20 neurosphères ont résulté des dissections de l'hippocampe, en comparativement à plus de 600 après dissection de la SVZ (résultats non montrés ici). Faut-il en conclure qu'il y a très peu de cellules souches dans l'hippocampe, ou serait-ce une population de progéniteurs peu différenciés qui assurent la neurogenèse dans cette région du cerveau? Cette question de nomenclature n'est pas un problème majeur, car ce qui compte, c'est que l'activité de neurogenèse adulte puisse persister toute la vie pour satisfaire aux fonctions biologiques de l'hippocampe.

### **2.2.3. Importance de la neurogenèse adulte**

En quelques semaines, les nouveaux neurones s'intègrent parfaitement dans le réseau complexe de l'hippocampe ou des bulbes olfactifs et ils adoptent des formes et des fonctions comparables aux neurones avoisinants. À cause des limites techniques, les fonctions précises de la neurogenèse adulte sont très peu connues. Cependant, quelques modèles expérimentaux montrent l'importance d'une neurogenèse adulte continue. L'arrêt de la neurogenèse dérivée de la SVZ cause une atrophie des bulbes olfactifs et une diminution de la discrimination olfactive (Imayoshi et al., 2008, Singer et al., 2009). Une privation olfactive postnatale diminue la taille des bulbes olfactifs chez le rat, mais en 40 jours après le retour des stimuli, les bulbes retrouvent leur volume initial (Cummings et al., 1997). Fonctionnellement, après trois semaines, les neurones nouvellement produits sont bien intégrés dans le réseau complexe des bulbes olfactifs et répondent au principal stimulus physiologique ; l'odorat (Carlen et al., 2002). La production des neurones des bulbes olfactifs est modulée par l'établissement de liens socio-sexuels chez le hamster (Huang and Bittman, 2002) et la simple présence de phéromones du sexe opposé stimule la neurogenèse à la fois dans les bulbes olfactifs et l'hippocampe des souris femelles (Mak et al., 2007). Par contre, la neurogenèse de l'hippocampe semble surtout importante pour des fonctions cognitives. Les neurones nouvellement produits joueront un rôle dans la plasticité synaptique essentielle à l'apprentissage (van Praag et al., 1999); la stimulation de la neurogenèse augmente la capacité d'apprentissage et le comportement d'exploration chez les rongeurs (van Praag et al., 1999, Kempermann et al., 2002). De plus, il est bien démontré que l'hippocampe joue un rôle fondamental dans la transmission de la mémoire à court-terme au long-terme chez l'humain (Milner et al., 1998). Malgré les différences entre leurs fonctions respectives présumées, on peut supposer une coordination de la neurogenèse entre les deux niches (SVZ-OB et SGZ) lorsqu'il s'agit de la mémoire olfactive impliquée dans le choix du partenaire au moment de la reproduction (Mak et al., 2007) ou le comportement maternel (Shingo et al., 2003).

### **3. Le vieillissement**

Le vieillissement peut être considéré comme une accumulation de changements par un organisme ou un objet à travers le temps (Bowen and Atwood, 2004). Chez les êtres vivants, on utilise le terme de sénescence comme synonyme du vieillissement. Dans le cas d'une cellule isolée, la sénescence se définit par la capacité limitée de cette cellule à se diviser en culture et sa mortalité attribuée à des facteurs intracellulaires (Hayflick and Moorhead, 1961, Hayflick, 2003). La sénescence d'un organisme vivant, son vieillissement, se caractérise par la diminution de la capacité à répondre au stress, un déséquilibre homéostatique, l'augmentation du risque de maladies, ainsi que l'accumulation de changements irréversibles menant à la mort. Plusieurs maladies sont liées à l'âge, comme le diabète de type II, l'ostéoporose, de nombreux cancers, les maladies cardiovasculaires, les accidents cérébro-vasculaires et les maladies neurodégénératives. Face à l'augmentation de l'espérance de vie, le nombre de personnes atteintes de ces maladies est en pleine croissance dans les sociétés modernes. Ceci implique des coûts considérables pour le secteur de la santé publique, d'où l'intérêt, ainsi que les fonds de recherche, réservés à l'étude des maladies liées au vieillissement.

#### **3.1. Le vieillissement du système nerveux central**

Le vieillissement physiologique (soi-disant normal) du SNC s'accompagne d'une diminution des capacités cognitives et motrices. Avec l'âge, le niveau de performance des tâches liées à la mémoire et la navigation spatiale diminue chez les mammifères (Zhong et al., 2000, Ennaceur et al., 2008, Mahmood et al., 2009, Tippett et al., 2009). Il y a aussi une diminution de la vitesse et de la capacité d'encoder l'information (Rosenzweig and Barnes, 2003, Wilson et al., 2005). Chez les personnes âgées saines, une diminution du volume de la matière blanche et une

perte d'axones myélinisés sont observées. Les fibres de petit diamètre seraient perdues avant les fibres de grand calibre, et cette perte serait de l'ordre de 45% entre l'âge de 20 et 80 ans (Marnier et al., 2003). La perte d'axones de petit calibre entraînerait des pertes d'information, alors que la diminution du nombre des fibres de fort calibre diminuerait la vitesse de propagation de l'information, augmentant ainsi le temps de réaction aux stimuli. Ceci pourrait s'expliquer par une diminution de la myélinisation ou une perte des oligodendrocytes responsables de cette fonction. En général, le vieillissement se caractérise par une altération de la plupart des fonctions motrices et cognitives complexes; mais il affecte aussi la rapidité et l'efficacité de réponses simples comme le réflexe de clignement des yeux (Kishimoto et al., 2001) et autres réflexes de peur (Moyer and Brown, 2006).

Le vieillissement est un facteur de risque associé à plusieurs maladies neurodégénératives à progression graduelle. À titre d'exemple, on peut mentionner la maladie de Huntington, caractérisée par l'apparition progressive de mouvements involontaires, de déficits cognitifs et de problèmes psychiatriques, et qui résulte d'une dégénérescence neuronale avec gliose affectant préférentiellement le striatum. Un autre exemple, la maladie de Parkinson, liée à une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire, qui cause des problèmes moteurs (akinésie, rigidité et tremblements) pouvant progresser jusqu'à une perte complète de la mobilité, associée ou non à des troubles cognitifs et une dysfonction olfactive. La démence la plus commune, la maladie d'Alzheimer, qui est caractérisée par l'accumulation de plaques séniles ( $\beta$ -amyloïde) et des enchevêtrements neurofibrillaires riches en Tau hyperphosphorylé, entraîne une mort neuronale massive dans plusieurs régions du cerveau. Ces maladies, aux mécanismes moléculaires complexes, ont en commun, la mort neuronale et un déséquilibre de la neurogenèse : une augmentation de celle-ci dans la maladie de Huntington (Curtis et al., 2005), ou sa diminution dans la maladie de Parkinson (Hoglinger et al., 2004) et

la maladie d'Alzheimer (Ziabreva et al., 2006). Que ce passe-t-il dans les niches de cellules souches neurales avec le vieillissement?

## **3.2. Le vieillissement des niches des cellules souches neurales**

Le vieillissement s'accompagne d'une perturbation de l'homéostasie des cellules souches dans l'ensemble de l'organisme et d'une diminution du renouvellement cellulaire. Ces phénomènes peuvent être dus à : (1) une diminution du nombre de cellules souches par suite d'une augmentation de l'apoptose, (2) une diminution de la capacité d'autorenouvellement des cellules souches, ou (3) une diminution de la production de cellules différenciées. On peut aussi envisager une perturbation des signaux intracellulaires, une insensibilité aux signaux extracellulaires et/ou une diminution des signaux (facteurs et hormones) extracellulaires, voire même systémiques (Donehower, 2002). Avec le vieillissement, une perte de cellules souches a été rapportée dans différents tissus, dont l'épiderme (Michel et al., 1996) et les muscles squelettiques (Dedkov et al., 2003). Cette règle n'est pas applicable aux cellules souches hématopoïétiques dont le nombre n'est pas affecté par l'âge et peut même augmenter avec l'âge dans certains souches de souris (Morrison et al., 1996). Le vieillissement pourrait donc avoir des effets tissu-spécifiques sur les cellules souches adultes, y compris celle de la SVZ et de la SGZ.

### **3.2.1. La zone sous-ventriculaire**

Malgré la continuité de la neurogenèse dans la SVZ et l'accumulation de neurones dans les bulbes olfactifs avec l'âge (Mirich et al., 2002), le vieillissement semble être accompagné d'un déséquilibre homéostatique de la SVZ. Le nombre de cellules présentes dans la SVZ diminue (Luo et al., 2006), alors qu'un déclin de l'activité de prolifération est observé en utilisant le BrdU (molécule incorporée dans



la phase S du cycle cellulaire) ou le Ki67 (antigène nucléaire exprimé dans les phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire) (Tropepe et al., 1997, Enwere et al., 2004, Luo et al., 2006, Ahlenius et al., 2009). Il a été également rapporté que le nombre de progéniteurs et de neuroblastes présents dans la SVZ diminue de 25 à 50% chez les souris entre à l'âge de 2 mois et 2 ans, avec diminution de la production de nouveaux neurones dans les bulbes olfactifs (Enwere et al., 2004).

Les changements liés à l'âge observés dans la SVZ pourraient s'expliquer par une augmentation de l'apoptose des progéniteurs et neuroblastes ou par une perte des cellules souches qui les produisent. Le nombre de cellules en apoptose (exprimant la caspase-3 activée) ainsi que le nombre d'astrocytes et de cellules épendymaires (candidats possibles au titre de CSNa) ont été soigneusement analysés mais ne semblent pas être affectés significativement par l'âge (Luo et al., 2006). Par contre, le nombre de cellules souches estimé par le *neurosphere assay* semble diminuer dans la SVZ de la souris âgée. Différentes études ont rapporté une diminution de 20-77% de ces cellules souches entre l'âge de 2 mois et 2 ans (Enwere et al., 2004, Maslov et al., 2004, Ahlenius et al., 2009).

Il a été rapporté que, chez la souris, le nombre de corps cellulaires astrocytaires en contact avec le ventricule latéral augmente en vieillissant (Luo et al., 2006, Luo et al., 2008). Cela s'accompagnerait d'une diminution du nombre d'épendymocytes et d'une augmentation du nombre d'astrocytes en contact avec le liquide cérébro-spinal, lequel semble capable d'activer les cellules souches neurales (Conover et al., 2000a). Toutefois, il n'est pas clair si la perte du contact des épendymocytes (CSNa potentielles) avec le liquide cérébro-spinal cause la diminution de la neurogenèse liée à l'âge; ou inversement, cette diminution de neurogenèse observée avec le vieillissement pourrait être responsable de la migration

des astrocytes (CSNa potentielles) vers le liquide cérébro-spinal, afin d'activer leur potentiel de cellules souches.

### **3.2.2. L'hippocampe**

La neurogenèse dans la SGZ de l'hippocampe persiste pour la durée de vie, mais son taux diminue avec l'âge chez la souris (Kempermann et al., 1998, Jin et al., 2003), le rat (Kuhn et al., 1996), le singe (Gould et al., 1999) et l'humain (Cameron and McKay, 1999, Kukekov et al., 1999). Avec l'âge, entre 2 mois et 2 ans chez les rongeurs, l'activité de prolifération des précurseurs et la capacité de différenciation en neurones deviennent jusqu'à 10 fois moindre (Kempermann et al., 2002, van Praag et al., 2005). Cette diminution, corrélée avec le déclin cognitif (Bizon et al., 2004), peut être inversée chez les souris placées dans un environnement enrichi (Kempermann et al., 2002) ou par traitement avec des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, comme l'Éserine ou le Donepezil (Itou et al., 2010), ou encore, chez le rat, par une adrénalectomie qui diminue le taux de corticostéroïdes circulant (Cameron and McKay, 1999). Ces observations suggèrent un rôle des nouveaux neurones dans la plasticité synaptique du circuit de l'hippocampe, voire même une relation de causalité entre la diminution de la production de nouveaux neurones et le dysfonctionnement cognitif.

# Problématique

Le vieillissement est accompagné d'une multitude d'altérations du SNC qui peuvent être physiologiques (vieillesse normale) ou pathologiques (maladies neurodégénératives liées à l'âge). Les mécanismes à l'origine de ces détériorations sont mal connus, mais leurs conséquences sont généralement un dysfonctionnement ou même une perte de cellules neurales (neurones, astrocytes ou oligodendrocytes). Alors qu'une réserve de cellules souches neurales semble dispersée dans tout le SNC adulte, seules celles qui sont situées dans des niches spécialisées sont actives et multipotentes *in vivo*. Il se pourrait que, dans le cadre d'une thérapie cellulaire, on soit, un jour, capable de diriger les CSNa déjà présentes dans le SNC pour restaurer les pertes liées à l'âge. Pour ce faire, il faudra pouvoir stimuler les CSNa à produire le bon type de progéniteurs, guider leur migration vers le bon endroit, et leur offrir les facteurs nécessaires à leur différenciation, leur maturation et leur survie. Mais on sait déjà que le vieillissement physiologique lui-même est accompagné d'une perte de CSNa. Sera-t-il possible de freiner ou d'arrêter cette perte avant même l'apparition des déficits cognitifs et le développement de maladies neurodégénératives?

Avant de pouvoir répondre à cette question, il faut comprendre les causes et les séquences d'événements qui résultent d'une baisse du nombre des CSNa et de leur activité de neurogenèse normale.

## Objectifs

Pour comprendre les changements liés au vieillissement tardif, il faut d'abord connaître les phénomènes qui se passent plus tôt, au cours du processus de sénescence. Des études ont montré une perte de cellules souches, une diminution de la prolifération et une altération des niches de neurogenèse tard dans la vie (Figure 5). Dans cette étude, nous cherchons à caractériser les changements précoces du vieillissement des CSNa et leur principale niche (la SVZ) en comparant des souris d'âge moyen (âgées de 12 mois) avec des contrôles jeunes adultes (âgées de 2 mois). Plus spécifiquement, nous cherchons à répondre aux questions suivantes :

1. Quels sont les changements structuraux de la principale niche de CSNa?
2. Quels sont les changements fonctionnels de la principale niche de CSNa?
3. Est-ce que le nombre des CSNa change précocement au cours du vieillissement?
4. Est-ce que les propriétés des CSNa présentent alors des changements ?

Figure 5 : **Liens de causalité possibles.** La relation entre les changements liés au vieillissement décrits dans la littérature est encore inconnue et la séquence de ces événements est le sujet de la présente étude.



**Manuscrit**

## 1. Identification de l'article

Le présent mémoire contient l'article suivant, dont je suis la première auteure.  
Le titre de cet article soumis pour publication à *Neuroscience* est :

***The subventricular zone stem cell niche of the adult mouse forebrain:  
structural and functional changes between early adulthood and  
middle-age***

Ses auteurs sont :

**Meriem Bouab**, Anne Aumont, Karl Forest-Bérard, Grigorios N. Paliouras,  
and Karl J.L. Fernandes

## 2. Contribution des auteurs

Le présent manuscrit, dont je suis la principale auteure, résume l'essentiel des travaux de ma maîtrise. Le détail des contributions des co-auteurs est décrit ci-dessous :

- J'ai conçu toutes les expériences en discutant avec mon directeur de recherche.
- J'ai effectué toutes les expériences et les analyses des résultats sauf pour les exceptions suivantes :
  1. Anne Aumont, technicienne de laboratoire, a coupé les sections semi-fines au microtome et disséqué le striatum pour les expériences de culture cellulaire.
  2. Karl Forest-Bérard, stagiaire de premier cycle sous ma direction, a fait quelques immunohistochimies, a compté les cellules sur les sections des bulbes olfactifs et a mesuré la taille des neurosphères.
  3. Grigorios Paliouras, stagiaire postdoctoral, m'a aidée à optimiser la technique et l'analyse des immunobuvardages Western.
- J'ai écrit la première version de l'article, mais la version finale a été modifiée par mon directeur de recherche et moi-même.

### **3. Contenu du manuscrit**

#### **The subventricular zone stem cell niche of the adult mouse forebrain: structural and functional changes between early adulthood and middle-age**

Meriem Bouab<sup>1</sup>, Anne Aumont<sup>1</sup>, Karl Forest-Bérard<sup>1</sup>, Grigorios N. Paliouras<sup>1</sup>,  
and Karl J.L. Fernandes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Cell Biology, Groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC), and Center of Excellence in Neuroscience of the Université de Montréal (CENUM), Université de Montréal, Montréal, Canada.

**Corresponding author:** Dr. Karl Fernandes, Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal, QC, Canada H3C 3J7

Phone: 514-343-5617

Fax: 514-343-5755



## Abbreviations

**aNSCs:** adult neural stem cells

**BDNF:** brain-derived neurotrophic factor

**BrdU:** 5-bromo-2-deoxyuridine

**DAB:** 3,3-diaminobenzidine

**DCX:** doublecortin

**EGF:** epidermal growth factor

**FGF2:** fibroblast growth factor-2

**GFAP:** glial fibrillary acidic protein

**IHC:** immunohistochemistry

**Mash1:** mammalian achaete scute homolog 1

**OB:** olfactory bulb

**Olig2:** oligodendrocyte transcription factor 2

**PECAM:** platelet/endothelial cell adhesion molecule-1

**RMS:** rostral migratory stream

**SVZ:** subventricular zone

## Summary

There is growing evidence that aging-associated impairments of adult neural stem cells (aNSCs) are already initiated by middle-age. In the present study, we therefore evaluated the changes occurring to aNSCs and their subventricular zone (SVZ) niche between early adulthood and middle-age, a critical and little-studied period of adulthood. Compared to 2-month-old young adults, the SVZ of 12-month-old middle-aged mice was found to display reduced protein expression of markers for multiple neural precursor sub-populations. Anatomically, this was associated with significant cytological aberrations, including an overall atrophy of the SVZ, loss of constitutively proliferating sub-ependymal cells, and accumulation of large lipid droplets within the ependyma. Functionally, these changes correlated with diminished addition of newly born neurons to the olfactory bulb, the principal target of SVZ-derived neuroblasts. To determine whether changes were evident at the level of the SVZ stem cell, we evaluated key *in vitro* and *in vivo* parameters of aNSCs. Tissue culture experiments showed that equal numbers of neurosphere-forming aNSCs could be isolated from young adult and middle-aged forebrains; however, middle-aged neural precursors had differences in growth factor-mediated differentiation *in vitro* and displayed evidence of increased quiescence *in vivo*. Thus, significant changes occur to both aNSCs and their SVZ niche between early and mid-adulthood. These findings provide a useful framework for future studies aimed at delineating the early events that lead to aging-associated changes in aNSCs.

**Keywords:** stem cells, neurogenesis, middle-age, subventricular zone, neurospheres, aging

## 1. Introduction

Several regions of the adult mammalian nervous system are home to self-renewing adult neural stem cells (aNSCs) (Weiss et al., 1996, Taupin and Gage, 2002). The aNSC niche that has been best characterized is a narrow band of tissue that lines the forebrain lateral ventricles, termed the subventricular zone (SVZ) (Chojnacki et al., 2009). Anatomically, the SVZ is comprised of four main cell types: type A neuroblasts, type B astrocytes, type C progenitor cells and type E ependymal cells, as well as smaller numbers of endothelial cells, microglia, mature neurons, and tanycytes (Doetsch et al., 1997). Various proportions of these SVZ cell types are mitotically active, resulting in the formation of a large and heterogeneous pool of constitutively proliferating SVZ cells (Morshead et al., 1998). According to the current model of the SVZ neurogenic lineage, forebrain aNSCs correspond to a slowly dividing sub-population of activated type B astrocytes (Morshead et al., 1994, Doetsch et al., 1999). Activated type B astrocytes produce rapidly dividing, transit-amplifying type C progenitors, the majority of which generate type A neuroblasts that migrate anteriorly in chains to the olfactory bulb (OB), where they continuously replace olfactory interneurons (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996, Lois et al., 1996, Doetsch et al., 1999). A sub-population of type C progenitors also differentiates into oligodendrocyte lineage cells, which populate peri-ventricular tissue (Menn et al., 2006). Type E ependymal cells line the lateral ventricles and normally do not proliferate (Chiasson et al., 1999, Doetsch et al., 1999), but they are an important source of neurogenic signals within the SVZ niche (Lim et al., 2000, Ramirez-Castillejo et al., 2006) and can also display multipotency under pathological conditions (Carlen et al., 2009).

As young adults age, the neurogenic activity of the SVZ progressively declines. In elderly mice (18-24 month old), fewer aNSCs can be isolated from the SVZ, the size of the constitutively proliferating SVZ cell population decreases, the rate of interneuron replacement in the OBs is reduced, and these changes correlate with the development of defects in olfactory function (Tropepe et al., 1997, Enwere et al., 2004, Maslov et al., 2004, Luo et al., 2006, Ahlenius et al., 2009). Importantly, there is evidence that some of the changes associated with aging begin to develop between early and mid-adulthood. For instance, in middle-aged mice (12-month-old), the constitutively proliferating pool of SVZ cells is already significantly diminished and fewer type C progenitors and type A neuroblasts are present, while the number of SVZ astrocytes does not seem to be changed (Luo et al., 2006). Reductions in cell survival, proliferation and neurogenesis have also been noted in the middle-aged hippocampal dentate gyrus, a second neurogenic niche of the adult brain (Stanley and Shetty, 2004, Rao et al., 2005). Although the physiological mechanisms underlying these aging-associated changes are not yet identified, in at least the hippocampus, declining levels of growth factors may contribute to these events (Kuhn et al., 1996, Shetty et al., 2004, Shetty et al., 2005).

We hypothesized that defining the cellular and molecular changes that have occurred within the SVZ by middle-age will be an important step towards understanding how aging-associated changes in adult neurogenesis are regulated. In the present study, we have therefore focused on the SVZ during the early to mid-adulthood period, simultaneously examining changes in i) antigenically-defined SVZ cell types, ii) SVZ cytology, iii) the output of newly born SVZ-derived neurons to the OB, and iv) the numbers and properties of early lineage aNSCs. This work complements a previous ultrastructural analysis of the middle-aged mouse SVZ (Luo et al., 2006), and provides a detailed framework for future investigations into the early stages of aNSC aging.

## 2. Experimental procedures

### *2.1 Animals and in vivo treatments*

All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and were approved by the institutional animal care committee. A total of ten 2-month-old adult male CD1 mice (Charles River, Saint-Constant, Canada), fifteen 2-month-old and fifteen 12-month-old adult male C57BL/6 mice (Taconic, Hudson, NY, USA) were used in these experiments.

To analyze cell proliferation, mice were given three intra-peritoneal injections of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) (1.5 mg/injection, Sigma, Oakville, Canada) at 3-hour intervals and were sacrificed 15 hours later to mark proliferating/recently dividing cells. To determine the long-term fate of dividing cells, seven 2-month-old and seven 12-month-old C57BL/6 mice were provided with 1mg/L BrdU in drinking water supplemented with 1% sucrose (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) for 14 days *ad libitum*, followed by a 21 day chase period.

### *2.2 Tissue Collection*

Mice were euthanized with chloral hydrate (7%, CDMV, Saint-Hyacinthe, Canada) and were then perfused transcardially with 25 ml of phosphate-buffered saline (PBS, Wisent, Saint-Bruno, Canada) followed by 40 ml of 4% formaldehyde freshly prepared from paraformaldehyde (Fisher Scientific). The brains were removed and post-fixed for an additional 2 hours in 4% formaldehyde, and then kept in PBS at 4°C until sectioning. The forebrain and OBs of each animal were cut into 40 µm coronal sections using a vibrating microtome (Leica VT1000S, Richmond Hill, Canada). In the forebrain, sections were collected in the rostral to caudal

direction, with section collection beginning with the appearance of the genu that joins the left and right sides of the corpus callosum, and ending when the lateral ventricles connected to the third ventricle (approximately 48 sections). Tissue sections were stored at -20°C in an antifreeze solution (glycerol [Fisher Scientific]:ethylene glycol [Sigma]:PBS, 3:3:4).

### ***2.3 Immunohistochemistry***

The primary antibodies used in these experiments were: mouse anti-human Ki67 (1:200), mouse anti-rat Nestin (1:400), mouse anti-rat Mash-1 (1:100) (all from BD Biosciences, Mississauga, Canada); rat anti-BrdU (1:200) (AbD Serotec, Raleigh, NC, USA); mouse anti-cow S100 $\beta$  monoclonal (1:1000), rabbit anti-cow S100 $\beta$  polyclonal (1:1000) (both from Sigma); goat anti-human Doublecortin (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, CA); rabbit anti-human Sox2 (1:1000), rabbit anti-mouse Olig2 (1:500), rabbit anti-rat NG2 (1:200), mouse anti-mouse NeuN (1:200) (all from Millipore, Billerica, MA, USA); and rabbit anti-cow GFAP (1:1000) (Dako Diagnostic, Mississauga, Canada).

For immunohistochemical labeling, free-floating 40  $\mu$ m sections were washed in PBS, and blocked for 2 hours with 0.1% Triton-X (Fisher Scientific) in PBS supplemented with 4% bovine serine albumin (BSA, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Primary antibodies were applied at room temperature overnight in 0.1% Triton-X in PBS containing 2% BSA. For fluorescence detection, we used secondary antibodies conjugated to either CY3 (1:1000, Jackson ImmunoResearch) or Alexa 488, 555 or 647 (1:1000, Invitrogen, Burlington, Canada) diluted in PBS for 45 minutes at room temperature, and nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (0.2  $\mu$ M, Sigma) for 2 minutes. For peroxidase-based detection using 3,3-diaminobenzine (DAB), sections were incubated in the

appropriate biotinylated secondary antibody (1:1000, Jackson Immuno Research) for 90 minutes at room temperature, and the signal revealed using the avidin–biotin–peroxidase system (VectaStain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlington, Canada) according to the manufacturer’s instructions.

For BrdU immunohistochemistry, sections were pre-treated with 2N HCl (EMD, Gibbstown, NJ, USA) for 40 minutes at 37°C to denature the DNA, blocked for 2 hours in 0.1% Triton-X in PBS containing 4% BSA and incubated at room temperature overnight in rat anti-BrdU antibody (alone or in combination with other antibodies) diluted in 0.1% Triton-X in PBS containing 2% BSA. Detection steps were performed as above.

#### ***2.4 Resin-embedded semi-thin sections***

To study the cellular organization of the SVZ, sections processed for DAB-based immunohistochemistry were fixed with 1% osmic acid (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) for 30 minutes, dehydrated in a graded series of ethanols and propylene oxide (Fisher Scientific), and then embedded in electron microscopy grade Resin (Durcupan ACM, Sigma). Resin-embedded sections were cut at 1 µm thickness on an Ultracut E, Reichert Jung ultramicrotome (Leica, Richmond Hill, Canada), counterstained with 1% toluidine blue (Fisher Scientific) and mounted on slides using PermOUNT (Fisher Scientific). They were examined with a 100x objective by light microscopy.

#### ***2.5 Neurosphere cultures and differentiation***

Mice were euthanized using chloral hydrate as previously described. Both striata, including their associated SVZs, were dissected into ice cold HBSS (Wisent), dissociated to single cells using papain (Worthington, Lakewood, NJ, USA), diluted

to 30 ml in a neural stem cell proliferation medium, and then seeded into 6 wells of a 6-well Falcon plate (BD Bioscience, Mississauga, Canada). Neural stem cell proliferation medium consisted of DMEM/F12 (3:1) (both from Invitrogen) supplemented with 1% Penicillin/Streptomycin (Wisent), 1 µg/ml Fungizone (Invitrogen), 2% B27 (Invitrogen), 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Sigma) and 25 ng/ml fibroblast growth factor-2 (FGF2) (Sigma). In some experiments, the medium was replenished with fresh EGF and FGF2 on the fourth day of culture, as indicated in the text. Primary neurospheres were grown for 7 days before measuring their diameter. To assess self-renewal, primary neurospheres grown for 7 days were passaged by centrifugation, the pellets were dissociated by trituration, and 5 cells/µl were re-plated in the same proliferation medium as primary neurospheres. The measurement of their diameter was performed after 7 days *in vitro*. Clonality of our primary neurosphere culture conditions was assessed in control mixing experiments: when primary neurosphere cultures were started using a mixture of cells obtained from the striata of wildtype and EYFP-expressing mice, virtually all primary neurospheres generated using the above conditions were either completely fluorescent or completely non-fluorescent (data not shown)\*. Using a similar mixing approach, we also determined that our culture conditions supported the growth of clonally derived secondary neurospheres (from dissociated primary neurospheres) if we used a plating density of 5 cells/µl or less (data not shown).

To assess differentiation, primary neurospheres were gently triturated and plated at 40 cells/µl onto poly-L-lysine-coated dishes (0.02 mg/mL, Sigma) in a medium consisting of DMEM/F12 (3:1) supplemented with 1% Penicillin/Streptomycin, 1µg/ml Fungizone, 2% B27, 1% fetal bovine serum

-----  
\* : See Annexe 1



(Wisent), 20 ng/ml EGF and 25 ng/ml FGF2. On the third day, the medium was changed to a new differentiation medium supplemented with different growth factor conditions: (1) without growth factors (-GF), (2) 5ng/ml EGF, (3) 5ng/ml FGF2, or (4) 10ng/ml BDNF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). At 9 days after plating, cells were either lysed for analysis by Western blotting or fixed in 4% formaldehyde for 15 minutes for immunocytochemistry.

### ***2.6 Immunocytochemistry***

After fixation with 4% formaldehyde, cells were washed in PBS, permeabilized with 0.2% Triton-X in PBS for 5 min, and blocked in 6% normal goat serum (NGS, Jackson ImmunoResearch) and 0.5% BSA in PBS for 2 hours. Primary antibodies were diluted in 3% NGS and 0.25% BSA in PBS and applied at 4°C overnight. The primary antibodies used in these experiments were mouse anti-rat  $\beta$ III tubulin (1:500, Covance, Emeryville, CA, USA), mouse anti-human CNPase (1:500, Millipore) and rabbit anti-cow GFAP (1:1000). For fluorescence detection, cells were processed as described for fluorescence immunohistochemistry.

### ***2.7 Western blotting***

For biochemical analyses, cells were lysed in Ripa Buffer (NP-40 10% (VWR, Mississauga, Canada), 1 M Tris pH 8, 5 M NaCl, 10% SDS and 10% sodium desoxycholate (all from Fisher Scientific) supplemented with 153 ng/ml sodium vanadate (Fisher Scientific) and protease inhibitors (Complete Mini, Roche Diagnostics, Laval, Canada). Protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). 75 micrograms of protein from each sample were separated by SDS-PAGE on 10% acrylamide gels (Bio-Rad, Mississauga, Canada) and transferred to a nitrocellulose membrane (0.45  $\mu$ m, Bio-Rad). Membranes were blocked in 5% skim milk (Carnation) in Tris-

buffered saline containing 0.2% Tween (Fisher Scientific) (TBS-T) and then incubated overnight at 4°C with primary antibody diluted in 5% skim milk in TBS-T. The following antibodies were used: mouse anti-rat  $\beta$ III tubulin (1:1000), mouse anti-human CNPase (1:1000), rabbit anti-cow GFAP (1:1000), and rabbit anti-rat ERK-1 (1:3000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:5000, Bio-Rad) or anti-rabbit IgG (1:5000, Millipore) secondary antibodies were diluted in blocking solution. Secondary antibodies were detected using the ECL chemiluminescence reagent kit following manufacturer's instruction (GE Health Care, Baie d'Urfé, Canada) and X-Omat Blue film (Kodak). Membranes were subsequently stripped with Re-Blot Plus Mild (Millipore), re-blocked and re-probed appropriately. Densitometric quantifications were performed using NIH ImageJ 64-bit Java Software for Windows XP.

## ***2.8 Microscopy***

For fluorescence visualization, microscopy was performed using a Leica SP1 laser-scanning confocal microscope or a motorized Olympus IX81 microscope equipped with a black and white CCD camera. For DAB visualization, slides were digitized using an automated system (NDP Scan, Hamamatsu Photonics K.K.) and/or examined using light microscopy. Image manipulations were limited to Brightness/Contrast, and were performed in a standardized manner for all images.

## ***2.9 Quantifications and statistical analyses***

Quantification of multi-label immunofluorescence experiments was performed to determine the proportion of proliferating SVZ cells that expressed various cell type markers. In most cases, sections were double-labelled for a marker of interest together with anti-Ki67. For each marker of interest, 3-4 SVZ sections (=6-8 ventricles/animal) between the stereotaxic coordinates of bregma 0.0 to +1.2

mm were analyzed from each of 3-4 animals, and the percentage of Ki67+ cells that were double-labelled is reported. For the marker Mash1, sections were double-labelled with anti-BrdU rather than anti-Ki67, as we could not reliably avoid cross-reactivity between the Mash1 and Ki67 signals.

Quantification of DAB immunohistochemistry was performed to estimate changes in the relative number of Ki67+, Mash1+ and BrdU+ cells between 2- and 12-month-old mice. In the SVZ, 4-5 sections (=8-10 ventricles per animal) between bregma 0.0 and +1.2mm were selected for IHC and quantification from each of 4 animals. Section levels were matched using the size and/or shape of tissue landmarks such as the corpus callosum, lateral ventricles, anterior commissures and third ventricle. In the OB, quantification of BrdU+ cells was performed with a 40x objective using 3 fields of view within the granular layer per section of OB, and from each of 3 OB sections per animal (=9 40x fields of view per animal). OB sections were selected from between bregma +3.4 to +3.9mm and levels were matched according to landmarks such as the size and/or shape of the bulbs and the subependymal zone. Quantifications are presented as uncorrected cell counts per ventricle (SVZ) or per field of view (OBs), and provide an approximation of relative changes in cell numbers between 2-month-old and 12-month-old mice.

To show the full distribution of primary data, quantifications are presented in the form of scatterplots. For calculating statistical significance, the average number of cells per ventricle/bulb per animal was first determined, and analyses were then performed on a per animal basis (generally 4 animals per group). Two-tailed unpaired t-tests were used to compare the means between pairs of groups, unless otherwise indicated, and statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ . All statistical analyses were performed using GraphPad Prism for Windows (version 5.02, GraphPad Software Inc).

### 3. Results

#### 3.1 Constitutively proliferating cells in the young adult mouse SVZ

A central feature of the young adult SVZ stem cell niche is the presence of a large, heterogeneous pool of constitutively proliferating cells. We began by using a variety of cell type-specific markers to characterize the proportions of this proliferating cell population that correspond to type A, B, C, and E cells.

Cell proliferation was assessed by expression of Ki67, a widely used proliferation-associated antigen (Scholzen and Gerdes, 2000). Consistent with previous studies, proliferating cells were found localized in clusters within the sub-ependymal layer of the SVZ (Figure 1a). When Ki67-expressing nuclei were identified by immunohistochemistry (IHC) and then quantified from 1 $\mu$ m semi-thin reconstructions of the SVZ, they were found to represent approximately 20% of all SVZ cells (Figure 1a). IHC on adjacent semi-thin sections confirmed the reliability of the IHC protocol: as expected, virtually all SVZ cells (ependymal and sub-ependymal) were immunoreactive for Nestin, a marker of immature neural cells; S100 $\beta$ -expressing cells were limited to the ependymal layer and to presumptive astrocytes at the striatal border of the SVZ; and Doublecortin (DCX)-expressing neuroblasts were found in sub-ependymal clusters (Figure 1a).

To identify the main sub-populations of proliferating SVZ cells, we used multi-label fluorescence IHC to co-label for markers of proliferation and previously reported markers of SVZ cells (Figure 1b, c). Virtually all Ki67<sup>+</sup> proliferating SVZ cells co-expressed the early neural lineage markers, Nestin and Sox2, excluding any significant contribution from microglia or endothelial cells (Figure 1b). The type A

neuroblast marker, DCX, and the type C progenitor sub-type markers, Mash1 and Olig2, labelled sub-populations of Ki67+ cells (Figure 1c), and the expression of Mash1 partially overlapped with that of DCX and that of Olig2 (data not shown)\*. No overlapping expression of Olig2 and DCX was observed. Quantification revealed that DCX was expressed by approximately 50% of proliferating cells (=25% of the DCX population), Mash1 was expressed by 50% of proliferating cells (=77% of the Mash1 population), and Olig2 was expressed by approximately 17% of proliferating cells (=56% of the Olig2 population). Small numbers of proliferating SVZ cells were also labelled with the type B astrocyte/neural stem cell marker GFAP or the type C progenitor marker NG2, but these populations could not be reliably quantified due to the fibrous nature of the labelling (Figure 1c). As expected from previous studies, no proliferating ependymal cells (S100 $\beta$ +Ki67+) were detected (Chiasson et al., 1999, Doetsch et al., 1999, Spassky et al., 2005) (Figure 1c). There was no significant difference in quantifications made from two separate mouse strains, C57BL/6 and CD1 mice, with both yielding an identical proliferation index of 20% and proliferating fractions of DCX+ cells and Olig2+ cells. Subsequent experiments were therefore performed using only C57BL/6 mice, a commonly used inbred mouse strain.

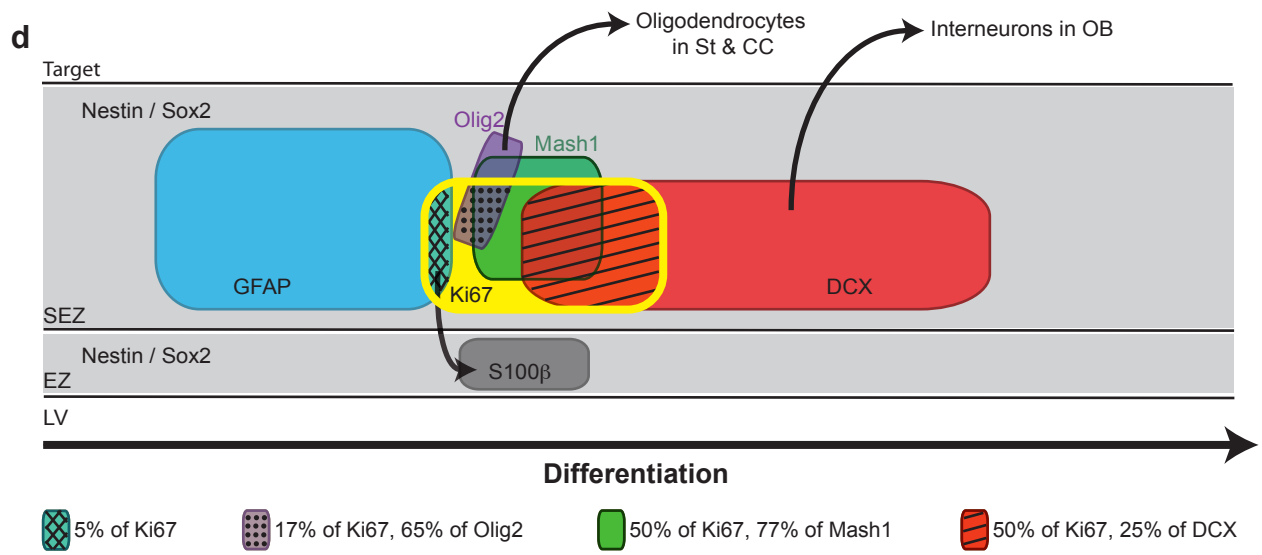
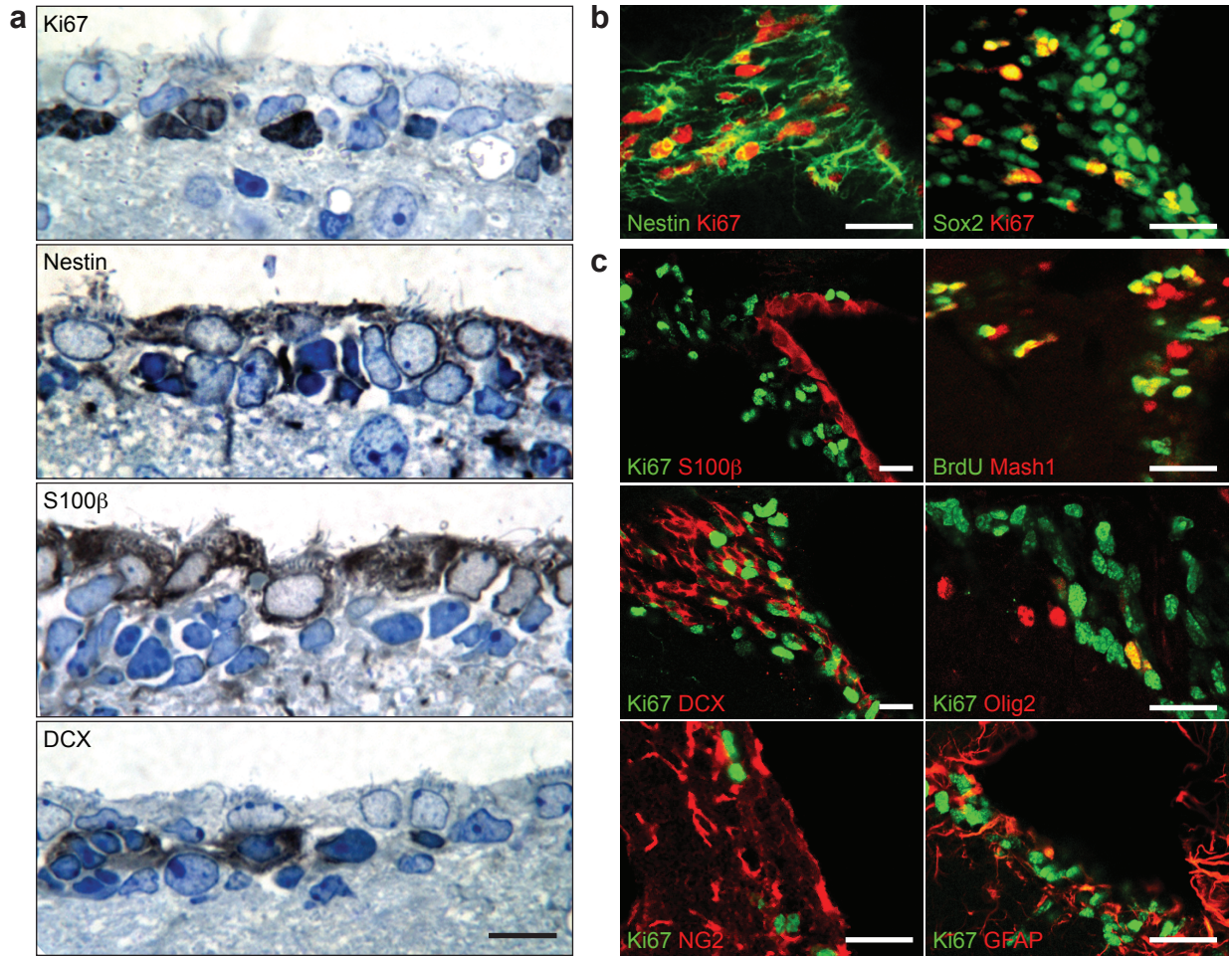
-----

\* : Within the SVZ: (1) the double labelled Mash1(+) Olig2(+) sub-population represents 62% of Olig2(+) cells and 34% of Mash1(+) cells, and (2) some cells co-express Mash1 and DCX, but their proportion was not determined in this study.

The relationships between the constitutively proliferating pool of SVZ cells and the principal, antigenically-defined SVZ cell types in the young adult brain are illustrated in Figure 1d. These results indicate that i) the marker Mash1 is most closely associated with the proliferative state, as greater than 75% of Mash1-expressing cells were Ki67+, and ii) the Mash1+ population separates into a DCX+ lineage and an Olig2+ lineage, which are associated with neuronal and oligodendrocytic fates, respectively.

-----

Figure M1 : **Relationship between proliferation and cell lineage markers in the SVZ of young adult mice.** **a**, Pre-embedding immunohistochemistry on coronal semi-thin sections of the striatal SVZ using various cell type markers: Ki67 for proliferating cells, Nestin for undifferentiated neural precursors, S100 $\beta$  for ependymal cells and DCX for neuroblasts. Note that Ki67+ nuclei are exclusively sub-ependymal. **b,c** Double label immunofluorescence staining for proliferating cells and cell-type markers. In **b**, all Ki67+ proliferating cells (red) express the immature neural markers Nestin and Sox2 (green). In **c**, note that S100 $\beta$ + ependymal cells (red) do not express Ki67, and that sub-populations of proliferating cells (green) express the markers Mash1, DCX, Olig2, NG2 or GFAP. **d**, Schematic of SVZ marker expression in relation to the constitutively proliferating SVZ cell population and SVZ differentiation pathways. Model is derived from the present results and findings from (Doetsch et al., 1997, Menn et al., 2006, Luo et al., 2008, Roybon et al., 2009). Scale bars: in **a** = 10 $\mu$ m, in **b** and **c** = 30 $\mu$ m.



### 3.2 Antigenic and anatomical changes within the middle-aged SVZ niche

It is well established that elderly mice (18-24 months of age) exhibit major reductions in SVZ cell proliferation and alterations in the cell types and cellular organization of their SVZ stem cell niche (Tropepe et al., 1997, Enwere et al., 2004, Maslov et al., 2004, Luo et al., 2006, Ahlenius et al., 2009). It has also been reported that some changes are already detectable by electron microscopy in middle-aged mice (12 months of age), including reduced numbers of ultrastructurally identified type C progenitors and type A neuroblasts (Luo et al., 2006). We therefore sought to confirm and extend these observations of changes occurring within the SVZ stem cell niche between the young adult (2-months-old) and middle-aged (12-months-old) periods of adulthood (Figures 2 and 3).

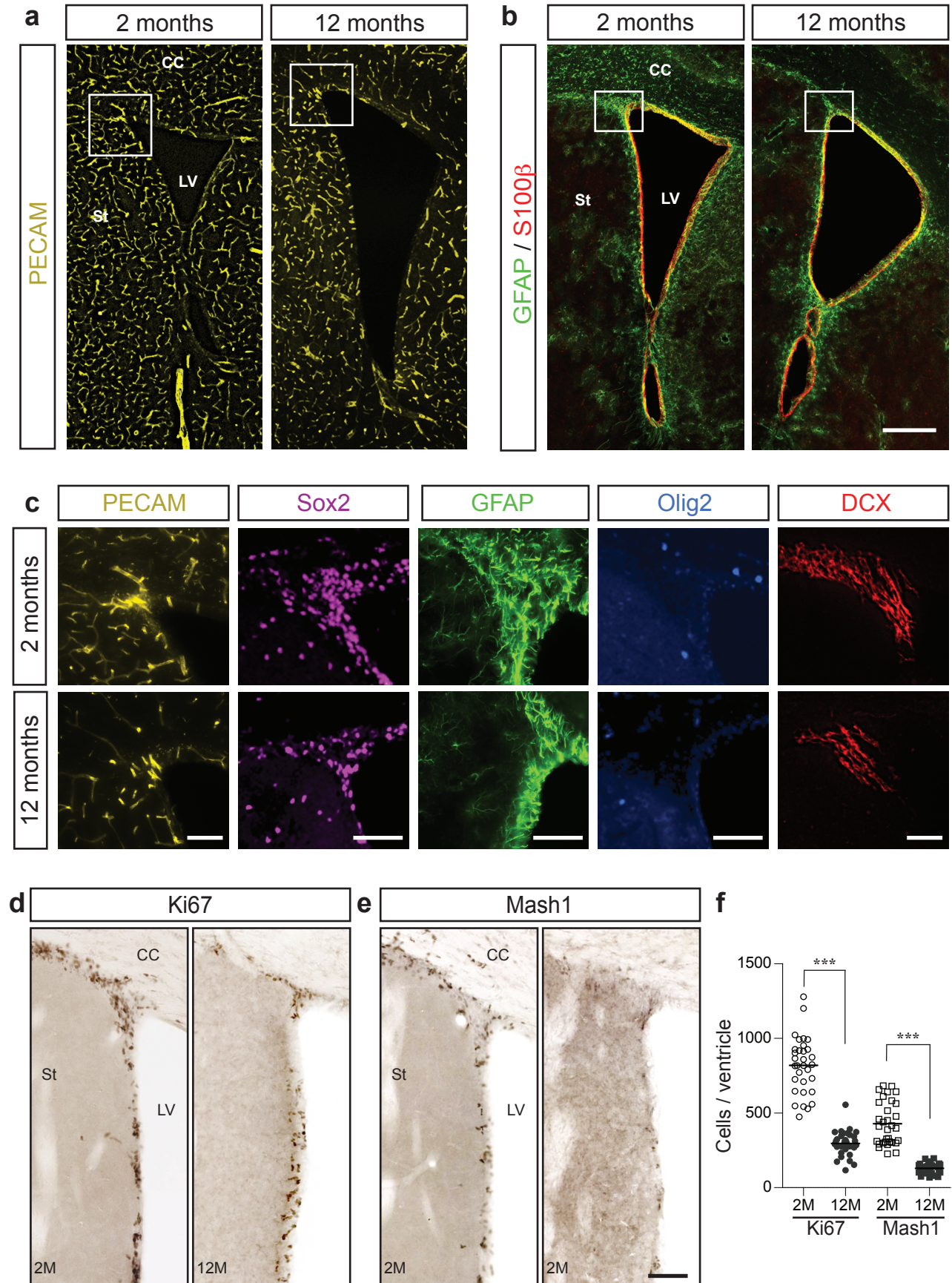
We began by surveying changes in expression patterns for a variety of SVZ-associated markers in young adult and middle-aged mice (Figure 2). Blood vessels, an important component of the SVZ neurogenic niche in young adult mice (Mirzadeh et al., 2008, Shen et al., 2008, Tavazoie et al., 2008), remained prominent within the middle-aged SVZ (Figure 2a, c), although they tended to display a less complex branching morphology throughout the brain (including in the SVZ). GFAP, expressed by type B astrocytes, showed less immunoreactivity within the SVZ and adjacent corpus callosum in middle-aged mice (Figure 2b, c). The number of cells labelled for Sox2 was markedly reduced in the middle-aged SVZ, and suggested an overall thinning of the SVZ (Figure 2c). Lastly, the numbers of Olig2+ oligodendrocyte progenitors and DCX+ neuroblasts were both visibly decreased in middle-aged mice (Figure 2c). Quantifications indicated that the numbers of Ki67+ proliferating cells and Mash1+ neural progenitors were both significantly decreased (Figure 2d-f). Compared to young adult mice, middle-aged mice had a 65% decrease in Ki67+ cells ( $818.7 \pm 31.9$  vs.  $296.8 \pm 25.61$  cells/ventricle,  $p \leq 0.001$ ,  $n=4$ ) (Figure



2d, f) and a parallel 68% decrease in Mash1+ cells ( $427.7 \pm 48$  vs.  $129.8 \pm 9.9$  cells/ventricle,  $p \leq 0.001$ ,  $n=4$ ) (Figure 2e, f). Thus, the majority of the constitutively proliferating cell population in the young adult mouse SVZ is already lost by middle-age.

-----

Figure M2 : **Age-related changes in expression of SVZ precursor markers between early adulthood and middle-age.** **a-c**, Fluorescence-based immunohistochemistry on coronal sections through the SVZ of 2 and 12-month-old mice. **a**, PECAM (yellow) expression in the young adult and middle-aged SVZ. **b**, GFAP (green) and S100 $\beta$ (red) expression in the young adult and middle-aged SVZ. **c**, High magnification of the dorsolateral corner shows PECAM (yellow), Sox2 (purple), GFAP (green), Olig2 (blue) and Dcx (red) expression in the young adult and middle-aged SVZ. **d-e**, DAB-based immunohistochemistry on coronal SVZ sections using antibodies for **d**, Ki67 or **e**, Mash1. **f**, Quantifications showing reductions in the number of Ki67(+) proliferating cells and Mash1(+) progenitors and neuroblasts between 2 and 12 months of age. LV, lateral ventricle; St, striatum; CC, corpus callosum.  $n=4$  animals per group,  $P \leq 0.001$  (\*\*\*) . Scale bars; in b = 200 $\mu$ m (for a, b), in c = 50 $\mu$ m, in e = 100 $\mu$ m (for d, e).



Since reduced expression of cellular markers is not necessarily indicative of cell loss, we examined the consequences of these observations on the structure of the SVZ niche in greater detail. Tissue sections were processed for Ki67 IHC and then used to generate 1  $\mu\text{m}$  semi-thin reconstructions of the lateral ventricles walls (Figure 3). Unlike the 2-month-old SVZ, which possessed a continuous, 3-6 cell thick sub-ependymal layer (Figure 3a), the 12-month-old SVZ displayed numerous regions where the sub-ependymal layer was non-existent or reduced in thickness (Figure 3b). Consistent with our earlier quantification (Figure 1a), approximately 20% of SVZ cells were found to be Ki67+ in 2-month-old mice, and this proportion was maintained in 12-month-old mice (Figure 3c, d, g). Moreover, an equal percentage of SVZ cells were ependymal cells in both 2- and 12-month-old mice (Figure 3h). Since the total number of SVZ cells decreased by approximately 30% in 12-month-old mice (data not shown), these data indicate that middle-aged mice underwent a proportional loss of both ependymal cells and proliferating sub-ependymal cells. Interestingly, closer examination of the SVZ showed that the proportion of ependymal cells possessing large, cytoplasmic lipid droplets (approximately 2 to 6 $\mu\text{m}$  in diameter) doubled to 40% in middle-aged mice (Figure 3e, f, i), possibly indicative of age-related changes in lipid metabolism (Martin and Parton, 2006, Farese and Walther, 2009).

Together, these findings reveal that a marked atrophy of the SVZ takes place by middle-age, and that this is associated with significant changes to both the proliferating and non-proliferating constituents of the SVZ niche.



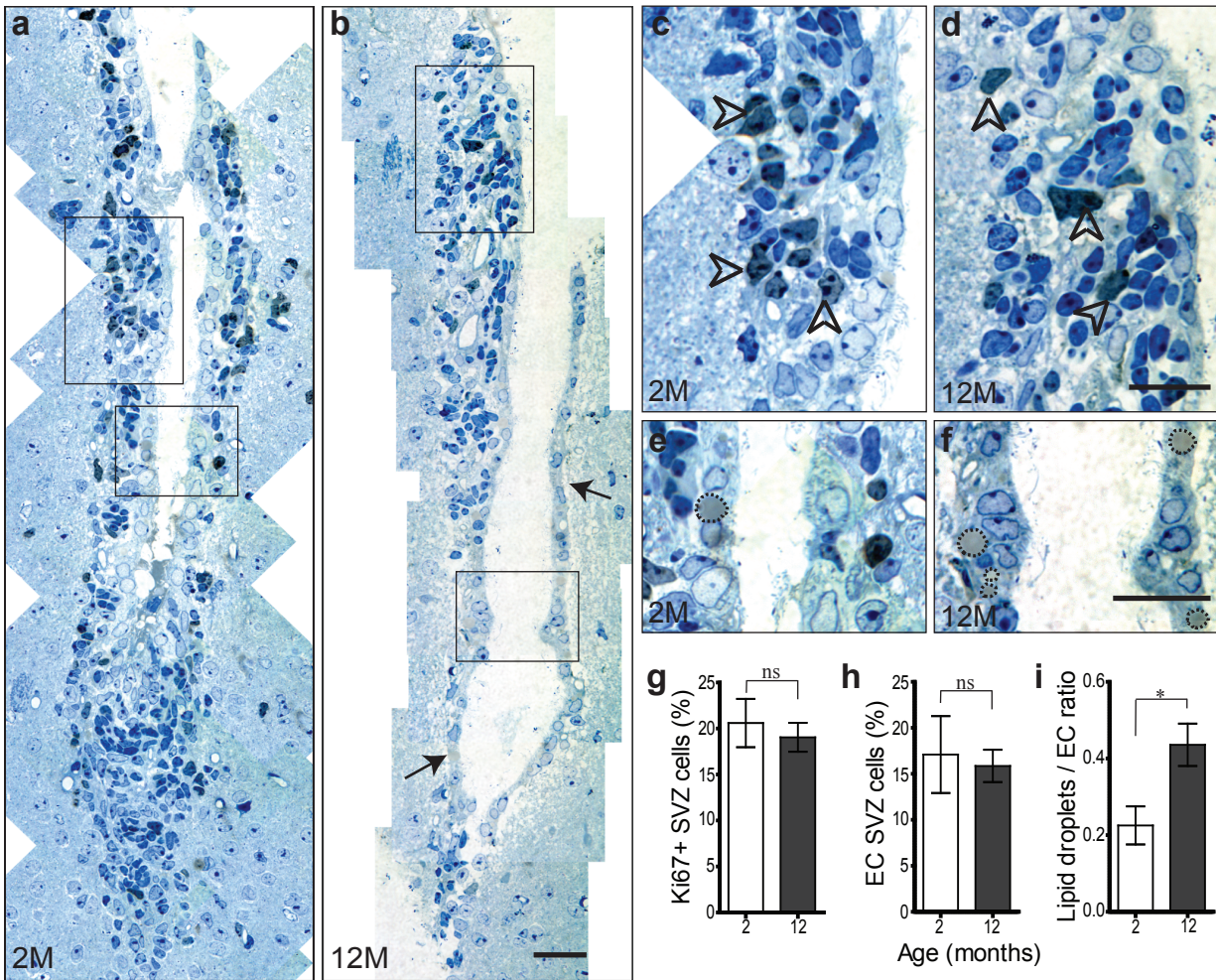


Figure M3: **Cytological changes within the SVZ niche between early and mid-adulthood.** Reconstruction of the SVZ from semi-thin sections from **a**, 2-month-old young adult (2M) and **b**, 12-month-old middle-aged (12M) mice, both processed for pre-embedding immunohistochemistry for Ki67. In **b**, arrows highlight areas of discontinuity of sub-ependymal cells. **c,d**, Enlargement of upper boxed areas in **a** and **b**. Arrowheads indicate some Ki67+ nuclei. **e,f**, Enlargement of lower boxed areas in **a** and **b**. Note the loss of sub-ependymal cells in the 12-month-old SVZ, as well as the increased number of large-sized lipid droplets within the ependymal layer (dotted line circles). **g-i**, Quantification of **g**, the percentage of SVZ cells that are Ki67+, **h**, the percentage of SVZ cells that are ependymal cells (EC), and **i**, the ratio of lipid droplets to the number of ependymal cells. Scale bars = 20 $\mu$ m, n=3 animals per group, P > 0.05 (ns), P  $\leq$  0.05 (\*).

### **3.3 Reduced numbers of BrdU-retaining cells in the middle-aged olfactory bulbs and SVZ**

SVZ-derived type A neuroblasts migrate to the OB via the rostral migratory stream (RMS) (Doetsch et al., 1999). Previous work has shown that, in elderly 18-24-month-old mice, fewer SVZ-derived neuroblasts are contributed to the OB (Enwere et al., 2004), but it is unclear whether this reduction has already begun in 12-month-old middle-aged mice. Moreover, it is possible that migrating neuroblasts or aNSCs residing within the RMS/OB (Pagano et al., 2000, Gritti et al., 2002, Alonso et al., 2008) may undergo extra rounds of division to initially compensate for reduced numbers of SVZ-derived neuroblasts. We therefore tested whether the above reductions in SVZ neurogenesis in middle-aged mice had already resulted in fewer neurons reaching the OB.

To trace the migration of SVZ-derived neuroblasts, BrdU was administered to the drinking water of young adult and middle-aged mice for 14 days, and the animals were sacrificed after an additional 3 weeks (Figure 4a). Young adult and middle-aged mice consumed equal volumes of BrdU-treated water (Figure 4b). IHC for Ki67 on OB sections revealed that the number of proliferating cells within the rostral extension of the RMS was decreased by 55% in middle-aged mice ( $70.4 \pm 5.1$  vs.  $33.7 \pm 4.4$  cells/section,  $p \leq 0.001$ ,  $n=4$ ) (Figure 4c,e-g). IHC for BrdU-retaining cells illustrated that BrdU<sup>+</sup> cells were homogeneously distributed in the granular and periglomerular layer of the OB, with a reduction of 76% in BrdU<sup>+</sup> cells in the granular layer of middle-aged mice ( $48.9 \pm 4.69$  vs.  $11.3 \pm 2.19$  cells/40x field,  $p = 0.0019$ ,  $n=3$ ) (Figure 4 d,h-j). Double-label immunofluorescence confirmed that in both young adult and middle-aged mice, 94-97% of the BrdU-retaining cells were NeuN<sup>+</sup> neurons (Figure 4k-m). Thus, the reduced SVZ neurogenesis observed in middle-aged mice has already translated into a similar decrease in the number of

newly born neurons being added to the OB, the principal functional output of the SVZ.

Tissues obtained using this BrdU paradigm were also used to assess the number of BrdU-incorporating cells retained within the SVZ, an established measure of the number of aNSCs that have divided over the course of the BrdU administration (Chiasson et al., 1999, Johansson et al., 1999, Jackson et al., 2006, Qu et al., 2010). aNSCs in the SVZ divide once every 28 days in the young adult mouse (Morshead et al., 1994), enabling them to retain incorporated BrdU for long periods of time. In contrast, the rapidly dividing type C progenitors quickly dilute out the BrdU during the 21 day chase period, while the migratory type A neuroblasts exit the SVZ via the RMS. Thus, BrdU-retaining cells within the SVZ are indicative of the number of resident aNSCs that have divided during the BrdU treatment period (Morshead et al., 1994, Chiasson et al., 1999, Johansson et al., 1999, Jackson et al., 2006, Qu et al., 2010). Quantification revealed that middle-aged mice had a 67% decrease in the number of BrdU-retaining SVZ cells ( $82.3 \pm 1.26$  vs.  $27.5 \pm 7.12$  cells/ventricle,  $p = 0.0016$ ,  $n=3$ ) (Figure 4 n-p), consistent with a significant decrease in the number of mitotically active aNSCs in the middle-aged SVZ.

### **3.4 The number of aNSCs cultured from the middle-aged SVZ is unchanged**

The decreased numbers of BrdU-retaining cells within the middle-aged SVZ could be explained by either a decrease in the actual number of aNSCs, a reduced proliferation rate/increased quiescence of aNSCs, or both. To determine whether the number of SVZ cells possessing aNSC potential is altered between early and mid-adulthood, we used the colony-forming neurosphere assay (Reynolds and Weiss, 1992). When performed under appropriate and carefully controlled conditions, the

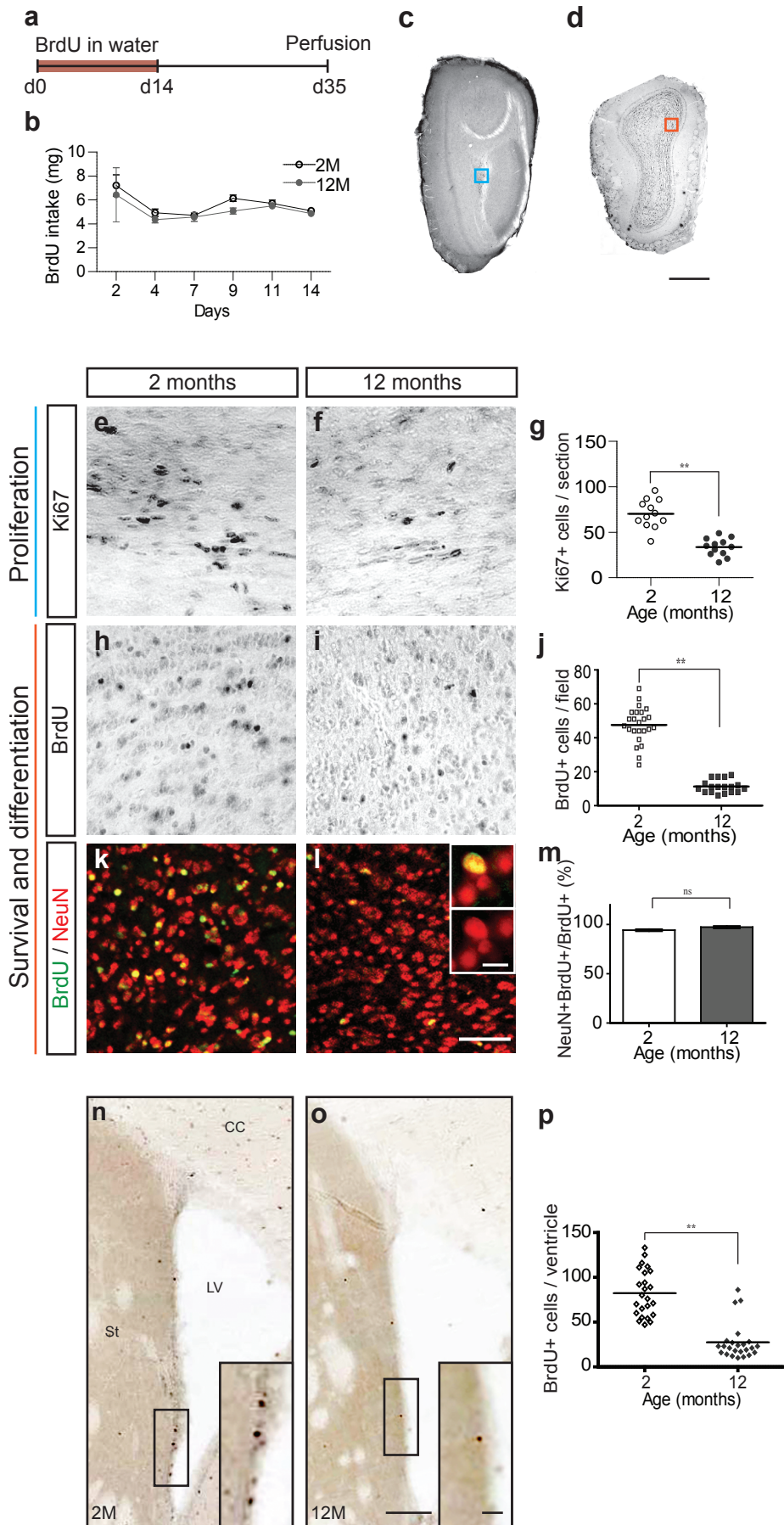
neurosphere assay provides a quantitative estimate of the number of cells having aNSC properties (Coles-Takabe et al., 2008, Louis et al., 2008).

Neurospheres were grown from the striata of 2-month-old and 12-month-old mice using two variations: (1) saturating growth factor conditions, where neurosphere cultures are fed regularly with epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor-2 (FGF2) (+GF), and (2) limiting growth factor conditions, where neurosphere cultures are only fed initially and then left untouched to prevent the formation of chimeric spheres (-GF) (Coles-Takabe et al., 2008) (Figure 5a-f). After seven days of growth under neurosphere-forming conditions *in vitro*, approximately 600-800 clonally-derived neurospheres were generated from the brains

-----

Figure M4 : **BrdU-retaining cells are decreased in the middle-aged SVZ and OB.** DAB and fluorescence-based immunohistochemistry on coronal sections through the SVZ and the OBs of BrdU-treated young adult and middle-aged mice. **a**, *In vivo* BrdU labelling procedure. Mice were administered BrdU for 2 weeks in their drinking water, followed by a 3 week chase period. **b**, BrdU intake by young adult and middle-aged mice. **c**, Ki67 was quantified in the subependymal zone (SEZ) of the OBs (blue square), which is the extension of the RMS (bregma +3.3 to +3.9 mm). **c**, 21d BrdU-retaining cells were quantified in the granule layer (red square) of the OBs (bregma +4.1 to +4.9 mm). **e,f**, Micrographs of Ki67+ cells in **e**, young adult and **f**, middle-aged mice. **g**, Quantification of the number of Ki67+ cells/section. **h,i**, Micrographs of BrdU+ cells in **h**, young adult and **i**, middle-aged mice. **j**, Quantification of the number of BrdU+ cells/section. **k,l**, Double-label immunofluorescence for BrdU (green) and NeuN (red) in the granule layer of **k**, young adult and **l**, middle-aged mice. **m**, Quantification of the percentage of BrdU+ cells that were NeuN+. **n,o**, Coronal sections through the SVZ from **n**, young adult and **o**, middle-aged mice. Boxed areas are enlarged in insets, showing the BrdU-retaining nuclei at higher magnification. **p**, Quantification shows that the number of long-term BrdU-retaining cells within the SVZ decreases by 66% in middle-aged mice. Scale bars; in **d** = 500µm (for **c**, **d**), in **l** = 20µm (for **e**, **f**, **h**, **i**, **k**, and **l**) (inset = 5µm), in **o** = 100µm (inset = 10µm) (for **n**, **o**), n=3 animals per group for BrdU, n=4 animals per group for Ki67,  $P > 0.05$  (ns),  $P \leq 0.01$  (\*\*).

**Figure M4**





of 2-month-old young adult mice, in good agreement with previous studies (Enwere et al., 2004). Interestingly, using -GF and +GF growth conditions, there was no significant difference in the number of primary neurospheres generated from young and middle-aged tissues (Figure 5a-c). When young adult and middle-aged neurospheres were dissociated and re-plated at clonal concentrations, they also displayed a similar self-renewal capacity (Figure 5e). Moreover, regardless of the treatment paradigm, neurospheres generated from 2- and 12-month-old mice were indistinguishable in terms of size, indicating there was no significant difference in the intrinsic proliferation capacity of neural precursors from the two age groups (Figure 5d,f).

Together with the reduction in the number of BrdU-retaining cells in the SVZ (Figure 4 n-p), these results suggest that the observed *in vivo* decrease in SVZ proliferation and neurogenesis results from an increased quiescence rather than loss of middle-aged aNSCs.

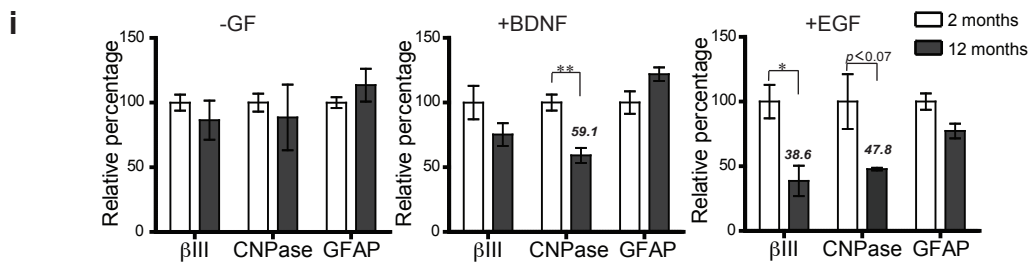
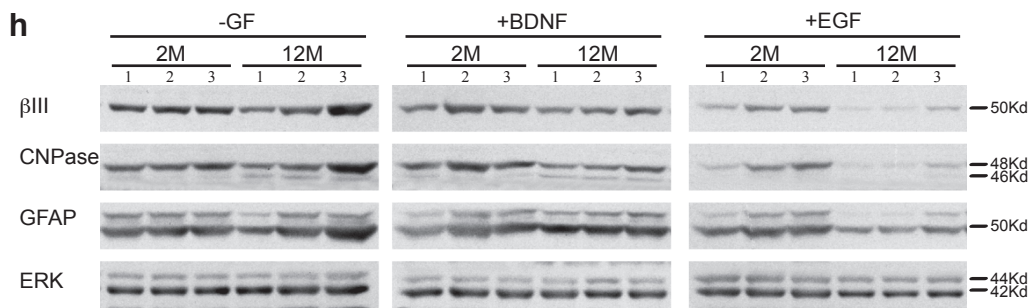
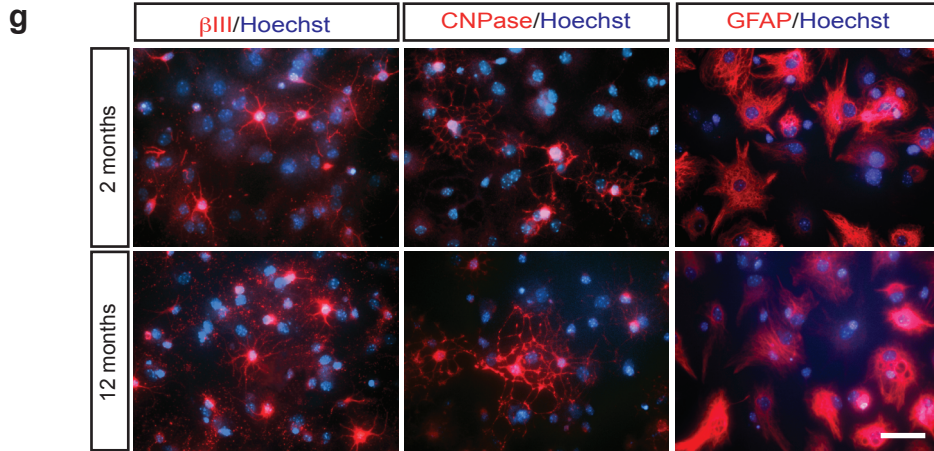
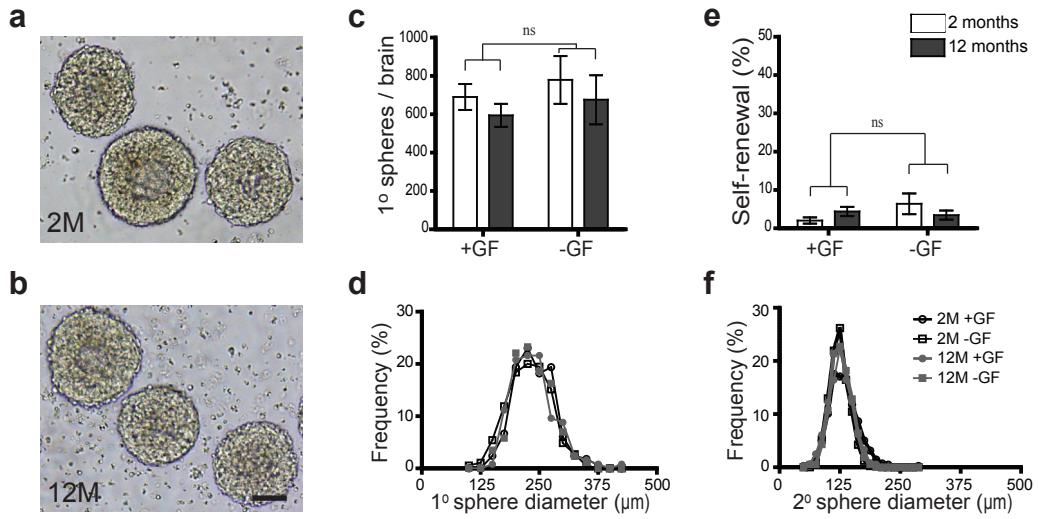
### **3.5 Middle-aged neural precursors exhibit reduced growth factor-mediated differentiation**

The neurospheres generated above were also used to test the intrinsic differentiation potential of 2- and 12-month-old neural precursors (Figure 5g-i). When primary neurospheres were dissociated, plated and differentiated for 9 days in the absence of FGF2 and EGF, neurospheres derived from both ages were capable of producing all three lineages of CNS cells,  $\beta$ III tubulin-expressing neurons, GFAP-expressing astrocytes and CNPase-expressing oligodendrocytes (Figure 5g). To quantify the levels of differentiation produced under different growth factor conditions, Western blotting was used to analyze sister cultures that were differentiated in the absence of growth factors, or in the presence of either FGF2,

brain-derived neurotrophic factor (BDNF) or EGF. Densitometry showed no significant age-related difference in the levels of  $\beta$ III-tubulin, CNPase or GFAP produced in either the absence of growth factors (Figure 5h) or in the presence of FGF2 (not shown) (Figure 5i). However, in response to BDNF or EGF, middle-aged neurospheres tended to generate less CNPase and  $\beta$ III tubulin (Figure 5h,i), including a 41% reduction in CNPase in response to BDNF ( $p=0.0084$ ,  $n=3$ ) and a 61% reduction in  $\beta$ III tubulin in response to EGF ( $p=0.0245$ ,  $n=3$ ). While these results do not distinguish between differences in neuron/oligodendrocyte production, survival, or protein expression, they reveal significant age-related differences in growth factor-induced differentiation of 2- and 12-month-old neurospheres.

-----

**Figure M5 : The number and *in vitro* proliferative capacity of middle-aged SVZ neural precursors are unchanged but their responses to growth factors are altered.** **a,b**, Representative images of neurospheres grown from the striata of **a**, young adult (2M) and **b**, middle-aged (12M) mice. **c**, Quantification of the number of primary neurospheres grown after 7 days *in vitro*. There is no significant difference in the number of neurospheres, regardless of age or whether they are fed regularly with growth factors (“+GF”) or only at the time of plating (“-GF”). **e**, When primary spheres were dissociated, they generated equal numbers of secondary spheres per primary sphere regardless of age or original feeding conditions, indicating equivalent self-renewal capacity. **d,f**, Both **d**, primary neurospheres and **f**, secondary neurospheres showed equal size distributions regardless of age or feeding conditions, indicating equivalent proliferative properties. **g**, Differentiated primary neurosphere cells from young adult (upper row) and middle-aged (lower row) mice, probed by fluorescence immunocytochemistry for the neuronal marker  $\beta$ III-tubulin, the oligodendrocyte marker CNPase, and the astrocyte marker GFAP. Cells were differentiated in 1% FBS, in the absence of other exogenous growth factors, and showed no obvious age-associated difference in the proportions of neural progeny. **h**, Western blot analysis of cultures generated from three 2-month-old and three 12-month-old mice, differentiated for 9 days *in vitro* either in the absence of exogenous growth factors (“-GF”) or in the presence of exogenous BDNF or EGF. **i**, Densitometry quantifications of Western blots, showing age-associated differences in the differentiation of neurons and oligodendrocytes in the presence of BDNF and EGF. Scale bars in **b** = 50 $\mu$ m (for **a**, **b**), in **g** = 40 $\mu$ m,  $n=3$  animals per group,  $P > 0.05$  (ns),  $P \leq 0.05$  (\*),  $P \leq 0.01$  (\*\*). Two-way ANOVA analyses for **c-f**.



## 4. Discussion

In the present study, we investigated changes occurring within the SVZ stem cell niche of mice between young adulthood and middle-age. Our principal findings are that (i) the activity of the SVZ system is highly reduced by middle-age, as reflected by reductions in the total number of proliferating neural precursors and a corresponding decrease in the rate of neuron addition to the OB; (ii) the SVZ stem cell niche exhibits marked cytological alterations by middle-age, including atrophy and partial loss of the sub-ependymal layer and the accumulation of large lipid droplets in the ependymal layer; (iii) neural precursors of middle-aged mice show evidence of increased quiescence *in vivo* and altered growth factor responsiveness *in vitro*; and (iv) these events take place without any significant age-associated decrease in the number of SVZ stem cells. These findings are summarized in Figure 6.

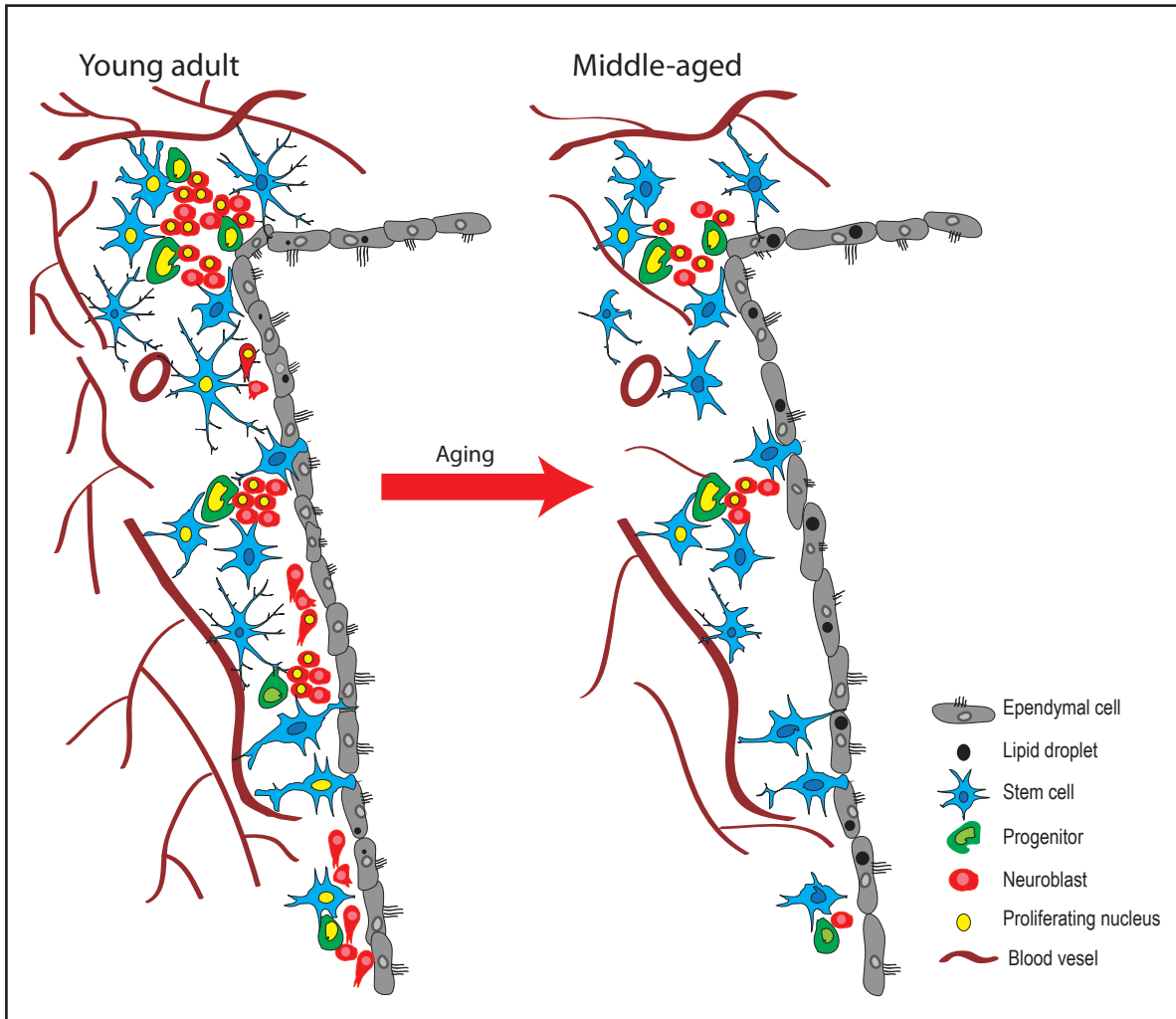


Figure M6: **Summary of age-associated changes occurring in the SVZ stem cell niche between early adulthood and middle-age.** The middle-aged SVZ undergoes a significant decline in the number of constitutively proliferating cells (yellow nuclei). Although the number of neurosphere-forming aNSCs (“stem cells”) remains stable, they proliferate less frequently in vivo, resulting in fewer progenitor cells and neuroblasts, and the disappearance of the sub-ependymal layer in some areas. These signs of quiescence may be regulated by local niche changes such as blood vessel alterations, ependymal cell loss, and/or metabolic alterations suggested by the increased numbers of large lipid droplets within the ependyma. In vitro, young adult and middle-aged neural precursors also display differences in their differentiation responses to particular growth factors (not shown; Figure 5).

#### **4.1 Aging-related changes in neural precursors and their SVZ niche**

Using a panel of markers to label various sub-populations of SVZ cells, we found that the middle-aged mouse SVZ showed strong reductions in the number of cells expressing markers for proliferation, progenitor cells and neuroblasts. In a previous study, Luo and colleagues likewise reported that the SVZ of middle-aged mice had reduced BrdU incorporation, indicative of less proliferation, and that by electron microscopy, there were fewer cells having the ultrastructural characteristics of type C progenitors and type A neuroblasts (Luo et al., 2006). Together, these results strongly suggested a reduced cellular output of the SVZ stem cell system by middle-age. To confirm this idea, we went on to assess the ongoing addition of SVZ-derived neuroblasts to the OB. Remarkably, we found that SVZ proliferation and the addition of BrdU-labelled neurons to the OB were both decreased by 65-76%, showing that these changes affected the entire SVZ/OB system, and that they were not significantly compensated for by aNSCs that have been reported to exist within the OB and RMS (Pagano et al., 2000, Gritti et al., 2002). Interestingly, Enwere and colleagues have reported that 2-year-old elderly mice had a virtually identical decrease in olfactory neurogenesis (Enwere et al., 2004) to what we have reported here for 12 month-old middle-aged mice; this suggests that aging-associated decreases in SVZ neuroblast production are already established by middle-age.

Examination of the overall cytology of the SVZ provided additional evidence that the SVZ stem cell niche is significantly altered by middle-age. First, the SVZ generally atrophied, mediated by the complete disappearance of the sub-ependymal cell layer in some areas; the sub-ependymal cell layer is normally occupied by type A, B and C sub-populations of neural precursors (Doetsch et al., 1997, Doetsch et al., 1999). Second, ependymal cells were decreased in the same proportion as sub-ependymal cells; this likely contributes to a reduction in neurogenic signals within

the SVZ niche, as ependymal cells are a source of multiple neurogenesis-promoting factors (Lim et al., 2000, Ramirez-Castillejo et al., 2006). Third, we identified a striking increase in the number of large lipid droplets present within the SVZ. These large-sized lipid droplets were located within the ependymal layer, and were increased in number by approximately two-fold compared to young adult mice. Lipid droplets are increasingly recognized as important and active organelles that play key roles in cellular metabolism, energy regulation and lipid compartmentalization (Martin and Parton, 2006, Goodman, 2008, Greenberg and Obin, 2008, Farese and Walther, 2009). While lipid droplets are present in most eukaryotic cells, it is unknown what the role and functional significance might be for the large lipid droplets that we observed in the ependyma, which is the brain's interface with the cerebrospinal fluid and a prominent regulatory component of the SVZ niche (Lim et al., 2000). Greater study of lipid metabolism in the aging SVZ may be of direct relevance to aging-associated alterations in SVZ neurogenesis.

#### **4.2 Altered properties, but not numbers, of middle-aged mouse forebrain aNSCs**

Using the clonal neurosphere assay, we determined that young adult and middle-aged mouse forebrains do not possess significantly different numbers of neurosphere-initiating cells. Several methods of using the neurosphere assay are currently in use, and recent studies have identified modifications aimed at ensuring the clonality of sphere formation (Coles-Takabe et al., 2008, Louis et al., 2008). In control experiments, we performed mixing experiments to identify culture conditions that, under our specific conditions, reproducibly yielded clonally derived neurospheres (See Methods). Furthermore, we consistently obtained 600-800 primary neurospheres per brain, comparable to the numbers obtained by others (Enwere et al., 2004). It is important to note that there is some debate about whether neurospheres originate from type B stem cells, type C progenitors, or both (Doetsch et al., 2002). However, given the massive decline in the Mash1+ type C population

that we observed between young adult and middle-aged mice, the lack of a statistical difference in the number of neurospheres derived from these mice indicates that, at least under our conditions, these neurospheres are likely to be derived principally from the type B stem cell population.

While there was no significant difference in the number of neurospheres derived from young adult versus middle-aged mice, two lines of evidence indicated that there are important differences in key properties of these neural precursors. First, differentiation by middle-aged neurospheres was detectably altered. While young adult and middle-aged neurospheres produced similar amounts of neuronal, oligodendrocyte, and astrocyte markers under basal differentiation conditions, middle-aged neurospheres generated significantly less neuronal and oligodendrocyte proteins in response to EGF and BDNF, respectively. Further experimentation will be required to determine whether this difference reflects reduced production of neurons and oligodendrocytes, altered survival responses of these cells, or decreased protein expression. Interestingly, a previous study has shown that immunoreactivity for the EGF receptor is diminished within the SVZ of 2-year-old elderly mice (Enwere et al., 2004), although it was not determined whether this was due to a decrease in the number of EGF receptor-expressing cells or the levels of receptor expression.

Second, middle-aged aNSCs showed evidence of a reduced *in vivo* proliferation rate. Using a classical *in vivo* BrdU label-retaining paradigm, we found that 65-70% fewer BrdU-incorporating cells had persisted within the middle-aged SVZ 21 days after BrdU administration. Previous studies have shown that long-term BrdU-labelled cells include the SVZ stem cell population (Chiasson et al., 1999, Johansson et al., 1999), and that these SVZ stem cells are type B astrocytes (Jackson et al., 2006, Qu et al., 2010). Thus, despite having similar numbers of neurosphere-



forming aNSCs, middle-aged aNSCs show evidence of proliferating less frequently (i.e., to be more quiescent) than young aNSCs. A possible caveat to this finding is that middle-aged mice outweighed their younger counterparts by approximately 55%; thus, although their intake of BrdU from the drinking water was identical to that of young adult mice, they may have had a decreased BrdU bioavailability. However, the interpretation that middle-aged aNSCs are more quiescent is consistent with the finding that neural precursor cell cycle times are increased in elderly (2-year-old) mice (Tropepe et al., 1997). Furthermore, recent work indicates that aNSCs in the hippocampus also increasingly shift into a quiescent state (Lugert et al., 2010).

### **4.3 Conclusions**

In the present study, we have identified changes occurring to both aNSCs and their SVZ niche during the early to mid-adulthood period. These changes are clearly evident prior to the onset of age-associated aNSC loss. In the future, defining the molecular basis of the changes occurring during this critical early adulthood period may be highly relevant for developing a deeper understanding of how healthy brain aging is promoted by factors such as exercise and diet, as well for comprehending the development of age-related neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's Disease.

## **Acknowledgements**

This work was supported by funds from the Canadian Institutes of Health Research (Grant number 86600), the Scottish Rite Charitable Foundation of Canada (Grant number 07114), the Alzheimer Societies of Canada and Saskatchewan (New Investigator Grant) and the Stranahan Foundation (American Alzheimer Association Grant number NIRG-07-60174). The authors are grateful to the members of the Fernandes lab and colleagues in the Department of Pathology and Cell Biology for helpful discussions and technical advice.

## Reference list

- 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.
- Alonso M, Ortega-Perez I, Grubb MS, Bourgeois JP, Charneau P, Lledo PM (2008), Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ. *J Neurosci* 28:11089-11102.
- Carlen M, Meletis K, Goritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabe-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisen J (2009), Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* 12:259-267.
- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, 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.
- 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.
- 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.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A (1996), Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14895-14900.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999), Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F, Garcia-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.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002), EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.
- 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.

- Farese RV, Jr., Walther TC (2009), Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139:855-860.
- Goodman JM (2008), The gregarious lipid droplet. *J Biol Chem* 283:28005-28009.
- Greenberg AS, Obin MS (2008), Many roads lead to the lipid droplet. *Cell Metab* 7:472-473.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL (2002), Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22:437-445.
- Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, Vandenberg S, Alvarez-Buylla A (2006), PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 51:187-199.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999), Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996), Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000), Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713-726.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996), Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, Wagey RE, Thomas TE, Eaves AC, Reynolds BA (2008), Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells* 26:988-996.
- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas CA, 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 SB, Lenington JB, Notti RQ, Conover JC (2006), The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* 5:139-152.
- Luo J, Shook BA, Daniels SB, Conover JC (2008), Subventricular zone-mediated ependyma repair in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 28:3804-3813.
- Martin S, Parton RG (2006), Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:373-378.

- 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.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine 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.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, 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.
- Morshead CM, Craig CG, 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 CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, 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.
- Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Etteri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA (2000), Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* 18:295-300.
- Qu Q, Sun G, Li W, Yang S, Ye P, Zhao C, Yu RT, Gage FH, Evans RM, Shi Y (2010), Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat Cell Biol* 12:31-40; sup pp 31-39.
- Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, Mira H, Escribano J, Farinas I (2006), Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9:331-339.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP, Shetty AK (2005), Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci* 21:464-476.
- Reynolds BA, Weiss S (1992), Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Roybon L, Deierborg T, Brundin P, Li JY (2009), Involvement of Ngn2, Tbr and NeuroD proteins during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 29:232-243.
- Scholzen T, Gerdes J (2000), The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-322.

- 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.
- Shetty AK, Hattiangady B, Shetty GA (2005), Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia* 51:173-186.
- Shetty AK, Rao MS, Hattiangady B, Zaman V, Shetty GA (2004), Hippocampal neurotrophin levels after injury: Relationship to the age of the hippocampus at the time of injury. *J Neurosci Res* 78:520-532.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2005), Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25:10-18.
- Stanley DP, Shetty AK (2004), Aging in the rat hippocampus is associated with widespread reductions in the number of glutamate decarboxylase-67 positive interneurons but not interneuron degeneration. *J Neurochem* 89:204-216.
- Taupin P, Gage FH (2002), Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69:745-749.
- 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.
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, 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.
- Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA (1996), Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16:7599-7609.

## **Discussion**

Dans la présente étude, nous avons examiné les changements structuraux et fonctionnels des CSNa et de leur principale niche (la SVZ) survenant entre le jeune âge et l'âge moyen. Premièrement, nous avons trouvé que la niche de la SVZ subit des altérations cytologiques en vieillissant, incluant une atrophie générale, une perte de cellules sous-épendymaires par endroits et une accumulation de gouttelettes lipidiques de grande taille dans l'épendyme. Ensuite, nous avons observé une forte réduction de l'activité des CSNa à l'âge moyen, représentée par une diminution du nombre de précurseurs en prolifération et résultant en une réduction similaire de neurones nouvellement produits dans les bulbes olfactifs. De plus, les CSNa montrent des signes de latence *in vivo* et une diminution de la réponse aux facteurs de croissance *in vitro*. Il faut aussi souligner que tous ces changements observés à l'âge moyen semblent se produire bien avant le moindre changement significatif du nombre des CSNa. Les résultats individuels sont discutés en détail dans la section *discussion* du manuscrit (voir p57-62).

## **1. La perte des cellules épendymaires**

Le vieillissement est accompagné par une atrophie de la SVZ. Cette atrophie est causée par la perte de la majorité des types cellulaires présents dans la niche. Puisque les cellules souches prolifèrent moins souvent, elles vont donner moins de progéniteurs et moins de neuroblastes. Mais le processus de remplacement des cellules épendymaires est aussi affecté. Les CSNa renouvellent les cellules épendymaires, mais étant donné que le processus est très lent et que l'épendyme est dépourvu de prolifération, on montre peu d'intérêt pour cette fonction dans la littérature. Le renouvellement des cellules épendymaires se fait par migration des astrocytes de la SVZ (CSNa) à la zone épendymaire et leur transformation directe en cellules épendymaires (Luo et al., 2008). Avec l'âge, et pour des raisons inconnues, il y a une diminution des cellules épendymaires. Ceci est accompagné par une



augmentation des astrocytes qui migrent vers la zone épendymaire (Luo et al., 2006) pour s'y transformer éventuellement en cellules épendymaires (Luo et al., 2008). Ce phénomène peut entraîner plusieurs problèmes : (1) la perte de CSNa avec le temps, puisqu'il n'y a pas de production intermédiaire de progéniteurs d'amplification mais plutôt une transformation directe des CSNa en cellules épendymaires; (2) le changement de transmission de la signalisation du liquide cérébro-spinal, par suite de la perte des cellules épendymaires servant de barrière et de système de filtrage du liquide cérébro-spinal (Bruni, 1998); (3) le changement de migration des neuroblastes, par suite de la perte des cils des cellules épendymaires qui dirigent normalement la migration des neuroblastes vers les bulbes olfactifs (Sawamoto et al., 2006); et (4) la perte de signalisation des cellules épendymaires puisque les cellules perdues ne seront pas complètement remplacées par les CSNa.

À ce stade, la niche de CSNa entre dans un cercle vicieux. Tard dans le processus du vieillissement, le nombre des cellules souches diminue à cause de leur transformation directe en cellules épendymaires, mais le nombre de cellules épendymaires continue de diminuer. Il en résulte une perte des molécules de signalisation, normalement exprimées par les cellules épendymaires, comme *Pigment epithelium-derived factor* (PEDF), qui stimule l'autorenouvellement des cellules souches (Ramirez-Castillejo et al., 2006), ainsi que des molécules régulatrices de la neurogenèse, comme *insulin-like growth factor binding protein* (IGFBP-2) (Cardona-Gomez et al., 2000), IGFBP-6 (Beilharz et al., 1998) et Noggin (Lim et al., 2000). Les précurseurs neuronaux de la SVZ expriment les BMP (*bone morphogenetic protein*), membres de la famille de TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*), et leurs récepteurs promoteurs de la gliogenèse *in vivo* et *in vitro* (Lim et al., 2000). Sauf que l'expression de Noggin, antagoniste de BMP, par les cellules épendymaires inhibe les BMP du microenvironnement (la niche) pour favoriser la neurogenèse. Éventuellement, la perte de Noggin et des autres molécules de signalisation associée

au vieillissement inhibera la neurogenèse (Figure 6). En résumé, il y aura moins de progéniteurs et de neuroblastes produits, et la migration du peu de cellules produites vers les bulbes olfactifs sera compromise. La question qui se pose donc ici est de savoir pourquoi et comment on perd les cellules épendymaires?

## 2. Le contrôle de la prolifération

On ne saurait attribuer la diminution de la prolifération des précurseurs de la SVZ à une seule cause nécessaire et suffisante. Plusieurs molécules et voies de signalisation sont possiblement impliquées d'une façon ou d'une autre dans l'altération de la prolifération avec l'âge. Ainsi, plusieurs facteurs sont impliqués dans la prolifération embryonnaire et adulte, comme sonic hedgehog (Shh) qui régule la prolifération des cellules souches et progénitrices (Palma et al., 2005), la tyrosine kinase Eph/ephrin, impliquée dans la prolifération des cellules souches et la migration des neuroblastes (Conover et al., 2000b), la voie de la  $\beta$ -caténine dépendante de Wnt, qui stimule la prolifération des progéniteurs et inhibe leur différenciation en neuroblastes (Adachi et al., 2007) et TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor alpha*), qui fonctionne via EGF-R (récepteur de EGF) pour favoriser la prolifération et diminuer la migration des neuroblastes dans le RMS (Kim et al., 2009b). Les liens entre ces molécules de signalisation sont mal connus. Par exemple, alors que la surexpression de BMP inhibe la neurogenèse (Lim et al., 2000) Wnt a un effet contraire. Wnt restaure la neurogenèse en inhibant GSK3 $\beta$ , dont le rôle principal est de phosphoryler  $\beta$ -caténine pour l'envoyer au protéasome (Adachi et al., 2007). L'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le cytosol facilite alors son transport au noyau, où elle stimule la division cellulaire (Figure 6). Une meilleure compréhension des voies de signalisation est nécessaire pour déchiffrer les mécanismes d'activation des cellules souches et les raisons des altérations qu'elles présentent lors du vieillissement physiologique et pathologique.

### 3. Latence et activation des cellules souches

Dans différents systèmes, les cellules souches adultes sont connues pour leur capacité d'autorenouvellement et de production de progéniteurs (cellules d'amplification transitoire). Les progéniteurs ont une grande capacité de prolifération (pour produire des cellules différenciées) mais leur durée de vie est limitée. Des études récentes ont mené à l'identification d'un nouveau type cellulaire qui a des propriétés intermédiaires par rapport à celles des cellules souches : longue survie et autorenouvellement, et les cellules progénitrices : prolifération rapide (Barker et al., 2007). Il semble que les cellules souches du follicule pileux ne produisent pas directement les progéniteurs d'amplification transitoire, mais plutôt passent par une étape intermédiaire où une partie des cellules souches est activée pour proliférer rapidement, tout en persistant dans le follicule pour plusieurs cycles (Jaks et al., 2008, Greco et al., 2009). La niche de cellules souches des cryptes intestinales semble aussi abriter un nouveau candidat comme cellule intermédiaire entre la cellule souche latente et le progéniteur à amplification rapide. Il a été rapporté que les cellules de Paneth du fond de la crypte sont des cellules prolifératrices multipotentes à longue durée de vie (Barker and Clevers, 2007). Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se divisent à tous les 145 jours, même si elles doivent produire des milliards de cellules sanguines au cours de cette période (Wilson et al., 2008). Une méthode de marquage a montré une division rapide des CSH (Haug et al., 2008). Il est donc probable que les CSH puissent exister sous deux formes : actives et latentes (Li and Clevers, 2010).

Dans notre étude, nous avons trouvé que le nombre de cellules capables de former des neurosphères ne change pas avec le vieillissement, mais que le nombre de cellules capables de retenir le BrdU durant trois semaines a diminué. Cette observation est en accord avec l'idée de l'existence de deux populations de CSNa : (1) des cellules latentes, inactives *in vivo* mais formant des neurosphères *in vitro*; et

(2) des cellules actives, prolifératrices *in vivo* mais dont la division est moins fréquente que celle des progéniteurs d'amplification transitoire. Nos observations suggèrent que le nombre absolu de CSNa ne change pas significativement entre le jeune âge et l'âge moyen, mais que la proportion de CSNa actives (cellules capables d'incorporer le BrdU) diminue.

Pour étudier les mécanismes d'activation, il est important de savoir si les mêmes cellules peuvent changer l'état de leur activité, ou bien, s'il s'agit de deux populations distinctes de CSNa. Est-il possible que ces cellules se trouvent dans deux niches séparées dans l'espace? Est-ce que les CSNa actives doivent nécessairement être en contact avec les vaisseaux sanguins et le liquide cérébro-spinal? Doivent-elles avoir un niveau minimal d'expression de récepteurs spécifiques? Doetsch a déjà mentionné dans la première description de son modèle de niche la présence de deux types d'astrocytes (cellules de type B1 inactives, et B2 à prolifération rapide) (Doetsch et al., 1997), mais aucune suite n'a été donnée à cette description. Une sous-population des astrocytes de la SVZ exprime EGF-R en commun avec les progéniteurs à amplification rapide (Pastrana et al., 2009), sauf qu'aucun lien n'a été établi entre l'expression d'EGF-R et la fréquence de prolifération des astrocytes. Par ailleurs, il faut rappeler que plus de la moitié des astrocytes en prolifération sont en contact direct avec les vaisseaux sanguins (Tavazoie et al., 2008). Pour le moment, nous connaissons mal les changements environnementaux qui causent la latence des CSNa avec l'âge. Il se pourrait que la perte de cellules épendymaires contribue à l'inactivation des CSNa, en diminuant la signalisation de Noggin ou en mettant les CSNa en contact directe avec le liquide cérébro-spinal. Une diminution du contact avec les vaisseaux sanguins ou une diminution de l'expression de l'EGF-R pourrait aussi être en cause (Figure 7). Une étude plus approfondie devrait mener à l'identification des deux sous populations de CSNa, ainsi qu'à la caractérisation des différences structurales, fonctionnelles et spatiales entre eux, et partant à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans leur activation.

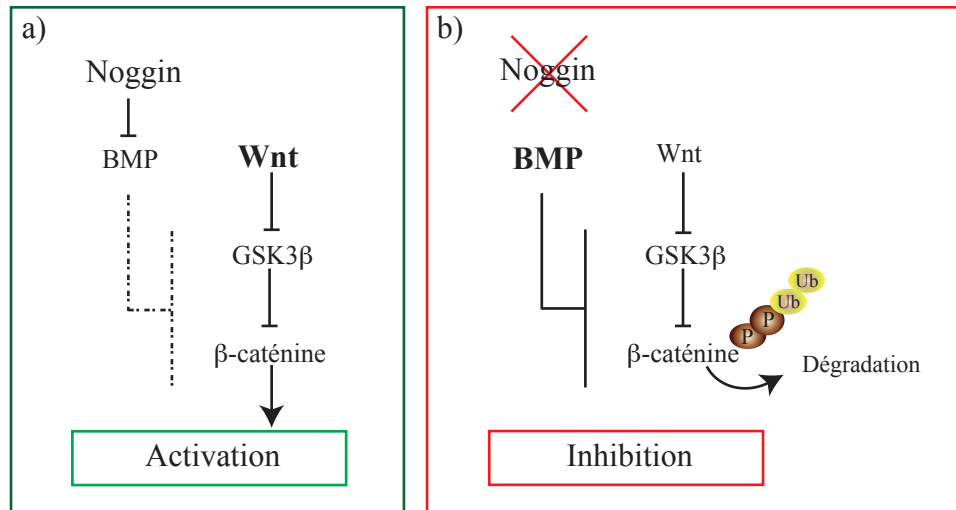


Figure 6: **L'importance de Noggin dans le processus de la neurogenèse.** La présence de Noggin dans le milieu inhibe les BMP laissant place à la voie de Wnt qui active les cellules souches impliquées dans le processus de neurogenèse (a). Au contraire, l'absence du signal de Noggin permet à BMP d'inhiber la voie de Wnt et de désactiver le processus de neurogenèse (b).

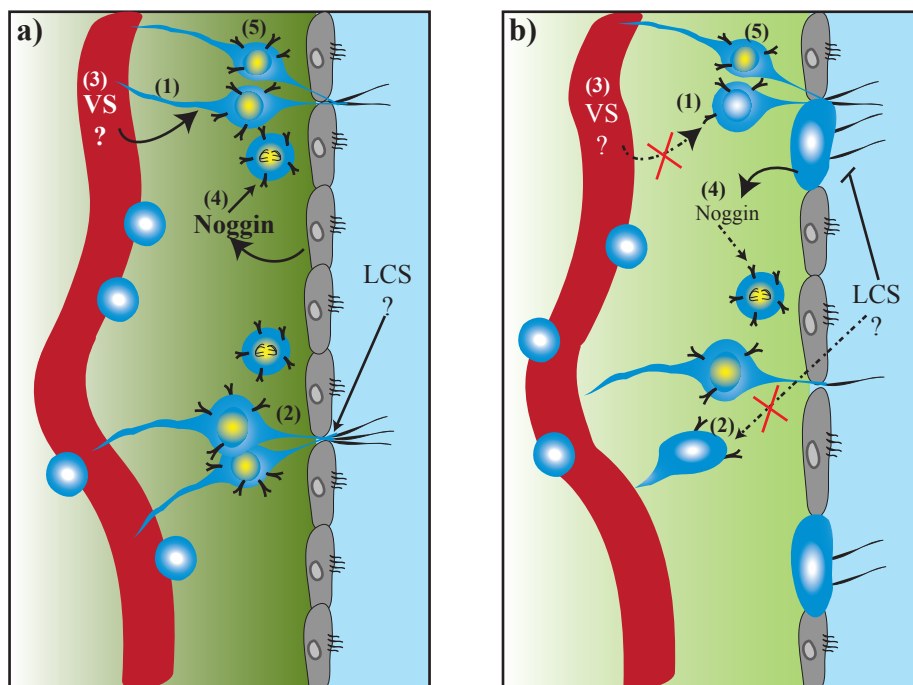


Figure 7: **Causes de la latence des CSNa de la SVZ.** Le nombre de CSNa (en bleu) ne change pas significativement entre le jeune âge (a) et l'âge moyen (b), mais le nombre de CSNa actives (noyau jaune) diminue. Cet effet peut être causé par (1) une perte du contact des CSNa avec les VS ou (2) avec le LCS, (3) une diminution des molécules de signalisation systémiques (via VS), (4) une diminution des molécules de signalisation dans la niche (gradient vert, ex: Noggin via les cellules épendymales), ou (5) une diminution de l'expression des récepteurs des molécules de signalisation (ex: EGF-R) par les CSNa. VS: vaisseau sanguin, LCS: liquide cérébro-spinal.

## 4. Freiner ou accélérer le vieillissement

Plusieurs molécules contribuent sans doute à déterminer la fréquence de prolifération et de différenciation des précurseurs de la neurogenèse, et participent ainsi aux processus du vieillissement de la niche de CSNa. Ces phénomènes interviennent à l'échelon cellulaire, mais l'organe (le SNC) et l'organisme (l'animal) sont aussi affectés avec l'âge. De façon générale, le déséquilibre moléculaire conduit à la perturbation cellulaire qui entraîne au dysfonctionnement des organes et finit par la mort de l'organisme. Peut-on arrêter l'horloge et survivre plus longtemps? Peut-on limiter les complications cognitives liées à l'âge? En d'autres mots : peut-on restimuler la neurogenèse?

Durant les deux dernières décennies, plusieurs techniques ont été utilisées pour restimuler la neurogenèse adulte affectée par le vieillissement. Des expériences de modulation génétique, d'infusion de facteurs trophiques, de modification environnementale, incluant l'effort physique, et même des restrictions nutritionnelles ont été tentées. Ainsi, il a été constaté qu'avec le vieillissement le gène p16<sup>*INK4a*</sup> codant pour un inhibiteur de la kinase cycline-dépendante liée à la sénescence (gène inhibiteur du cycle cellulaire) est surexprimé dans différents tissus dont le SNC. Il a été rapporté que les souris âgées dont le gène p16<sup>*INK4a*</sup> est invalide ont des capacités d'autorenouvellement de CSNa, de prolifération et de neurogenèse moins diminuées que celles de souris sauvages du même âge (Molofsky et al., 2006). Cet effet peut-être atténué *in vitro* par la surexpression de Bmi-1 (oncogène inhibiteur du gène p16), mais pas *in vivo* (He et al., 2009). L'infusion de facteurs trophiques comme TGF- $\alpha$ , EGF ou FGF-2 semblent inverser la sénescence des précurseurs neuronaux (Craig et al., 1996, Jin et al., 2003), alors que l'effet d'autres facteurs comme BDNF reste contradictoire (Zigova et al., 1998, Benraiss et al., 2001, Galvao et al., 2008). Plusieurs manipulations moléculaires réussissent à améliorer la prolifération, la différenciation ou la survie des cellules, mais restent à l'état expérimental et loin d'être applicables chez l'humain pour des raisons techniques et éthiques.

## 4.1. L'effet de l'environnement sur l'équilibre du SNC

Une méthode moins offensive et possiblement applicable chez l'humain est la manipulation de l'environnement externe : diminuer le stress, enrichir l'environnement ou pratiquer l'exercice physique. De nombreuses études ont montré que la manipulation de l'environnement améliore la neurogenèse chez les souris jeunes adultes en augmentant la prolifération des progéniteurs et la survie des neuroblastes. Cependant, ces études ont généralement porté sur la SGZ et non la SVZ. La manipulation de l'environnement externe apparaît aussi bénéfique pour les souris âgées, bien que ses effets soient moins prononcés. Même si les causes de l'augmentation de la neurogenèse par suite de manipulations de l'environnement restent mal connues (la stimulation motrice, cognitive, l'oxygénation, les facteurs de croissance ou même les hormones), la durabilité des effets observés est encourageante en vue d'éventuelles applications cliniques.

Dans une étude où les souris étaient placées à l'âge de 10 mois dans un environnement enrichi pour une période de 10 mois supplémentaires, les auteurs ont constaté que le nombre de neurones nouvellement produits dans la couche granulaire de l'hippocampe avait augmenté de 5 fois par rapport aux souris non manipulées (Kempermann et al., 2002). Cette augmentation résultant principalement de la survie et la différenciation en neurones a amélioré la capacité d'apprentissage et l'activité locomotrice des souris âgées. Une autre étude a démontré que l'exercice physique volontaire pendant 7 semaines améliore la neurogenèse et les performances cognitives chez la souris âgée de 19 mois (van Praag et al., 2005). Cette étude démontre que les CSNa âgées sont encore capable de réagir aux stimuli exogènes. De plus, la stimulation à court terme (environnement enrichi pour une semaine) s'est avérée avoir un effet surprenant sur la neurogenèse chez de souris jeunes adultes (Tashiro et al., 2007) et même chez de souris âgées (Jessberger and Gage, 2008). Une étude de notre laboratoire a montré que l'exercice à long-terme augmente aussi la

neurogenèse dans la SVZ chez les souris jeunes adultes (Bednarczyk et al., 2009), mais aucune étude n'a jusqu'ici porté sur ses effets sur la SVZ et la neurogenèse dans les bulbes olfactifs de souris âgées. Il y a un manque flagrant d'études sur l'effet de l'exercice physique, l'enrichissement de l'environnement, le stress, l'inflammation et autres facteurs sur les CSNa de la SVZ jeune et âgée. Par contre avec l'apparition de nouvelles techniques de détection de la neurogenèse *in vivo* (Manganas et al., 2007, Pereira et al., 2007), on peut espérer un avancement des recherches sur la relation entre l'environnement externe et la neurogenèse chez les animaux de laboratoire, voire même chez l'humain.

#### **4.1.1. L'effet de la nutrition sur l'équilibre du système nerveux central**

Au quotidien, il est probablement plus facile de modifier notre façon de manger que de manipuler l'environnement externe. Mais, comment la nutrition pourrait-elle affecter notre vie au plan cellulaire? La drosophile (*D. melanogaster*) est un modèle simple qui permet d'étudier l'effet des nutriments sur la qualité de vie. Deux études récentes ont porté sur l'importance du ratio protéines/glucides en ce qui a trait à la capacité de reproduction et la longévité des mouches (Lee et al., 2008, Skorupa et al., 2008). Avec un régime dont le ratio protéines/glucides était réduit, la durée de vie et l'accumulation de triglycérides étaient augmentées, alors que la fécondité était favorisée par l'augmentation de ce ratio. D'un autre côté, l'augmentation des glucides dans l'alimentation diminue la durée de vie des mouches (Mair et al., 2005, Skorupa et al., 2008). Une autre étude a démontré que l'ajout de glucose au régime alimentaire du ver *C. elegans* réduit son espérance de vie en activant la voie de signalisation de l'insuline via le récepteur IGF-R (Lee et al., 2009). On a aussi montré récemment, chez le même organisme, que HIF-1 (hypoxia inducible factor) agit dans la voie de TOR/S6K pour prolonger la durée de vie du ver



(Chen et al., 2009b). Il est connu que TOR (*target of Rapamycin*) phosphoryle la protéine 4E-BP inhibitrice du facteur de traduction eIF4E pour augmenter la traduction de l'ARNm. Une nouvelle publication a montré que l'augmentation de la durée de vie de *D. melanogaster* lors de la restriction diététique (diminution de protéines) est lié à la voie de 4E-BP (Zid et al., 2009). Il semble que, chez *C. elegans*, la restriction diététique par le jeûne un jour sur deux ou un jour sur trois augmente l'espérance de vie du ver de plus de 40% (Honjoh et al., 2009). Les mêmes auteurs ont aussi observé que l'effet de la restriction calorique (diminution du rapport protéinique dans la diète) peut être imité par l'inhibition de TOR ou de *rheb-1* (GTPase activatrice de TOR), mais cette voie n'est pas affectée par le jeûne. Ainsi donc, la voie de TOR pourrait être activée de façon indépendante par le récepteur de l'insuline et par la présence d'acides aminés (Figure 8).

Comme chez les levures (Fabrizio et al., 2001), les larves (Pan et al., 2007) et les mouches (Kapahi et al., 2004), l'inactivation de la voie TOR est aussi impliquée dans le prolongement de la survie des souris (Selman et al., 2009). La délétion de la S6K, kinase en aval des voies de signalisation de TOR et de l'insuline (Shamji et al., 2003), protège contre les déclin moteurs, osseux et immunitaires causés par le vieillissement (Selman et al., 2009). Alors que la rapamycine, un inhibiteur naturel de la voie de TOR utilisé en clinique comme agent immunosuppresseur, réduit l'activité de la S6K dans les cellules eucaryotes de la levure à l'humain (Sonenberg and Hinnebusch, 2009), son administration augmente l'espérance de vie des souris adultes de 6 mois (Chen et al., 2009a) et très âgées de 20 mois (Harrison et al., 2009). Des analyses ont montré les effets bénéfiques des restrictions diététiques et/ou caloriques sur le vieillissement du cœur, du foie, du muscle squelettique, du tissu adipeux, du tissu osseux, ainsi que des fonctions vasculaire et motrice (Pearson et al., 2008), mais peu d'études ont porté sur l'effet du régime alimentaire sur la neurogenèse des organismes âgés. Les quelques études existantes montrent une amélioration de

l'apprentissage (Stewart et al., 1989), ainsi que des performances cognitives (Martin et al., 2007) et motrices (Ingram et al., 1987), corrélée à une augmentation de la neurogenèse dans l'hippocampe (voir la revue (Stangl and Thuret, 2009)).

Une étude sur 20 ans a récemment montré que la restriction calorique (30% de réduction de la nourriture totale à l'âge adulte) augmente la qualité de vie des singes 'macaques rhésus'. En comparaison avec un groupe contrôle du même âge, les singes en restriction calorique ont conservé une apparence physique plus jeune et présenté une amélioration significative de leur fonction musculaire, de l'homéostasie du glucose et de l'incidence de néoplasie ou de problèmes cardiovasculaires, ainsi qu'une diminution de l'atrophie du cerveau liée à l'âge (Colman et al., 2009). Il semble aussi que la restriction calorique débutant à l'adolescence (3-5 ans chez les singes) améliore le système immunitaire, diminue la sénescence et augmente la capacité de prolifération des lymphocytes T (Messaoudi et al., 2006).

Évidemment les études de restriction nutritionnelle à long terme et leurs effets moléculaires sont difficilement réalisables chez l'humain. Sachant que la restriction nutritionnelle affecte nécessairement le poids corporel, des corrélations prospectives et rétrospectives peuvent remplacer les essais cliniques contrôlés. Plusieurs études ont établi des liens entre l'index de masse corporelle et l'équilibre du SNC. De manière générale, il semble que la détérioration des fonctions cognitives et motrices soit accélérée par l'augmentation du poids corporel (Elias et al., 2003, Lafortuna et al., 2006). Sauf que l'excès de poids corporel a des effets différents selon l'âge des personnes. Dans le groupe des personnes d'âge moyen, l'obésité est associée au risque de développer une démence, alors que ce même risque est plutôt associé au faible poids corporel chez les personnes âgées (Fitzpatrick et al., 2009). Il semble même que le surplus de poids ait un effet protecteur contre le développement de démences de type Alzheimer chez les personnes âgées (Hughes et al., 2009).

Généralement, l'obésité mène au développement de la résistance à l'insuline, au dysfonctionnement vasculaire, et au dépôt de protéines dans le cerveau, tous phénomènes susceptibles d'affecter les fonctions cognitives (Naderali et al., 2009).

Les différentes approches protectrices et stimulatrices, mentionnées ci-haut, semblent converger vers la voie de TOR. Cette voie n'est sûrement pas la seule affectée par le vieillissement, mais elle peut être manipulée par les facteurs de croissance, le taux d'oxygénation (exercice) et la quantité de sucres et de protéines (nutrition). L'activation de la voie de TOR stimule l'expression de plusieurs protéines via E4-BP (Hay and Sonenberg, 2004), et TOR est responsable de l'inhibition de l'autophagie (Noda and Ohsumi, 1998). Hypothétiquement, avec l'âge, les cellules perdent le contrôle de cette voie et surexpriment plusieurs protéines sans pouvoir les dégrader. Le dysfonctionnement de ces deux capacités conduit à une surcharge protéinique et un déséquilibre métabolique pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire (Hands et al., 2009). Théoriquement, l'administration de la rapamycine, un inhibiteur de TOR, pourrait donc diminuer le risque de dommages liés au vieillissement et augmenter la survie cellulaire (Figure 8).

La voie de TOR est impliquée dans le processus du vieillissement de façon systémique. Curieusement, cette voie est nécessaire à l'initiation de la différenciation durant la neurogenèse du tube neural embryonnaire (Fishwick et al., 2010) et semble être impliquée dans la neurogenèse de l'hippocampe adulte (Kim et al., 2009a) des vertébrés. Il sera intéressant de vérifier le niveau d'expression de cette voie dans la SVZ, le RMS et les bulbes olfactifs et d'évaluer le changement de son activité (s'il y a lieu) avec l'âge.

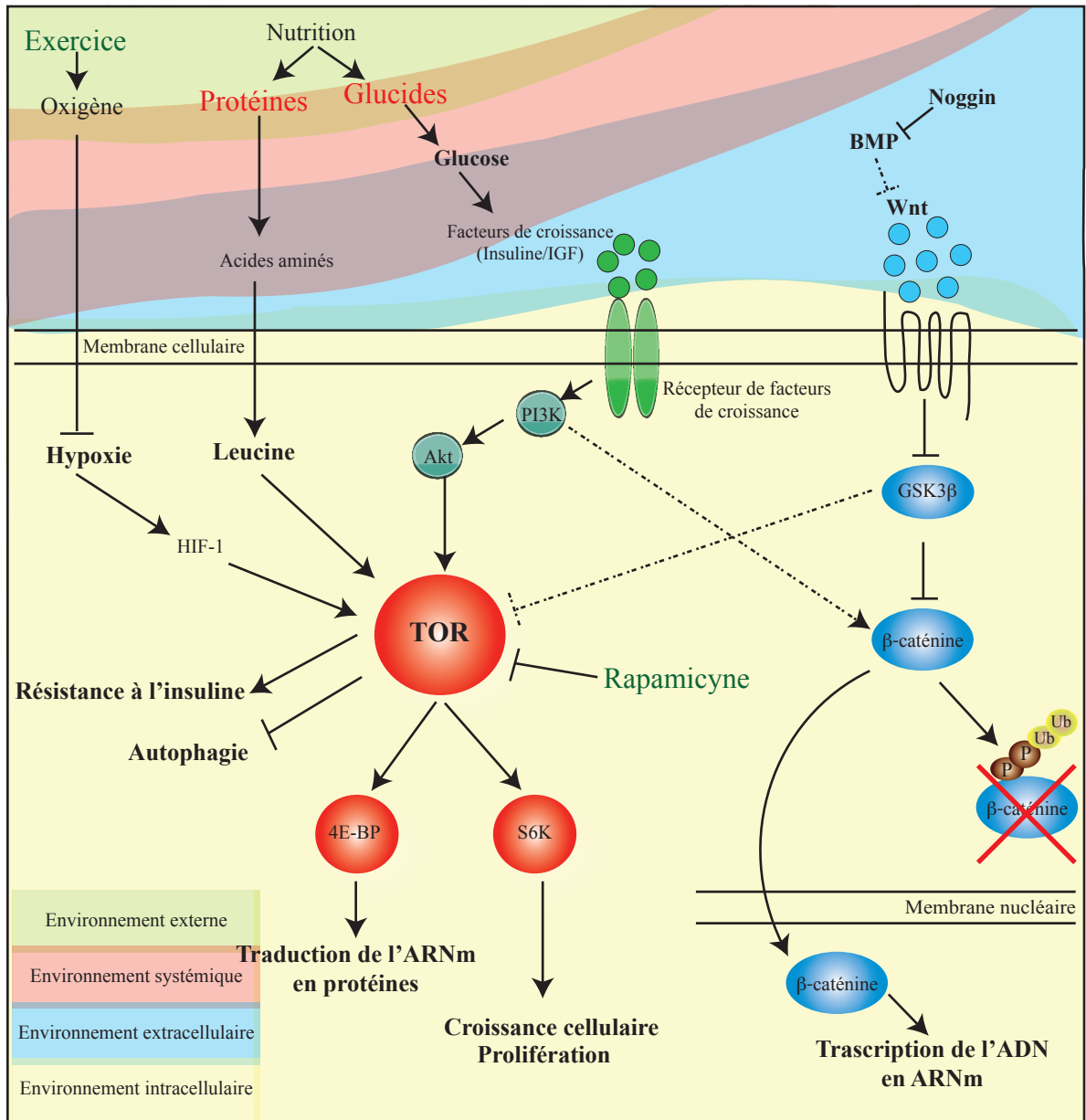


Figure 8: **Les voies de signalisation possiblement impliquées dans le vieillissement.** Plusieurs facteurs sont impliqués dans la modulation du processus du vieillissement. La molécule TOR semble centrale pour plusieurs voies de signalisation dépendantes de l'environnement externe, systémique, extracellulaire ou intracellulaire. L'activation de TOR est importante pour la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire, mais son hyper-activation peut conduire à la sénescence cellulaire par suite d'une inhibition de l'autophagie, de résistance à l'insuline ou de surexpression protéinique.

## Réflexion...

L'objectif de la gérontologie et plus spécifiquement de la gériatrie est d'améliorer la qualité de vie des personnes âgées et de prévenir leur souffrance. Ceci vaut pour l'organisme entier (l'humain), mais ne peut-on en dire autant à l'échelon cellulaire (niches de cellules souches)? Avec le vieillissement, les niches des cellules souches entrent en sénescence et leurs activités de prolifération et de différenciation diminuent. Les efforts scientifiques de nos jours visent donc principalement à réactiver les niches de neurogenèse.

Il faut se demander non seulement comment, mais aussi pourquoi la neurogenèse diminue avec l'âge. Est-il possible que la sénescence des niches soit une réaction cellulaire protectrice? Il est connu que certaines mutations modifient la longévité des organismes peu complexes. Par exemple, la survie de la drosophile est augmentée par suite d'une surexpression des gènes *grappa* et *dSir2* codant pour des histones méthyle-transférases, dont le rôle est de modifier la configuration de la chromatine pour empêcher la transcription des gènes en aval (*gene silencing*) (Rogina and Helfand, 2004, Shanower et al., 2005, List et al., 2009). Par contre, à cause de la longue durée de vie des organismes plus complexes et du grand nombre de leurs divisions cellulaires, une accumulation d'importantes mutations (Bailey et al., 2004) pourrait potentiellement mener à la formation de tumeurs. De plus, avec l'âge, le système immunitaire devient moins efficace pour protéger le corps contre ses propres attaques. N'est-il pas plus sage de laisser la nature inhiber la prolifération de ces cellules mutées? N'est-il pas irresponsable de vouloir les restimuler et de risquer la formation de tumeurs? On est encore loin de connaitre les cellules au point de pouvoir stimuler les bonnes et inhiber les mauvaises.   l'heure actuelle, il est sûrement plus sage de s'éloigner de toutes formes de manipulations moléculaires et

de se limiter à un mode de vie sain et équilibré pour améliorer notre qualité de vie jusqu'à son arrivée au point de non retour : la mort.

Il est tout de même indispensable de continuer les recherches dans le domaine. La présente étude propose que l'altération de l'environnement soit responsable de la latence des CSNa à l'âge moyen avant leur perte à un âge plus avancé. Cette étude ajoute une pièce au casse-tête de la biologie du vieillissement des CSNa. On peut former l'espoir qu'elle contribue à la compréhension des régulateurs biologiques et puisse un jour aider à prévenir ou à restaurer les déclinés liés au vieillissement physiologique et pathologique de façon naturelle.

*Meriem Bouab*

*Mai 2010*

# Bibliographie

Les références ci-dessous étaient générées automatiquement par EndNote X3 :

1970. Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee. *Anat Rec*, 166, 257-61.
- 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, 2827-36.
- AGUIRRE, A. A., CHITTAJALLU, R., BELACHEW, S. & GALLO, V. 2004. NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. *J Cell Biol*, 165, 575-89.
- 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, 4408-19.
- ALLEN, E. 1912. *The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat*, Baltimore,.
- ALTMAN, J. 1963. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec*, 145, 573-91.
- ALTMAN, J. 1969a. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol*, 136, 269-93.
- ALTMAN, J. 1969b. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 137, 433-57.
- ALTMAN, J. & DAS, G. D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124, 319-35.
- ALTMAN, J. & DAS, G. D. 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol*, 126, 337-89.
- ALTMAN, J. & DAS, G. D. 1967. Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature*, 214, 1098-101.
- ALVAREZ-BUYLLA, A., GARCIA-VERDUGO, J. M., MATEO, A. S. & MERCHANT-LARIOS, H. 1998. Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. *J Neurosci*, 18, 1020-37.
- ANTCZAK, M. & VAN BLERKOM, J. 1997. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod*, 3, 1067-86.
- ANTON, E. S., MARCHIONNI, M. A., LEE, K. F. & RAKIC, P. 1997. Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development*, 124, 3501-10.

- ARSENJEVIC, Y., VILLEMURE, J. G., BRUNET, J. F., BLOCH, J. J., DEGLON, N., KOSTIC, C., ZURN, A. & AEBISCHER, P. 2001. Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Exp Neurol*, 170, 48-62.
- BAILEY, K. J., MASLOV, A. Y. & PRUITT, S. C. 2004. Accumulation of mutations and somatic selection in aging neural stem/progenitor cells. *Aging Cell*, 3, 391-7.
- BARKER, N. & CLEVERS, H. 2007. Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells. *Gastroenterology*, 133, 1755-60.
- BARKER, N., VAN ES, J. H., KUIPERS, J., KUJALA, P., VAN DEN BORN, M., COZIJNSEN, M., HAEGEBARTH, A., KORVING, J., BEGTHEL, H., PETERS, P. J. & CLEVERS, H. 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449, 1003-7.
- BAYER, S. A., YACKEL, J. W. & PURI, P. S. 1982. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*, 216, 890-2.
- BEDARD, A. & PARENT, A. 2004. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res*, 151, 159-68.
- BEDNARCZYK, M. R., AUMONT, A., DECARY, S., BERGERON, R. & FERNANDES, K. J. 2009. Prolonged voluntary wheel-running stimulates neural precursors in the hippocampus and forebrain of adult CD1 mice. *Hippocampus*, 19, 913-27.
- BEILHARZ, E. J., RUSSO, V. C., BUTLER, G., BAKER, N. L., CONNOR, B., SIRIMANNE, E. S., DRAGUNOW, M., WERTHER, G. A., GLUCKMAN, P. D., WILLIAMS, C. E. & SCHEEPENS, A. 1998. Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Brain Res Mol Brain Res*, 59, 119-34.
- BENRAISS, A., CHMIELNICKI, E., LERNER, K., ROH, D. & GOLDMAN, S. A. 2001. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci*, 21, 6718-31.
- BISCHOFF, M., PARFITT, D. E. & ZERNICKA-GOETZ, M. 2008. Formation of the embryonic-abembryonic axis of the mouse blastocyst: relationships between orientation of early cleavage divisions and pattern of symmetric/asymmetric divisions. *Development*, 135, 953-62.
- BIZON, J. L., LEE, H. J. & GALLAGHER, M. 2004. Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline. *Aging Cell*, 3, 227-34.
- BOWEN, R. L. & ATWOOD, C. S. 2004. Living and dying for sex. A theory of aging based on the modulation of cell cycle signaling by reproductive hormones. *Gerontology*, 50, 265-90.
- BRETON-PROVENCHER, V., LEMASSON, M., PERALTA, M. R., 3RD & SAGHATELYAN, 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, 15245-57.
- BRUNI, J. E. 1998. Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech*, 41, 2-13.
- CAMERON, H. A. & MCKAY, R. D. 1999. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci*, 2, 894-7.
- CAMERON, H. A., WOOLLEY, C. S., MCEWEN, B. S. & GOULD, E. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56, 337-44.
- CAMPBELL, K. & GOTZ, M. 2002. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci*, 25, 235-8.



- CARDONA-GOMEZ, G. P., CHOWEN, J. A. & GARCIA-SEGURA, L. M. 2000. Estradiol and progesterone regulate the expression of insulin-like growth factor-I receptor and insulin-like growth factor binding protein-2 in the hypothalamus of adult female rats. *J Neurobiol*, 43, 269-81.
- CARLEN, M., CASSIDY, R. M., BRISMAR, H., SMITH, G. A., ENQUIST, L. W. & FRISEN, J. 2002. Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol*, 12, 606-8.
- CARLEN, M., MELETIS, 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, 259-67.
- CHEN, C., LIU, Y. & ZHENG, P. 2009a. mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells. *Sci Signal*, 2, ra75.
- CHEN, D., THOMAS, E. L. & KAPAHI, P. 2009b. HIF-1 modulates dietary restriction-mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 5, e1000486.
- CHIASSON, B. J., TROPEPE, V., MORSHEAD, C. M. & 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, 4462-71.
- CHOI, B. H. 1988. Prenatal gliogenesis in the developing cerebrum of the mouse. *Glia*, 1, 308-16.
- CHOI, B. H. & LAPHAM, L. W. 1978. Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study. *Brain Res*, 148, 295-311.
- CHOJNACKI, A. K., MAK, G. K. & WEISS, S. 2009. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat Rev Neurosci*, 10, 153-63.
- CLELLAND, C. D., CHOI, M., ROMBERG, C., CLEMENSON, G. D., JR., FRAGNIERE, A., TYERS, P., JESSBERGER, S., SAKSIDA, L. M., BARKER, R. A., GAGE, F. H. & BUSSEY, T. J. 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*, 325, 210-3.
- COLES-TAKABE, B. L., BRAIN, I., PURPURA, 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, 2938-44.
- COLMAN, R. J., ANDERSON, R. M., JOHNSON, S. C., KASTMAN, E. K., KOSMATKA, K. J., BEASLEY, T. M., ALLISON, D. B., CRUZEN, C., SIMMONS, H. A., KEMNITZ, J. W. & WEINDRUCH, R. 2009. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325, 201-4.
- COLUCCI-D'AMATO, L. & DI PORZIO, U. 2008. Neurogenesis in adult CNS: from denial to opportunities and challenges for therapy. *Bioessays*, 30, 135-45.
- CONOVER, D. L., FENTON, B. M., FOSTER, T. H. & HULL, E. L. 2000a. An evaluation of near infrared spectroscopy and cryospectrophotometry estimates of haemoglobin oxygen saturation in a rodent mammary tumour model. *Phys Med Biol*, 45, 2685-700.
- CONOVER, J. C., DOETSCH, F., GARCIA-VERDUGO, J. M., GALE, N. W., YANCOPOULOS, G. D. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2000b. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci*, 3, 1091-7.
- COROTTO, F. S., HENEGAR, J. A. & MARUNIAK, J. A. 1993. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett*, 149, 111-4.

- COSKUN, V., WU, H., BLANCHI, B., TSAO, S., KIM, K., ZHAO, J., BIANCOTTI, J. C., HUTNICK, L., KRUEGER, R. C., JR., FAN, G., DE VELLIS, J. & SUN, Y. E. 2008. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 1026-31.
- CRAIG, C. G., TROPEPE, V., MORSHEAD, C. M., REYNOLDS, B. A., WEISS, S. & 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, 2649-58.
- CUMMINGS, D. M., HENNING, H. E. & BRUNJES, P. C. 1997. Olfactory bulb recovery after early sensory deprivation. *J Neurosci*, 17, 7433-40.
- CURTIS, M. A., PENNEY, E. B., PEARSON, J., DRAGUNOW, M., CONNOR, B. & FAULL, R. L. 2005. The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington's disease human brain. *Neuroscience*, 132, 777-88.
- DEDKOV, E. I., BORISOV, A. B., WERNIG, A. & CARLSON, B. M. 2003. Aging of skeletal muscle does not affect the response of satellite cells to denervation. *J Histochem Cytochem*, 51, 853-63.
- DELHAYE-BOUCHAUD, N. 2001. [Development of the central nervous system in mammals]. *Neurophysiol Clin*, 31, 63-82.
- DENG, W., SAXE, M. D., GALLINA, I. S. & GAGE, F. H. 2009. Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci*, 29, 13532-42.
- 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, 703-16.
- DOETSCH, F., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*, 17, 5046-61.
- 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, 1021-34.
- DONEHOWER, L. A. 2002. Does p53 affect organismal aging? *J Cell Physiol*, 192, 23-33.
- ELIAS, M. F., ELIAS, P. K., SULLIVAN, L. M., WOLF, P. A. & D'AGOSTINO, R. B. 2003. Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: the Framingham heart study. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27, 260-8.
- ENNACEUR, A., MICHALIKOVA, S., VAN RENSBURG, R. & CHAZOT, P. L. 2008. Detailed analysis of the behavior and memory performance of middle-aged male and female CD-1 mice in a 3D maze. *Behav Brain Res*, 187, 312-26.
- 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, 8354-65.
- ERIKSSON, P. S., PERFILIEVA, E., BJORK-ERIKSSON, T., ALBORN, A. M., NORDBORG, C., PETERSON, D. A. & GAGE, F. H. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4, 1313-7.
- FABRIZIO, P., POZZA, F., PLETCHER, S. D., GENDRON, C. M. & LONGO, V. D. 2001. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, 292, 288-90.

- FARESE, R. V., JR. & WALTHER, T. C. 2009. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*, 139, 855-60.
- FARKAS, L. M. & HUTTNER, W. B. 2008. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 707-15.
- FENG, L., HATTEN, M. E. & HEINTZ, N. 1994. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron*, 12, 895-908.
- FISHWICK, K. J., LI, R. A., HALLEY, P., DENG, P. & STOREY, K. G. 2010. Initiation of neuronal differentiation requires PI3-kinase/TOR signalling in the vertebrate neural tube. *Dev Biol*, 338, 215-25.
- FITZPATRICK, A. L., KULLER, L. H., LOPEZ, O. L., DIEHR, P., O'MEARA, E. S., LONGSTRETH, W. T., JR. & LUCHSINGER, J. A. 2009. Midlife and late-life obesity and the risk of dementia: cardiovascular health study. *Arch Neurol*, 66, 336-42.
- FUJITA, S. 1964. Analysis of Neuron Differentiation in the Central Nervous System by Tritiated Thymidine Autoradiography. *J Comp Neurol*, 122, 311-27.
- GAGE, F. H., COATES, P. W., PALMER, T. D., KUHN, H. G., FISHER, L. J., SUHONEN, J. O., PETERSON, D. A., SUHR, S. T. & RAY, J. 1995. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11879-83.
- GALVAO, R. P., GARCIA-VERDUGO, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2008. Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. *J Neurosci*, 28, 13368-83.
- GARCIA-VERDUGO, J. M., FERRON, S., FLAMES, N., COLLADO, L., DESFILIS, E. & FONT, E. 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull*, 57, 765-75.
- GOLDMAN, S. A., ZUKHAR, A., BARAMI, K., MIKAWA, T. & NIEDZWIECKI, D. 1996. Ependymal/subependymal zone cells of postnatal and adult songbird brain generate both neurons and nonneuronal siblings in vitro and in vivo. *J Neurobiol*, 30, 505-20.
- GOODMAN, J. M. 2008. The gregarious lipid droplet. *J Biol Chem*, 283, 28005-9.
- GOTZ, M. & HUTTNER, W. B. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 777-88.
- GOULD, E., REEVES, A. J., FALLAH, M., TANAPAT, P., GROSS, C. G. & FUCHS, E. 1999. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5263-7.
- GRECO, V., CHEN, T., RENDL, M., SCHOBER, M., PASOLLI, H. A., STOKES, N., DELA CRUZ-RACELIS, J. & FUCHS, E. 2009. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell*, 4, 155-69.
- GREENBERG, A. S. & OBIN, M. S. 2008. Many roads lead to the lipid droplet. *Cell Metab*, 7, 472-3.
- GRITTI, A., BONFANTI, L., DOETSCH, F., CAILLE, I., ALVAREZ-BUYLLA, A., LIM, D. A., GALLI, R., VERDUGO, J. M., HERRERA, D. G. & VESCOVI, A. L. 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci*, 22, 437-45.
- HANDS, S. L., PROUD, C. G. & WYTTENBACH, A. 2009. mTOR's role in ageing: protein synthesis or autophagy? *Aging (Albany NY)*, 1, 586-97.

- HARRISON, D. E., STRONG, R., SHARP, Z. D., NELSON, J. F., ASTLE, C. M., FLURKEY, K., NADON, N. L., WILKINSON, J. E., FRENKEL, K., CARTER, C. S., PAHOR, M., JAVORS, M. A., FERNANDEZ, E. & MILLER, R. A. 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460, 392-5.
- HASTINGS, N. B. & GOULD, E. 1999. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*, 413, 146-54.
- HATTEN, M. E. 1999. Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci*, 22, 511-39.
- HAUG, J. S., HE, X. C., GRINDLEY, J. C., WUNDERLICH, J. P., GAUDENZ, K., ROSS, J. T., PAULSON, A., WAGNER, K. P., XIE, Y., ZHU, R., YIN, T., PERRY, J. M., HEMBREE, M. J., REDENBAUGH, E. P., RADICE, G. L., SEIDEL, C. & LI, L. 2008. N-cadherin expression level distinguishes reserved versus primed states of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2, 367-79.
- HAY, N. & SONENBERG, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18, 1926-45.
- HAYFLICK, L. 2003. Living forever and dying in the attempt. *Exp Gerontol*, 38, 1231-41.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- HE, S., IWASHITA, T., BUCHSTALLER, J., MOLOFSKY, A. V., THOMAS, D. & MORRISON, S. J. 2009. Bmi-1 over-expression in neural stem/progenitor cells increases proliferation and neurogenesis in culture but has little effect on these functions in vivo. *Dev Biol*, 328, 257-72.
- HOGLINGER, G. U., RIZK, P., MURIEL, M. P., DUYCKAERTS, C., OERTEL, W. H., CAILLE, I. & HIRSCH, E. C. 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci*, 7, 726-35.
- HONJOH, S., YAMAMOTO, T., UNO, M. & NISHIDA, E. 2009. Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*. *Nature*, 457, 726-30.
- HUANG, L. & BITTMAN, E. L. 2002. Olfactory bulb cells generated in adult male golden hamsters are specifically activated by exposure to estrous females. *Horm Behav*, 41, 343-50.
- HUGHES, T. F., BORENSTEIN, A. R., SCHOFIELD, E., WU, Y. & LARSON, E. B. 2009. Association between late-life body mass index and dementia: The Kame Project. *Neurology*, 72, 1741-6.
- IMAYOSHI, I., SAKAMOTO, M., OHTSUKA, T., TAKAO, K., MIYAKAWA, T., YAMAGUCHI, M., MORI, K., IKEDA, T., ITOHARA, S. & KAGEYAMA, R. 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci*, 11, 1153-61.
- INGRAM, D. K., WEINDRUCH, R., SPANGLER, E. L., FREEMAN, J. R. & WALFORD, R. L. 1987. Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. *J Gerontol*, 42, 78-81.
- ITOU, Y., NOCHI, R., KURIBAYASHI, H., SAITO, Y. & HISATSUNE, T. 2010. Cholinergic activation of hippocampal neural stem cells in aged dentate gyrus. *Hippocampus*.
- JACKSON, E. L., GARCIA-VERDUGO, J. M., GIL-PEROTIN, S., ROY, M., QUINONES-HINOJOSA, A., VANDENBERG, S. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2006. PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron*, 51, 187-99.
- JAKS, V., BARKER, N., KASPER, M., VAN ES, J. H., SNIPPERT, H. J., CLEVERS, H. & TOFTGARD, R. 2008. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet*, 40, 1291-9.

- JESSBERGER, S. & GAGE, F. H. 2008. Stem-cell-associated structural and functional plasticity in the aging hippocampus. *Psychol Aging*, 23, 684-91.
- JIN, K., SUN, Y., XIE, L., BATTEUR, 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, 175-83.
- JOHANSSON, C. B., MOMMA, S., CLARKE, D. L., RISLING, M., LENDAHL, U. & FRISEN, J. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 96, 25-34.
- KALMAN, M. 1998. Astroglial architecture of the carp (*Cyprinus carpio*) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Anat Embryol (Berl)*, 198, 409-33.
- KAPAH, P., ZID, B. M., HARPER, T., KOSLOVER, D., SAPIN, V. & BENZER, S. 2004. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol*, 14, 885-90.
- KAPLAN, M. S. & BELL, D. H. 1983. Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Exp Brain Res*, 52, 1-5.
- KAPLAN, M. S. & BELL, D. H. 1984. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci*, 4, 1429-41.
- KAPLAN, M. S. & HINDS, J. W. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197, 1092-4.
- KEMPERMANN, G., GAST, D. & GAGE, F. H. 2002. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol*, 52, 135-43.
- KEMPERMANN, G., KUHN, H. G. & GAGE, F. H. 1998. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*, 18, 3206-12.
- KIM, J. Y., DUAN, X., LIU, C. Y., JANG, M. H., GUO, J. U., POW-ANPONGKUL, N., KANG, E., SONG, H. & MING, G. L. 2009a. DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron*, 63, 761-73.
- KIM, Y., COMTE, I., SZABO, G., HOCKBERGER, P. & SZELE, F. G. 2009b. Adult mouse subventricular zone stem and progenitor cells are sessile and epidermal growth factor receptor negatively regulates neuroblast migration. *PLoS One*, 4, e8122.
- KIRSCHENBAUM, B., NEDERGAARD, M., PREUSS, A., BARAMI, K., FRASER, R. A. & GOLDMAN, S. A. 1994. In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cereb Cortex*, 4, 576-89.
- KISHIMOTO, Y., SUZUKI, M., KAWAHARA, S. & KIRINO, Y. 2001. Age-dependent impairment of delay and trace eyeblink conditioning in mice. *Neuroreport*, 12, 3349-52.
- KITAMURA, T., SAITOH, Y., TAKASHIMA, N., MURAYAMA, A., NIIBORI, Y., AGETA, H., SEKIGUCHI, M., SUGIYAMA, H. & INOKUCHI, K. 2009. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell*, 139, 814-27.
- 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, 983-97.
- KORNACK, D. R. & RAKIC, P. 1999. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5768-73.

- KRIEGSTEIN, A. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-84.
- KRIEGSTEIN, A. R. & GOTZ, M. 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia*, 43, 37-43.
- 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, 2027-33.
- KUKEKOV, V. G., LAYWELL, E. D., SUSLOV, O., DAVIES, K., SCHEFFLER, B., THOMAS, L. B., O'BRIEN, T. F., KUSAKABE, M. & STEINDLER, D. A. 1999. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol*, 156, 333-44.
- LAFORTUNA, C. L., AGOSTI, F., PROIETTI, M., ADORNI, F. & SARTORIO, A. 2006. The combined effect of adiposity, fat distribution and age on cardiovascular risk factors and motor disability in a cohort of obese women (aged 18-83). *J Endocrinol Invest*, 29, 905-12.
- LAGACE, D. C., DONOVAN, M. H., DECAROLIS, N. A., FARNBAUCH, L. A., MALHOTRA, S., BERTON, O., NESTLER, E. J., KRISHNAN, V. & EISCH, A. J. 2009. Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4436-41.
- LEE, K. P., SIMPSON, S. J., CLISSOLD, F. J., BROOKS, R., BALLARD, J. W., TAYLOR, P. W., SORAN, N. & RAUBENHEIMER, D. 2008. Lifespan and reproduction in *Drosophila*: New insights from nutritional geometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2498-503.
- LEE, S. J., MURPHY, C. T. & KENYON, C. 2009. Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell Metab*, 10, 379-91.
- LI, L. & CLEVERS, H. 2010. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*, 327, 542-5.
- LIM, D. A., TRAMONTIN, 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, 713-26.
- LIST, O., TOGAWA, T., TSUDA, M., MATSUO, T., ELARD, L. & AIGAKI, T. 2009. Overexpression of grappa encoding a histone methyltransferase enhances stress resistance in *Drosophila*. *Hereditas*, 146, 19-28.
- LOIS, C. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2074-7.
- LOUIS, S. A., RIETZE, R. L., DELEYROLLE, L., WAGEY, R. E., THOMAS, T. E., EAVES, A. C. & REYNOLDS, B. A. 2008. Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells*, 26, 988-96.
- LUO, J., DANIELS, S. B., LENNINGTON, J. B., NOTTI, R. Q. & CONOVER, J. C. 2006. The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell*, 5, 139-52.
- LUO, J., SHOOK, B. A., DANIELS, S. B. & CONOVER, J. C. 2008. Subventricular zone-mediated ependyma repair in the adult mammalian brain. *J Neurosci*, 28, 3804-13.
- LUSKIN, M. B. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11, 173-89.
- MAHMOOD, O., ADAMO, D., BRICENO, E. & MOFFAT, S. D. 2009. Age differences in visual path integration. *Behav Brain Res*, 205, 88-95.

- MAIR, W., PIPER, M. D. & PARTRIDGE, L. 2005. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLoS Biol*, 3, e223.
- MAK, G. K., ENWERE, E. K., GREGG, C., PAKARAINEN, T., POUTANEN, M., HUHTANIEMI, I. & WEISS, S. 2007. Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat Neurosci*, 10, 1003-11.
- MANGANAS, L. N., ZHANG, X., LI, Y., HAZEL, R. D., SMITH, S. D., WAGSHUL, M. E., HENN, F., BENVENISTE, H., DJURIC, P. M., ENIKOLOPOV, G. & MALETIC-SAVATIC, M. 2007. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science*, 318, 980-5.
- MARKAKIS, E. A. & GAGE, F. H. 1999. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*, 406, 449-60.
- MARNER, L., NYENGAARD, J. R., TANG, Y. & PAKKENBERG, B. 2003. Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. *J Comp Neurol*, 462, 144-52.
- MARTIN, B., PEARSON, M., KEBEJIAN, L., GOLDEN, E., KESELMAN, A., BENDER, M., CARLSON, O., EGAN, J., LADENHEIM, B., CADET, J. L., BECKER, K. G., WOOD, W., DUFFY, K., VINAYAKUMAR, P., MAUDSLEY, S. & MATTSON, M. P. 2007. Sex-dependent metabolic, neuroendocrine, and cognitive responses to dietary energy restriction and excess. *Endocrinology*, 148, 4318-33.
- MARTIN, S. & PARTON, R. G. 2006. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 373-8.
- 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, 1726-33.
- MENN, B., GARCIA-VERDUGO, J. M., YASCHINE, C., GONZALEZ-PEREZ, O., ROWITCH, D. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2006. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci*, 26, 7907-18.
- MESSAOUDI, I., WARNER, J., FISCHER, M., PARK, B., HILL, B., MATTISON, J., LANE, M. A., ROTH, G. S., INGRAM, D. K., PICKER, L. J., DOUEK, D. C., MORI, M. & NIKOLICH-ZUGICH, J. 2006. Delay of T cell senescence by caloric restriction in aged long-lived nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 19448-53.
- MICHEL, M., TOROK, N., GODBOUT, M. J., LUSSIER, M., GAUDREAU, P., ROYAL, A. & GERMAIN, L. 1996. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci*, 109 ( Pt 5), 1017-28.
- MILNER, B., SQUIRE, L. R. & KANDEL, E. R. 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20, 445-68.
- MING, G. L. & SONG, H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 28, 223-50.
- MIRICH, J. M., WILLIAMS, N. C., BERLAU, D. J. & BRUNJES, P. C. 2002. Comparative study of aging in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 454, 361-72.
- 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, 265-78.

- 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, 448-52.
- MORI, T., BUFFO, A. & GOTZ, M. 2005. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 69, 67-99.
- MORRISON, S. J., WANDYDZ, A. M., AKASHI, K., GLOBERSON, A. & WEISSMAN, I. L. 1996. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2, 1011-6.
- 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, 1071-82.
- MOYER, J. R., JR. & BROWN, T. H. 2006. Impaired trace and contextual fear conditioning in aged rats. *Behav Neurosci*, 120, 612-24.
- NADERALI, E. K., RATCLIFFE, S. H. & DALE, M. C. 2009. Obesity and Alzheimer's disease: a link between body weight and cognitive function in old age. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 24, 445-9.
- NOCTOR, S. C., FLINT, A. C., WEISSMAN, T. A., DAMMERMAN, R. S. & KRIEGSTEIN, A. R. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409, 714-20.
- 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, 136-44.
- NOCTOR, S. C., MARTINEZ-CERDENO, V. & KRIEGSTEIN, A. R. 2007. Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. *Arch Neurol*, 64, 639-42.
- NOCTOR, S. C., MARTINEZ-CERDENO, V. & KRIEGSTEIN, A. R. 2008. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol*, 508, 28-44.
- NODA, T. & OHSUMI, Y. 1998. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*, 273, 3963-6.
- PAGANO, S. F., IMPAGNATIELLO, F., GIRELLI, M., COVA, L., GRIONI, E., ONOFRI, M., CAVALLARO, M., ETTERI, S., VITELLO, F., GIOMBINI, S., SOLERO, C. L. & PARATI, E. A. 2000. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells*, 18, 295-300.
- PALMA, V., LIM, D. A., DAHMANE, N., SANCHEZ, P., BRIONNE, T. C., HERZBERG, C. D., 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, 335-44.
- PALMER, T. D., RAY, J. & GAGE, F. H. 1995. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*, 6, 474-86.
- PALMER, T. D., WILLHOITE, A. R. & GAGE, F. H. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*, 425, 479-94.
- PAN, K. Z., PALTER, J. E., ROGERS, A. N., OLSEN, A., CHEN, D., LITHGOW, G. J. & KAPAHI, P. 2007. Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 6, 111-9.



- PARRAS, C. M., GALLI, R., BRITZ, O., SOARES, S., GALICHET, C., BATTISTE, J., JOHNSON, J. E., NAKAFUKU, M., VESCOVI, A. & GUILLEMOT, F. 2004. Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J*, 23, 4495-505.
- 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 U S A*, 106, 6387-92.
- PEARSON, K. J., BAUR, J. A., LEWIS, K. N., PESHKIN, L., PRICE, N. L., LABINSKY, N., SWINDELL, W. R., KAMARA, D., MINOR, R. K., PEREZ, E., JAMIESON, H. A., ZHANG, Y., DUNN, S. R., SHARMA, K., PLESHKO, N., WOOLLETT, L. A., CSISZAR, A., IKENO, Y., LE COUTEUR, D., ELLIOTT, P. J., BECKER, K. G., NAVAS, P., INGRAM, D. K., WOLF, N. S., UNGVARI, Z., SINCLAIR, D. A. & DE CABO, R. 2008. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab*, 8, 157-68.
- PEREIRA, A. C., HUDDLESTON, D. E., BRICKMAN, A. M., SOSUNOV, A. A., HEN, R., MCKHANN, G. M., SLOAN, R., GAGE, F. H., BROWN, T. R. & SMALL, S. A. 2007. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 5638-43.
- PICARD-RIERA, N., DECKER, L., DELARASSE, C., GOUDE, K., NAIT-OUESMAR, B., LIBLAU, R., PHAM-DINH, D. & EVERCOOREN, A. B. 2002. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13211-6.
- PLATEL, J. C., GORDON, V., HEINTZ, T. & BORDEY, A. 2009. GFAP-GFP neural progenitors are antigenically homogeneous and anchored in their enclosed mosaic niche. *Glia*, 57, 66-78.
- POTTEN, C. S. & LOEFFLER, M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, 110, 1001-20.
- QU, Q., SUN, G., LI, W., YANG, S., YE, P., ZHAO, C., YU, R. T., GAGE, F. H., EVANS, R. M. & SHI, Y. 2010. Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat Cell Biol*, 12, 31-40; sup pp 1-9.
- RAKIC, P. 1985. Limits of neurogenesis in primates. *Science*, 227, 1054-6.
- RAMIREZ-CASTILLEJO, C., SANCHEZ-SANCHEZ, F., ANDREU-AGULLO, C., FERRON, S. R., AROCA-AGUILAR, J. D., SANCHEZ, P., MIRA, H., ESCRIBANO, J. & FARINAS, I. 2006. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci*, 9, 331-9.
- RANDO, T. A. 2006. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*, 441, 1080-6.
- REYNOLDS, B. A. & WEISS, S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, 1707-10.
- ROGINA, B. & HELFAND, S. L. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15998-6003.
- ROSENZWEIG, E. S. & BARNES, C. A. 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol*, 69, 143-79.
- ROY, N. S., WANG, S., JIANG, L., KANG, J., BENRAISS, A., HARRISON-RESTELLI, C., FRASER, R. A., COULDWELL, W. T., KAWAGUCHI, A., OKANO, H., NEDERGAARD, M. & GOLDMAN, S. A. 2000. In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med*, 6, 271-7.
- SAWAMOTO, K., WICHTERLE, H., GONZALEZ-PEREZ, O., CHOLFIN, J. A., YAMADA, M., SPASSKY, N., MURCIA, N. S., GARCIA-VERDUGO, J. M., MARIN, O., RUBENSTEIN, R. D. & DE CAZANVILLE, J. 2007. The transcription factor Npas2 is essential for the generation of neural stem cells in the adult mouse brain. *Development*, 134, 111-20.

- J. L., TESSIER-LAVIGNE, M., OKANO, H. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2006. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*, 311, 629-32.
- SCHNEIDER, S. Q. & BOWERMAN, B. 2003. Cell polarity and the cytoskeleton in the *Caenorhabditis elegans* zygote. *Annu Rev Genet*, 37, 221-49.
- SCHOLZEN, T. & GERDES, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182, 311-22.
- SEABERG, R. M. & 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, 1784-93.
- SELMAN, C., TULLET, J. M., WIESER, D., IRVINE, E., LINGARD, S. J., CHOUDHURY, A. I., CLARET, M., AL-QASSAB, H., CARMIGNAC, D., RAMADANI, F., WOODS, A., ROBINSON, I. C., SCHUSTER, E., BATTERHAM, R. L., KOZMA, S. C., THOMAS, G., CARLING, D., OKKENHAUG, K., THORNTON, J. M., PARTRIDGE, L., GEMS, D. & WITHERS, D. J. 2009. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science*, 326, 140-4.
- SHAMJI, A. F., NGHIEM, P. & SCHREIBER, S. L. 2003. Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Mol Cell*, 12, 271-80.
- SHANOWER, G. A., MULLER, M., BLANTON, J. L., HONTI, V., GYURKOVICS, H. & SCHEDL, P. 2005. Characterization of the grappa gene, the *Drosophila* histone H3 lysine 79 methyltransferase. *Genetics*, 169, 173-84.
- SHARPLESS, N. E. & DEPINHO, R. A. 2007. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 703-13.
- 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.
- SHIHABUDDIN, L. S., RAY, J. & GAGE, F. H. 1997. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol*, 148, 577-86.
- SHINGO, T., GREGG, C., ENWERE, E., FUJIKAWA, H., HASSAM, R., GEARY, C., CROSS, J. C. & WEISS, S. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science*, 299, 117-20.
- SINGER, B. H., JUTKIEWICZ, E. M., FULLER, C. L., LICHTENWALNER, R. J., ZHANG, H., VELANDER, A. J., LI, X., GNEGY, M. E., BURANT, C. F. & PARENT, J. M. 2009. Conditional ablation and recovery of forebrain neurogenesis in the mouse. *J Comp Neurol*, 514, 567-82.
- SKORUPA, D. A., DERVISEFENDIC, A., ZWIENER, J. & PLETCHER, S. D. 2008. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell*, 7, 478-90.
- SONENBERG, N. & HINNEBUSCH, A. G. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136, 731-45.
- 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, 10-8.
- STANGL, D. & THURET, S. 2009. Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. *Genes Nutr*, 4, 271-82.

- STEVENSON, J. A. & YOON, M. G. 1981. Mitosis of radial glial cells in the optic tectum of adult goldfish. *J Neurosci*, 1, 862-75.
- STEWART, J., MITCHELL, J. & KALANT, N. 1989. The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. *Neurobiol Aging*, 10, 669-75.
- SUN, Y., KONG, W., FALK, A., HU, J., ZHOU, L., POLLARD, S. & SMITH, A. 2009. CD133 (Prominin) negative human neural stem cells are clonogenic and tripotent. *PLoS One*, 4, e5498.
- TASHIRO, A., MAKINO, H. & GAGE, F. H. 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci*, 27, 3252-9.
- TAUPIN, P. & GAGE, F. H. 2002. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res*, 69, 745-9.
- TAVAZOIE, M., VAN DER VEKEN, L., SILVA-VARGAS, V., LOUISSAINT, M., COLONNA, L., ZAIDI, B., GARCIA-VERDUGO, J. M. & DOETSCH, F. 2008. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 3, 279-88.
- TIPPETT, W. J., LEE, J. H., MRAZ, R., ZAKZANIS, K. K., SNYDER, P. J., BLACK, S. E. & GRAHAM, S. J. 2009. Convergent validity and sex differences in healthy elderly adults for performance on 3D virtual reality navigation learning and 2D hidden maze tasks. *Cyberpsychol Behav*, 12, 169-74.
- TROPEPE, V., CRAIG, C. G., MORSHEAD, C. M. & 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, 7850-9.
- VAN PRAAG, H., CHRISTIE, B. R., SEJNOWSKI, T. J. & GAGE, F. H. 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13427-31.
- VAN PRAAG, H., SHUBERT, T., ZHAO, C. & GAGE, F. H. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*, 25, 8680-5.
- WEISS, S., DUNNE, C., HEWSON, J., WOHL, C., WHEATLEY, M., PETERSON, A. C. & REYNOLDS, B. A. 1996. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci*, 16, 7599-609.
- WILSON, A., LAURENTI, E., OSER, G., VAN DER WATH, R. C., BLANCO-BOSE, W., JAWORSKI, M., OFFNER, S., DUNANT, C. F., ESHKIND, L., BOCKAMP, E., LIO, P., MACDONALD, H. R. & TRUMPP, A. 2008. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*, 135, 1118-29.
- WILSON, I. A., IKONEN, S., GALLAGHER, M., EICHENBAUM, H. & TANILA, H. 2005. Age-associated alterations of hippocampal place cells are subregion specific. *J Neurosci*, 25, 6877-86.
- ZHONG, Y. M., NISHIJO, H., UWANO, T., TAMURA, R., KAWANISHI, K. & ONO, T. 2000. Red ginseng ameliorated place navigation deficits in young rats with hippocampal lesions and aged rats. *Physiol Behav*, 69, 511-25.
- ZIABREVA, I., PERRY, E., PERRY, R., MINGER, S. L., EKONOMOU, A., PRZYBORSKI, S. & BALLARD, C. 2006. Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Psychosom Res*, 61, 311-6.

- ZID, B. M., ROGERS, A. N., KATEWA, S. D., VARGAS, M. A., KOLIPINSKI, M. C., LU, T. A., BENZER, S. & KAPAHI, P. 2009. 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*. *Cell*, 139, 149-60.
- ZIGOVA, T., PENCEA, V., WIEGAND, S. J. & LUSKIN, M. B. 1998. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci*, 11, 234-45.

# Annexe I

## Clonalité des neurosphères

Le *neurosphere assay* est une méthode d'isolation de cellules souches *in vitro* à partir d'un tissu neural primaire. Suite à la dissociation des cellules du tissu et leur incubation dans un milieu approprié, toutes les cellules différenciées meurent sauf les cellules souches neurales qui survivent et prolifèrent pour produire des neurosphères. Par définition, la neurosphère est une colonie sphérique de près de dix milles cellules originaires d'une seule cellule souche neurale, donc le nombre de neurosphères indique le nombre de cellules souches présentes dans un tissu. Sachant que les conditions de culture ainsi que la densité des cellules primaires peuvent facilement falsifier les résultats obtenus du *neurosphere assay*, une expérience contrôle devienne nécessaire pour déterminer la validité de la mesure du nombre de CSNa à partir du nombre de neurosphères. Premièrement, dans des conditions de culture inappropriées, les cellules primaires du tissu peuvent s'agréger et former des structures qui ressemblent aux neurosphères. Le compte de ces agrégats donne une surestimation du nombre de CSNa. Par contre, une densité élevée des cellules primaires peut causer la formation de neurosphères originaires de plusieurs cellules souches. Cet artéfact peut mener à une sous-estimation du nombre de CSNa. Nous avons utilisé le striatum de souris normale (CD1) et celui de souris exprimant EYFP dans une expérience contrôle (voir p37). Les neurosphères produites n'étaient pas complètement hétérogènes (agrégats de cellules), ni encapsulées (cellule originaires multiples), mais elles étaient toutes homogènes, soit CD1 soit EYFP (originaires d'une seule cellule) (Figure 9). Ce résultat contrôle ajoute de la crédibilité à nos observations et de la confiance en nos conclusions.

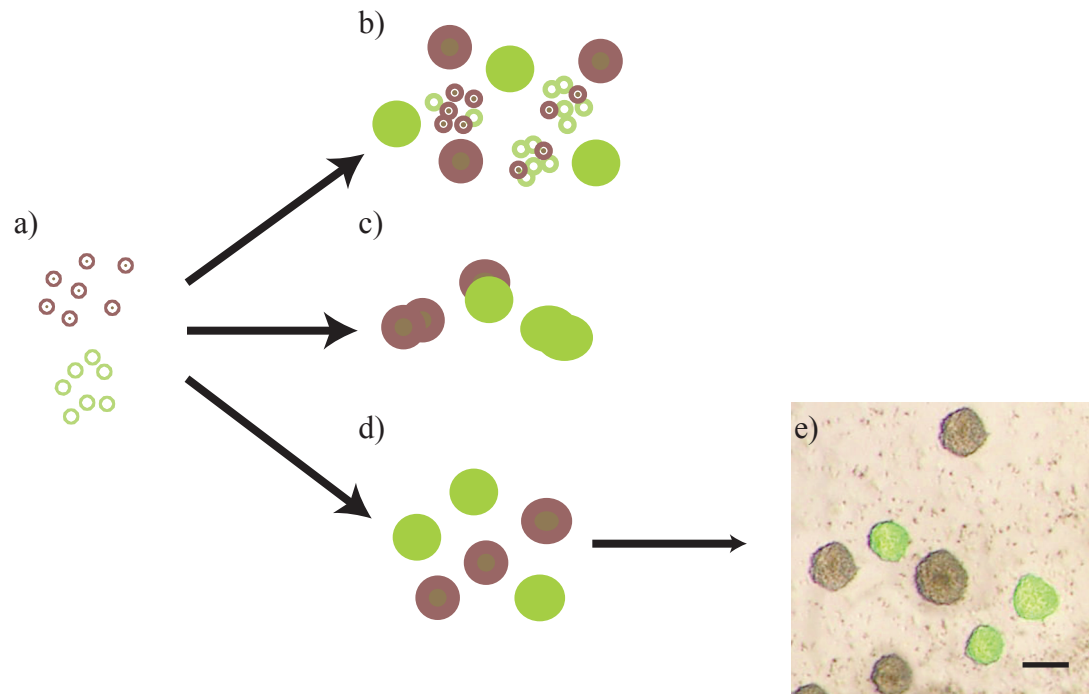


Figure 9 : **La clonalité des neurosphères.** **a**, Cellules dissocié des striatum de souris CD1 (en brun) et EYFP (en vert). Les conditions de culture dont la densité initiale des cellules peuvent causer une surestimation (**b**) ou une sous-estimation (**c**) du nombre de neurosphères produites. Dans les bonnes conditions, chaque neurosphere provienne d'une seule cellule souche, ce qui la rend homogène (brune ou verte) (**d**). **e**, Neurosphères primaires après 6 jours en culture. Bar d'échelle = 250mm.