

NNT : 2016SACLS549

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A  
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N°577  
Structure et dynamique des systèmes vivants

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Par

**Mme Lise MORIZUR**

**Régulation de la quiescence et de la prolifération des  
cellules souches neurales dans le cerveau adulte**

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 13 décembre 2016 :

**Composition du Jury :**

M. Denis DAVID	Professeur des universités, Université Paris-Saclay / Paris-Sud	Président du jury
Mme Isabelle CAILLE	Maître de conférences, Université Paris Diderot	Rapporteur
M. Olivier RAINETEAU	Directeur de recherche, Inserm	Rapporteur
Mme Valérie CORONAS	Professeure des universités, Université de Poitiers	Examinateur
M. François BOUSSIN	Directeur de recherche, CEA	Examinateur
M. Marc-André MOUTHON	Directeur de recherche, CEA	Directeur de thèse



## **Remerciements**

J'adresse tout d'abord mes remerciements aux Docteurs Isabelle Caillé et Olivier Raineteau pour avoir accepté d'évaluer ce travail en qualité de rapporteurs et pour y avoir consacré leur temps et leur attention. Je remercie également les Professeurs Valérie Coronas et Denis David d'avoir fait partie de mon jury de thèse et d'avoir contribué à la discussion scientifique.

Un immense merci à François de m'avoir accueillie au sein de son équipe. Grand maître à penser pour certains, superman et chauffeur de rallye pour d'autres, les superlatifs ne manquent pas... Parade à tout ennui et véritable encyclopédie de la langue française (on en est rendu où déjà ?), ce fut un plaisir de (presque) partager un bureau ! Merci pour ta disponibilité de tous les instants, les petites attentions à coup de cafés (comment ça une erreur de bouton ?) et tous les souvenirs mémorables.

Je remercie également Marc-André de m'avoir aidée à naviguer à travers les eaux houleuses du doctorat et de m'avoir amenée à bon port. Merci beaucoup de m'avoir laissée une grande autonomie de travail au cours de ma thèse tout en apportant ton inestimable rigueur scientifique, le tout en suivant avec bienveillance et enthousiasme mes nombreuses expériences botaniques plus ou moins couronnées de succès...

Un grand merci également à Alexandra, Mathieu, José et Nathalie avec qui j'ai partagé cette immersion dans la neurogenèse adulte. C'était un véritable plaisir de travailler avec vous ! Une pensée particulière pour Alexandra sur qui j'ai pu compter d'un bout à l'autre de cette belle aventure, et dont le sens de la répartition doublé d'une solide dose d'humour et d'optimisme (le prochain tri, c'est le bon !) a ajouté du piquant à la vie quotidienne du laboratoire.

Je n'oublie bien évidemment pas notre Catherine et Liliane du rez-de-chaussée, le bien-nommé Olivier. Malgré des goûts cinématographiques quelques peu douteux et une tendance (très prononcée) à écouter de la musique d'ascenseur pendant les expériences, ta bonne humeur permanente et tes talents artistiques - toujours dans la finesse - ont égayé ces 3 années passées au laboratoire.

Plus généralement, merci à l'ensemble des membres du LRP pour ces années hautes en couleur, tous les bons souvenirs (chouchou, qui a dit chouchou ?), les nombreuses tentatives de cours d'œnologie, les expériences culinaires et les points culture générale. Sans oublier les LRPistes d'adoption passés et présents - Christopher, Jérôme et Pierre - sur qui on peut toujours compter pour apporter un peu de poésie à nos journées.

Je remercie également nos secrétaires de choc, Aurélie et Arielle, qui s'occupent d'une main experte de tous nos tracas administratifs - on ne le dira jamais assez, la capacité à comprendre les méandres administratifs de l'université devrait figurer en bonne place parmi les compétences à développer pour arriver au bout d'une thèse !

Le tout sans oublier mes compagnons de galère - Amandine, Maëlle, Dalal, Mahasen, Jonathan - qui ne vont pas tarder à entrer dans la dernière ligne droite et à qui je souhaite bien du courage.

Une dernière pensée pour ma famille et Sylvain, relecteurs et « pom-pom girls » de l'ombre.

**A tous, merci !**

# TABLE DES MATIERES

<b>Remerciements.....</b>	<b>1</b>
<b>Table des figures.....</b>	<b>7</b>
<b>Table des tableaux.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>    1. Neurogenèse et cellules souches neurales.....</b>	<b>11</b>
1.1 Historique de la neurogenèse adulte .....	11
1.2 Les cellules souches neurales.....	13
1.2.1 Les cellules souches : une définition.....	13
1.2.2 Découverte des cellules souches neurales.....	13
1.2.3 Origine embryonnaire des CSN adultes.....	15
a. Les cellules de la glie radiaire, élément central de la neurogenèse embryonnaire .....	15
b. Des cellules de la glie radiaire embryonnaire aux cellules souches neurales adultes .....	16
c. Régionalisation embryonnaire des principales zones neurogéniques adultes.....	19
<b>    2. Neurogenèse adulte .....</b>	<b>20</b>
2.1 La neurogenèse hippocampique de la zone sous-granulaire.....	21
2.1.1 La formation hippocampique .....	21
2.1.2 Neurogenèse de la zone sous-granulaire .....	23
2.2 La neurogenèse bulbaire de la zone sous-ventriculaire.....	25
2.2.1 De la zone sous-ventriculaire au bulbe olfactif .....	25
2.2.2 Diversité et régionalisation des neurones générés au niveau du bulbe olfactif .....	27
2.2.3 Présence d'une neurogenèse sous-ventriculaire chez l'Homme .....	29
2.2.4 Organisation cellulaire de la niche sous-ventriculaire adulte chez la souris.....	30
2.2.5 Une structure en rosace en contact avec le microenvironnement.....	33
2.3 Les CSN quiescentes, réservoir de la neurogenèse adulte.....	36
2.3.1 Homéostasie tissulaire et quiescence .....	36
2.3.2 Identification de cellules souches quiescentes dans les tissus adultes.....	37
<b>    3. Modulation des phases précoce</b> s de la neurogenèse adulte.....	<b>39</b>
3.1 L'accident vasculaire cérébral ischémique.....	39
3.2 Effet de l'exercice et de l'enrichissement de l'environnement.....	40
3.3 Reprise de la neurogenèse après un stress génotoxique.....	41

3.4 Modulation pharmacologique de l'état dépressif.....	43
3.5 Evolution avec l'âge des niches neurogéniques.....	44
<b>4. Régulation moléculaire de la neurogenèse adulte .....</b>	<b>48</b>
4.1 Facteurs intrinsèques .....	48
4.1.1 Contrôle du cycle cellulaire .....	48
4.1.2 Régulateurs transcriptionnels .....	50
4.1.3 Modifications épigénétiques.....	51
4.2 Facteurs extrinsèques.....	54
4.2.1 Régulation par les facteurs de croissance .....	54
a. EGF et FGF-2 .....	54
b. PEDF.....	54
c. VEGF-C .....	55
d. IGF-I/II.....	55
4.2.2 Modulation par les neurotransmetteurs.....	57
a. Signaux GABAergiques.....	57
b. Signaux sérotoninergiques .....	57
c. Régulation par les morphogènes .....	58
4.2.3 Modulation par la niche .....	61
a. Matrice extracellulaire et fractones .....	61
b. Ephrine .....	62
c. Cadhérine.....	63
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>65</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>67</b>
<b>ARTICLE 1 .....</b>	<b>69</b>
Cell sorting of neural stem and progenitor cells from the adult mouse subventricular zone and live-imaging of their cell cycle dynamics .....	69
<b>ARTICLE 2 .....</b>	<b>87</b>
TGF $\beta$ lengthens the G1 phase of stem cells in aged mouse brain .....	87
<b>ARTICLE 3 .....</b>	<b>113</b>
Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells .....	113
<b>ARTICLE 4 .....</b>	<b>135</b>
Gene profiling analysis of quiescent and activated neural stem cells from the adult mouse subventricular zone .....	135

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>177</b>
<b>1. Le tri cellulaire comme outil d'étude de la neurogenèse adulte .....</b>	<b>179</b>
1.1 Vers l'identification et la purification des CSN adultes .....	179
1.2 Purification des CSN quiescentes, des CSN activées et de la progénie neurale.....	180
1.3 Hétérogénéité cellulaire des populations neurogéniques triées .....	181
<b>2. Les CSN, entre quiescence et activation.....</b>	<b>183</b>
2.1 Caractérisation fonctionnelle des CSN quiescentes .....	183
2.2 La quiescence, un état cellulaire dynamique .....	185
<b>3. Le vieillissement comme modèle d'étude des mécanismes régulant la neurogenèse adulte .....</b>	<b>188</b>
3.1 Acquisition d'un phénotype quiescent au cours du vieillissement .....	188
3.2 Le microenvironnement, acteur majeur du vieillissement de la ZSV.....	190
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>193</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>199</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>224</b>



## **Table des figures**

Figure 1 : Caractéristiques des cellules souches neurales du cerveau adulte .....	14
Figure 2 : Les CSN au cours du développement embryonnaire.....	18
Figure 3 : Régionalisation embryonnaire des CSN de la ZSV adulte .....	19
Figure 4 : Localisation des deux principales zones de neurogenèse adulte dans le cerveau murin .....	20
Figure 5 : Organisation de l'hippocampe .....	22
Figure 6 : Neurogenèse adulte dans le gyrus dentelé de l'hippocampe .....	24
Figure 7 : Neurogenèse olfactive : de la zone sous-ventriculaire au bulbe olfactif .....	26
Figure 8 : Diversité des interneurones du bulbe olfactif et origine régionale.....	28
Figure 9 : Organisation de la zone sous-ventriculaire chez la souris adulte.....	35
Figure 10 : Progression dans le cycle cellulaire.....	37
Figure 11 : Représentation schématique du vieillissement de la ZSV murine .....	46

## **Table des tableaux**

Tableau 1 : Facteurs intrinsèques modulant l'activité des CSN adultes .....	53
Tableau 2 : Facteurs extrinsèques modulant l'activité des CSN adultes .....	64

## Liste des abréviations

- 5-HT : 5-hydroxytryptamine (serotonin)
- <sup>14</sup>C : carbone 14
- Ara-C : cytosine D-β-arabinofurosido D
- BMP : Bone morphogenetic protein
- BrdU : bromodeoxyuridine
- CA : corne d'Ammon
- Cdk : cyclin-dependent protein kinase
- Cdki : cyclin-dependent kinase inhibitor
- CSN : cellule souche neurale
- MEC : matrice extracellulaire
- EGF : epidermal growth factor
- FGF : fibroblast growth factor
- GABA : γ-aminobutyric acid
- GC: cellules granulaires
- GD : gyrus dentelé
- HAT : histone acétyltransférase
- HDAC : histone désacétylase
- IGF : insulin growth factor
- LCR : liquide céphalo-rachidien
- LGE : éminence ganglionnaire latérale
- MGE : éminence ganglionnaire médiane
- PGC : cellules périglomérulaires
- RMS : *rostral migratory stream* (chemin de migration rostrale)
- Shh : sonic hedgehog
- TLX : orphan nuclear receptor tailless
- TGF : transforming growth factor
- VEGF : vascular endothelial growth factor
- ZSG : zone sous-granulaire
- ZSV : zone sous-ventriculaire

# **INTRODUCTION**

---

---



## 1. Neurogenèse et cellules souches neurales

### 1.1 Historique de la neurogenèse adulte

*« Une fois le développement terminé, la croissance et la régénération des axones et des dendrites s'arrêtent irréversiblement. Dans le cerveau adulte, les voies nerveuses sont fixes et immuables : tout est destiné à mourir, rien ne peut être régénéré.»*

- Santiago Ramón y Cajal, 1913

Cette théorie de la fixité neuronale portée par le neuroanatomiste espagnol Santiago Ramón y Cajal ancrera pendant la majeure partie du XXème siècle l'idée selon laquelle le cerveau adulte était incapable de se régénérer une fois le développement achevé. On tenait ainsi pour dogme que les neurones étaient exclusivement produits lors de la période embryonnaire chez les mammifères et qu'en conséquence leur nombre ne faisait que décroître au cours de la vie.

Les travaux précurseurs d'Ezra Allen en 1912 questionnèrent pour la première fois ce dogme en montrant la présence d'une activité mitotique le long des ventricules latéraux de rats albinos jusqu'à l'âge de 4 mois (Allen, 1912). Ces travaux restèrent cependant dans l'anonymat ne pouvant relier les mitoses observées à la production de nouveaux neurones. Il fallut attendre la fin des années 1950 pour que l'hypothèse de l'existence d'une neurogenèse adulte soit à nouveau avancée. Suivant par autoradiographie l'incorporation de la [<sup>3</sup>H]-thymidine radioactive dans les cellules en prolifération, Joseph Altman apporta les premières observations de la génération de nouveaux neurones chez de jeunes rats adultes au niveau du néocortex (Altman, 1962) et du gyrus dentelé (GD) de l'hippocampe (Altman, 1963; Altman and Das, 1965a). Il décrivit par la suite la formation post-natale de cellules dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) (Altman and Das, 1965b) ainsi que leur voie de migration le long du chemin de migration rostrale (RMS) vers le bulbe olfactif (Altman, 1969). Ces résultats se heurtèrent une fois encore au scepticisme de la communauté scientifique, dû notamment aux limitations techniques de l'époque qui ne permettaient pas d'apporter la preuve formelle que les cellules radio-marquées étaient bien des neurones et non des cellules gliales dont les propriétés prolifératives étaient connues. Les travaux de Michael Kaplan,

une dizaine d'années plus tard, confirmèrent cependant les résultats d'Altman et apportèrent la preuve expérimentale du caractère neuronal des cellules néoformées radio-marquées dans le cerveau adulte grâce à l'utilisation de la microscopie électronique (Kaplan and Hinds, 1977; Kaplan and Bell, 1984). Parallèlement, l'équipe de Fernando Nottebohm démontra pour la première fois le rôle fonctionnel de l'apport permanent de nouveaux éléments dans les circuits neuronaux préexistants. Etudiant la capacité des canaris mâles à apprendre chaque année de nouveaux chants à la saison des amours, ils démontrent que le volume du centre vocal supérieur augmentait spécifiquement et qu'un nombre important de neurones nouvellement formés y étaient intégrés (Nottebohm, 1981; Paton and Nottebohm, 1984). Ces résultats suggèrent le rôle clé joué par le renouvellement neuronal dans une forme adulte d'apprentissage.

La neurogenèse adulte acquit réellement ses lettres de noblesse en 1998 lorsque le groupe de Fred Gage démontra pour la première fois son existence chez l'Homme au niveau de l'hippocampe (Eriksson et al., 1998). Cela fut rendu possible par l'examen des cerveaux de personnes décédées ayant reçu de leur vivant une injection de bromodeoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine s'incorporant en phase S du cycle cellulaire, afin d'estimer l'indice prolifératif de leurs cellules tumorales. Associant la détection du BrdU à l'utilisation de marqueurs cellulaires, ils montrèrent sans ambiguïté la nature neuronale des cellules nouvellement générées dans l'hippocampe. La neurogenèse adulte est dès lors un phénomène accepté et commun à l'ensemble des mammifères. L'équipe de Jonas Frisén a récemment confirmé ces résultats en suivant l'évolution de l'incorporation de carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ) dans l'ADN génomique de neurones provenant de différentes régions du cerveau humain (Spalding et al., 2013). Tirant profit des tests de bombes nucléaires effectués entre 1955 et 1963 qui avaient provoqué une élévation transitoire du taux de  $^{14}\text{C}$  dans l'atmosphère, ils ont pu déterminer si une population cellulaire donnée se renouvellait au cours de la vie adulte en rapportant son taux en  $^{14}\text{C}$  à la mort de l'individu par rapport au taux atmosphérique présent à sa naissance. Cette méthode permet de montrer qu'environ un tiers des neurones de l'hippocampe est renouvelé à l'âge adulte, soit environ 700 nouveaux neurones par jour (Spalding et al., 2013), tandis que de nouveaux neurones apparaissent au niveau du striatum, une structure attenante à la ZSV (Ernst et al., 2014).

## **1.2 Les cellules souches neurales**

### **1.2.1 Les cellules souches : une définition**

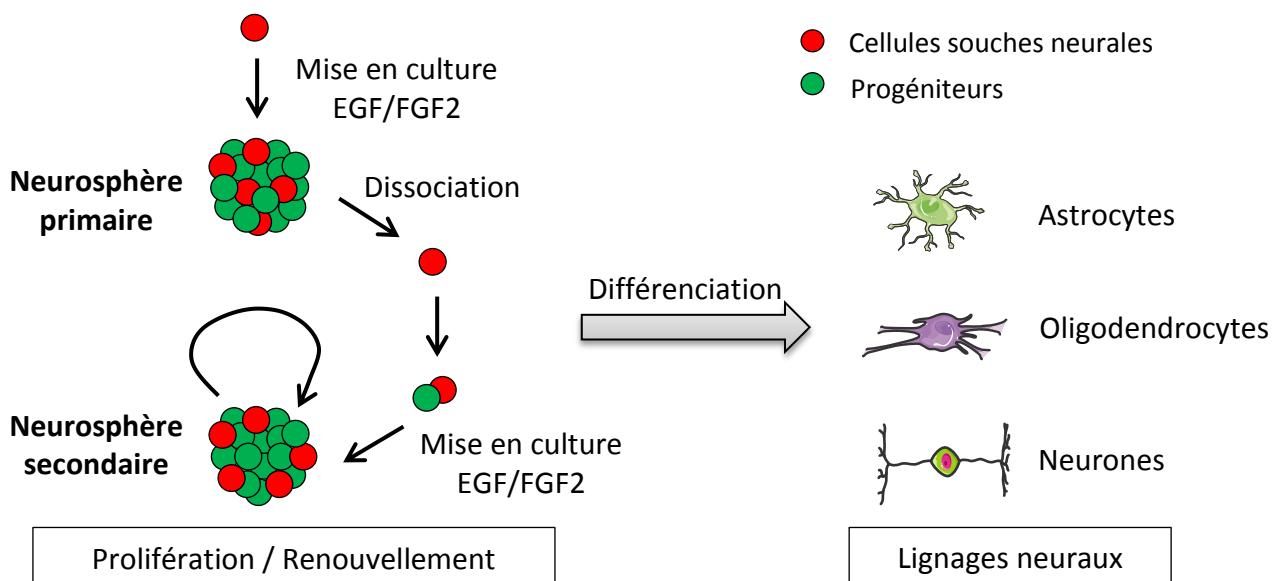
De nombreux tissus, dont l'intestin, la peau et la moelle osseuse se renouvellent en permanence à l'âge adulte. Cette régénération tissulaire repose sur l'existence de cellules souches. Par définition, une cellule souche est une cellule indifférenciée capable de se multiplier à l'identique et de générer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire. On distingue les cellules souches embryonnaires pluripotentes des cellules souches adultes par leur capacité à conduire à la formation de tous les tissus de l'organisme, y compris la lignée germinale. Les cellules souches adultes sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en différents types cellulaires spécifiques d'un lignage restreint selon leur tissu d'origine. Elles jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en assurant un équilibre entre les processus de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire. Les cellules souches adultes sont localisées dans un microenvironnement cellulaire spécialisé, appelé niche. Les niches jouent un rôle central dans l'intégration des signaux en provenance de l'environnement et constituent un système dynamique nécessaire au maintien des cellules souches dans les tissus (Scadden, 2006). En effet, elles leur offrent une protection contre les stimuli de différenciation, d'apoptose, et tout autre signal qui pourrait perturber le maintien de leur nombre au cours du temps (Morrison and Spradling, 2008). Cela passe notamment par leur capacité à alterner entre deux types de division cellulaire : la division symétrique permettant de générer deux cellules filles identiques, et la division asymétrique permettant de générer une cellule spécialisée engagée dans une voie de différenciation spécifique, tout en maintenant une cellule fille qui gardera à l'identique son statut de cellule souche dans le tissu (Watt and Hogan, 2000).

### **1.2.2 Découverte des cellules souches neurales**

Bien qu'il fût admis que de nouveaux neurones étaient créés en permanence à l'âge adulte et intégrés dans les circuits neuronaux préexistants, l'idée que des neurones, cellules post-mitotiques, puissent se diviser et engendrer de nouvelles cellules filles, apparaissait peu plausible. La découverte par Brent Reynolds et Sam Weiss en 1992 de

l'existence de cellules souches neurales (CSN) multipotentes dans le cerveau adulte marqua un tournant. Ils montrèrent que certaines cellules du striatum de souris adultes étaient capables de proliférer en présence de l'EGF (epidermal growth factor) pour former des amas de cellules indifférenciées, appelés neurosphères, capables de se renouveler et de donner naissance à des astrocytes et à des neurones (Reynolds and Weiss, 1992) (Figure 1). Des CSN furent par la suite isolées de la ZSV (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Luskin, 1993; Lois and Alvarez-Buylla, 1994) et de l'hippocampe murin adulte (Gage et al., 1995; Palmer et al., 1997). Chez l'Homme, des CSN ont également pu être obtenues à partir de tissus prélevés post-mortem sur des cerveaux adultes (Palmer et al., 2001) et des neurosphères multipotentes ont été dérivées à partir de biopsies collectées des ventricules latéraux et de l'hippocampe de patients (Kukekov et al., 1999; Westerlund et al., 2003; Sanai et al., 2004).

L'existence de CSN sous-jacentes du maintien d'une neurogenèse adulte a depuis été démontrée dans une grande variété d'espèces parmi lesquelles les rongeurs (Reynolds and Weiss, 1992; Palmer et al., 1997), les chiens (Milward et al., 1997), les oiseaux (Goldman and Nottebohm, 1983), les reptiles (Font et al., 2001), les chèvres (Brus et al., 2013) et les primates non humains (Gould et al., 1999; Kornack and Rakic, 1999).



**Figure 1 : Caractéristiques des cellules souches neurales du cerveau adulte**

En présence de mitogènes (EGF et/ou FGF2), les CSN prolifèrent en suspension et forment des neurosphères. En milieu de différenciation, elles génèrent les 3 types cellulaires majeurs du système nerveux central : neurones, oligodendrocytes et astrocytes.

### **1.2.3 Origine embryonnaire des CSN adultes**

Le cerveau est principalement constitué de neurones et de cellules gliales (astrocytes – oligodendrocytes – cellules de Schwann – microglie). Les neurones sont des cellules excitables chargées d'acheminer et de traiter l'information sous forme de dépolarisations électriques le long de leur membrane. Les cellules gliales sont quant à elles des cellules de soutien indispensables à la survie des neurones en assurant l'isolement physique et électrique des tissus nerveux, les fonctions métaboliques, le soutien squelettique et leur protection vis-à-vis des corps étrangers en cas de lésions. Elles jouent également un rôle trophique nécessaire au fonctionnement normal du cerveau. Alors que les neurones et les cellules gliales ont longtemps été considérés comme deux entités cellulaires distinctes qui divergent tôt au cours du développement embryonnaire, des études récentes montrent que les CSN adultes dérivent de cellules de la glie radiaire situées autour des ventricules dans le cerveau embryonnaire (Gaiano et al., 2000; Haubensak et al., 2004; Merkle et al., 2004; Noctor et al., 2004; Noctor et al., 2007).

#### a. Les cellules de la glie radiaire, élément central de la neurogenèse embryonnaire

Au cours du développement embryonnaire, des milliards de neurones sont créés à partir d'un feuillet primitif pseudo-stratifié, le neurectoderme. Celui-ci est composé d'une couche de cellules neuroépithéliales, correspondant à la zone ventriculaire (ZV), dont le nombre est rapidement amplifié par divisions symétriques pour former la plaque neurale (Rakic, 1988). Le début de la neurogenèse embryonnaire à proprement parler débute à partir du 10<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire (E10) chez la souris avec la différenciation des cellules neuroépithéliales en cellules de la glie radiaire par division asymétrique (Martynoga et al., 2012). Ces dernières génèrent alors directement un neurone ou produisent des précurseurs intermédiaires qui vont proliférer au niveau de la ZSV avant de se différencier en neurones (Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004; Noctor et al., 2007). Les cellules de la glie radiaire possèdent un cil primaire en contact avec le liquide céphalorachidien à la surface du ventricule et projettent de l'autre côté un long prolongement vers la surface piale (Gadisseux et al., 1989). Ces prolongements

servent de support à la migration radiale des neurones immatures, d'abord dans les couches profondes (E11-E13) et ensuite dans les couches superficielles corticales (E14-E16) (Angevine and Sidman, 1961; Berry and Rogers, 1965; Sidman and Rakic, 1973). Les astrocytes sont produits dans un second temps à partir de E16 jusqu'aux premières semaines de développement postnatal chez la souris. Le troisième type cellulaire majeur du système nerveux - les oligodendrocytes - est exclusivement produit pendant la période post-natale (Sauvageot and Stiles, 2002; Bayraktar et al., 2015). Les cellules de la glie radiaire disparaissent quelques jours après la naissance en se différenciant en cellules épendymaires et en astrocytes pour respectivement former la paroi ventriculaire et la ZSV (Culican et al., 1990; Spassky et al., 2005; Noctor et al., 2008) (Figure 2). Les cellules de la glie radiaire sont également à l'origine d'un échafaudage glial qui se forme progressivement à distance de la ZV et sur lequel les cellules progénitrices migrent pour former la seconde zone neurogénique du cerveau adulte, le GD de l'hippocampe (Hodge et al., 2013; Urban and Guillemot, 2014).

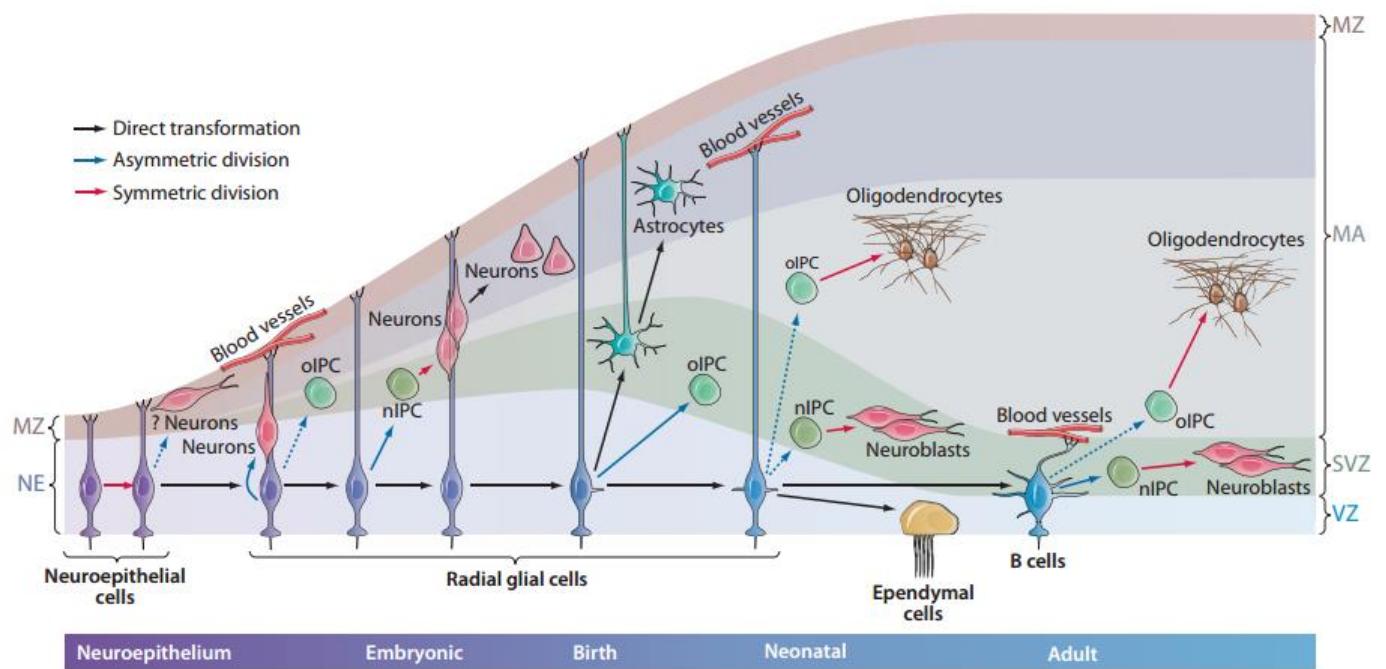
#### b. Des cellules de la glie radiaire embryonnaire aux cellules souches neurales adultes

L'existence d'une neurogenèse postnatale suggère un continuum entre le cerveau embryonnaire et adulte. La découverte de CSN au niveau de la ZSV adulte possédant un cil primaire en contact avec le ventricule et exprimant une protéine spécifique des cellules gliales, la GFAP (glial fibrillary acidic protein), suggéra une éventuelle filiation entre les cellules de la glie radiaire embryonnaire et les CSN adultes (Doetsch et al., 1997; Tramontin et al., 2003).

Traçant le devenir des cellules neuroépithéliales de la ZV infectées à E9.5 avec un vecteur rétroviral portant le gène Notch1, l'équipe de Gord Fishell montra qu'après s'être différenciées en cellules de la glie radiaire, elles se retrouvaient le long de la ZSV et exprimaient la GFAP à l'âge adulte (Gaiano et al., 2000), deux caractéristiques des CSN adultes qui avaient été démontrées peu de temps auparavant (Doetsch et al., 1999a). L'équipe d'Alvarez-Buylla a ensuite spécifiquement marqué les cellules de la glie radiaire en période néonatale (P0) par injection d'un adénovirus au niveau de leurs prolongements corticaux afin de suivre directement leur progénie (Merkle et al., 2004).

Quelques jours après injection, le gène rapporteur était retrouvé dans des cellules GFAP+ le long de la ZSV. De plus, des neuroblastes marqués étaient observés à l'âge adulte dans le chemin de migration rostrale (RMS) et des neurones marqués se trouvaient dans le bulbe olfactif (Merkle et al., 2004). Ces travaux suggèrent que les cellules souches de la ZSV adulte appartenaient au lignage cellules neuroépithéliales - cellules de la glie radiaire – CSN adultes (Alvarez-Buylla et al., 2001; Bonfanti and Peretto, 2007) (Figure 2). Deux études récentes ont par ailleurs montré que les CSN adultes sont dérivées de cellules de la glie radiaire embryonnaire qui ralentissent leur cycle cellulaire au cours du développement fœtal entre E13.5 et E15.5 puis restent relativement quiescentes jusqu'à être réactivées dans le cerveau post-natal (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015).

L'origine des CSN d'une autre zone neurogénique du cerveau adulte, le GD, n'est pour l'heure pas totalement définie. Bien qu'il soit supposé qu'elles se forment à partir des cellules de la glie radiaire composant les échafaudages gliaux mis en place lors de la formation du GD, il n'existe pas de démonstration par traçage génétique que ces échafaudages représentent un seul et même lignage continu de glie radiaire menant à la formation des CSN adultes dans l'hippocampe (Xu et al., 2015). Il semblerait toutefois que les CSN se relocaliseraient de la partie ventrale à la partie dorsale de l'hippocampe à l'âge adulte dans la zone sous-granulaire (Li et al., 2013).

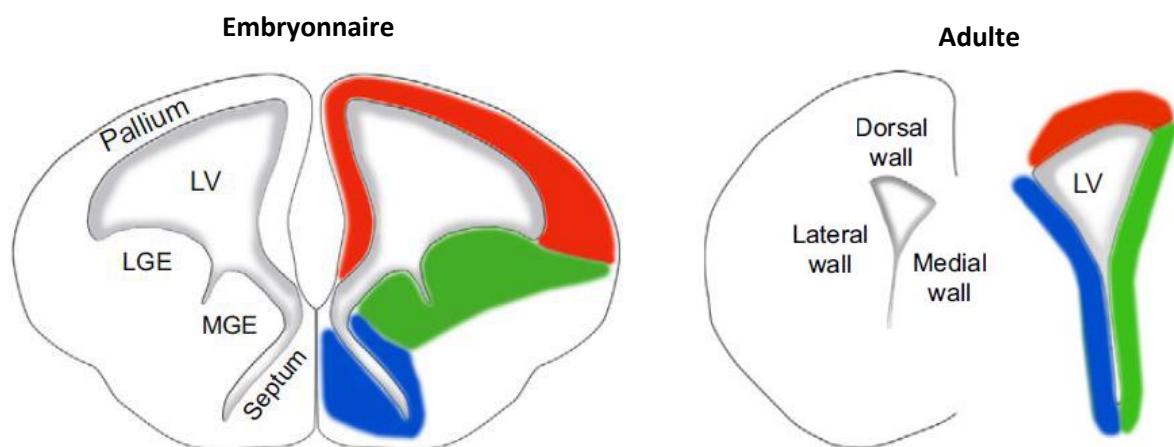


**Figure 2 : Les CSN au cours du développement embryonnaire**

La neurogenèse embryonnaire débute par la différenciation des cellules neuroépithéliales en cellules de la glie radiaire qui projettent de longs appendices perpendiculairement à la surface ventriculaire en direction de la surface corticale. Ces dernières donnent alors naissance à des progéniteurs intermédiaires et à des neurones. Les progéniteurs nerveux migrent ensuite sur les appendices des cellules de la glie radiaire et passent de la zone ventriculaire (VZ) à la zone marginale (MZ) du plateau cortical. La neurogenèse laisse la place à une gliogenèse à partir de E16, donnant naissance aux astrocytes et oligodendrocytes. Après la naissance, les cellules de la glie radiaire se différencient en cellules épendymaires le long des ventricules et en cellules souches neurales dans la zone sous-ventriculaire. MZ, zone marginale ; MA : couches corticales ; VZ, zone ventriculaire; SVZ : zone sous-ventriculaire. Schéma de (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

### c. Régionalisation embryonnaire des principales zones neurogéniques adultes

Les cellules de la glie radiaire sont réparties à travers le neuroépithélium en 4 régions qui se distinguent selon un axe dorso-ventral : le pallium, l'éminence ganglionnaire latérale (LGE), l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) et le septum (Fiorelli et al., 2015). La majorité des CSN de la région latérale de la ZSV adulte provient des cellules de la glie radiaire embryonnaire de la LGE et de la MGE (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Les cellules de la glie radiaire du pallium et du septum génèrent également une partie des CSN adultes des murs dorsal et médian, respectivement (Ventura and Goldman, 2007; Alvarez-Buylla et al., 2008) (Figure 3). Le GD est quant à lui spécifié à partir de la partie médiane du pallium au niveau de l'ourlet cortical (ou cortical hem) (Urban and Guillemot, 2014).



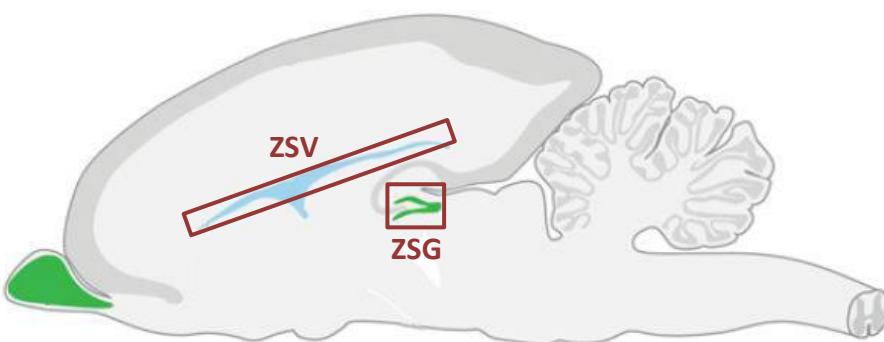
**Figure 3 : Régionalisation embryonnaire des CSN de la ZSV adulte**

Les cellules bordant les ventricules à l'âge adulte sont issues de 4 régions distinctes au cours du développement embryonnaire : le septum, le pallium, les éminences ganglionnaires latérales (LGE) et les éminences ganglionnaires médianes (MGE). Adapté de (Fiorelli et al., 2015).

## 2. Neurogenèse adulte

Il existe deux foyers principaux de neurogenèse dans le cerveau adulte : la zone sous-granulaire (ZSG) du GD, et la zone sous-ventriculaire (ZSV) qui longe les ventricules latéraux (Figure 4). On y trouve des CSN qui sont responsables du renouvellement neuronal dans l'hippocampe à partir de la ZSG et dans le bulbe olfactif à partir de la ZSV.

Il est important de noter que la neurogenèse adulte ne se limite pas exclusivement à la ZSV et la ZSG (pour revue (Gould, 2007; Migaud et al., 2010)). En effet, la production de nouveaux neurones a été décrite, y compris chez l'Homme, dans le striatum (Bedard et al., 2002; Ernst et al., 2014), le néocortex (Gould et al., 1999; Dayer et al., 2005), la substance noire (Zhao et al., 2003), le cortex piriforme (Bernier et al., 2002), l'amygdale (Bernier et al., 2002), le complexe vagal dorsal (Bauer et al., 2005) et l'hypothalamus (Kokoeva et al., 2005; Xu et al., 2005). Ces données restent toutefois sujettes à controverse quant à l'existence réelle d'une neurogenèse en conditions physiologiques dans ces zones (Gould, 2007).



**Figure 4 : Localisation des deux principales zones de neurogenèse adulte dans le cerveau murin**

Coupe sagittale du cerveau murin présentant la zone sous-ventriculaire (ZSV) et la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus dentelé de l'hippocampe. Adapté de (Ernst and Frisen, 2015).

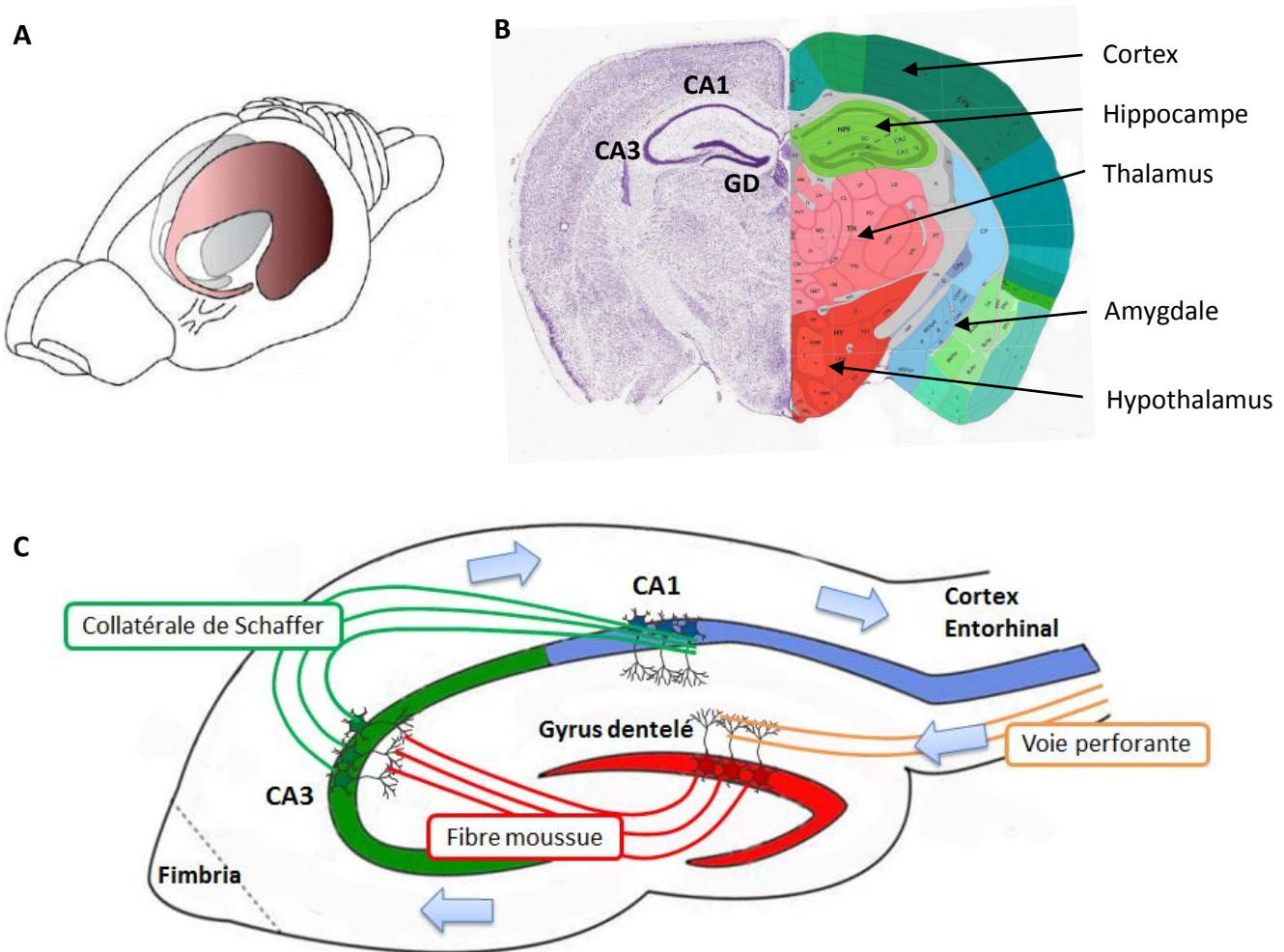
## **2.1 La neurogenèse hippocampique de la zone sous-granulaire**

Chez les rongeurs adultes, environ 9 000 nouveaux neurones sont générés chaque jour dans l'hippocampe, soit l'équivalent d'un renouvellement cellulaire de 6% chaque mois (Cameron and McKay, 2001). L'hippocampe est au centre d'un réseau neuronal complexe qui le maintient en contact avec de nombreuses structures cérébrales tels que le thalamus et l'amygdale. Il fait également partie du système limbique qui joue un rôle central dans la mémoire et les émotions. L'hippocampe est de fait impliqué dans la consolidation de l'information, la mémoire à court et long-terme ainsi que la navigation spatiale. Il joue également un rôle dans le contrôle du stress et de l'anxiété (Rolando and Taylor, 2014). Chez les mammifères adultes, la neurogenèse hippocampique se limite à la zone sous-granulaire du GD.

### **2.1.1 La formation hippocampique**

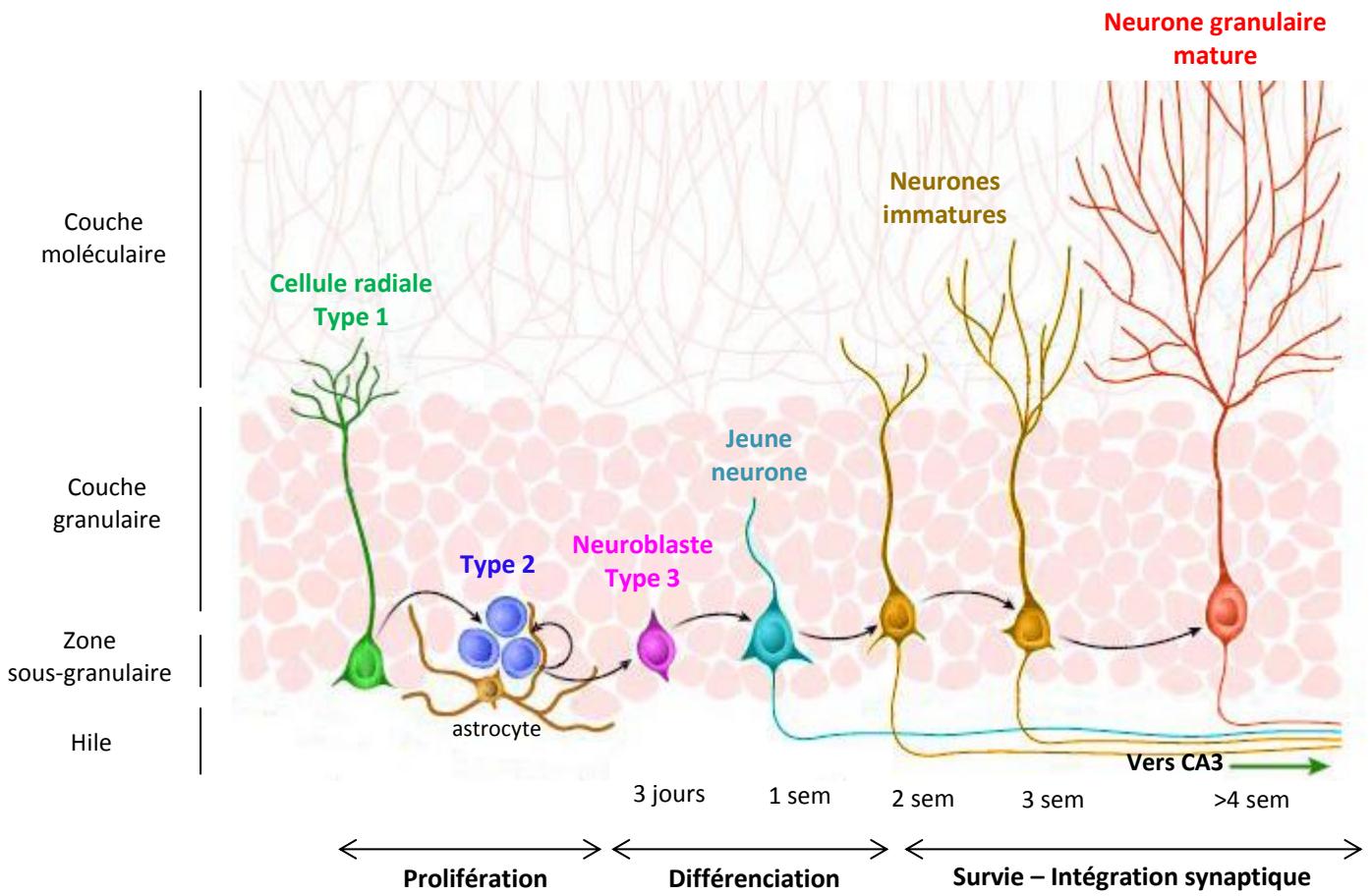
L'hippocampe est une structure incurvée qui s'étend sous la surface corticale dans la partie postérieure du cerveau (Figure 5.A). Structurellement, il est formé de deux structures principales : la corne d'Ammon (CA) subdivisée en trois sous-régions (CA1, CA2 et CA3), et le GD (Figure 5.B). Ce dernier est composé de trois couches distinctes : la couche moléculaire, la couche granulaire et le hile. La couche granulaire est principalement composée de cellules excitatrices, dites granulaires, agrégées les unes aux autres. Leurs dendrites apicales arborisent la couche moléculaire, relativement pauvre en corps cellulaire. Leurs axones s'étendent vers le hile et forment la fibre moussue en direction de la région CA3 de la corne d'Ammon (Amaral et al., 2007) (Figure 5.C). Cette structure particulière place l'hippocampe au centre d'un vaste réseau neuronal appelé formation hippocampique qui forme un circuit tri-synaptique et unidirectionnel. L'entrée de l'information dans cette boucle se fait par les axones du cortex entorhinal, appelés voie perforante, sur les cellules granulaires du GD (Ramón y Cajal, 1893). Ces dernières projettent leurs dendrites sur les cellules de la région CA3 par la voie des fibres moussues, qui transmet le signal vers la région CA1 par les collatérales de Schaffer. Finalement, les axones des cellules de CA1 projettent vers le subiculum qui

contacte en retour le cortex entorhinal, formant ainsi une boucle anatomique (Amaral et al., 2007).



## **2.1.2 Neurogenèse de la zone sous-granulaire**

La neurogenèse adulte dans l'hippocampe est initiée par la prolifération de CSN adultes (type 1) au niveau de la zone sous-granulaire située à l'interface de la couche granulaire et du hile du GD (Figure 6) (Ming and Song, 2011). Celles-ci se divisent asymétriquement et génèrent des progéniteurs intermédiaires (type 2) qui se différencient à leur tour en neuroblastes (type 3). Ces précurseurs neuronaux vont majoritairement se différencier en cellules granulaires et dans une moindre mesure en cellules gliales (Steiner et al., 2004). Le passage d'une cellule progénitrice à un neurone mature fonctionnellement intégré au sein des réseaux neuronaux préexistants de l'hippocampe se fait au terme d'un long processus de maturation qui s'étend sur plusieurs semaines (Esposito et al., 2005). Au cours de la première semaine, les cellules progénitrices devenues neuroblastes puis neurones immatures migrent sur une courte distance et s'intègrent au niveau de la couche granulaire adjacente (Kempermann et al., 2003; Esposito et al., 2005). Les jeunes neurones commencent alors à développer des prolongements dendritiques apicaux et étendent des axones le long des zones de projection des fibres moussues (Hastings and Gould, 1999). Une grande majorité des nouveaux neurones seront éliminés par apoptose (Sierra et al., 2010). Au cours de la deuxième et troisième semaine, les jeunes neurones établissent des connexions afférentes et efférentes avec le réseau neuronal local : les dendrites se ramifient dans la couche moléculaire et forment des synapses avec les fibres d'axones venant du cortex entorhinal (Zhao et al., 2006) tandis les axones atteignent la couche des cellules pyramidales de la région CA3 (Toni et al., 2008). La maturation électrophysiologique et l'intégration fonctionnelle des neurones sont initiées par l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (ou GABA) sécrété dans le milieu extracellulaire par les interneurones présents localement puis par la mise en place d'afférences synaptiques GABAergiques (en provenance des interneurones locaux) et glutamatergiques (en provenance de la voie perforante) (Ge et al., 2008). La maturation des jeunes neurones s'achève environ 2 mois après leur naissance. Leurs propriétés physiologiques et leur plasticité synaptique sont alors similaires à celles des cellules granulaires matures voisines (Ge et al., 2008).



**Figure 6 : Neurogenèse adulte dans le gyrus dentelé de l'hippocampe**

Les cellules souches neurales (type I) sont des cellules radiales situées dans la zone sous-granulaire du gyrus dentelé à l'origine de nouveaux neurones granulaires matures qui s'intègrent dans la couche granulaire. Le passage d'une cellule progénitrice à un neurone mature fonctionnellement intégré au sein des réseaux neuronaux préexistants se fait au terme d'un long processus de maturation qui s'étend sur plusieurs semaines. Adapté de (Aimone et al., 2014).

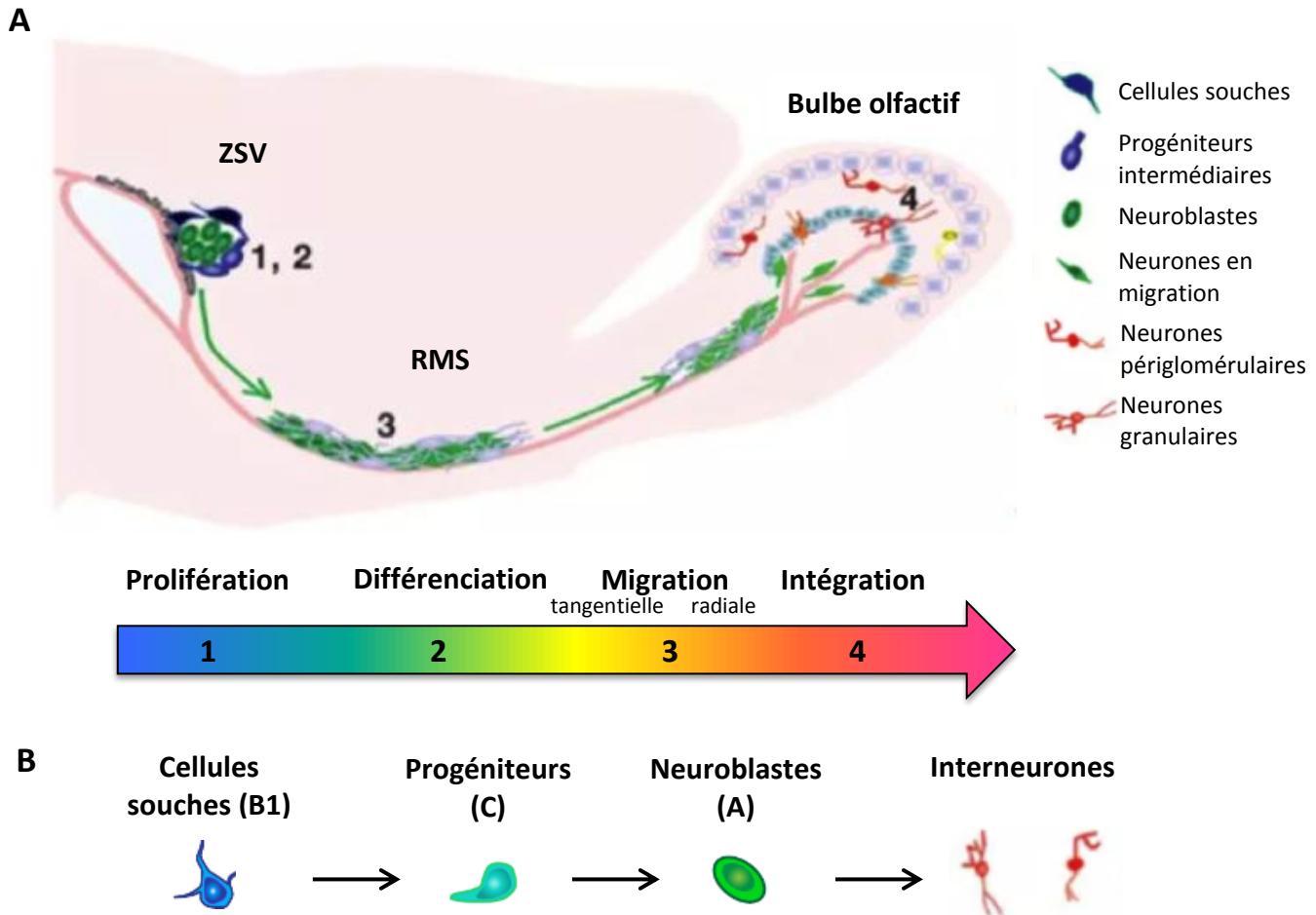
## **2.2 La neurogenèse bulinaire de la zone sous-ventriculaire**

Le bulbe olfactif reçoit un apport journalier de plusieurs milliers de nouveaux interneurones chez les jeunes souris adultes. La source de cette neurogenèse se situe à plusieurs millimètres de distance au niveau de la ZSV qui s'étend le long des ventricules latéraux et qui concentre la grande majorité des cellules en prolifération du cerveau adulte murin. Ce flux constant de nouveaux neurones apparaît essentiel pour des tâches liées à la discrimination, l'apprentissage et la mémorisation des odeurs (Lazarini and Lledo, 2011). De plus, il semblerait impliqué dans le contrôle des comportements liés aux phéromones, comme l'accouplement (Mak et al., 2007) et la reconnaissance parents-enfants chez la souris, bien que des résultats contradictoires aient été rapportés sur ce dernier point (Feierstein et al., 2010; Mak and Weiss, 2010).

### **2.2.1 De la zone sous-ventriculaire au bulbe olfactif**

Le mur du ventricule latéral abrite la ZSV où sont nichées des cellules de type astrocytaire exprimant la GFAP (Doetsch et al., 1997). Ces cellules de type B1 jouant le rôle de CSN adultes (Doetsch et al., 1999b), prolifèrent lentement et donnent naissance aux cellules progénitrices d'amplification transitoire hautement proliférantes (type C) qui se différencient à leur tour en neuroblastes (type A) (Lois and Alvarez-Buylla, 1994) (Figure 7.A). Ces neuroblastes se regroupent dans la partie antérieure de la ZSV, et migrent le long du chemin de migration rostrale (RMS) formé d'une gaine de cellules astrocytaires en direction du bulbe olfactif qu'ils atteignent en 2 à 7 jours (Lois et al., 1996; Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002). Il est estimé qu'environ 30 000 neuroblastes sont produits quotidiennement au niveau de la ZSV et empruntent le RMS chez la souris (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Une fois dans le bulbe olfactif, les neuroblastes migrent radialement dans les différentes couches (jours 5-7) et se différencient en interneurones granulaires (95%) et périglomérulaires (environ 3%) qui seront matures après 15 à 30 jours (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Lazarini and Lledo, 2011) (Figure 7.B). Bien que des milliers de neurones soient générés tous les jours, seule une faible proportion d'entre eux s'intègre durablement dans le circuit neuronal préexistant. Il est ainsi estimé

que seulement 50% des cellules granulaires nouvellement formées survivent après 45 jours (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002).



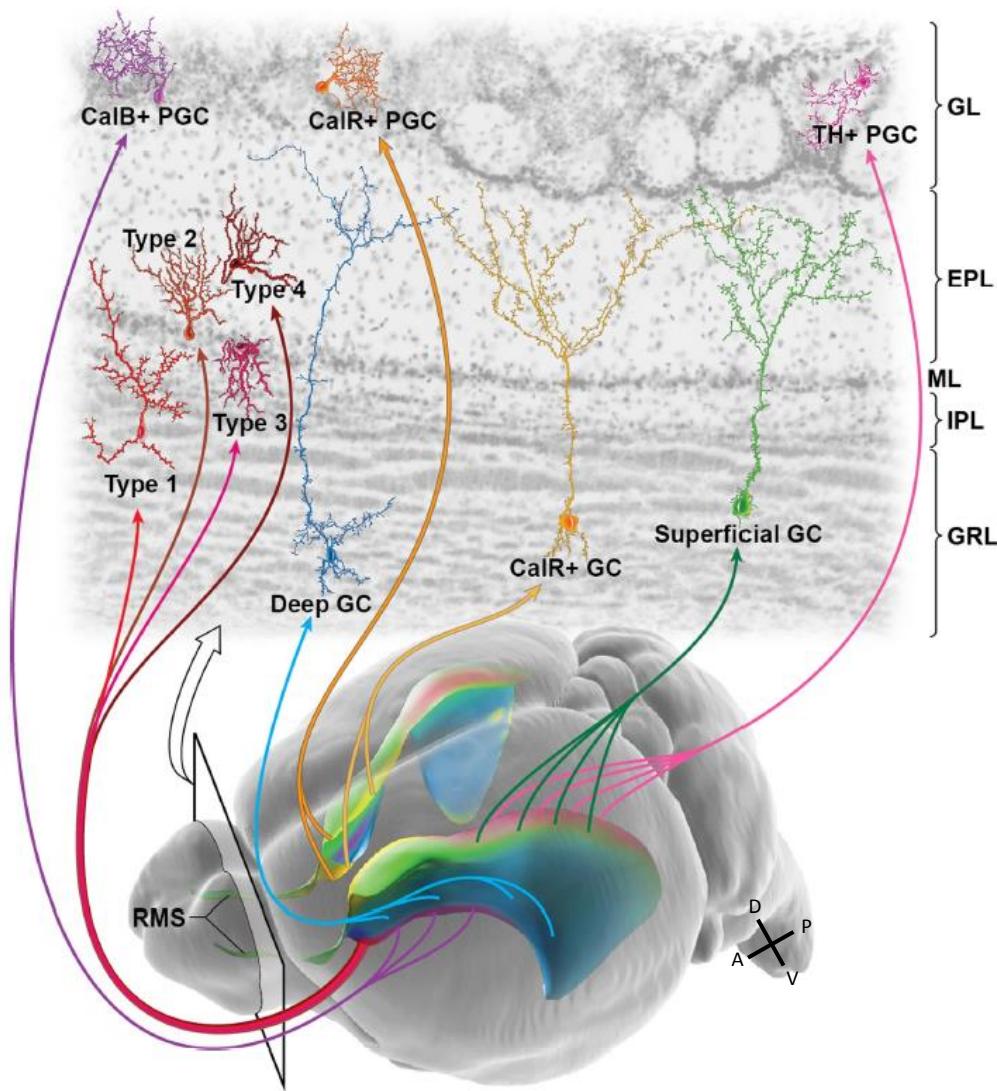
**Figure 7 : Neurogenèse olfactive : de la zone sous-ventriculaire au bulbe olfactif**

A. La production de nouveaux neurones dans le bulbe olfactif se divise en quatre étapes : 1/ Multiplication : les cellules souches qui bordent le ventricule latéral génèrent des progéniteurs intermédiaires , 2/ Différenciation : les progéniteurs intermédiaires se différencient en neuroblastes, 3/ Migration : des chaînes de neuroblastes se forment et migrent le long du chemin de migration rostrale pour atteindre le bulbe olfactif, 4/ Intégration : les nouveaux neurones migrent dans le bulbe olfactif et se différencient en interneurones granulaires et périglomérulaires. Adapté de (Ming and Song, 2005). B. Principaux types cellulaires impliqués dans la neurogenèse olfactive.

## **2.2.2 Diversité et régionalisation des neurones générés au niveau du bulbe olfactif**

Le bulbe olfactif est une structure hautement stratifiée dans laquelle les jeunes neurones migrent radialement au travers de la couche granulaire et de la couche périglomérulaire où ils se différencient en interneurones inhibiteurs locaux. Pour l'heure, 10 types d'interneurones ont été décrits dans le bulbe olfactif à l'âge adulte selon leur morphologie, leur localisation et l'expression de marqueurs moléculaires (Merkle et al., 2007; Merkle et al., 2014). La majeure partie des interneurones s'intègre dans la couche granulaire où ils forment des cellules granulaires (GC) superficielles et profondes, dont certaines expriment la Calretinin (CalR+ GC). Les interneurones restants migrent jusqu'à la couche glomérulaire et se différencient en interneurones périglomérulaires (PGC) de trois types selon le marqueur qu'ils expriment : Calbindin (CalB+ PGC), Calretinin (CalR+ PGC), et Tyrosine Hydroxylase (TH+ PGC) (Lim and Alvarez-Buylla, 2014) (Figure 8).

De manière intéressante, les CSN adultes sont prédestinées à produire un type d'interneurones selon la localisation des cellules de la glie radiaire dont elles proviennent entre E11.5 et E15.5 (Merkle et al., 2007; Fuentealba et al., 2015). Ainsi, le type d'interneurone généré est le fruit d'une régionalisation des cellules souches le long de la ZSV adulte. Alors que les cellules souches de la partie dorsale donnent principalement des GC superficielles et des PGC TH+, celles de la partie ventrale produisent des GC profondes et des PGC CalB+. Les GC et PGC CalR+ sont quant à elles dérivées de la zone médiane de la ZSV (Merkle et al., 2007). Quatre nouveaux sous-types d'interneurones (types 1 à 4) récemment identifiés, et dont la fonction n'est pour l'heure pas connue, sont quant à eux générés depuis la partie antéro-ventrale de la ZSV (Merkle et al., 2014) (Figure 8). Cette spécificité spatiale et temporelle du potentiel de différenciation neuronale des cellules souches semble au moins en partie intrinsèque. En effet, lorsque des cellules souches sont prélevées à un endroit de la ZSV pour être greffées dans une zone différente (transplantations hétérotopiques), elles continuent à générer les dérivés caractéristiques de leur zone d'origine (Kelsch et al., 2007; Merkle et al., 2007). Ainsi, des CSN issues de la partie ventrale de la ZSV qui sont greffées dans la partie dorsale continuent de produire des PGC CalB+ mais pas de PGC TH+.



**Figure 8 : Diversité des interneurones du bulbe olfactif et origine régionale**

Vue oblique du cerveau murin montrant les différentes régions de la ZSV adulte (indiquées en couleur) à l'origine des cellules périmoléculaires (PGC) et des cellules granulaires (GC) du bulbe olfactif tel qu'illustré dans la partie haute de la figure. Chaque région produit préférentiellement un type d'interneurone au niveau du bulbe olfactif qui peut être caractérisé par la localisation de son soma et de son arborisation dendritique, ainsi que par l'expression de marqueurs moléculaires. Les GC peuvent être sous-divisées en cellules profondes (deep GC) et superficielles (superficial GC), dont certaines expriment la Calretinin (CalR+ GC). Les cellules PGC sont caractérisées par l'expression de la Calbindin (CalB+ PGC), de la Calretinin (CalR+ PGC) ou de la Tyrosine hydroxylase (TH+ PGC). Quatre sous-types d'interneurones récemment identifiés (type 1 à 4) dérivent de la partie antéro-ventrale de la ZSV. Figure de (Lim and Alvarez-Buylla, 2014).

### **2.2.3 Présence d'une neurogenèse sous-ventriculaire chez l'Homme**

On retrouve des cellules en prolifération dans la ZSV postnatale humaine qui présentent des caractéristiques souches de par leur capacité à s'auto-renouveler et à produire des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones *ex vivo* (Eriksson et al., 1998; Sanai et al., 2004). Chez l'Homme, la ZSV présente une architecture cellulaire bien distincte puisque les CSN ne sont pas adjacentes à l'épendyme. En effet, elles forment un ruban astrocytaire séparé de la couche de cellules épendymaires bordant le ventricule par une zone dépourvue de cellules (Sanai et al., 2004; Quinones-Hinojosa et al., 2006). De plus, bien que des cellules souches persistent à l'âge adulte le long de la ZSV, le bulbe olfactif humain ne présente pas de neurogenèse significative à l'âge adulte (Sanai et al., 2011; Bergmann et al., 2012). Alors que chez l'enfant âgé de moins de 18 mois, un chemin de migration rostral contenant de nombreux neurones immatures est visible entre la ZSV et le bulbe olfactif, cette neurogenèse diminue sensiblement durant l'enfance pour devenir quasi inexistante à l'âge adulte (Sanai et al., 2011; Wang et al., 2011). La question se pose alors quant à la fonction de ces progéniteurs si la neurogenèse de la ZSV n'alimente pas le bulbe olfactif en neurones. Cette différence par rapport au modèle murin pourrait s'expliquer par un chemin de migration différent et/ou par l'absence de marqueurs spécifiques permettant de suivre le devenir des cellules souches dans le temps. Des études de datation au  $^{14}\text{C}$  ont récemment révélé que de nouveaux interneurones apparaissent chez l'Homme au niveau du striatum qui pourrait être alimenté par les CSN de la ZSV (Ernst et al., 2014). Cette hypothèse reste néanmoins controversée car un suivi de la migration des neuroblastes suggère l'absence de lien cellulaire entre la ZSV et la neurogenèse du striatum chez l'Homme (Wang et al., 2014).

## 2.2.4 Organisation cellulaire de la niche sous-ventriculaire adulte chez la souris

L'analyse par microscopie électronique de l'ultrastructure de la zone sous-ventriculaire a permis de mettre en évidence la présence de 4 types cellulaires principaux : les cellules épendymaires (type E), les cellules de type astrocytaires (type B), les cellules progénitrices (type C) et les neuroblastes (type A) (Doetsch et al., 1997) (Figure 9.A).

Chaque type cellulaire est identifié selon sa morphologie, sa localisation et l'expression de marqueurs spécifiques (Figure 9) :

- **Les cellules épendymaires (type E)** possèdent une grande surface apicale et forment la paroi du ventricule latéral séparant la ZSV de la lumière ventriculaire. Le battement des cils présents à leur surface assurent la circulation du liquide cérébrospinal (Sawamoto et al., 2006). On distingue deux sous-types de cellules épendymaires : les cellules de type E1 qui présentent 50 longs cils (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009), et les cellules de type E2 qui ne semblent contenir que deux longs cils (Mirzadeh et al., 2008). Ces cellules ne prolifèrent pas en conditions physiologiques et expriment des marqueurs tels que le mCD24 (Calaora et al., 1996), le S100 $\beta$  (Didier et al., 1986), et la prominin1 ou CD133 (Weigmann et al., 1997).

- **Les cellules de type astrocytaire (type B)** regroupent les CSN à l'origine de la neurogenèse adulte (type B1) et les astrocytes « non souches » qui ne prolifèrent pas (type B2). Tout comme les cellules de la glie radiaire dont elles dérivent, les cellules de type B1 présentent une polarité apico-basale avec un cil primaire au niveau de la cavité ventriculaire et un long prolongement vers la surface piale au contact des vaisseaux sanguins (Mirzadeh et al., 2008). Les cellules de type B expriment une combinaison de marqueurs gliaux tels que la GFAP (glial fibrillary acidic protein), le transporteur de glutamate GLAST ou la BLBP (brain lipid-binding protein) (Hartfuss et al., 2001). Les cellules de type B2 de la ZSV se distinguent des cellules de type B1 par leur expression de la protéine S100 $\beta$  (Raponi et al., 2007). Ces dernières expriment quant à elles des marqueurs de progéniteurs neuraux tels que le filament intermédiaire Nestine (Doetsch

et al., 1997), le facteur de transcription Sox2 (Ellis 2004) ou le marqueur ciliaire prominin1 (ou CD133 chez l'humain) (Corti et al., 2007). Elles expriment également le carbohydrate extracellulaire Lewis X (LeX/CD15) à la différence des cellules de type B2 (Capela and Temple, 2002), qui est toutefois aussi exprimé par les cellules de type C (Aguirre et al., 2004). Il est important de noter qu'aucun de ces marqueurs n'est spécifique des cellules de type B1, ce qui impose l'utilisation de plusieurs marqueurs moléculaires pour les identifier.

- **Les cellules progénitrices à amplification transitoire (type C)** sont des précurseurs immatures qui prolifèrent et qui sont présents le long de tout le ventricule latéral avec une morphologie sphérique. Les cellules de type C sont le plus souvent regroupées en amas à proximité des chaînes de neuroblastes (Doetsch et al., 1997). Elles expriment le filament intermédiaire Nestine (Doetsch et al., 1997), le facteur de transcription mash1 (Aguirre et al., 2004; Parras et al., 2004), le carbohydrate extracellulaire Lewis X (LeX/CD15) (Aguirre et al., 2004) et le récepteur à l'EGF (Doetsch et al., 2002).

- **Les neuroblastes (type A)** s'organisent en chaînes dans la partie antérieure de la ZSV pour former le RMS et migrent vers le bulbe olfactif où ils se différencient essentiellement en interneurones inhibiteurs. Les neuroblastes ont la morphologie typique des cellules en migration avec un corps cellulaire allongé et de courts prolongements mais conservent un statut prolifératif actif. Ils expriment des marqueurs de différenciation neuronale tels que la  $\beta$ III tubuline (Doetsch et al., 1997), la forme polysialylée de la molécule d'adhésion cellulaire neurale PSA-NCAM (Doetsch et al., 1997) et la doublecortine (DCX) (Brown et al., 2003; Couillard-Despres et al., 2005).

La filiation entre les principaux types cellulaires neurogéniques de la ZSV adulte a pu être établie en étudiant sa recolonisation après injection dans le ventricule latéral d'un agent anti-mitotique, l'Ara-C (cytosine D- $\beta$ -arabinofurosido). Ce traitement élimine toutes les cellules en prolifération : seules les cellules épendymaires et une partie des cellules de type B survivent. Une étude de l'ultrastructure de la ZSV a montré qu'après l'arrêt du traitement Ara-C, les cellules de type B1 entrent en prolifération et assurent une reprise progressive de la neurogenèse en donnant naissance séquentiellement à des

progéniteurs intermédiaires (type C) puis à des neuroblastes (type A) (Doetsch et al., 1999b). Ces données ont depuis été confirmées à l'aide de modèles murins transgéniques GLAST::CreERT2 et GFAP::GFP permettant de suivre *in vivo* le lignage cellulaire des CSN (Mori et al., 2006; Pastrana et al., 2009; Codega et al., 2014).

L'identification de marqueurs cellulaires des cellules de type B1 a permis de confirmer leur rôle central dans la neurogenèse adulte. Pour cela, des souris génétiquement modifiées permettant le traçage conditionnel d'une population cellulaire précise ont été développées. Ainsi, le suivi du devenir des astrocytes souches au moyen de la lignée murine GLAST::CreERT2 en combinaison avec une lignée rapportrice R26R a montré que presque la moitié des interneurones présents dans les bulbes olfactifs exprimaient le gène rapporteur 4 mois après l'induction de la recombinaison à l'âge adulte, et provenait donc de ces astrocytes souches présents le long de la ZSV (Mori et al., 2006). Similairement, des cellules marquées dans un modèle Nestin::CreERT2 se retrouvent dans le RMS après 15 jours et s'intègrent dans les différentes couches du bulbe olfactif après 45 jours (Giachino and Taylor, 2009).

## 2.2.5 Une structure en rosace en contact avec le microenvironnement

Notre connaissance de l'architecture de la paroi du ventricule latéral est longtemps restée incomplète, en grande partie à cause de la difficulté à examiner l'organisation 3D d'un tissu par immunohistochimie. La mise au point de préparations en « wholomount » de la ZSV a révélé son organisation unique. Vue de face, le mur du ventricule est composé d'un tapis de cellules épendymaires multiciliées entre lesquelles s'intercalent le cil primaire des cellules de type B1. Cette disposition des cellules épendymaires autour des cellules de type B1 forme des motifs dits « en rosace » (Mirzadeh et al., 2008) (Figure 9.C). La distribution de ces rosaces, et des cellules de type B1, n'est pas homogène : le mur ventriculaire présente des zones de forte densité de CSN, avec parfois une dizaine de contacts apicaux de cellule de type B1 au niveau d'une même rosace (Mirzadeh et al., 2008) (Figure 9.B). Les régions antéro-ventrale et postéro-dorsale regroupent ainsi la majeure partie des CSN et concentrent donc l'activité neurogénique de la ZSV (Mirzadeh et al., 2008).

L'architecture hautement spécialisée de la ZSV peut être divisée en 3 domaines selon la morphologie bipolaire des CSN adultes : (I) l'interface apicale/ventriculaire, (II) l'interface intermédiaire et (III) l'interface basale/vasculaire (Fuentealba et al., 2012) (Figure 9.C). Le domaine apical comprend le cil primaire des CSN qui est en contact direct avec le liquide céphalo-rachidien (LCR) sécrété par le plexus choroïde. Le LCR contient de nombreux facteurs solubles capables de modifier le comportement des CSN et des cellules de la progénie neurale (Lehtinen et al., 2011; Silva-Vargas et al., 2016). On trouve également un important réseau d'axones sérotoninergiques de neurones localisés dans les noyaux du raphé du tronc cérébral qui forme un véritable plexus à la surface du ventricule, en contact avec les cellules épendymaires et les CSN (Tong et al., 2014). Dans leur domaine intermédiaire, les CSN sont en contact avec les progéniteurs intermédiaires, les neuroblastes, et de nombreuses cellules de soutien. Du côté basal, les CSN établissent des contacts étroits avec le système vasculaire et répondent à des signaux sécrétés localement par les cellules endothéliales (Shen et al., 2004; Tavazoie et al., 2008), ce qui permet à des facteurs systémiques en provenance du système vasculaire de moduler le fonctionnement de la niche (Sawada et al., 2014). Ceci est

rendu possible par une perméabilité vasculaire spécifique au niveau de la ZSV. Les CSN sont en effet associées aux vaisseaux sanguins à des endroits où la barrière hémato-encéphalique est particulièrement perméable en raison de l'absence de péricytes et de pieds astrocytaires (Tavazoie et al., 2008). Les domaines intermédiaire et basal sont par ailleurs en contact avec des terminaisons dopaminergiques du mésencéphale (Kim et al., 2010) et avec des neurones cholinergiques (Paez-Gonzalez et al., 2014), illustrant bien l'interconnexion entre la niche neurogénique et son microenvironnement.

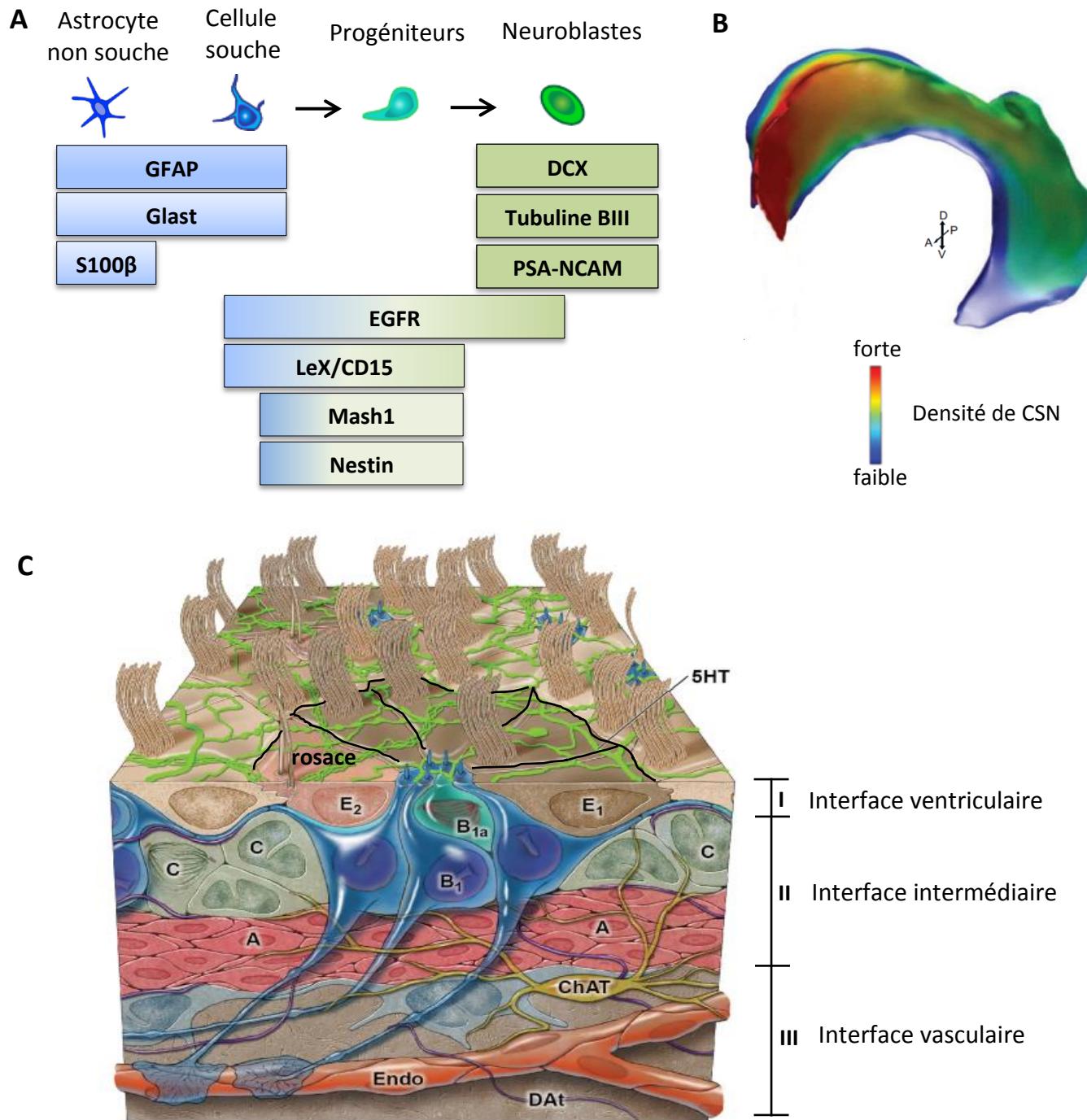


Figure 9 : Organisation de la zone sous-ventriculaire chez la souris adulte

A. Composition cellulaire de la ZSV adulte et marqueurs moléculaires associés. B. Densité des CSN adultes à travers la surface ventriculaire (rouge : forte densité, bleu : faible densité). Adapté de (Fiorelli et al., 2015). C. Les CSN (type B1) sont entourées par des cellules épendymaires multiciliées (type E), formant des structures dites « en rosace » sur la surface ventriculaire où un réseau dense d'axones sérotoninergiques est présent. Les CSN se différencient en progéniteurs nerveux (type C) qui se divisent et se différencient pour donner naissance aux neuroblastes (type A). La morphologie radiale des CSN leur permet de contacter à la fois le ventricule via un cil primaire ainsi que les vaisseaux sanguins et leurs cellules endothéliales (Endo) via un long prolongement basal. Des terminaisons dopaminergiques (Dat) et des neurones cholinergiques (ChAT) parcourrent également la niche. Adapté de (Lim and Alvarez-Buylla, 2014).

## **2.3 Les CSN quiescentes, réservoir de la neurogenèse adulte**

### **2.3.1 Homéostasie tissulaire et quiescence**

Les cellules souches multipotentes adultes assurent l'homéostasie des tissus grâce à leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation. Elles se caractérisent également par leur capacité à maintenir un état de dormance non prolifératif, la quiescence, duquel les cellules peuvent sortir pour intégrer ou réintégrer le cycle cellulaire en présence de stimuli. La progression dans le cycle cellulaire repose sur l'action coordonnée de complexes protéiques constitués de cyclines et de leurs partenaires, les Cdk (cyclin-dependent protein kinases). L'action des complexes cycline-Cdk est, entre autres, contrebalancée par les Cdki (cyclin-dependent kinase inhibitors) appartenant aux familles INK4 ( $p16^{INK4a}$ ,  $p15^{INK4b}$ ,  $p18^{INK4c}$  et  $p19^{INK4d}$ ) et Cip/Kip ( $p21^{cip1/waf1}$ ,  $p27^{kip1}$  et  $p57^{kip2}$ ) (Figure 10). Elles peuvent de fait bloquer les cellules dans une des phases du cycle cellulaire et ainsi réguler l'entrée en quiescence en début de phase G<sub>1</sub>, sensible au microenvironnement (Cunningham and Roussel, 2001; Cheung and Rando, 2013). Le point de restriction de la phase G<sub>1</sub> est particulièrement important puisqu'une fois dépassé, les cellules commencent irréversiblement un cycle cellulaire (Daignan-Fornier and Sagot, 2011).

La quiescence est à distinguer de la senescence où les cellules se trouvent en état d'arrêt irréversible considéré comme un programme de protection contre toute capacité de prolifération illimitée (Campisi, 2013). Les cellules souches quiescentes seraient activées *in vivo* de manière occasionnelle pour permettre une prolifération et une différenciation afin de soutenir la production de cellules spécialisées, avant de retourner à leur état quiescent initial pour éviter un épuisement de leur stock au cours du temps et pour réduire la probabilité d'accumuler des mutations faces à des conditions du microenvironnement plus ou moins favorables (Mira et al., 2010; Cheung and Rando, 2013; Kawaguchi et al., 2013).

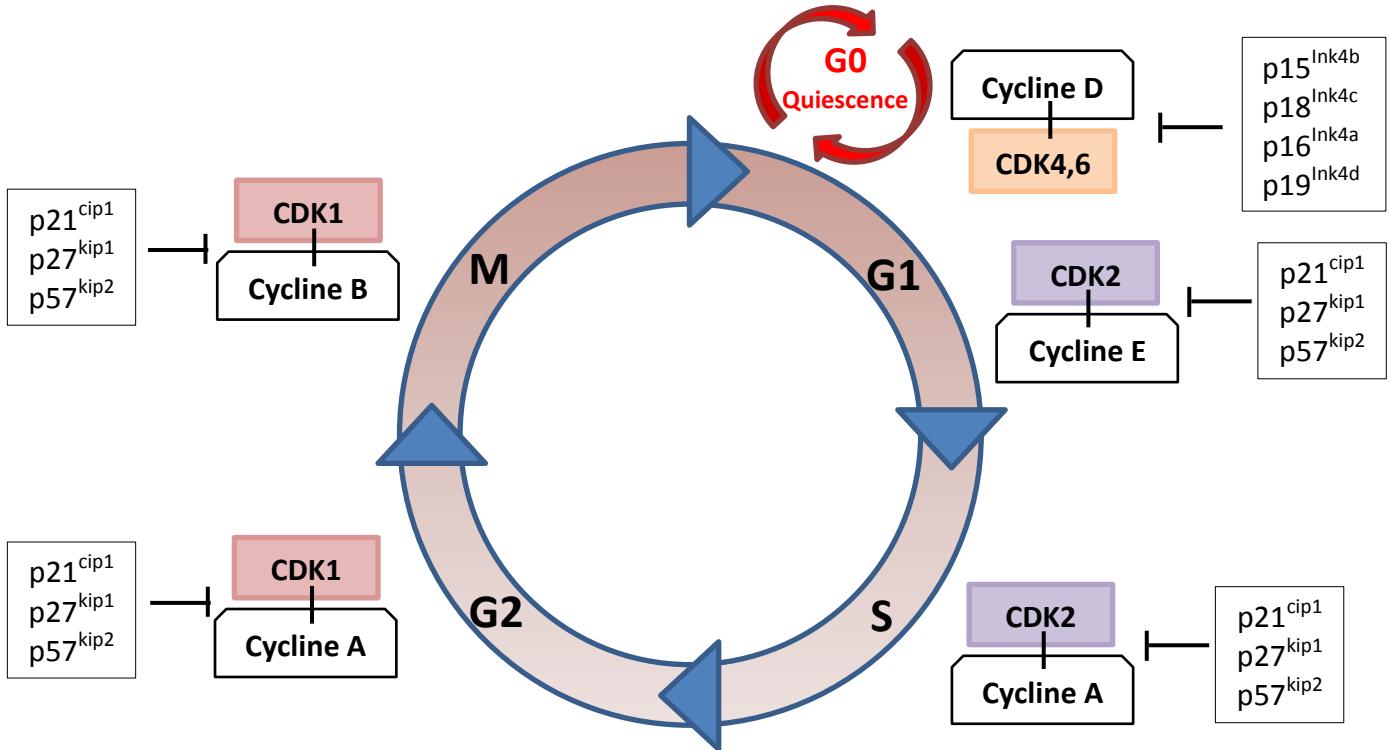


Figure 10 : Progression dans le cycle cellulaire

La progression dans les différentes phases du cycle cellulaire est régulée par l'expression de cyclines, de leurs co-activateurs (CDK) et des inhibiteurs des cdk appartenant aux familles INK4 ( $p16^{INK4a}$ ,  $p15^{INK4b}$ ,  $p18^{INK4c}$  et  $p19^{INK4d}$ ) et Cip/Kip ( $p21^{cip1/waf1}$ ,  $p27^{kip1}$  et  $p57^{kip2}$ ). Lorsqu'elles ne se divisent pas ou ont une très longue phase  $G_1$ , les cellules sont dites en quiescence ou en phase  $G_0$ .

### 2.3.2 Identification de cellules souches quiescentes dans les tissus adultes

L'existence de cellules souches quiescentes a d'abord été démontrée *in vivo* dans le système hématopoïétique. Lorsque des souris sont exposées à des agents anti-mitotiques, l'hématopoïèse est momentanément altérée, suggérant l'existence de cellules résistantes se trouvant hors du cycle cellulaire et capables d'entrer en prolifération. Des expériences de transplantation en série de moelle osseuse montrent par ailleurs que ces cellules sont capables de s'autorenouveler sur le long terme et de produire des cellules progénitrices hautement prolifératives capables de reconstituer le système hématopoïétique (Cheng et al., 2000; Wilson et al., 2008). A l'inverse, l'utilisation de cellules souches hématopoïétiques provenant de souris déficientes pour  $p21^{cip1/waf1}$ , dont les cellules souches ne peuvent pas rester en  $G_0$ , a montré que la production à long terme des cellules sanguines était réduite (Cheng et al., 2000). Ce

résultat démontre que l'existence d'un état quiescent est nécessaire au maintien sur le long terme des cellules souches responsables de l'hématopoïèse et de manière plus générale à l'homéostasie tissulaire.

L'identification et la localisation des cellules souches quiescentes dans de nombreux tissus des mammifères adultes ont par la suite été possibles grâce à leur capacité de rétention de divers analogues de nucléotides de l'ADN tel que le BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine). Ce dernier s'intègre dans l'ADN en phase de réPLICATION et permet donc de marquer l'ensemble des cellules ayant traversé la phase S du cycle cellulaire. L'administration continue de BrdU suivie d'une période de chasse permet de discriminer les cellules actives en prolifération, qui perdent leur marquage par dilution au cours des divisions successives, des cellules dont le cycle cellulaire est plus lent et qui retiennent le marquage. Ces dernières sont appelées *label-retaining cells* ou LRC. Des cellules souches quiescentes ont ainsi été identifiées dans l'intestin (Buczacki et al., 2013), la peau (Braun et al., 2003), le cerveau (Morshead et al., 1994) ou encore le muscle (Fukada et al., 2007).

La découverte de la coexistence de CSN quiescentes et de CSN en prolifération au niveau de la ZSV et de la ZSG chez la souris adulte s'est faite grâce à l'étude de leur régénération après traitements anti-mitotiques ou après irradiation à des doses faibles à modérées (Morshead et al., 1994; Doetsch et al., 1999a; Tada et al., 1999; Lugert et al., 2010; Daynac et al., 2013). La reprise de la neurogenèse est observée quelques jours après l'élimination des cellules en prolifération, suggérant l'existence d'une population souche résistante hors du cycle cellulaire. Ces CSN quiescentes représentent de fait un important réservoir potentiel de cellules neurales, comme les neurones mais aussi les oligodendrocytes tout au long de la vie.

### **3. Modulation des phases précoces de la neurogenèse adulte**

#### **3.1 L'accident vasculaire cérébral ischémique**

L'accident vasculaire cérébral ischémique, ou infarctus cérébral, est lié à l'occlusion d'une artère cérébrale ayant pour conséquence de priver de sang une partie du cerveau. Les tissus en aval ne reçoivent alors plus d'oxygène, de glucose ou d'autres métabolites nécessaires à leur fonctionnement, entraînant une forte mort neuronale dans la région ischémiee. Après cette phase initiale de mortalité neuronale, on observe une forte augmentation de la prolifération et de la neurogenèse au niveau de la ZSV et de la ZSG chez le rongeur adulte (Liu et al., 1998; Jin et al., 2001; Zhang et al., 2001; Arvidsson et al., 2002; Nakatomi et al., 2002; Parent et al., 2002). Ainsi, une augmentation de la prolifération cellulaire est observée dans les deux zones neurogéniques à partir du 2<sup>ème</sup> jour, pour atteindre son maximum entre 1 et 2 semaines, et finalement revenir à son niveau basal après 3 à 5 semaines (Liu et al., 1998; Jin et al., 2001). Les progéniteurs neuronaux nouvellement formés migrent ensuite vers les régions touchées où ils se différencient en neurones matures (Arvidsson et al., 2002; Tanaka et al., 2004). Il semble toutefois que la majorité de ces nouveaux neurones ne survivent pas à long terme et que le remplacement neuronal reste marginal. Il est ainsi estimé que seuls 0,2% des neurones perdus suite à un infarctus cérébral sont effectivement remplacés par des neuroblastes en provenance de la ZSV (Arvidsson et al., 2002). Cette stimulation de la neurogenèse endogène se retrouve également chez l'Homme suite à un infarctus cérébral avec une augmentation de la prolifération cellulaire à proximité des régions ischémiees et l'apparition de nouveaux neurones (Jin et al., 2006; Macas et al., 2006). Ceci témoigne de la capacité du tissu cérébral à se régénérer en mobilisant des CSN et des progéniteurs endogènes à proximité des zones touchées, qui représentent de fait des cibles cellulaires de choix pour le développement de stratégies thérapeutiques pour la réparation neuronale.

### **3.2 Effet de l'exercice et de l'enrichissement de l'environnement**

L'enrichissement de l'environnement des animaux de laboratoire participe à la stimulation sociale (interactions avec des congénères), physique (cages plus grandes, présence de jouets et d'une roue) et sensorielle (bruits, odeurs) (pour revue voir (Clemenson et al., 2015)). De nombreuses études ont montré que l'environnement dans lequel évoluent les souris module la neurogenèse de la ZSV et de la ZSG (Corotto et al., 1994; Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999; Kempermann et al., 2002; Rochefort et al., 2002; Kronenberg et al., 2003). La production et la survie des nouveaux neurones dans les bulbes olfactifs dépendent du contexte sensoriel dans lequel évoluent les souris. La privation d'odeur unilatérale par la fermeture d'une narine chez la souris adulte conduit à une perte nette du nombre de neurones granulaires dans le bulbe olfactif ipsilateral qui fait suite à une baisse de la prolifération cellulaire, d'une augmentation de la mort cellulaire et d'une survie neuronale moindre (Corotto et al., 1994). A l'inverse, l'exposition à de nouvelles odeurs pendant 40 jours augmente le nombre de nouveaux neurones sans modifier la prolifération et améliore la mémoire olfactive des souris (Rochefort et al., 2002). L'activité physique régule quant à elle spécifiquement la neurogenèse hippocampique adulte et les capacités cognitives associées. Ainsi, l'exercice physique par ajout d'une roue dans les cages augmente la neurogenèse du GD qui se traduit par un meilleur apprentissage spatial dans le test Morris Water Maze (van Praag et al., 1999). Alors que l'activité physique joue un rôle direct dans la prolifération cellulaire, l'enrichissement environnemental influence positivement la survie neuronale (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999; Kempermann et al., 2002; Kronenberg et al., 2003). De manière intéressante, lorsque les souris utilisent une roue pendant 10 jours (augmentation de la prolifération) puis sont exposées à un environnement enrichi pendant 30 jours (pour favoriser la survie neuronale), on observe une augmentation de 30% du nombre de nouveaux neurones par rapport à chaque stimulus pris séparément (Fabel et al., 2009).

### **3.3 Reprise de la neurogenèse après un stress génotoxique**

Chez l'Homme, la radiothérapie est l'un des traitements principaux des tumeurs cérébrales et des cancers « tête et cou ». Elle consiste à cibler les masses tumorales à l'aide de radiations ionisantes afin de les détruire. Délivrées à fortes doses ( $>50$  Gy), des altérations structurelles majeures et des troubles cognitifs apparaissent (Silber et al., 1992; Roman and Sperduto, 1995; Surma-aho et al., 2001; Lawrence et al., 2010; Marazziti et al., 2012; Ricard et al., 2012). Afin de limiter ces effets secondaires, la radiothérapie est le plus souvent délivrée par doses fractionnées inférieures ou égales à 2 Gy (Calabrese and Schlegel, 2009; Lawrence et al., 2010).

Des déficits d'apprentissage et de mémoire olfactive et spatiale sont également observés chez des souris irradiées (Shukitt-Hale et al., 2000; Lazarini et al., 2009; Valley et al., 2009). Ces altérations cognitives sont, entre autres, le résultat de modifications radio-induites au sein des niches neurogéniques adultes de la ZSV et de l'hippocampe. Une apoptose massive dans ces dernières est observée entre 6 et 12h post-irradiation et la prolifération cellulaire est fortement réduite selon un effet dose aussi bien dans le GD (Parent et al., 1999; Tada et al., 2000; Mizumatsu et al., 2003) que dans la ZSV (Tada et al., 1999; Achanta et al., 2012; Daynac et al., 2013). À la différence des cellules en prolifération qui sont extrêmement radiosensibles, les CSN quiescentes de la ZSV adulte sont résistantes aux fortes doses ( $<15$  Gy) (Tada et al., 1999; Achanta et al., 2012; Daynac et al., 2013; Pineda et al., 2013). Toutefois, leur maintien ne permet pas une reprise systématique de la neurogenèse après irradiation et dépend de la dose reçue. Alors que la prolifération cellulaire dans la ZSV reprend quelques jours après une irradiation à doses modérées ( $<5$  Gy) (Hopewell and Cavanagh, 1972; Tada et al., 1999; Daynac et al., 2013), les CSN survivant à des doses de 10-15 Gy perdent durablement leur capacité à produire de nouveaux neurones (Panagiotakos et al., 2007; Lazarini et al., 2009; Achanta et al., 2012).

De manière générale, les effets de l'irradiation sur la neurogenèse adulte peuvent être classés selon deux plages de doses. Pour des doses faibles à modérées (inférieures à 5 Gy), on observe une mort de la quasi-totalité des cellules en prolifération, mais la

neurogenèse repart quelques jours après irradiation, permettant de repeupler rapidement les zones neurogéniques (Hopewell and Cavanagh, 1972; Tada et al., 1999; Daynac et al., 2013). Ainsi, l'irradiation à dose faible ou modérée peut être utilisée pour interrompre la neurogenèse de façon transitoire et permettre de construire un modèle pour étudier les mécanismes cellulaires sous-jacents de cette régénération. Pour 10Gy ou des doses excédant 10Gy, la neurogenèse est bloquée durablement et le repeuplement des zones neurogéniques n'est que partiel, voire inexistant (Tada et al., 1999; Achanta et al., 2012). Il est alors possible d'étudier les effets d'une perte de la neurogenèse adulte au niveau comportemental (Santarelli et al., 2003; Lazarini et al., 2009). Il est important de noter ici que la diminution de la neurogenèse à long terme après irradiation à fortes doses (5 à 10 Gy) ne semble pas être entièrement due à la diminution de la capacité intrinsèque de prolifération des CSN mais également à l'altération de leur microenvironnement (Pineda et al., 2013). On pourra citer en exemple l'expression du TGF $\beta$ 1 par les cellules endothéliales dans le cerveau irradié. Le blocage *in vivo* de la voie TGF $\beta$  permet le rétablissement de la neurogenèse dans le cerveau murin irradié à 15Gy (Pineda et al., 2013).

### **3.4 Modulation pharmacologique de l'état dépressif**

La dépression et les troubles anxieux sont des problèmes de santé publique touchant 10 à 20% de la population mondiale (Wong and Licinio, 2001). Le délai d'apparition d'un effet clinique notable après la mise en place d'un traitement chronique avec des antidépresseurs prend habituellement 3 à 4 semaines chez l'Homme (Wong and Licinio, 2001). Ce délai d'action laisse penser que des changements neurochimiques et structuraux lents ont lieu dans les zones du système limbique qui jouent un rôle central dans la régulation des émotions, auquel appartient l'hippocampe et où le délai d'action des antidépresseurs pourrait refléter le temps de la maturation neuronale (Eisch and Petrik, 2012). Il a par ailleurs été montré que les personnes atteintes de dépression récurrente présentaient une réduction du volume de l'hippocampe (Campbell et al., 2004; Videbech and Ravnkilde, 2004) et que cette réduction était elle-même corrélée à la durée de l'épisode dépressif (Sheline et al., 1996). Chez les primates non-humains, le stress, un facteur prédisposant à la dépression chez l'Homme, diminue la neurogenèse hippocampique, tandis que l'administration d'antidépresseurs rétablit son niveau (Czeh et al., 2001). Similairement, la prise d'antidépresseurs en traitement chronique stimule la neurogenèse hippocampique adulte chez le rongeur et le primate non-humain (Malberg et al., 2000; Manev et al., 2001; Santarelli et al., 2003; Perera et al., 2007). Devant ces éléments convergents, les équipes de recherche ont cherché à savoir si la modulation de la neurogenèse hippocampique était effectivement nécessaire à l'efficacité des antidépresseurs. Pour cela, des souris traitées par antidépresseurs ont été irradiées (dose cumulée de 15 Gy) de manière à bloquer la neurogenèse de l'hippocampe (Santarelli et al., 2003). Soumettant les souris à des tests comportementaux permettant de caractériser leur état dépressif, aucune amélioration comportementale n'est observée (Santarelli et al., 2003). Le blocage de la neurogenèse hippocampique supprimerait donc l'efficacité thérapeutique des antidépresseurs. Ceci illustre l'importance de bien comprendre les mécanismes sous-jacents au maintien d'une neurogenèse active tout au long de la vie.

### **3.5 Evolution avec l'âge des niches neurogéniques**

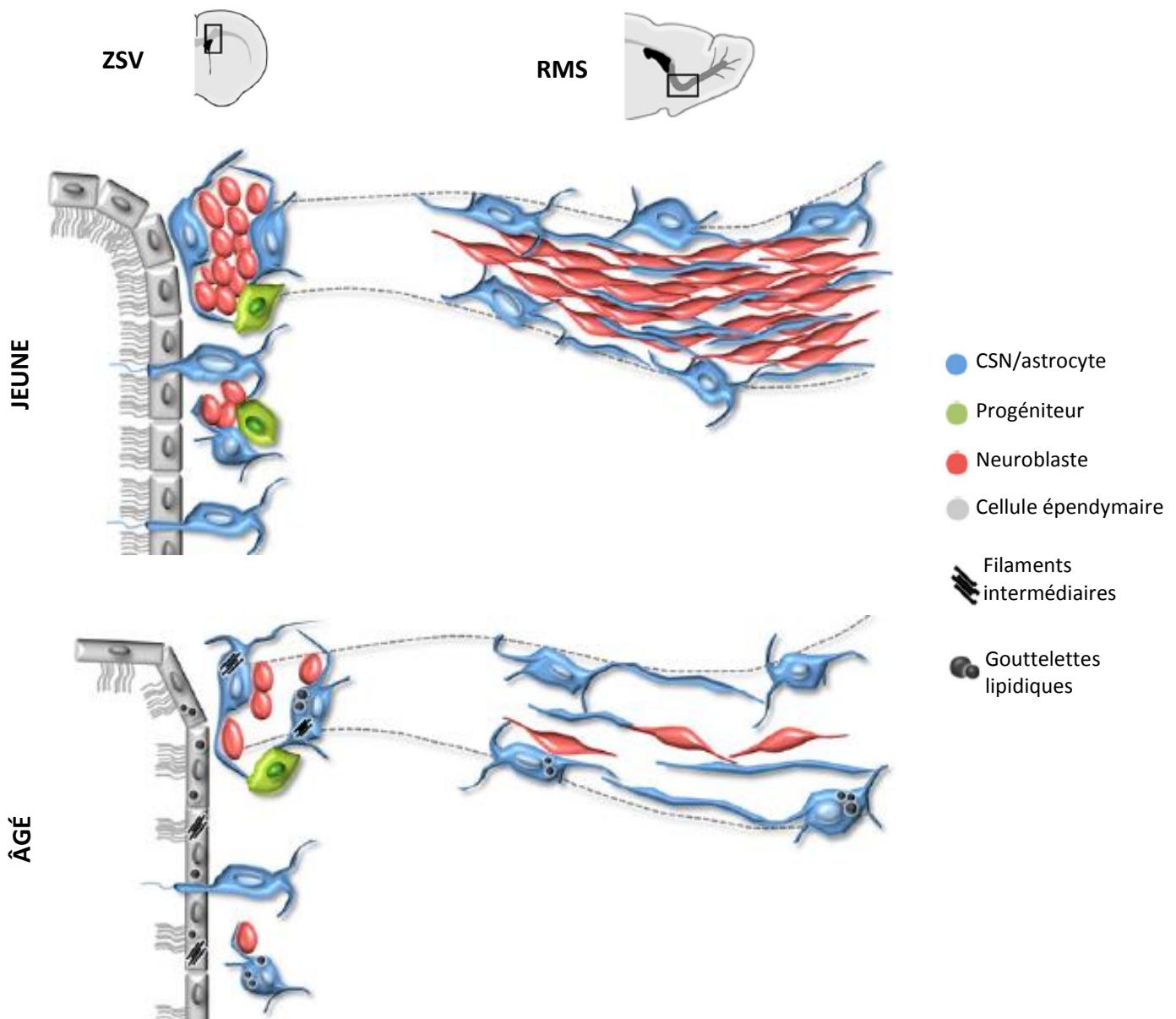
Une diminution des capacités attentionnelles et de la vitesse de traitement de l'information, ainsi qu'une baisse de la mémoire et de la navigation spatiale sont observées chez les personnes âgées (Parasuraman and Giambra, 1991; Salthouse, 1996; Moffat et al., 2001; Toner et al., 2009). Le vieillissement est également un facteur de risque associé à plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Huntington qui se caractérisent par une forte mort neuronale et un déséquilibre de la neurogenèse au niveau des niches neurogéniques (Curtis et al., 2005; Ziabreva et al., 2006). Le tissu cérébral des personnes âgées (60-87 ans) garde toutefois la capacité de se régénérer suite à une lésion, par exemple suite à un infarctus cérébral (Macas et al., 2006).

Bien que la neurogenèse persiste à l'âge adulte au bord des ventricules latéraux et dans le GD de l'hippocampe, elle décline fortement avec le vieillissement en conditions physiologiques, impactant le renouvellement des neurones et les capacités de régénération des zones neurogéniques, entraînant une altération progressive des capacités cognitives et motrices. On pourra citer en exemple la détérioration de la capacité à discriminer deux odeurs très proches ainsi que la moins bonne mémoire et navigation spatiale chez les souris âgées (Enwere et al., 2004; Ming and Song, 2011).

La production de nouveaux neurones diminue dans le bulbe olfactif et la ZSG de l'hippocampe avec l'âge (Seki and Arai, 1995; Kuhn et al., 1996; Enwere et al., 2004; Bouab et al., 2011). Ce déclin de la neurogenèse est directement lié à une forte baisse du potentiel prolifératif (Kuhn et al., 1996; Tropepe et al., 1997; Enwere et al., 2004; Luo et al., 2006; Tanaka et al., 2007; Ben Abdallah et al., 2010), essentiellement due à la diminution du nombre de CSN/progéniteurs neuronaux (Enwere et al., 2004; Maslov et al., 2004; Luo et al., 2006; Olariu et al., 2007; Ahlenius et al., 2009; Bouab et al., 2011). Bien que des résultats contradictoires aient été rapportés, les études les plus récentes s'accordent sur le fait que la diminution de la neurogenèse de la ZSG et de la ZSV murine au cours du vieillissement proviendrait, non pas d'un épuisement du stock de cellules souches, mais essentiellement d'une altération de leur prolifération (Lugert et al., 2010;

Bouab et al., 2011; Piccin et al., 2014), entre autres liée à une altération du microenvironnement de la niche (Pineda et al., 2013). Par ailleurs, il semble que la capacité intrinsèque de prolifération et de différenciation des progéniteurs neuronaux ne soit pas altérée puisqu'ils conservent leur capacité à proliférer ex vivo, du moins jusqu'à l'âge moyen (Bouab et al., 2011), et qu'ils continuent à générer des neurones matures similairement au jeune adulte (McDonald and Wojtowicz, 2005; Rao et al., 2005; Ahlenius et al., 2009; Shook et al., 2012).

Avec le vieillissement, l'organisation structurale des niches neurogéniques change irrémédiablement. Au niveau de la ZSV, les ventricules latéraux se referment progressivement dans les parties ventrale et médiane, restreignant la région neurogénique à la région dorso-latérale du ventricule (Luo et al., 2006; Shook et al., 2012). On y observe une diminution uniforme du nombre de structures en rosace au contact du ventricule (Shook et al., 2012). L'épendyme subit également des changements structuraux avec l'apparition d'astrocytes s'intercalant entre les cellules épendymaires (Luo et al., 2006; Luo et al., 2008) et une accumulation de gouttelettes lipidiques qui suggèrent des changements dans le métabolisme de la niche (Bouab et al., 2011; Capilla-Gonzalez et al., 2014). Enfin, une analyse fine de la structure de la ZSV par microscopie électronique chez des souris âgées de 2 mois à 22 mois a montré son affinement progressif, en accord avec la diminution du nombre de progéniteurs neuronaux (Luo et al., 2006; Bouab et al., 2011) (Figure 11).



**Figure 11 : Représentation schématique du vieillissement de la ZSV murine**

Bien que le nombre de cellules souches semble rester stable avec l'âge, elles perdent pour la plupart leur contact avec le ventricule et prolifèrent moins. En résulte une perte progressive des progéniteurs intermédiaires et la quasi disparition des chaînes de neuroblastes dans le chemin de migration rostrale (RMS). Adapté de (Capilla-Gonzalez et al., 2015).

De manière importante, la diminution de la neurogenèse adulte au cours du temps n'est pas définitive. Ainsi, lorsque des souris âgées sont placées dans un environnement enrichi à court terme (1 semaine) ou à long terme (10 mois), le nombre de neurones nouvellement produits dans la couche granulaire de l'hippocampe est significativement augmenté, tout comme la capacité d'apprentissage et l'activité locomotrice des souris (Kempermann et al., 2002; Jessberger and Gage, 2008). De manière similaire, l'exercice ou la restriction alimentaire entraînent une augmentation de la prolifération des progéniteurs neuronaux et plus généralement de la neurogenèse dans la ZSG chez des souris âgées (van Praag et al., 2005; Fontan-Lozano et al., 2007). Bien documentée pour la ZSG, l'influence de l'environnement sur la neurogenèse de la ZSV au cours du vieillissement reste à déterminer.

La modification de l'architecture de la ZSV observée au cours du vieillissement suggère que la diminution de la neurogenèse peut être en partie attribuée à une modification du microenvironnement dans lequel évoluent les CSN et la progénie neurale. Le rôle joué par les facteurs circulants au cours du vieillissement a été mis en évidence à l'aide d'un système de parabiose hétérochronique qui consiste à relier en continu la circulation sanguine entre une jeune souris et une souris âgée. Il a ainsi été montré que l'exposition d'une vieille souris à un jeune environnement vasculaire rétablit la neurogenèse de la ZSV et de la ZSG à un niveau similaire au jeune adulte, et inversement (Villeda et al., 2011; Katsimpardi et al., 2014; Villeda et al., 2014). De plus, les fonctions cognitives associées sont améliorées avec une meilleure discrimination olfactive et une meilleure performance dans des tests de mémoire et d'apprentissage spatial (Katsimpardi et al., 2014; Villeda et al., 2014). De manière similaire, des expériences de co-cultures de cellules totales issues de la ZSV de souris jeunes et de souris âgées (18 à 22 mois) ont montré que le potentiel prolifératif de ces dernières revenait à des niveaux similaires à celui observé chez le jeune adulte (Piccin et al., 2014). Cet effet n'est pas retrouvé en présence de cellules issues de cultures de neurosphères établies, et donc de CSN et de progéniteurs intermédiaires, ou du striatum de jeunes souris, soulignant le rôle joué par les cellules non neurogéniques de la ZSV (Piccin et al., 2014). Ces résultats montrent une régulation avec l'âge de facteurs sécrétés par le microenvironnement qui s'avèrent indispensables au maintien d'une neurogenèse adulte.

## **4. Régulation moléculaire de la neurogenèse adulte**

La découverte de la neurogenèse adulte et de la capacité des CSN à produire de nouveaux neurones fonctionnels capables de s'intégrer dans les réseaux neuronaux pré-existants a fait naître beaucoup d'espoir pour leur utilisation à des fins thérapeutiques dans de nombreux troubles neurologiques et maladies neurodégénératives. Dans l'optique d'une stimulation *in vivo* des CSN endogènes, il est essentiel de comprendre les mécanismes qui régulent leur recrutement, leur prolifération ainsi que leur différenciation au sein des niches neurogéniques adultes. Dans un souci de synthèse, nous nous concentrerons par la suite sur les différents niveaux de régulation moléculaire de l'autorenouvellement et de la balance entre quiescence et prolifération des CSN en conditions physiologiques.

### **4.1 Facteurs intrinsèques**

#### **4.1.1 Contrôle du cycle cellulaire**

Les régulateurs du cycle cellulaire sont impliqués dans la régulation de la balance quiescence versus prolifération des CSN chez l'adulte (voir figure 10). Les souris déficientes pour p21<sup>cip1/waf1</sup>, une protéine inhibitrice des CDK régulant la transition de la phase G<sub>1</sub> à la phase S du cycle cellulaire, présentent une prolifération plus élevée des CSN entraînant à long terme un épuisement prématûré de leur stock (Kippin et al., 2005). p21<sup>cip1/waf1</sup> est donc essentiel pour maintenir les CSN adultes dans un état de quiescence indispensable au maintien d'une neurogenèse au cours du temps (Kippin et al., 2005). La progression en G<sub>1</sub> est également contrôlée par d'autres membres de la famille Cip/kip, comme p27<sup>kip1</sup> qui régule négativement la prolifération des progéniteurs neuronaux dans la ZSV et la ZSG adultes (Qiu et al., 2009). Une étude récente a par ailleurs montré que p27<sup>kip1</sup> est surexprimé dans les CSN quiescentes de la ZSG et que son absence entraîne leur activation (Andreu et al., 2015). L'augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est quant à elle liée à une diminution de la prolifération des CSN (Molofsky et al., 2003) tandis que la répression de l'expression de p53 favorise leur prolifération et leur survie dans la ZSV (Gil-Perotin et al., 2006; Meletis et al., 2006). Par ailleurs, l'analyse du transcriptome de

CSN issues de souris déficientes pour p53 a permis d'identifier l'altération de plusieurs régulateurs du cycle cellulaire, notamment une diminution de l'expression de p21<sup>cip1/waf1</sup> et p27<sup>kip1</sup> (Meletis et al., 2006). Les homologues de p53, p63 et p73, semblent également réguler la prolifération des CSN (Agostini et al., 2010; Talos et al., 2010; Cancino et al., 2013). Enfin, le gène suppresseur de tumeur PTEN (phosphatase and tensin homolog) participe à la régulation du cycle cellulaire en empêchant les cellules de se diviser trop rapidement et de façon incontrôlée par son effet antagoniste sur la voie de signalisation PI3-kinase/Akt (Sun et al., 1999). Sa suppression augmente l'autorenouvellement et la prolifération des CSN de la ZSV et de la ZSG, ne pouvant plus inhiber leur transition de la phase G<sub>0</sub> vers la phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire (Groszer et al., 2001; Groszer et al., 2006; Gregorian et al., 2009; Amiri et al., 2012).

On observe par ailleurs une dérégulation de la machinerie du cycle cellulaire au cours du vieillissement. Ainsi, l'expression des inhibiteurs des kinases du cycle cellulaire p16<sup>Ink4A</sup> et p19<sup>Arf</sup>, régulateurs clés du point de contrôle G<sub>1</sub>/S qui sont impliqués dans la senescence cellulaire (Kim and Sharpless, 2006), est augmentée dans la ZSV de souris âgées (Molofsky et al., 2003; Molofsky et al., 2006; Nishino et al., 2008). L'expression de ces 2 membres de la famille INK4 est réprimée par les modulateurs transcriptionnels Bmi1 et Hmga2. Bmi1 soutient la prolifération et l'autorenouvellement cellulaire en inhibant p16<sup>Ink4A</sup> et p19<sup>Arf</sup> (Molofsky et al., 2005). A l'inverse, les souris déficientes pour Bmi1 présentent une prolifération réduite au niveau de la ZSV (Molofsky et al., 2003; Molofsky et al., 2006). Hmga2 inhibe également p16<sup>Ink4A</sup> et p19<sup>Arf</sup> au cours du développement mais son expression diminue avec le vieillissement (Nishino et al., 2008). De manière intéressante, les cellules souches et progéniteurs neuronaux issus de souris âgées déficientes pour p16<sup>INK4</sup> présentent des capacités d'autorenouvellement, de prolifération et de neurogenèse moins diminuées que celles de souris sauvages du même âge, spécifiquement au niveau de la ZSV (Molofsky et al., 2006). Enfin, les souris déficientes pour p21<sup>cip1/waf1</sup> présentent un épuisement prématûre du stock de CSN et un déclin prématûre de la neurogenèse au cours du temps (Kippin et al., 2005).

#### 4.1.2 Régulateurs transcriptionnels

L'expression de différents facteurs de transcription régule la balance entre autorenouvellement et différenciation des CSN adultes. La protéine Sox2 est un facteur de transcription exprimé dans les cellules souches et progéniteurs neuronaux indispensable au maintien d'une neurogenèse adulte (Graham et al., 2003). Sa suppression mène à une forte diminution de la prolifération dans la ZSV et la ZSG, et à une rapide perte des CSN (Ferri et al., 2004). Les membres de la famille de facteurs de transcription FoxO contrôlent de nombreux gènes régissant divers processus cellulaires tels que la prolifération, la mort cellulaire ou encore la différenciation (Greer and Brunet, 2005). Après une phase initiale de prolifération accrue des CSN et progéniteurs neuronaux, les souris adultes déficientes pour FoxO1/3/4 présentent une baisse progressive du stock de cellules souches menant à une diminution de la neurogenèse dans la ZSV (Paik et al., 2009). De même, les souris FoxO3(-/-) adultes ont moins de CSN, avec en plus une capacité d'autorenouvellement diminuée (Renault et al., 2009). La famille FoxO joue donc un rôle clé dans la régulation de la balance quiescence versus prolifération et le contrôle de l'autorenouvellement des CSN. Le récepteur nucléaire tailless (TLX ou NR2E1) est exprimé par les CSN de la ZSG et de la ZSV adulte (Shi et al., 2004). L'inactivation de TLX dans celles-ci conduit à l'arrêt de la prolifération et mène à une perte complète de la neurogenèse dans la ZSV (Sun et al., 2007; Liu et al., 2008). Le facteur de transcription nucléaire Gsx2 est exprimé dans les CSN activées et les cellules de type C de la région dorsale de la ZSV adulte. Des expériences de gain/perte de fonction ont montré que son expression facilite la transition des CSN de l'état quiescent à l'état prolifératif (Lopez-Juarez et al., 2013). Utilisant un modèle de culture cellulaire induisant la quiescence des CSN via l'ajout de BMP4, l'équipe de François Guillemot a récemment montré que le facteur de transcription NFIX est augmenté lorsque les cellules entrent en quiescence et participe à la mise en place du programme d'expression génique propre à l'état quiescent. *In vivo*, la mutation du gène résulte en une diminution de la fraction quiescente des CSN hippocampiques (Martynoga et al., 2013).

#### 4.1.3 Modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques sont des changements transmissibles et réversibles de l'expression des gènes sans modification de la séquence nucléotidique de l'ADN (Berger et al., 2009). L'état chromatinien peut être modifié par méthylation de l'ADN, par modification post-traductionnelle de protéines associées à l'ADN (histones) et par action de petits ARN non codants. Ces mécanismes épigénétiques peuvent participer au contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules souches dans le cerveau des mammifères adultes (pour revue, voir (Murao et al., 2016)). La modification des histones peut se faire selon deux mécanismes antagonistes : l'acétylation via les enzymes histone acétyltransférase (HAT), et la méthylation par les enzymes désacétylase (HDAC). Alors que les HAT facilitent l'accès de la machinerie de transcription à la chromatine en diminuant l'affinité des histones pour l'ADN, les HDAC ont un effet inverse en condensant la chromatine, inhibant ainsi la transcription (Hsieh and Gage, 2004). Le récepteur nucléaire orphelin TLX, précédemment décrit comme jouant un rôle essentiel dans le maintien des CSN de la ZSV et de la ZSG adultes dans un stade indifférencié et prolifératif (Shi et al., 2004), recrute les enzymes désacétylase HDAC3 et HDAC5 sur les promoteurs des gènes  $p21^{cip1/waf1}$  et PTEN dont la transcription est alors réprimée, ce qui entraîne une diminution de la prolifération des CSN (Sun et al., 2007).

De manière intéressante, TLX est engagé dans des boucles de rétrocontrôle avec des petits ARN non codant, les miR-9 et Let-7b, qui régulent la prolifération et la différenciation des CSN via la dégradation des ARNm de TLX (Zhao et al., 2009; Zhao et al., 2010). Ainsi, lorsque le miR-9 ou Let-7b est surexprimé dans les CSN adultes, on observe une diminution de la prolifération des cellules souches et une hausse de la différenciation neurale (Zhao et al., 2009; Zhao et al., 2010). L'activité de TLX est également modulée par le recrutement de l'histone désacétylase LSD1, dont l'expression régule par ailleurs positivement la prolifération des CSN (Sun et al., 2010). A l'inverse des miR-9 et Let-7b, la surexpression du miR-137 ou du miR-184 augmente la prolifération des CSN et réprime la différenciation neuronale (Liu et al., 2010; Szulwach et al., 2010). La modification des histones est par ailleurs contrôlée par les membres du groupe Trithorax Polycomb (PcG) (Ringrose and Paro, 2007; Gonzales-Roybal and Lim, 2013). La

perte de la protéine Bmi-1, membre du complexe PcG, entraîne chez les souris adultes un épuisement du stock de CSN (Molofsky et al., 2003). Bmi-1, régulant les inhibiteurs du cycle cellulaire  $p16^{ink4}$  et  $p19^{arf}$ , contrôle les capacités de prolifération et d'autorenouvellement des CSN (Molofsky et al., 2003; Bruggeman et al., 2005).

Le tableau 1 recense les principaux facteurs intrinsèques qui participent au maintien des CSN adultes au sein des niches neurogéniques en agissant sur leur autorenouvellement, la balance entre quiescence et activation et sur leur prolifération.

	Autorenouvellement	Sortie de quiescence	Prolifération	Références
<b>Régulateurs du cycle cellulaire</b>				
<b>p16<sup>INK4a</sup></b>			-	Molofsky <i>et al.</i> , 2003
<b>p21<sup>cip1/waf1</sup></b>	+	-	-	Kippin <i>et al.</i> , 2005
<b>p27<sup>Kip1</sup></b>		-		Andreu <i>et al.</i> , 2015
<b>p53</b>			-	Meletis <i>et al.</i> , 2005 Gil-Perotin <i>et al.</i> , 2006
<b>p63</b>			+	Agostini <i>et al.</i> , 2010
<b>p73</b>	+		+	Talos <i>et al.</i> , 2010 Cancino <i>et al.</i> , 2013
<b>PTEN</b>	-	-	-	Sun <i>et al.</i> , 1999 Groszer <i>et al.</i> , 2001 Groszer <i>et al.</i> , 2006 Gregorian <i>et al.</i> , 2009 Amiri <i>et al.</i> , 2012
<b>Facteurs de transcription</b>				
<b>FoxO</b>	+	-	-	Paik <i>et al.</i> , 2009 Renault <i>et al.</i> , 2009
<b>Gsx2</b>		+		Lopez_Juarez <i>et al.</i> , 2013
<b>NFIX</b>		-		Martynoga <i>et al.</i> , 2013
<b>Tlx</b>			+	Sun <i>et al.</i> , 2007 Liu <i>et al.</i> , 2008
<b>Régulateurs épigénétiques</b>				
<b>Bmi-1</b>	+		+	Molofsky <i>et al.</i> , 2003
<b>Let-7b</b>			-	Zhao <i>et al.</i> , 2010
<b>miR-9</b>			-	Zhao <i>et al.</i> , 2009
<b>miR-137</b>			+	Szuwach <i>et al.</i> , 2010
<b>miR-184</b>			+	Liu <i>et al.</i> , 2010

**Tableau 1 : Facteurs intrinsèques modulant l'activité des CSN adultes**

Principaux régulateurs du cycle cellulaire, facteurs de transcription et régulateurs épigénétiques jouant un rôle dans le contrôle de l'autorenouvellement, de la transition quiescence-prolifération et le maintien du statut prolifératif des cellules souches neurales dans les zones neurogéniques adultes. Cases vides : pas d'information.

## 4.2 Facteurs extrinsèques

### 4.2.1 Régulation par les facteurs de croissance

#### a. EGF et FGF-2

L'*epidermal growth factor* (EGF) et le *fibroblast growth factor* (FGF-2) ont été les premiers facteurs de croissance identifiés comme favorisant la prolifération cellulaire des CSN et progéniteurs neuronaux *in vitro* pour former des neurosphères (Reynolds and Weiss, 1992). La signalisation de l'EGF passe par sa liaison sur le récepteur à activité tyrosine de l'EGF (EGFR). Ce dernier peut aussi être activé par le *heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF), le *transforming growth factor alpha* (TGF- $\alpha$ ) ou encore l'amphiréguline (AR) (Riese and Stern, 1998). *In vivo*, l'administration par injection intraventriculaire de l'EGF ou de TGF- $\alpha$  augmente la prolifération des cellules au niveau de la ZSV et de la ZSG adultes (Craig et al., 1996; Kuhn et al., 1997; Fallon et al., 2000; Doetsch et al., 2002).

Les CSN expriment les récepteurs au FGF-2 (FGF-1R et FGF-2R) aussi bien dans la ZSV que dans la ZSG (Zheng et al., 2004; Chadashvili and Peterson, 2006), et similairement à l'EGF, l'administration de FGF-2 augmente la prolifération des cellules au sein de la ZSV et la neurogenèse dans le bulbe olfactif (Kuhn et al., 1997). A l'inverse, l'invalidation du gène codant pour FGF-2 conduit à une réduction de moitié du nombre de progéniteurs en division au sein de la ZSV et une diminution du nombre de neurones qui s'intègrent dans le bulbe olfactif (Zheng et al., 2004).

#### b. PEDF

Le *pigment epithelium growth factor* (PEDF) est produit par les cellules endothéliales et épithéliales de la ZSV adulte (Ramirez-Castillejo et al., 2006). Son ajout en culture en présence d'agents mitogènes augmente de manière significative le nombre de neurosphères primaires et secondaires formées, indiquant un rôle dans l'autorenouvellement des CSN (Ramirez-Castillejo et al., 2006). *In vivo*, son

administration par injection intra-ventriculaire augmente en quelques jours le nombre de CSN en prolifération (Ramirez-Castillejo et al., 2006). De manière intéressante, le PEDF module la balance entre division symétrique et asymétrique en augmentant l'activité de la voie Notch dans les CSN via l'expression des répresseurs transcriptionnels Hes1 et Hes5, impliqués dans le maintien à l'état quiescent des CSN (Ishibashi et al., 1994; Ohtsuka et al., 2001; Ramirez-Castillejo et al., 2006; Andreu-Agullo et al., 2009; Ables et al., 2011).

#### c. VEGF-C

Le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) est un facteur de croissance qui stimule la prolifération cellulaire au niveau de la ZSG et la ZSV (Jin et al., 2002). Les CSN de la ZSV et la ZSG expriment à leur surface le récepteur VEGFR-3 et produisent elles-mêmes son ligand, le VEGF-C. La stimulation des CSN par le VEGF-C mène à l'activation de ces cellules, c'est-à-dire à leur entrée en cycle cellulaire et à leur conversion en progéniteurs neuronaux, pour finalement produire de nouveaux neurones (Calvo et al., 2011; Han et al., 2015).

#### d. IGF-I/II

Les facteurs de croissance *insulin-like growth factor I/II* (IGF-I et IGF-II) jouent tous les deux un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire au sein des niches neurogéniques adultes. Alors que l'ajout d'IGF-I *ex vivo* et *in vivo* augmente la prolifération des progéniteurs neuronaux (Aberg et al., 2000; Aberg et al., 2003; Yuan et al., 2015), des études récentes ont révélé que l'IGF-II favorise l'expansion et l'autorenouvellement des CSN de la ZSV et de la ZSG (Bracko et al., 2012; Ziegler et al., 2012). En effet, son ajout en culture augmente de manière significative le nombre de neurosphères formées issues de cellules de ZSV postnatales et améliore l'autorenouvellement des CSN (Ziegler et al., 2012). *In vivo*, l'IGF-II est libéré au niveau du plexus choroïde dans le LCR et se lie au cil primaire des CSN au niveau de la cavité ventriculaire (Lehtinen et al., 2011). Dans la ZSG, l'IGF-II est produit directement par les

CSN (production autocrine) (Bracko et al., 2012). Ces rôles spécifiques d'IGF-I et IGF-II semblent s'expliquer par la distribution de leur récepteur respectif au sein des niches neurogéniques : le récepteur à l'IGF-I, l'IGF-IR, est principalement présent sur les cellules progénitrices ; le récepteur à l'IGF-2, le récepteur à insuline, principalement sur les cellules souches (Ziegler et al., 2012; Ziegler et al., 2015).

Au cours du vieillissement, les niveaux d'expression de l'EGFR et de son ligand physiologique, le TGF- $\alpha$ , sont réduits (Tropepe et al., 1997; Enwere et al., 2004). Le TGF- $\alpha$  est naturellement peu exprimé dans le modèle murin waved-1, où on observe une diminution de la neurogenèse au niveau de la ZSV et une perte de la discrimination olfactive fine similairement aux souris âgées (Enwere et al., 2004). Dans la niche du GD hippocampique, l'équipe de Geetha Shetty a également constaté une diminution des facteurs de croissance FGF-2, VEGF et IGF-I au cours du vieillissement (Shetty et al., 2005). L'administration intra-cérébro-ventriculaire de FGF-2 et de HB-EGF chez des souris âgées (23-25mois) permet de restaurer des niveaux de prolifération similaires à ceux trouvés chez les jeunes adultes dans la ZSV et la ZSG (Jin et al., 2003). Le rétablissement de l'expression d'IGF-I à des niveaux ressemblant à ceux observés chez une jeune souris adulte augmente la neurogenèse de la ZSG (Lichtenwalner et al., 2001). Cette capacité à répondre à des facteurs exogènes suggère que, bien que la niche de la ZSV puisse être compromise au cours du vieillissement, les cellules souches et la progénie neurale conservent une capacité de prolifération intrinsèque.

#### **4.2.2 Modulation par les neurotransmetteurs**

##### **a. Signaux GABAergiques**

L'acide gamma-aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux adulte. Son action est possible via les récepteurs canaux ioniques  $\text{GABA}_\text{A}\text{R}$  et  $\text{GABA}_\text{C}\text{R}$ , et le récepteur couplé aux protéines G,  $\text{GABA}_\text{B}\text{R}$  (Chebib and Johnston, 1999). Dans la ZSV adulte, le GABA sécrété par les neuroblastes active de manière tonique les récepteurs  $\text{GABA}_\text{A}\text{R}$  exprimés par les cellules GFAP+, diminuant leur prolifération (Liu et al., 2005). L'ajout d'un antagoniste du  $\text{GABA}_\text{A}\text{R}$ , la bicuculline, entraîne par ailleurs l'entrée en cycle des CSN quiescentes et augmente la prolifération au sein de la ZSV adulte (Fernando et al., 2011; Daynac et al., 2013). Ce mécanisme permettrait aux neuroblastes de la ZSV d'effectuer un rétrocontrôle négatif sur leur propre production en modulant la balance quiescence-prolifération des cellules souches dont ils proviennent. Les CSN de la ZSG adulte répondent également au GABA ambient produit par les interneurones parvalbumines via la sous-unité gamma 2 des récepteurs  $\text{GABA}_\text{A}\text{R}$  (Song et al., 2012). Le blocage de la voie GABA par suppression conditionnelle de cette sous-unité entraîne une sortie rapide de quiescence des CSN augmentant alors leur nombre par divisions symétriques (Song et al., 2012).

##### **b. Signaux sérotoninergiques**

La sérotonine, également appelée 5-hydroxytryptamine (5-HT), est un neurotransmetteur produit par les neurones sérotoninergiques localisés dans les noyaux du raphé du tronc cérébral. Elle est délivrée par l'intermédiaire de leurs axones qui se projettent dans l'ensemble du système nerveux central. Chez le rat adulte, le blocage pharmacologique de la synthèse de la sérotonine au moyen de parachlorophenylalanine réduit la neurogenèse au niveau de la ZSV et de la ZSG (Brezun and Daszuta, 1999). A l'inverse, l'administration de sérotonine ou d'autres agonistes des récepteurs 5-HT1A et 5-HT2C augmente la prolifération dans la ZSV *in vivo*, tandis que l'activation de 5-HT1B la réduit (Banasr et al., 2004). Des données récentes montrent par ailleurs que l'innervation sérotoninergique en provenance du raphé forme un réseau d'axones dense en contact

avec les cellules épendymaires et les cellules de type B1 au niveau de la surface apicale des ventricules latéraux (Tong et al., 2014). Enfin, l'injection intra-ventriculaire d'un agoniste du récepteur 5-HT2C chez des souris GFAP::GFP adultes a permis de montrer que l'augmentation de la prolifération observée au niveau de la ZSV est spécifiquement due à l'augmentation de la prolifération des CSN, dont le nombre reste inchangé (Tong et al., 2014).

### c. Régulation par les morphogènes

#### **Superfamille des TGF $\beta$**

Les ligands de la famille du *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires dont la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Cette famille est composée des TGF $\beta$ , des activines et des *bone morphogenic proteins* (BMP) qui régulent, entre autres, la neurogenèse adulte (Kingsley, 1994). Le TGF $\beta$  est présent sous trois formes - TGF $\beta$ 1, 2 et 3 - et se lie sur les récepteurs TGF $\beta$ RI et TGF $\beta$ RII qui forment un hétérodimère présent sur les CSN et progéniteurs intermédiaires (Wachs et al., 2006; Pineda et al., 2013). *In vitro*, l'ajout de TGF $\beta$ 1 sur des cultures de neurosphères issues de la ZSV et de la ZSG rallonge le cycle cellulaire et inhibe la prolifération (Buckwalter et al., 2006; Wachs et al., 2006; Pineda et al., 2013). *In vivo*, le TGF $\beta$ 1 est un inhibiteur de la neurogenèse adulte (Buckwalter et al., 2006; Wachs et al., 2006).

La voie de signalisation BMP est aussi active au niveau de la ZSV et de la ZSG chez la souris adulte. Dans la ZSV, les cellules de type B et C expriment BMP2 et BMP4, également produit par les cellules épendymaires et les cellules endothéliales, ainsi que les récepteurs associés BMPRIA/IB/II (Lim et al., 2000; Mathieu et al., 2008). Le rôle de la voie BMP dans la balance quiescence-prolifération des CSN au niveau de la ZSG a été mis en évidence grâce à un modèle de souris déficientes pour le récepteur BMPRIA, normalement porté par les CSN (Mira et al., 2010). En son absence, on observe une augmentation transitoire de la prolifération dans la ZSG, rapidement suivie d'une diminution du nombre de CSN (Mira et al., 2010). Similairement, le blocage *in vivo* de la

signalisation des BMP dans l'hippocampe par injection intracérébrale de l'antagoniste Noggin mène dans un premier temps au recrutement des CSN quiescentes qui entrent en cycle et à l'augmentation de la neurogenèse, puis à long terme à un épuisement progressif des précurseurs neuronaux (Bonaguidi et al., 2005; Mira et al., 2010). Enfin, l'ajout de BMP2/4 *in vitro* ou leur surexpression *in vivo* diminue drastiquement la prolifération des CSN et progéniteurs neuronaux et inhibe la neurogenèse dans les zones neurogéniques adultes (Lim et al., 2000; Bonaguidi et al., 2005; Mathieu et al., 2008).

## Shh

Sonic hedgehog (*shh*) est un morphogène qui joue un rôle majeur dans la différenciation ventrale et l'orientation des cellules souches au cours de l'embryogenèse (Panchision and McKay, 2002). Sa voie de signalisation est également primordiale pour le maintien des CSN dans le cerveau adulte au niveau des zones neurogéniques. La transduction du signal passe par la liaison de *shh* sur le récepteur Patched permettant de lever l'inhibition qu'exerçait Patched sur Smoothmed (*Smo*), et ainsi permettre le passage du signal vers le noyau. Le blocage pharmacologique de *Smo* par la cyclopamine ou la suppression ciblée de son expression diminue la prolifération des cellules de la ZSV et de l'hippocampe *in vivo*, qui génèrent moins de neurosphères *ex vivo* (Machold et al., 2003; Balordi and Fishell, 2007). De plus, on observe une perte des CSN quiescentes et des cellules de type C conduisant rapidement à la perte de la progénie neuronale (Balordi and Fishell, 2007). Par ailleurs, l'activation conditionnelle de la voie Shh via l'inactivation du récepteur Patched dans les CSN mène à une forte diminution de la neurogenèse liée au passage d'un mode de division asymétrique à symétrique entraînant un épuisement progressif de leur progénie directe (Ferent et al., 2014). Les astrocytes peuplant les niches de la ZSG et de la ZSV libèrent du *shh* dans le milieu ambiant qui stimule les CSN et leur entrée dans le cycle cellulaire (Jiao and Chen, 2008).

## **Notch**

Le récepteur Notch, une protéine transmembranaire dont la partie extracellulaire interagit avec des ligands présents à la surface de cellules voisines, permet de maintenir le stock de CSN dans les zones neurogéniques en régulant le cycle cellulaire pour contrôler la production de cellules filles. Notch1 ainsi que deux de ses ligands, les protéines Jagged1 (JAG1) et Dll1 (delta-like1) sont exprimés dans la ZSV adulte (Stump et al., 2002; Nyfeler et al., 2005). La liaison de ces ligands sur les récepteurs Notch induit le clivage protéolytique et la libération de son domaine intracellulaire qui subit une translocation vers le noyau. Il forme alors un complexe avec le régulateur transcriptionnel RBPJk et permet la transcription des gènes cibles, parmi lesquels hes1 et hes5 qui sont impliqués dans le maintien à l'état quiescent des cellules souches du cerveau des rongeurs adultes (Ishibashi et al., 1994; Ohtsuka et al., 2001; Ables et al., 2011). Chez l'adulte, la voie de signalisation Notch est essentielle au maintien des CSN dans les niches neurogéniques. En effet, la surexpression de Notch1 au niveau de la ZSV postnatale diminue la prolifération cellulaire et fait entrer plus spécifiquement les CSN dans un état de quiescence empêchant leur différenciation (Chambers et al., 2001). A l'inverse, la suppression de Notch1 ou de RBPJk conduit à la différenciation neuronale de la majorité des CSN et à une hausse transitoire de la neurogenèse, ce qui entraîne la perte des CSN de la ZSV et la ZSG suite à une entrée en cycle des CSN quiescentes (Ables et al., 2010; Ehm et al., 2010; Imayoshi et al., 2010; Ottone et al., 2014). Similairement, le traitement de CSN dérivées de cellules souches embryonnaires humaines par un inhibiteur des gamma-sécrétases essentielles à la voie Notch, le DAPT, diminue les taux de CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) et SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2), et augmente les niveaux de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>kip1</sup>, ralentissant la progression en G<sub>1</sub> (Borghese et al., 2010).

## **Wnt/β-caténine**

Au cours du développement embryonnaire chez les mammifères, la voie Wnt/β-caténine assure la mise en place de l'axe dorso-ventral du tube neural ainsi que la différenciation de la zone dorsale du télencéphale à l'origine du néocortex et de l'hippocampe (Lee and Jessell, 1999). Dans le cerveau adulte, le suivi de la voie Wnt/β-

caténine à l'aide de souris Axin2-CreERT2 a permis de montrer que celle-ci est active dans les CSN de la ZSV et de la ZSG (Bowman et al., 2013) et qu'elle participe directement au maintien de leur autorenouvellement et de leur prolifération (Qu et al., 2010). Ainsi, l'injection stéréotaxique intra-craniale d'un vecteur lentiviral portant le gène de l'axine, inhibiteur de la B-caténine, diminue la prolifération de la ZSV et de la ZSG (Qu et al., 2010). A l'inverse, l'activation de la voie Wnt/B-caténine *in vivo* par injection dans le ventricule de l'inhibiteur de GSK3 $\beta$  AR-A014418 augmente la prolifération des CSN et progéniteurs neuronaux et mène à une hausse de la neurogenèse (Azim et al., 2014). Similairement, la surexpression de la  $\beta$ -caténine *in vivo* entraîne une hausse du nombre de cellules de CSN le long des ventricules (Qu et al., 2010), probablement en favorisant leur division symétrique (Piccin and Morshead, 2011).

#### **4.2.3 Modulation par la niche**

##### a. Matrice extracellulaire et fractones

Les CSN et progéniteurs neuronaux des zones neurogéniques adultes sont maintenus au sein d'une matrice extracellulaire (MEC) qui, en plus de son rôle de support, module directement le comportement cellulaire des CSN (Gattazzo et al., 2014). On trouve au sein de la ZSV des structures spécialisées de la MEC appelées fractones, principalement composées de protéoglycans héparanes sulfates (HSPG) et de laminines (Mercier et al., 2002; Mercier, 2016). De manière intéressante, les CSN établissent un contact direct avec les fractones via leurs longs prolongements (Mercier et al., 2002). Par ailleurs, la grande majorité des CSN et des progéniteurs neuronaux en prolifération se situent à proximité des fractones dans la ZSV adulte (Kerever et al., 2007). Une accumulation de preuves suggèrent que de nombreux facteurs impliqués dans la balance quiescence/prolifération des CSN, tels que les BMP4 et BMP7 ou le FGF2, sont captés par les HSPG des fractones (Kerever et al., 2007; Douet et al., 2012; Douet et al., 2013; Mercier and Douet, 2014). Injectant simultanément dans le ventricule latéral de FGF-2 et de l'héparitinase-1 afin de dégrader les chaînes héparane sulfate des HSPG, il a ainsi été montré que la prolifération cellulaire de la ZSV est diminuée par rapport à l'injection de

FGF-2 seul (Kerever et al., 2007; Douet et al., 2013). A l'inverse, l'inhibition de la prolifération cellulaire au niveau de la ZSV par la BMP7 est en partie levée après traitement à l'héparitinase-1 (Douet et al., 2012). Bien que ces études n'apportent pas de preuve directe de la modulation de la prolifération des CSN par les fractones, ces derniers jouent très certainement un rôle central en concentrant les facteurs de croissance libérés localement dans la niche (Mercier, 2016).

### b. Ephrine

Les éphrines, ligands membranaires, participent au maintien des CSN dans les zones neurogéniques adultes en interagissant avec les récepteurs Eph. Dans la ZSG adulte, l'interaction entre les CSN/progéniteurs intermédiaires via leur récepteur EphB1 et le ligand éphrine-B3 porté par les fibres moussues du hile inhibe leur prolifération (Chumley et al., 2007). Dans la ZSV adulte, le récepteur EphA4 est spécifiquement exprimé par les CSN. Son extinction au moyen d'un shRNA entraîne une diminution de leur prolifération et une augmentation de la différenciation (Khodosevich et al., 2011). Similairement, l'interaction entre le récepteur EphA7 porté par les CSN et le ligand ephrinA2 exprimé par les cellules progénitrices maintient l'intégrité de la niche en régulant la prolifération des cellules souches et progéniteurs neuronaux (Holmberg et al., 2005). Par ailleurs, l'injection intra-ventriculaire de l'ectodomaine de EphB2 et de Ephrin-B2 augmente la prolifération cellulaire de la ZSV et multiplie par 8 le nombre de CSN (Conover et al., 2000). L'équipe de Simona Parrinello a récemment montré que le contact avec les cellules endothéliales vasculaires maintient les CSN dans un état de quiescence au niveau de la ZSV, mécanisme en partie médié par la signalisation eph/ephrinB2. La suppression de Ephrin-B2 sélectivement dans l'endothélium adulte ne modifie pas le nombre absolu de CSN mais augmente significativement la proportion en prolifération, ce qui mène à une augmentation rapide de la production de neurones, suivie d'un épuisement rapide de la population des CSN quiescentes et leur descendance immédiate (Ottone et al., 2014).

### c. Cadhéline

Les cadhérines, une classe de glycoprotéines, sont exprimées à la surface des cellules et jouent un rôle important dans l'adhésion cellulaire via la formation de jonctions adhérentes ou de desmosomes qui constituent des jonctions d'ancrage entre cellules adjacentes (Takeichi, 1995). Dans cette superfamille, la E-cadhérine et la N-cadhérine sont toutes deux exprimées par les cellules épendymaires et les CSN dans la ZSV adulte, et modulent directement la quiescence de ces dernières (Karpowicz et al., 2009; Porlan et al., 2014). En effet, la suppression conditionnelle de la E-cadhérine augmente la prolifération des progéniteurs neuronaux et entraîne des défauts dans l'autorenouvellement des CSN *in vitro* et *in vivo* (Karpowicz et al., 2009). La N-cadhérine assure quant à elle l'adhésion des CSN aux cellules épendymaires dans la ZSV adulte (Porlan et al., 2014). La perturbation de la N-cadhérine *in vivo*, via le clivage de son ectodomaine par la métalloprotéase MT5-MMP, se traduit par un nombre plus élevé de CSN en prolifération, ce qui suggère que l'adhésion des CSN au sein de leur niche régule directement leur quiescence (Porlan et al., 2014).

Le tableau 2 recense les principaux facteurs extrinsèques qui participent au maintien des CSN adultes au sein des niches neurogéniques en agissant sur leur autorenouvellement, la balance entre quiescence et activation et sur leur prolifération.

	Autorenouvellement	Sortie de quiescence	Prolifération	Références
Facteurs de croissance				
<b>PEDF</b>	+	+		Ramirez-Castillejo <i>et al.</i> , 2006 Andreu-Agulló <i>et al.</i> , 2009
<b>EGF</b>			+	Reynold and Weiss 1992 Craig <i>et al.</i> , 1996 Kuhn <i>et al.</i> , 1997 Doetsch <i>et al.</i> , 2002
<b>IGF-II</b>	+		+	Ziegler <i>et al.</i> , 2012 Bracko <i>et al.</i> , 2012
<b>FGF-2</b>			+	Kuhn <i>et al.</i> , 1997
<b>VEGF</b>		+	+	Calvo <i>et al.</i> , 2011 Han <i>et al.</i> , 2015
Neurotransmetteurs				
<b>GABA</b>	-	-	-	Liu <i>et al.</i> , 2005 Fernando <i>et al.</i> , 2011 Song <i>et al.</i> , 2012
<b>Sérotonine</b>			-	Tong <i>et al.</i> , 2014a
Morphogènes				
<b>BMP</b>		-	-	Lim <i>et al.</i> , 2002 Bonaguidi <i>et al.</i> , 2005 Mathieu <i>et al.</i> , 2008 Mira <i>et al.</i> , 2010
<b>Notch</b>	+	-		Chambers <i>et al.</i> , 2001 Ables <i>et al.</i> , 2010 Ehm <i>et al.</i> , 2010 Imayoshi <i>et al.</i> , 2010 Ottone <i>et al.</i> , 2014
<b>Shh</b>	+	+	+	Machold <i>et al.</i> , 2003 Malodi and Fishell 2007 Jiao and Chen 2008
<b>Wnt/B-caténine</b>	+	-	+	Qu <i>et al.</i> , 2010 Piccin <i>et al.</i> , 2011 Azim <i>et al.</i> , 2014
Interactions cellulaires				
<b>Ephrine A2</b>			-	Holmberg <i>et al.</i> , 2005
<b>Ephrine B2</b>	+	-	+	Conover <i>et al.</i> , 2010 Ottone <i>et al.</i> , 2014
<b>Cadhérine E</b>	+			Karpowicz <i>et al.</i> , 2009
<b>Cadhérine N</b>		-	-	Porlan <i>et al.</i> , 2014

**Tableau 2 : Facteurs extrinsèques modulant l'activité des CSN adultes**

De nombreux facteurs solubles produits au niveau des niches neurogéniques – facteurs de croissance, neurotransmetteurs, morphogènes - jouent un rôle dans le contrôle de l'autorenouvellement, de la transition quiescence-prolifération et le maintien du statut prolifératif des cellules souches neurales des zones neurogéniques adultes, tout comme les interactions cellulaires. Cases vides : pas d'information.

## OBJECTIFS

La découverte de la persistance des CSN dans le cerveau adulte, capables de produire de nouveaux neurones venant s'intégrer dans les réseaux neuronaux pré-existants, a soulevé un intérêt particulier quant à leur utilisation comme cibles thérapeutiques potentielles dans le cadre de différentes atteintes cérébrales telles que l'ischémie cérébrale ou les maladies neurodégénératives. L'existence de CSN sous-jacentes du maintien d'une neurogenèse adulte a depuis été démontrée dans une grande variété d'espèces parmi lesquelles les rongeurs (Reynolds and Weiss, 1992), les oiseaux (Goldman and Nottebohm, 1983), les primates non humains (Gould et al., 1999; Kornack and Rakic, 1999), et l'Homme (Eriksson et al., 1998; Kukekov et al., 1999; Palmer et al., 2001; Sanai et al., 2004). De manière remarquable, les CSN conservent leurs capacités à proliférer et à se différencier dans le lignage neural, y compris chez les personnes très âgées ( $>80$  ans) et atteintes de maladies (Leonard et al., 2009; van den Berge et al., 2010). L'intérêt thérapeutique d'un ciblage des CSN endogènes est par ailleurs renforcé par leur capacité à donner également naissance aux deux autres types cellulaires du cerveau adulte, les astrocytes et les oligodendrocytes (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

Dans le cadre d'une stimulation *in vivo* des CSN endogènes dans l'optique d'une stratégie thérapeutique régénérative des tissus cérébraux lésés, il est essentiel de comprendre les mécanismes qui régulent leur prolifération au sein des niches neurogéniques adultes. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur l'étude de la neurogenèse dans la ZSV de la souris adulte. Mon projet de thèse s'est orienté vers deux objectifs principaux :

### **1/ L'étude du déclin de la neurogenèse bulbaire au cours du vieillissement chez la souris adulte et des mécanismes sous-jacents.**

Bien que la neurogenèse persiste tout au long de la vie, la production de nouveaux neurones diminue fortement avec l'âge au niveau de la ZSV où une réduction progressive du nombre de cellules en prolifération, et plus spécifiquement des progéniteurs

neuronaux, est observée (Tropepe et al., 1997; Enwere et al., 2004; Bouab et al., 2011). L'étude du vieillissement de la ZSV adulte constitue en ce sens un bon modèle pour disséquer les facteurs intrinsèques et extrinsèques aux CSN et à leur progénie neurale qui sont essentiels au maintien d'une neurogenèse adulte. A l'aide d'une méthode de tri cellulaire par cytométrie en flux mise au point au sein du laboratoire qui permet d'identifier et de trier spécifiquement les CSN et leur progénie de la ZSV adulte (voir l'article 1), nous avons cherché à identifier les stades cellulaires impliqués dans la diminution de la neurogenèse au cours du vieillissement et à caractériser les mécanismes moléculaires associés (voir les articles 2 et 3).

## **2/ La caractérisation de l'état de quiescence des CSN dans la ZSV murine adulte.**

En plus de leurs propriétés d'autorenouvellement et de différenciation dans différents lignages, les cellules souches se caractérisent par leur capacité à maintenir un état quiescent qui coexiste au sein des niches avec un état hautement prolifératif. Bien que l'existence des CSN quiescentes au sein de la ZSV dans le cerveau adulte ait été démontrée depuis de nombreuses années (Morshead et al., 1994; Doetsch et al., 1999a), leurs caractéristiques cellulaires *in vivo* sont peu connues. Par ailleurs, les signaux moléculaires qui régulent cet état quiescent en conditions physiologiques sont très largement ignorés. A l'aide de notre stratégie de tri cellulaire permettant d'isoler spécifiquement les CSN quiescentes des CSN en prolifération (voir l'article 1), nous avons cherché à caractériser leur caractère souche ainsi que les mécanismes moléculaires associés à la balance quiescence-prolifération des CSN à l'aide d'une étude comparative de leur transcriptome (voir l'article 4).

# **RESULTATS**

---

---



# **ARTICLE 1**

## **Cell sorting of neural stem and progenitor cells from the adult mouse subventricular zone and live-imaging of their cell cycle dynamics**

Mathieu Daynac\*, Lise Morizur\*, Thierry Kortulewski, Laurent R. Gauthier, Martial Ruat, Marc-André Mouthon, François D. Boussin

\* Premiers auteurs associés

Publié dans **Journal of Visualized Experiments - JoVE (2015)**



## Résumé de l'article 1

La découverte des CSN adultes et de leurs propriétés d'autorenouvellement et de différenciation a soulevé un grand intérêt comme possible outil pour la médecine réparatrice du cerveau. Cependant, une meilleure connaissance de leur dynamique cellulaire, de leurs mécanismes moléculaires et plus généralement de leur identité souche est indispensable. Les progrès dans ce domaine ont longtemps été freinés par la complexité des niches neurogéniques et la rareté des CSN. Des approches *in vivo* au niveau des ventricules ont fourni des données sur les CSN et leur environnement immédiat mais sont extrêmement lourdes à mettre en place. Des expériences *in vitro* de culture en neurosphères ou en adhésion permettent de travailler avec un plus grand nombre de cellules mais perdent la spécificité de la niche, en plus de poser des problèmes de méthodologie (Pastrana et al., 2011). Ainsi, la mise au point de techniques de purification robustes des CSN et des cellules de la progénie neurale par cytométrie en flux constitue une étape importante pour mieux comprendre leur régulation fonctionnelle et moléculaire.

En raison de l'absence de marqueurs de surface uniques, les CSN ont pendant longtemps été étudiées et identifiées à postériori sur leur capacité à générer des neurosphères multipotentes *ex vivo*. Utilisant des souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la nestine, une première équipe a purifié la fraction cellulaire nestine-GFP<sup>+</sup> et montré qu'elle concentrait les cellules capables de former des neurosphères et de se différencier dans les trois lignages (Kawaguchi et al., 2001). L'équipe de Perry Bartlett a ensuite identifié une population PNA<sup>faible</sup>HSA/CD24<sup>faible</sup> au sein de laquelle 63% des cellules initiaient des neurosphères (Rietze et al., 2001). Le marqueur membranaire LeX/CD15 a également été utilisé pour trier une population enrichie en CSN à partir de la ZSV (Capela and Temple, 2002). Partant de l'observation que les CSN pouvaient être identifiées *in vitro* par leur capacité à former des neurosphères en présence d'EGF, l'équipe d'Andrea Hellwig a par la suite trié les cellules EGFR<sup>fort</sup> et montré qu'elles concentraient effectivement une grande majorité des cellules formant des neurosphères (Ciccolini et al., 2005). Une autre stratégie a associé le suivi de l'expression de la GFAP à celui de la prominine 1 (ou CD133), une glycoprotéine

transmembranaire exprimée par les cellules épendymaires et sur le cil primaire de certaines cellules de types B1 (Beckervordersandforth et al., 2010). Les CSN (hGFAP-GFP<sup>+</sup>/Prominin1<sup>+</sup>) ont ainsi pu être séparées des astrocytes non souches (GFAP-GFP<sup>+</sup>/Prominin1<sup>-</sup>) et des cellules épendymaires (GFAP-GFP<sup>-</sup>/Prominin1<sup>+</sup>) (Beckervordersandforth et al., 2010). Bien que ces études aient constitué une avancée majeure pour l'étude des CSN, elles ne permettent toutefois pas de purifier l'ensemble des cellules de la progénie neurale. Plus récemment, l'équipe de Fiona Doetsch a couplé le suivi de l'expression de la GFAP, du CD24 et d'un ligand fluorescent du récepteur à l'EGF afin de purifier spécifiquement les CSN (GFAP-GFP<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>) des progéniteurs intermédiaires (GFAP-GFP<sup>-</sup>EGFR<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>) ainsi que des neuroblastes (GFAP-GFP<sup>-</sup>EGFR<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>) (Pastrana et al., 2009). L'un des défis actuels reste la distinction entre les CSN quiescentes et les CSN activées.

Dans ce premier article de méthodologie, nous détaillons la technique de tri cellulaire par cytométrie en flux mise au point au sein du laboratoire qui permet de purifier les principales populations cellulaires de la ZSV, dont les CSN quiescentes et activées (Daynac et al., 2013). Cette approche est à l'heure actuelle la seule qui ne requiert pas l'utilisation de souris transgéniques.

Les différents types cellulaires sont identifiés selon l'expression de trois marqueurs membranaires : le CD15/LeX exprimé par les CSN et les progéniteurs intermédiaires, le CD24 exprimé par les neuroblastes et par les cellules épendymaires, et le ligand du récepteur de l'EGF présent sur les cellules en prolifération. Cette stratégie nous permet d'isoler simultanément les 5 populations neurogéniques de la ZSV chez la souris adulte :

- les CSN quiescentes (CD24<sup>-</sup>LeX<sup>fort</sup>EGFR<sup>-</sup>)
- les CSN activées (CD24<sup>-</sup>LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>)
- les progéniteurs intermédiaires (CD24<sup>-</sup>LeX<sup>-</sup>EGFR<sup>+</sup>)
- les neuroblastes immatures (**CD24**<sup>intermédiaire</sup>LeX<sup>-</sup>EGFR<sup>+</sup>)
- les neuroblastes (**CD24**<sup>intermédiaire</sup>LeX<sup>-</sup>EGFR<sup>-</sup>)

Nous montrons que cette stratégie de purification peut être couplée au système FUCCI (Fluorescence Ubiquitination Cell Cycle Indicator) permettant de visualiser de manière précise la position des cellules dans le cycle cellulaire (Sakaue-Sawano et al., 2008). Par exemple, la progression des cellules en phase G<sub>1</sub> peut être suivie à l'aide de souris FUCCI-Rouge grâce à l'émission d'une fluorescence rouge par vidéo-microscopie (Sakaue-Sawano et al., 2008). Dans ce système, les cellules FUCCI-Rouge<sup>négatif</sup> correspondent aux cellules en phases S-G<sub>2</sub>/M, les cellules FUCCI-Rouge<sup>faible</sup> sont en phase G<sub>1</sub> et les cellules FUCCI-Rouge<sup>fort</sup> sont en train de sortir ou sont hors du cycle cellulaire (voir la Figure 2 du papier ci-après). Il est alors possible d'étudier la dynamique du cycle cellulaire cellule par cellule.

La combinaison de notre technique de tri et de la technologie FUCCI est un outil puissant pour mieux comprendre la régulation du cycle cellulaire des CSN et de leur progénie neurale, qui reste à l'heure actuel un défi majeur pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans le contexte du vieillissement ou d'atteintes cérébrales.



**Video Article**

# Cell Sorting of Neural Stem and Progenitor Cells from the Adult Mouse Subventricular Zone and Live-imaging of their Cell Cycle Dynamics

Mathieu Daynac<sup>\*1,2,3,4,5</sup>, Lise Morizur<sup>\*1,2,3,4</sup>, Thierry Kortulewski<sup>1,2,3,4</sup>, Laurent R. Gauthier<sup>1,2,3,4</sup>, Martial Ruat<sup>5</sup>, Marc-André Mounthon<sup>1,2,3,4</sup>, François D. Boussin<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>CEA DSV iRCM SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, UMR 967

<sup>2</sup>INSERM, UMR 967

<sup>3</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967

<sup>4</sup>Université Paris Sud, UMR 967

<sup>5</sup>CNRS, Université Paris Sud, UMR 9197, Neuroscience Paris-Saclay Institute, Molecules Circuits Department

\*These authors contributed equally

Correspondence to: Mathieu Daynac at [mathieu.daynac@cea.fr](mailto:mathieu.daynac@cea.fr), Lise Morizur at [lise.morizur@cea.fr](mailto:lise.morizur@cea.fr), Marc-André Mounthon at [marc-andre.mounthon@cea.fr](mailto:marc-andre.mounthon@cea.fr), François D. Boussin at [boussin@cea.fr](mailto:boussin@cea.fr)

URL: <http://www.jove.com/video/53247>

DOI: doi:10.3791/53247

Keywords: Neuroscience, Issue 103, FUCCI, FACS, neural stem and progenitor cells, subventricular zone, time-lapse video microscopy, cell cycle.

Date Published: 9/14/2015

Citation: Daynac, M., Morizur, L., Kortulewski, T., Gauthier, L.R., Ruat, M., Mounthon, M.A., Boussin, F.D. Cell Sorting of Neural Stem and Progenitor Cells from the Adult Mouse Subventricular Zone and Live-imaging of their Cell Cycle Dynamics. *J. Vis. Exp.* (103), e53247, doi:10.3791/53247 (2015).

## Abstract

Neural stem cells (NSCs) in the subventricular zone of the lateral ventricles (SVZ) sustain olfactory neurogenesis throughout life in the mammalian brain. They successively generate transit amplifying cells (TACs) and neuroblasts that differentiate into neurons once they integrate the olfactory bulbs. Emerging fluorescent activated cell sorting (FACS) techniques have allowed the isolation of NSCs as well as their progeny and have started to shed light on gene regulatory networks in adult neurogenic niches. We report here a cell sorting technique that allows to follow and distinguish the cell cycle dynamics of the above-mentioned cell populations from the adult SVZ with a LeX/EGFR/CD24 triple staining. Isolated cells are then plated as adherent cells to explore in details their cell cycle progression by time-lapse video microscopy. To this end, we use transgenic Fluorescence Ubiquitination Cell Cycle Indicator (FUCCI) mice in which cells are red-fluorescent during G<sub>1</sub> phase due to a G<sub>1</sub> specific red-Cdt1 reporter. This method has recently revealed that proliferating NSCs progressively lengthen their G<sub>1</sub> phase during aging, leading to neurogenesis impairment. This method is easily transposable to other systems and could be of great interest for the study of the cell cycle dynamics of brain cells in the context of brain pathologies.

## Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/53247>

## Introduction

Quiescent neural stem cells (NSCs) are the source for adult neurogenesis<sup>1</sup> and can convert into their proliferative “activated” form expressing the EGFR (aNSCs)<sup>2</sup>. Once activated, they give rise to transit amplifying cells (TACs)<sup>3</sup> and then neuroblasts that migrate to the olfactory bulbs (OB) through a tube of astrocytes and finally differentiate into neurons<sup>4,5</sup>. NSCs and their progeny are organized in specialized “niches” architectures along the lateral ventricles, implicating a myriad of factors controlling their proliferation<sup>6</sup>. The isolation and purification of SVZ neurogenic cells is necessary to illuminate the complex molecular regulation of their proliferation but have remained a challenge for a long time due to the lack of specific markers and adapted techniques.

New approaches using flow cytometry have rendered possible the isolation of NSCs and their progeny from the adult SVZ<sup>2,7-11</sup>. Using the stem cell marker LeX<sup>12</sup> along with neuroblast marker CD24<sup>13</sup> and a fluorescence EGF to label EGFR on proliferating cells<sup>2</sup>, we recently developed a FACS strategy allowing the purification of five of the main SVZ neurogenic populations: quiescent and activated NSCs, TACs, immature as well as migrating neuroblasts<sup>9</sup>. Here, we describe in details this cell sorting technique and how a LeX/EGFR/CD24 triple staining allowed for the first time the isolation of both quiescent and activated NSCs.

Although neurogenesis persists during adulthood, the production of new neurons is drastically decreased in the aging brain<sup>14</sup>. Most studies agree on a progressive reduction in the number of proliferating progenitor cells in the SGZ and SVZ<sup>15-20</sup>. The consequences are not innocuous as the age-related decline in neurogenesis in the SVZ provokes a diminution of newborn neurons in the olfactory bulbs of the aged brain, ultimately leading to impairment in olfactory discrimination in aged mice<sup>18</sup>. Elucidating cell cycle kinetics of neural progenitors is a key step to understand the mechanisms underlying the evolution of adult neurogenesis during aging. Recent studies have investigated the cell cycle and lineage

progression of adult neural stem cells *in vitro*<sup>21</sup> and *in vivo*<sup>22</sup> but none of them took advantage of cell sorting techniques and genetically encoded fluorescent cell-cycle probes to visualize the cell-cycle phases of isolated cells at a single-cell level.

Here we describe a protocol that takes advantage of the transgenic FUCCI mice in which cells are fluorescent during their cell cycle, allowing the distinction between G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M phases<sup>23</sup>. This protocol shows how prospective isolation of NSCs and their progeny from adult FUCCI mice combined with time-lapse video microscopy allows the study of the cell cycle dynamics at a single-cell level.

## Protocol

This protocol has been designed in compliance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and has been approved by our animal welfare institutional committee (CETEA-CEA DSV IdF).

### 1. Basic Setup Prior to Culture and Videomicroscopy

1. Use glass bottom culture plates or μ-Plates for confocal video microscopy. For 1 - 5 × 10<sup>3</sup> cells/well, use 96-well plates and 24-well plates for more than 5 × 10<sup>3</sup> cells/well.
2. At least one day prior to commencing the experiment, prepare sterile Poly-D-lysine (PDL) coated plates for adherent monolayer cultures. Add enough PDL (10 µg/ml in dH<sub>2</sub>O) to coat the bottom of each well and incubate O/N at 37 °C. Remove the PDL solution and rinse three times with dH<sub>2</sub>O before allowing the plate to dry in the hood during at least 2 hr under a laminar flow. If not used immediately, store the coated plate at -20 °C.
3. Prepare culture medium by mixing NSC Basal Medium and NSC Proliferation Supplement at a 9:1 ratio (see Material table) along with 2 µg/ml heparin, 20 ng/ml purified human recombinant epidermal growth factor (EGF), and 10 ng/ml human recombinant fibroblast growth factor 2 (FGF-2). Warm up the culture medium to 37 °C in a water bath before use.
4. For the SVZ dissociation, prepare papain solution: 1 mg/ml papain (15 UI/ml) in Earl's Balance Salt Solution (EBSS) containing 0.2 mg/ml L-cysteine, 0.2 mg/ml EDTA, and 0.01 mg/ml DNase I in PBS. Sterilize the solution by passing through a 0.2 µm filter. Equilibrate the solution at 37 °C before use.
5. To stop the enzymatic reaction, prepare a protease inhibitor solution (Ovomucoid): DMEM:F12 medium containing 0.7 mg/ml trypsin inhibitor type II. Filter the solution using a 0.2 µm filter.
6. Prepare PBS 0.6% glucose solution to collect the brains and PBS 0.15% BSA solution for washing steps and for antibody staining.
7. Prepare dissection tools: scissors, dissecting and tying forceps, scalpel. Soak them in 70% ethanol.

### 2. Harvesting of Adult Mouse Brains and SVZ Microdissections

1. Sacrifice adult FUCCI mice<sup>23</sup> (2 to 3-month-old and/or 12-month-old for aging studies) performing a cervical dislocation in accordance to the appropriate institutional guidelines.
2. Spray the mouse using 70% ethanol and cut the head off using sharp scissors.
3. Make an incision along the scalp to reveal the skull.
4. Perform a longitudinal midline cut starting at the base of the skull towards the olfactory bulbs using a small pair of scissors. Make sure to avoid damaging the underlying brain with the scissor blades. Remove the upper open part of the skull with curved forceps to expose the brain.
5. Collect the brain in a 15 mm petri dish containing 0.6% glucose in PBS.
6. Dissect away the olfactory bulbs. Place the brain on its dorsal surface and make a coronal section through the optic chiasm using a scalpel.
7. Under a dissecting microscope, position the rostral part of the brain section with the cut coronal surface facing upwards toward the experimenter.
8. To dissect the SVZ, remove the septum with a fine curved forceps then insert one tip of a fine forceps into the striatum immediately adjacent to the ventricle and detach the SVZ from the surrounding tissue. For additional details, refer to Azari *et al.*<sup>24</sup>. Place the dissected SVZ into a petri dish containing 1 ml of PBS-0.6% glucose.

### 3. SVZ Tissue Dissociation

1. Mince the dissected SVZ in the petri dish until no large pieces remain.
2. Transfer the minced tissue along with the PBS-0.6% glucose to a 15 ml tube and centrifuge at 200 x g for 5 min.
3. Discard the supernatant and add 1 ml of pre-warmed papain (1 mg/ml, prepared in step 1.4) supplemented with 0.01 mg/ml DNase I. Incubate for 10 min in a water bath at 37 °C. Use 1 ml of papain per mouse.
4. Centrifuge at 200 x g for 5 min and discard the supernatant.
5. Add 1 ml of pre-warmed ovomucoid (0.7 mg/ml, prepared in step 1.5) to stop papain activity. Mechanically dissociate the minced tissue further into a single-cell suspension by gently pipetting up and down 20 times through a p1000 micropipette tip. Avoid air bubbles.
6. Pass the cell suspension through a sterile 20 µm filter in a new 15 ml tube. Make sure to wash the cell filter with PBS 0.15% BSA to avoid losing cells.
7. Centrifuge at 200 x g for 10 min and discard the supernatant. Re-suspend the cells in 100 µl of PBS containing 0.15% BSA.

### 4. Immunofluorescent Staining for Cell Sorting

For cell sorting using FUCCI-Red mice (**Figure 2A**), use the following antibodies: CD24 phycoerythrin-cyanine7 conjugate [PC7] ; CD15/LeX fluorescein isothiocyanate [FITC] conjugated and Ax647 conjugated EGF ligand.

Note: LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells and EGFR<sup>+</sup> cells are not abundant in the adult SVZ: ≈ 600 and 1500 cells/mouse respectively<sup>9</sup>. We recommend pooling SVZ cells from 2 to 3 mice to have enough material. Do not work with more than 12 mice on the same day so that the cell sorting duration doesn't exceed 3 hr. Keep in mind that working with too many mice on the same day will lead to an increased cell sorting duration possibly resulting in increased cell death and/or cell differentiation.

1. Perform the FACS staining in 100 µl of PBS 0.15% BSA per mouse (or in 200 µl for a group of 2 to 3 mice for optimal staining).
2. Prepare the control tubes. Use compensation beads to prepare single color control tubes according to the manufacturer's protocol. Select a fraction of cells (1/10 of the cells extracted from one mouse is enough) and separate it in 4 tubes to prepare 1 negative control tube (unmarked cells) and 3 fluorescence minus one (FMO) control tubes. Resuspend the cells in 200 µl of PBS 0.15% BSA per tube.  
Hint: For LeX-FITC FMO control, label the cells with CD24-PC7 (1:50) and Ax647#conjugated EGF ligand (1:200); for CD24-PC7 FMO control, label the cells with CD15/LeX-FITC (1:50) and Ax647#conjugated EGF ligand (1:200) and for Ax647#conjugated EGF ligand FMO control, label the cells with CD15/LeX-FITC (1:50) and CD24-PC7 (1:50).
3. For the tubes used for cell sorting, use the following antibodies at the indicated dilution in PBS 0.15% BSA: CD24-PC7 (1:50), CD15/LeX-FITC (1:50) and Ax647#conjugated EGF ligand (1:200).
4. Incubate for 20 min at 4 °C in the dark. Wash with 1 ml PBS 0.15% BSA and centrifuge at 200 x g for 10 min. Resuspend the cells in 200 µl of PBS 0.15% BSA per brain. Keep the cell sorting tubes on ice and proceed immediately to the cell sorting.
5. If using FUCCI-Green mice, separate LeX-positive and LeX-negative fractions using separation columns before cell sorting as the LeX-FITC antibody shares the same emission wavelength than the FUCCI-green fluorescence (**Figure 3A,B**).
  1. First, label the cells with a mouse anti-human LeX-antibody (1:50) for 15 minutes at 4 °C in the dark in 100 µl of PBS 0.15% BSA.
  2. Wash the cells with 1 ml PBS 0.15% BSA and centrifuge at 200 x g for 10 min, then label the cells with anti-mouse IgM microbeads (1:10) for 15 minutes at 4 °C in the dark.
  3. Wash the cells with 1 ml PBS 0.15% BSA and centrifuge at 200 x g for 10 min. Resuspend the cells in 500 µl PBS 0.15% BSA and pour the cells through separation column in magnetic field as schematized in **Figure 3 C**. Wash the column with 1 ml PBS 0.15% BSA to obtain LeX negative fraction.
  4. To obtain LeX-positive fraction, remove the separation column from the magnetic field and elute the cells with 2 ml PBS 0.15% BSA.
  5. Proceed to CD24-PC7 and Ax647#conjugated EGF ligand staining as indicated in 4.2.

## 5. Cell Sorting

Note: Cells were sorted on a FACS sorter at 40 Psi with an 86 µm nozzle. Fluorescence was collected using the following filter set: 520/35nm (FITC), 575/26nm (PE), 670/20nm (Ax647) and 740LP (PC7). Compensation is necessary to prevent false-positive signals as an overlap is found between the emission spectra of the FUCCI-red fluorescence and the PC7 dye.

1. Immediately prior to cell sorting, add a vital dye to discriminate live from dead cells. We used HO (see material table) at a 2 µg/ml final concentration. Run the negative control tube (unmarked cells) through the FACS sorter and select the cells using side scatter (SSC) and forward scatter (FSC) parameters (**Figure 1A**).  
NOTE: Dead cells were excluded by gating only the HO-negative fraction (**Figure 1A'**) and then doublets were excluded by selecting the Pulse Width negative fraction (**Figure 1A''**).
2. Run the single color controls prepared in step 4.2 and adjust the photomultiplier tube (PMT) voltages if necessary (*i.e.* negative population too high and/or positive cells off scale). Perform color compensation in the compensation window of the software.
3. Run FMO controls prepared in step 4.2 (LeX-FITC FMO control, CD24-PC7 FMO control and Ax647-conjugated EGF ligand FMO control) and draw the sorting gates (**Figure 1**). Sort the cells directly into 100 µl of culture medium in 1.5 ml microtubes.

## 6. Preparation of Cells for Microscopy

1. Plate the freshly sorted cells at a density of 1 - 3 x 10<sup>3</sup> cells/well on Poly-D-Lysine- coated 96-well µ-Plate with 300 µl of culture medium.
2. Prior to video microscopy, incubate the culture plates at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> at least for 1 hr to allow cell adhesion.

## 7. Microscope Setup and Image Acquisition

1. Perform live imaging using a Plan Apo VC 20x DIC objective (NA: 0.75) on a confocal laser scanning microscope system attached to an inverted thermostated chamber at 37 °C under 5% of CO<sub>2</sub> atmosphere.
2. Position the 96-well µ-Plate inside the pre-warmed and equilibrated thermostated chamber and replace the lid by a thermostated cover.
3. Open the NIS-Elements software and click in the menu bar on "Acquire/Acquisition controls/ND acquisition" to select the options of the time-lapse (length, stage positions, confocal z-sections,...), "Acquire/Acquisition controls/Ti Pad" to select the objectives and "Acquire/Acquisition controls/A1plus Settings" to select the PMT level for each fluorescence in the menu bar. Select a folder to save the data files.
4. Using the ND acquisition window, set the center of each well as a stage position and select the large image option to 7 x 7 mm<sup>2</sup>. This will create a mosaic image around the center of each well. Set the overlap for the large mosaic image to 5%. Take pictures every 20 min for 24 hr. Select the Plan Apo VC 20x DIC objective (NA: 0.75) in the Ti Pad window.
5. In the A1plus Settings window, acquire images using high speed resonant scanner at a 512 x 512 pixels format with a resolution of 1.26 µm/pixel. Use brightfield to visualize cell shapes. In the case of FUCCI-Red mice, excite red fluorescence at 561 nm and collect using a 595/50 nm filter. In the case of FUCCI-Green mice, excite green fluorescence at 488 nm and collect using a 530/40 nm filter. Determine the optimal PMT level, offset and laser power for each wavelength.  
NOTE: We recommend using the autofocus function for the brightfield channel to allow the software to autofocus at each stage position before each acquisition. Hint: A Plan Apo VC 20x DIC objective (NA: 0.75) was used for its excellent resolution without the need for oil. Other objectives may be used depending on the optical resolution desired.
6. Select the 'Run now' button on the ND acquisition window to begin acquisition.

Hint: Follow the computer work for 1 loop to be sure that everything is working properly.

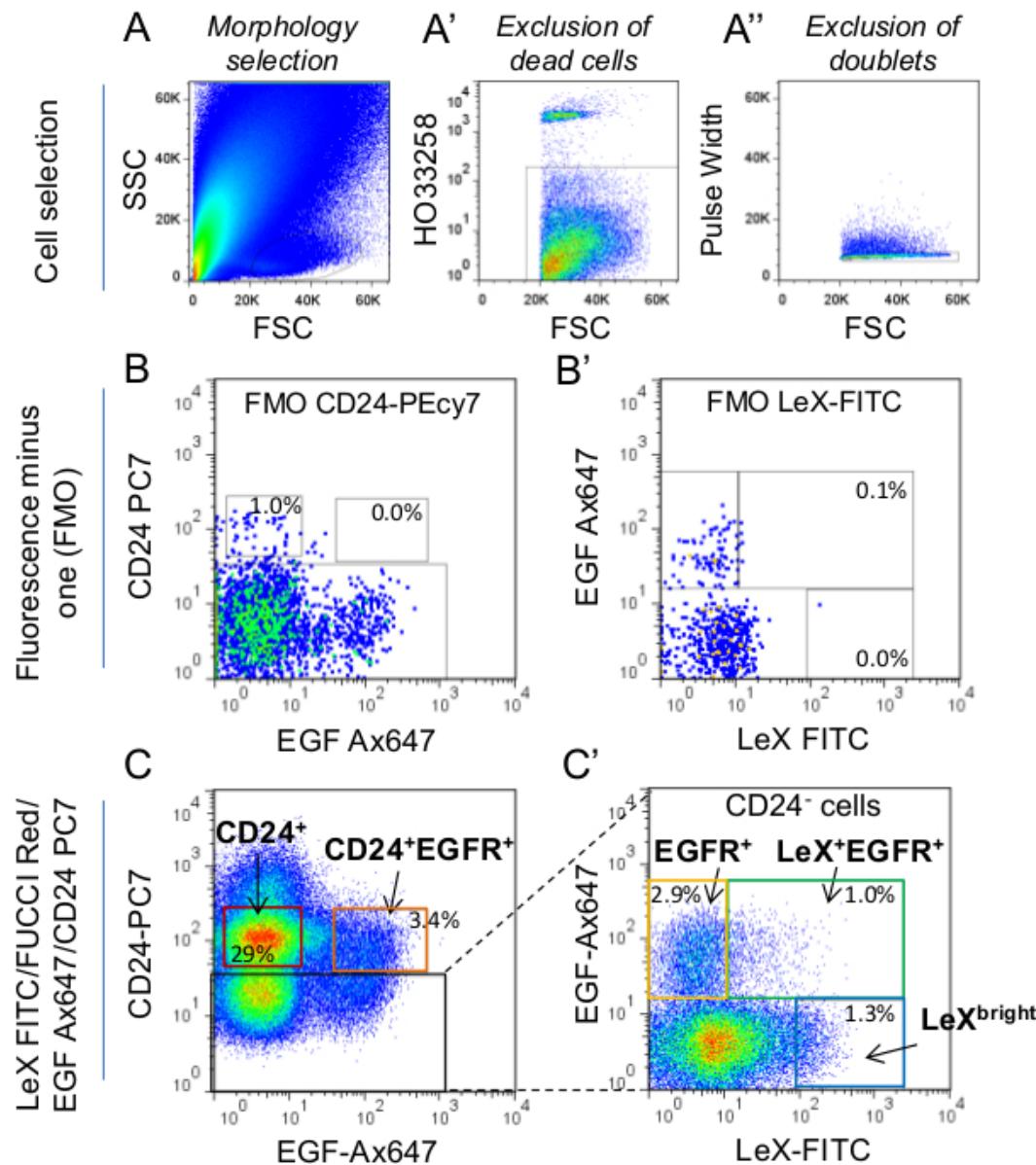
## 8. Image Processing and Analysis

1. Analyze the data directly on the NIS-Elements software by tracking the cells individually. Hint: To gain time, save each position in .avi format using NIS-Elements software and analyze the movies with ImageJ.
2. In ImageJ software, track individual cells undergoing at least 2 divisions (*i.e.* one cell to a four-cell colony). Crop a small area around the cell and select 'Image/Duplicate'.
3. Select 'Image/Stacks/Make Montage' in the menu bar to make a montage. Specify the frames to be included, the size of the images and save the montage as a .tif file for optimal resolution.
4. To calculate the first S-G<sub>2</sub>/M phase length (**Figure 2C,D**), select a single red fluorescent cell (in G<sub>1</sub>) and then set t = 0 (S phase will begin once the red-fluorescence switches off). Count the number of frames until the cell divides to estimate the S-G<sub>2</sub>/M length.  
NOTE: The calculated time depends on the time interval between each frame.
5. To calculate the following G<sub>1</sub> phase (**Figure 2C,D**), continue to track the cell that just divided. If the divided cell enters G<sub>1</sub> phase, there will be an accumulation of cdt1 red-fluorescent protein. Calculate the number of frames until red-fluorescence switches off again for each cell.  
Hint: At the beginning of G<sub>1</sub> the red fluorescence might be weak so choose the onset of the G<sub>1</sub> phase on the frame where the cell has divided to avoid approximations.

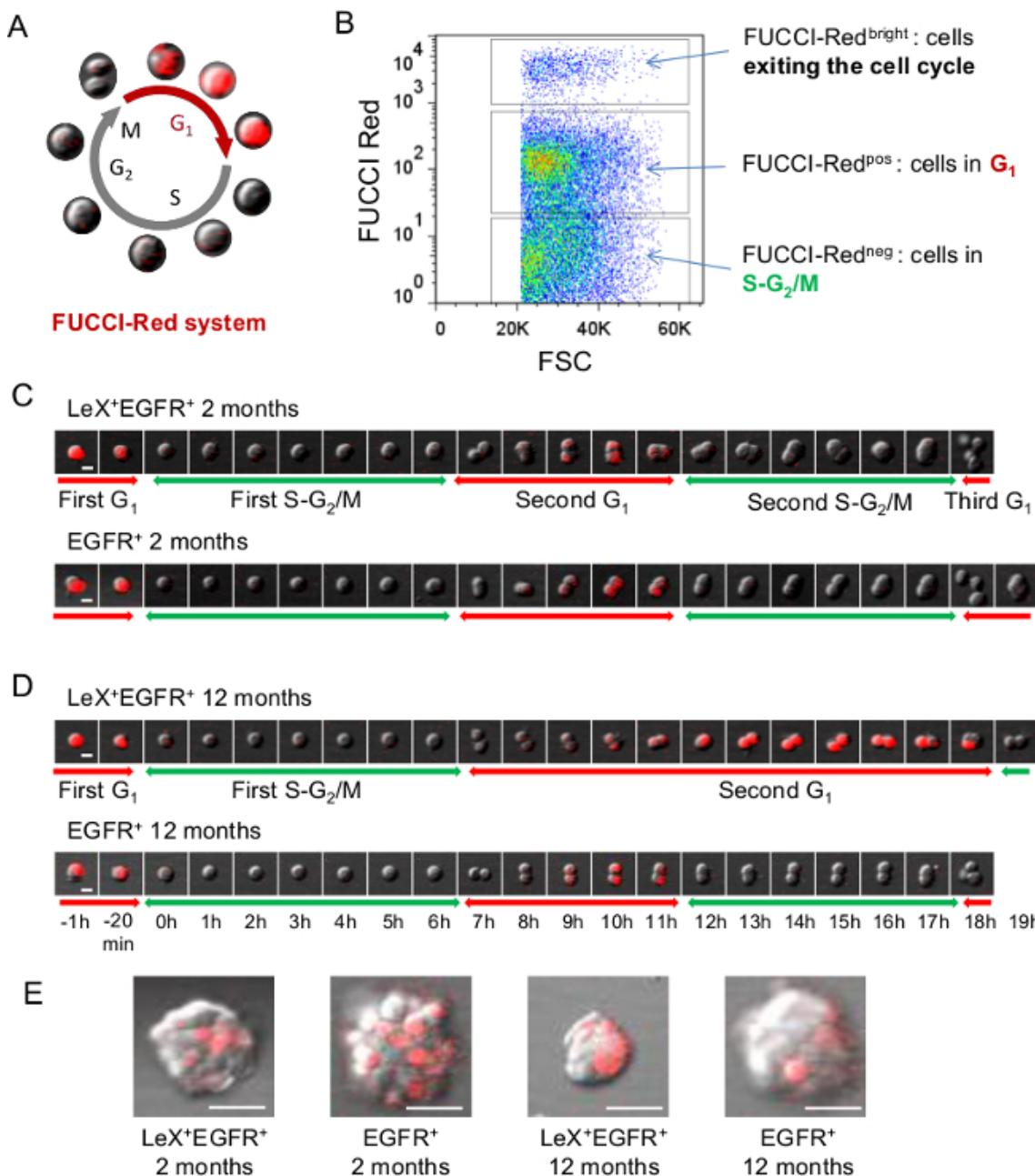
## Representative Results

The ability to reliably discriminate between the different cell populations of the adult mouse SVZ stem cell lineage is primordial to investigate their functional properties. To that purpose, we have developed a LeX/EGFR/CD24 triple-labeling strategy allowing the purification of specific cell populations from the adult SVZ: quiescent NSCs (LeX<sup>bright</sup>), activated NSCs (LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup>), TACs (EGFR<sup>+</sup>), immature and migrating neuroblasts (CD24<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and CD24<sup>+</sup>, respectively)<sup>9</sup> (**Figure 1**). Applied to FUCCI transgenic mice, the cell sorting technique allows the live imaging of the cell cycle phases of the different neurogenic populations at the single-cell level<sup>25</sup>. FUCCI-Red mice were used to follow the G<sub>1</sub> phase with red fluorescence using time-lapse video microscopy (**Figure 2A**). FUCCI-Red<sup>neg</sup> cells represent the cells in S-G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle, FUCCI-Red<sup>pos</sup> cells are G<sub>1</sub> cells and FUCCI-Red<sup>bright</sup> cells are cells exiting or out of the cell cycle (**Figure 2B**)<sup>23,26</sup>. LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> and EGFR<sup>+</sup> cells from young adult (**Figure 2C**) and middle-aged mice (**Figure 2D**) were plated as adherent cells on poly-D-lysine coated culture plates. The first S-G<sub>2</sub>/M phase was identified on single cells once the red fluorescence switches off until the cell divides. As previously observed the S-G<sub>2</sub>/M phase length showed no difference between LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> and EGFR<sup>+</sup> cells, either in young or middle-aged mice. Then we calculated the next G<sub>1</sub> phase length from the first division until the red fluorescence switches off. Interestingly, a G<sub>1</sub> phase lengthening was found during aging in LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> cells but not in EGFR<sup>+</sup> cells<sup>25</sup> (**Figure 2C,D**). In consequence, neurospheres obtained 5 days after plating are smaller in LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> cells obtained from aged mice as shown in **Figure 2E**.

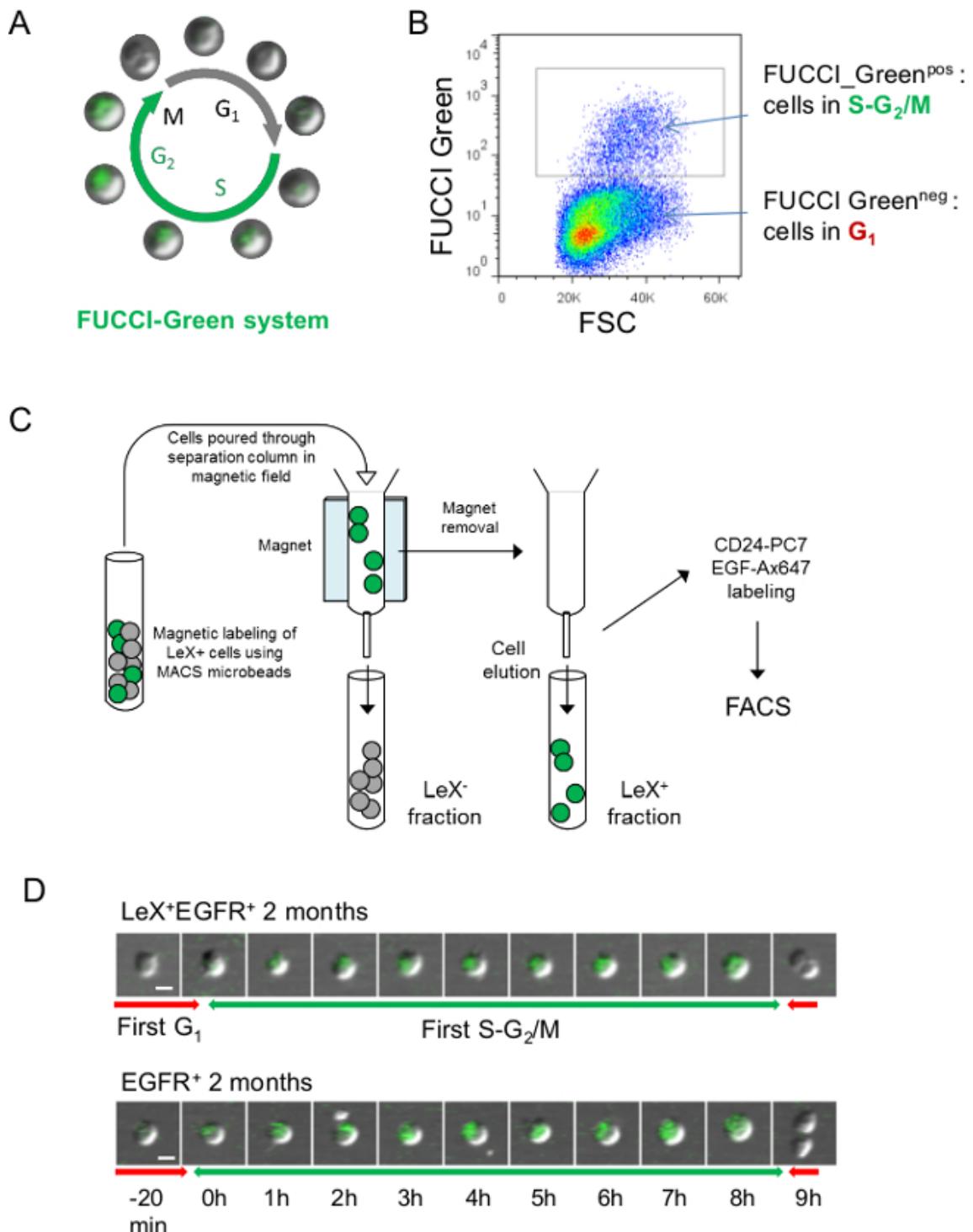
FUCCI-Green mice can also be used to visualize the S-G<sub>2</sub>/M phase with green fluorescence (**Figure 3A,B**) but cells have to be pre-sorted using separation columns as LeX-FITC antibody shared the same emission wavelength than the FUCCI-green fluorescence (**Figure 3C**). An example of FUCCI-green fluorescence for the first S-G<sub>2</sub>/M phase of young adult LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> and EGFR<sup>+</sup> cells is shown in **Figure 3D**.



**Figure 1: Strategy of cell selection by FACS.** (A) Cells were first selected according to their morphology using Side scatter (SSC) vs Forward scatter (FSC) parameters. For further details on morphology gate selection, refer to Daynac et al.<sup>9</sup> (A') Dead cells were labeled using HO marker and excluded from the selection. (A'') Doublets were excluded using pulse width parameter. In order to set up the sorting gates, Fluorescence minus one (FMO) controls for CD24-PC7 (LeX-FITC/FUCCI-Red/EGF-Ax647 labeling; B) and LeX-FITC (FUCCI-Red/EGF-Ax647/CD24-PC7 labeling; B') were used. (C,C') Then, sorting gates were determined in LeX-FITC/FUCCI-Red/EGF-Ax647/CD24-PC7 labeled tubes along with FMO controls. The mean percentages of total cells are represented within the gates. If selecting CD24<sup>+</sup> cells (neuroblasts), be careful to exclude CD24<sup>bright</sup> expressing cells from the gate. Indeed, CD24<sup>bright</sup> correspond to ependymal cells<sup>2,9</sup>. C' represents the CD24 negative cells (black square in C). Only LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> (C') sorting gates were used for this study.



**Figure 2: Live analyses of cell cycle using FUCCI-Red mice.** (A) Schematic representation of FUCCI-Red cell cycle where cells are red-fluorescent during G1 phase and colorless during S-G<sub>2</sub>/M phases<sup>23</sup>. (B) FACS representation of FUCCI-Red fluorescence on SVZ cells. (C, D) Video microscopy with LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells sorted from young (C) and middle-aged (D) FUCCI-Red mice allows the tracking of the G<sub>1</sub> phase with red fluorescence whereas the S-G<sub>2</sub>/M phases can be deduced when the red fluorescence switches off. Successive images are shown with a time scale presented in D. (E) Representative images of colonies (neurospheres) obtained 5 days after plating. Scale bar: 10  $\mu$ m (C, D), 30  $\mu$ m (E). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 3: Strategy for live analyses of cell cycle using FUCCI-Green mice.** (A) Schematic representation of FUCCI-Green cell cycle where cells are green during S-G<sub>2</sub>/M phase and colorless during G<sub>1</sub> phase<sup>23</sup>. (B) FACS representation of FUCCI-Green fluorescence: FUCCI-Green<sup>neg</sup> cells represent the cells in G<sub>1</sub> phase of the cell cycle while FUCCI-Green<sup>pos</sup> cells are cells in S-G<sub>2</sub>/M<sup>23</sup>. (C) In order to follow the green-fluorescent S-G<sub>2</sub>/M phases of LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells, SVZ cells had to be pre-sorted with separation columns. Cells were labeled with anti-mouse LeX antibody and LeX<sup>+</sup> fraction was retained on the column using anti-mouse microbeads (see protocol 4.). Then, LeX<sup>+</sup> and LeX<sup>-</sup> fractions were eluted and labeled with EGF-Ax647 and CD24-PC7 antibodies for FACS sorting. (D) Video microscopy of LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells sorted from young FUCCI-Green mice allows the tracking of the S-G<sub>2</sub>/M phases with green fluorescence. Successive images are shown with a time scale presented in D. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$  (D).

## Discussion

The cell sorting technique described herein allows reliable discrimination between quiescent NSCs, activated NSCs and their progeny enabling studies of their properties and dynamics in the adult brain<sup>9</sup>. Coupled with the FUCCI technology which permits the visualization of cell cycle progression in living cells<sup>23</sup>, we developed a rapid and efficient technique to follow the G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle from young adult and aged mouse brain cells.

The cell sorting technique used in this protocol was the first validated combination of markers allowing the purification of the five main neurogenic populations from the SVZ<sup>9</sup>. It was also the first validated technique enabling the distinction of quiescent and activated NSCs. It is noteworthy that this technique does not require the use of transgenic mice *per se*, which is necessary when adapted to transgenic mouse models such as FUCCI. Since then, Codega *et al.*<sup>10</sup> have used a GFAP-GFP/CD133/EGFR triple labeling combination to distinguish quiescent NSCs from their activated counterpart but it cannot be adapted to FUCCI technology as it requires the use of GFAP-GFP transgenic mice. Mich *et al.*<sup>11</sup> have developed a Glast/EGFR/CD24 triple labeling strategy that shares common results with the technique used in this study<sup>9</sup>. Indeed, a high correlation between LeX and Glast NSCs markers was already observed in Daynac *et al.* study<sup>9</sup>. However, the Glast antibody used in the Mich *et al.* technique is coupled to phycoerythrin and thus cannot be adapted with the use of FUCCI-Red mice.

There are several important technical points that require attention before sorting SVZ cells. First, the dissociation step is very important as the brain tissue has to be dissociated into single cells while preserving the structural integrity of the proteins used for the antibody labeling strategy. 0.05% trypsin-EDTA has been shown to be very effective in dissociating SVZ tissue<sup>27</sup> but the LeX antigen was found to be highly sensitive as almost all LeX-FITC immunofluorescence was lost (data not shown). Thus, papain was used as it was more efficient and less destructive than other proteases on brain tissue. Moreover, neither LeX nor EGFR nor CD24 were affected by papain treatment. It should be noted that the antibody labeling was altered if the papain treatment exceeded 15 min. We obtained optimal results with a 10 min papain treatment associated with a mechanical dissociation (pipette up and down 20 times).

The poly-D-Lysine coating allows culture of adherent cells and the formation of colonies after several days in culture. It is now widely accepted that *in vitro* assays comes with their limitations<sup>28,29</sup>. We recommend determining only the first cell cycle for the cells undergoing at least one subsequent division to stay as close as possible to the *in vivo* cell phenotype.

It is noteworthy to mention that the Geminin (green fluorescence) and Cdt1 (red fluorescence) proteins used to design the FUCCI system<sup>23</sup> were previously shown to be abundantly expressed by neural progenitors during early neurogenesis in mice<sup>30</sup> and in adult brain tissues<sup>9,25</sup>. Although the mKO2-hCdt1(30/120) construct was mainly used in the present study to follow the G<sub>1</sub> phase with red fluorescence, the use of both constructs [mKO2-hCdt1(30/120) and mAG-hGem(1/110)] could be envisioned to allow the visualization of the major phases of the cell cycle (G<sub>1</sub> and S-G<sub>2</sub>/M) as well as the G<sub>1</sub>/S transition<sup>23</sup>. The main drawback of the dual-color imaging is the limited compatible sets of fluorescence that can still be used for the cell labeling. One solution is to use separation columns. For example, we have successfully depleted the CD24-positive fraction from cells using separation columns before cell sorting and live-imaging as we used a CD24-PE antibody that shared the same emission wavelength than the FUCCI-Red fluorescence<sup>25</sup>.

Few studies have investigated the cell cycle length of adult mouse SVZ populations. The total cell cycle length obtained with our technique is close to the one estimated *in vitro* by Costa *et al.*<sup>21</sup>, but we were able for the first time to distinguish the different cell cycle phases. In an *in vivo* study, Ponti *et al.*<sup>22</sup> used the incorporation of thymidine analogs to determine the proliferation dynamics of the different SVZ cell populations. However, they could neither perform a continuous monitoring of the cell cycle nor track the cells at the single-cell level. This could be an issue as it was shown that a strong heterogeneity exists within a given SVZ cell population<sup>22,25</sup>. We describe here an alternative *in vitro* technique, easy to set up, that allows the live imaging of the cell cycle phases of different adult neurogenic populations at a single-cell level.

Understanding the regulation of the cell cycle of neural stem cells and progenitors remains a challenge for the development of new therapeutic approaches in the context of aging or brain pathologies. Our protocol can thus have a wide range of applications. In the context of aging, this technique could also prove useful to understand the effects of aging on NSCs differentiation. Indeed, it is possible to identify neural stem/progenitor cells entering differentiation as their red fluorescent intensity is distinctively higher<sup>26</sup>. Finally, it could also be of interest to exploit the continuous live imaging at a single-cell level to study the cell intrinsic and extrinsic processes responsible for the lineage progression of adult NSCs.

## Disclosures

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

We are indebted to C Joubert, V Neuville, V Barroca, J Tilliet and all the staff of animal facilities; to J Baijer and N Dechamps for cell sorting; O. Etienne for technical assistance, and A. Gouret for her administrative assistance. Flow cytometry and cell sorting were carried out at the iRCM Flow Cytometry Shared Resource, established by equipment grants from DIM-Stem-Pôle, INSERM, Fondation ARC, and CEA. This work was supported by grants of Electricité de France (EDF). M.D. has a fellowship from La Ligue Contre le Cancer and L.M. from Région Ile-de-France (DIM Biothérapies). Marc-André Mounthon and François D. Boussin share co-senior authorship.

## References

1. Morshead, C. M., et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*. **13**, 1071-1082 (1994).
2. Pastrana, E., Cheng, L. C., Doetsch, F. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci USA*. **106**, 6387-6392 (2009).
3. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia Verdugo, J. M., Alvarez Buyla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. **97**, 703-716 (1999).
4. Kriegstein, A., Alvarez Buyla, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. **32**, 149-184 (2009).
5. Lois, C., Garcia Verdugo, J. M., Alvarez Buyla, A. Chain migration of neuronal precursors. *Science*. **271**, 978-981 (1996).
6. Fuentealba, L. C., Obernier, K., Alvarez Buyla, A. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell stem cell*. **10**, 698-708 (2012).
7. Rietze, R. L., et al. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature*. **412**, 736-739 (2001).
8. Fischer, J., et al. Prospective isolation of adult neural stem cells from the mouse subependymal zone. *Nat Protoc*. **6**, 1981-1989 (2011).
9. Daynac, M., et al. Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. *Stem Cell Res*. **11**, 516-528 (2013).
10. Codega, P., et al. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron*. **82**, 545-559 (2014).
11. Mich, J. K., et al. Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *Elife*. **3**, e02669 (2014).
12. Capela, A., Temple, S. LeX ssea 1 is expressed by adult mouse CNS stem cells identifying them as nonependymal. *Neuron*. **35**, 865-875 (2002).
13. Calaora, V., Chazal, G., Nielsen, P. J., Rougon, G., Moreau, H. mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience*. **73**, 581-594 (1996).
14. Pineda, J. R., et al. Vascular derived TGF-beta increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO Mol Med*. **5**, 548-562 (2013).
15. Lugert, S., et al. 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 (2010).
16. Blackmore, D. G., Golmohammadi, M. G., Large, B., Waters, M. J., Rietze, R. L. Exercise increases neural stem cell number in a growth hormone dependent manner augmenting the regenerative response in aged mice. *Stem cells*. **27**, 2044-2052 (2009).
17. Bouab, M., Paliouras, G. N., Aumont, A., Forest Berard, K., Fernandes, K. J. Aging of the subventricular zone neural stem cell niche evidence for quiescence associated changes between early and mid adulthood. *Neuroscience*. **173**, 135-149 (2011).
18. Enwere, E., et al. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling diminished olfactory neurogenesis and deficits in fine olfactory discrimination. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*. **24**, 8354-8365 (2004).
19. Maslov, A. Y., Barone, T. A., Plunkett, R. J., Pruitt, S. C. Neural stem cell detection characterization and age related changes in the subventricular zone of mice. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*. **24**, 1726-1733 (2004).
20. Tropepe, V., Craig, C. G., Morshead, C. M., van der Kooy, D. Transforming growth factor alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*. **17**, 7850-7859 (1997).
21. Costa, M. R., et al. Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development*. **138**, 1057-1068 (2011).
22. Ponti, G., et al. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**, 1045-1054 (2013).
23. Sakaue Sawano, A., et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell cycle progression. *Cell*. **132**, 487-498 (2008).
24. Azari, H., Rahman, M., Sharififar, S., Reynolds, B. A. Isolation and expansion of the adult mouse neural stem cells using the neurosphere assay. *Journal of visualized experiments JoVE*. (2010).
25. Daynac, M., et al. TGFbeta lengthens the G1 phase of stem cells in aged mouse brain. *Stem cells*. **32**, 3257-3265 (2014).
26. Roccio, M., et al. Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. *Development*. **140**, 459-470 (2013).
27. Walker, T. L., Kempermann, G. One mouse two cultures isolation and culture of adult neural stem cells from the two neurogenic zones of individual mice. *Journal of visualized experiments JoVE*. e51225 (2014).
28. Reynolds, B. A., Rietze, R. L. Neural stem cells and neurospheres re evaluating the relationship. *Nat Methods*. **2**, 333-336 (2005).
29. Pastrana, E., Silva Vargas, V., Doetsch, F. Eyes wide open a critical review of sphere formation as an assay for stem cells. *Cell stem cell*. **8**, 486-498 (2011).
30. Spella, M., et al. Licensing regulators Geminin and Cdt1 identify progenitor cells of the mouse CNS in a specific phase of the cell cycle. *Neuroscience*. **147**, 373-387 (2007).

**Materials List for:****Cell Sorting of Neural Stem and Progenitor Cells from the Adult Mouse Subventricular Zone and Live-imaging of their Cell Cycle Dynamics**

Mathieu Daynac<sup>\*1,2,3,4,5</sup>, Lise Morizur<sup>1,2,3,4</sup>, Thierry Kortulewski<sup>1,2,3,4</sup>, Laurent R. Gauthier<sup>1,2,3,4</sup>, Martial Ruat<sup>5</sup>, Marc-André Mounthon<sup>1,2,3,4</sup>, François D. Boussin<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>CEA DSV iRCM SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, UMR 967

<sup>2</sup>INSERM, UMR 967

<sup>3</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967

<sup>4</sup>Université Paris Sud, UMR 967

<sup>5</sup>CNRS, Université Paris Sud, UMR 9197, Neuroscience Paris-Saclay Institute, Molecules Circuits Department

\*These authors contributed equally

Correspondence to: Mathieu Daynac at [mathieu.daynac@cea.fr](mailto:mathieu.daynac@cea.fr), Lise Morizur at [lise.morizur@cea.fr](mailto:lise.morizur@cea.fr), Marc-André Mounthon at [marc-andre.mounthon@cea.fr](mailto:marc-andre.mounthon@cea.fr), François D. Boussin at [boussin@cea.fr](mailto:boussin@cea.fr)

URL: <http://www.jove.com/video/53247>

DOI: [doi:10.3791/53247](https://doi.org/10.3791/53247)

## Materials

Name	Company	Catalog Number	Comments
96-well uncoated glass bottom culture plates	MatTek Corp.	P96G-1.5-5-F	
μ-Plates 96-well	Ibidi	89626	
Poly-D-Lysine	Millipore	A003E	
NeuroCult NSC Basal Medium	STEMCELL Technologies	5700	
NeuroCult NSC Proliferation Supplement	STEMCELL Technologies	5701	
Heparin	STEMCELL Technologies	7980	
EGF	Millipore	GF144	
FGF-2	Millipore	GF003	
Papain	Worthington	LS003119	
EBSS	Invitrogen	24010-043	
L-cysteine	Sigma	C-7352	
0.5M EDTA, pH 8.0	Promega	V4231	
DNase I	Sigma	D5025-15KU	
Trypsin inhibitor type II	Sigma	T9128	Ovomucoid
DMEM:F12 medium	Life Technologies	31330-038	
20 μm filter	BD Medimachine Filcon	340622	
Eppendorf microtubes 3810X	Sigma	Z606340-1000EA	
BSA	Sigma	A1595	Bovine serum albumin solution
CD24 phycoerythrin-cyanine7 conjugate [PC7]	Life Technologies	A14776	Mouse IgM; clone MMA. 1:50
CD15/LeX fluorescein isothiocyanate [FITC] - conjugated	BD Biosciences	332778	Rat IgG2b; clone M1/69. 1:50
Mouse anti-human LeX antibody	BD Pharmingen	559045	Mouse IgM; clone MAM. 1:50
Alexa647 - conjugated EGF ligand	Life Technologies	E35351	1:200; Ax647-conjugated EGF ligand in the text
CompBeads	BD Biosciences	644204	
MACS LS separation columns	Miltenyi Biotec	130-042-401	separation columns (in the manuscript)

Anti-mouse IgM microbeads	Miltenyi Biotec	130-047-301	
Hoechst 33258	Sigma	861405	HO (in the manuscript)
INFLUX cell sorter	BD Biosciences		FACS sorter (in the text)
Nikon A1R confocal laser scanning microscope system attached to an inverted ECLIPSE Ti	Nikon Corp.		confocal laser scanning microscope (in the manuscript)
NIS-Elements AR.4.13.01 64-bit software	Nikon Corp.		NIS-Elements software (in the manuscript)
Plan Apo VC 20x DIC objective (NA: 0.75)	Nikon Corp.		
ECLIPSE Ti thermostated chamber	Nikon Corp.		thermostated chamber (in the manuscript)
ImageJ	RBS		
FlowJo	Tree Star, Ashland, OR		
FUCCI mice	RIKEN BioResource Center, JAPAN		Sakaue-Sawano et al. 2008



## **ARTICLE 2**

### **TGF $\beta$ lengthens the G1 phase of stem cells in aged mouse brain**

Mathieu Daynac, Jose R. Pineda, Alexandra Chicheportiche, Laurent R. Gauthier, Lise Morizur, François D. Boussin, Marc-André Moushon

Publié dans **Stem Cells (2014)**



## Résumé de l'article 2

Bien que la neurogenèse persiste à l'âge adulte le long des ventricules latéraux et au niveau du gyrus dentelé de l'hippocampe, elle décline fortement avec le vieillissement (Seki and Arai, 1995; Kuhn et al., 1996; Enwere et al., 2004; Bouab et al., 2011). Ce déclin est directement lié à une réduction progressive du nombre de cellules en prolifération (Kuhn et al., 1996; Tropepe et al., 1997; Enwere et al., 2004; Luo et al., 2006; Tanaka et al., 2007; Ben Abdallah et al., 2010), essentiellement due à la diminution du nombre de progéniteurs neuronaux (Enwere et al., 2004; Maslov et al., 2004; Bouab et al., 2011; Piccin et al., 2014). Des résultats contradictoires ont été rapportés quant à la nature exacte des cellules concernées par cette diminution : tandis que certaines études rapportent un déclin avec l'âge du nombre de CSN (Maslov et al., 2004; Shook et al., 2012), d'autres n'observent pas de différence (Piccin et al., 2014). Ces différences peuvent s'expliquer par les limitations expérimentales inhérentes aux méthodes de culture cellulaire utilisées (Pastrana et al., 2011), et par la difficulté à distinguer et à déterminer le nombre de CSN *in situ* le long des ventricules. A l'aide de la technique de tri cellulaire décrite dans l'article 1, nous avons cherché à mieux caractériser les populations cellulaires de la ZSV touchées par le vieillissement et à comprendre les mécanismes moléculaires associés.

Nous avons regardé dans un premier temps si les différentes populations cellulaires de la ZSV étaient modifiées chez des souris âgées de 2 mois et de 12 mois. Alors que le nombre de CSN quiescentes et activées reste constant à 12 mois, nous observons une forte diminution du nombre de cellules de la progénie neurale avec une perte de 75,4% des progéniteurs intermédiaires, de 84,5% des neuroblastes immatures et de 65,7% des neuroblastes. Parallèlement, nous montrons que la prolifération des CSN activées est drastiquement diminuée à 12 mois avec un contenu en ADN > 2N qui passe de 31,4% à 2 mois à seulement 2,9% à 12 mois. Comparativement, la prolifération des progéniteurs intermédiaires et des neuroblastes n'est que légèrement atténuée. Par ailleurs, la diminution de la prolifération des CSN activées est associée à un rallongement spécifique de la durée de leur cycle cellulaire, qui est reflétée par la plus petite taille des

neuroosphères formées en culture. Afin de visualiser plus en détail les perturbations du cycle des CSN activées à 12 mois, nous avons ensuite utilisé des souris transgéniques FUCCI-Rouge qui permettent de suivre en temps réel la progression des cellules dans la phase G<sub>1</sub> avec l'émission d'une fluorescence rouge (Sakaue-Sawano et al., 2008). Nous observons un allongement spécifique de la durée de la phase G<sub>1</sub> des CSN activées à 12 mois, sans que le reste du cycle ne soit modifié. Pris dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que la dérégulation du cycle cellulaire des CSN, et non la diminution de leur nombre, pourrait être responsable du déclin de la neurogenèse avec l'âge.

Nous avons ensuite cherché à comprendre quels pourraient être les mécanismes moléculaires responsables de la diminution de la prolifération des CSN activées. Nous avons dans un premier temps regardé s'il existait une raison intrinsèque aux CSN en suivant l'expression des CdKi (cyclin-dependent kinase inhibitors) par qRT-PCR à 2 mois et à 12 mois. De manière intéressante, l'expression des régulateurs du cycle cellulaire de la famille Ink4 (p16, p18, p19) et de la famille Cip/Kip (p21, p27, p57) n'est pas modifiée entre 2 mois et 12 mois dans les CSN activées et les progéniteurs intermédiaires. Nous sommes par la suite partis de l'hypothèse selon laquelle une modification du microenvironnement de la niche, et donc un facteur extrinsèque, pourrait participer à l'apparition d'un déficit prolifératif dans les CSN. Nous avions déjà observé au sein du laboratoire que l'augmentation de la production de TGF $\beta$ 1 par les cellules endothéliales de la ZSV chez des souris âgées de 24 mois diminuait la prolifération des CSN (Pineda et al., 2013). Nous montrons que l'ajout de TGF $\beta$ 1 en culture allonge spécifiquement la durée de la phase G<sub>1</sub> des CSN activées et des progéniteurs intermédiaires issus de souris de 2 mois. De plus, le blocage pharmacologique de la voie du TGF $\beta$  par un inhibiteur sélectif du récepteur TGF $\beta$ R1 *in vitro*, et par l'administration intraveineuse *in vivo* d'un anticorps neutralisant dirigé contre le TGF $\beta$ , diminue la durée de la phase G<sub>1</sub> des CSN activées à 12 mois, sans toutefois perturber le cycle des progéniteurs intermédiaires. Ainsi, la voie du TGF $\beta$  est impliquée dans la dérégulation du cycle cellulaire des CSN activées via l'allongement spécifique de la durée de la phase G<sub>1</sub>.

Ces données montrent que le stock de CSN adultes au niveau de la ZSV reste constant au cours du vieillissement. Cependant, on observe une forte diminution de la prolifération des CSN activées associée à un rallongement de la durée de la phase G<sub>1</sub>. Ceci semble être l'une des causes de la perte des progéniteurs neuraux, et donc de la diminution de la neurogenèse au cours du temps. De plus, la voie du TGF $\beta$  apparaît comme un acteur clé dans cette dérégulation du cycle cellulaire des CSN activées. Il serait intéressant de voir si la mise en place d'un traitement anti-TGF $\beta$  chez des souris âgées permet de restaurer les fonctions cognitives altérées en stimulant les CSN endogènes.



## TGF $\beta$ Lengthens the G1 Phase of Stem Cells in Aged Mouse Brain

MATHIEU DAYNAC,<sup>a,b,c,d</sup> JOSE R. PINEDA,<sup>a,b,c,d</sup> ALEXANDRA CHICHEPORTICHE,<sup>a,b,c,d</sup>  
LAURENT R. GAUTHIER,<sup>a,b,c,d</sup> LISE MORIZUR,<sup>a,b,c,d</sup> FRANÇOIS D. BOUSSIN,<sup>a,b,c,d</sup>  
MARC-ANDRÉ MOUTHON<sup>a,b,c,d</sup>

**Key Words.** Neural stem cells • Neurogenesis • Cell cycle • Flow cytometry • Aging • TGF-beta

<sup>a</sup>CEA DSV iRCM SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>b</sup>INSERM, U967, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>c</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>d</sup>Université Paris Sud, UMR 967, Fontenay-aux-Roses, France.

Correspondence: Marc-André Mouthon, Ph.D., CEA, DSV, iRCM, SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, BP n°6, 92265 Fontenay-aux-Roses cedex, France. Telephone: 33-1-46-54-94-61; Fax: 33-1-46-54-91-80; e-mail: marc-andre.mouthon@cea.fr; or François Boussin, Ph.D., CEA, DSV, iRCM, SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, BP n°6, 92265 Fontenay-aux-Roses cedex, France. Telephone: 33-1-46-54-94-61; Fax: 33-1-46-54-91-80; e-mail: boussin@cea.fr

Received February 21, 2014; accepted for publication July 1, 2014; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* August 7, 2014.

© AlphaMed Press  
1066-5099/2014/\$30.00/0

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.1815>

### ABSTRACT

Neurogenesis decreases during aging causing a progressive cognitive decline but it is still controversial whether proliferation defects in neurogenic niches result from a loss of neural stem cells or from an impairment of their progression through the cell cycle. Using an accurate fluorescence-activated cell sorting technique, we show that the pool of neural stem cells is maintained in the subventricular zone of middle-aged mice while they have a reduced proliferative potential eventually leading to the subsequent decrease of their progeny. In addition, we demonstrate that the G1 phase is lengthened during aging specifically in activated stem cells, but not in transit-amplifying cells, and directly impacts on neurogenesis. Finally, we report that inhibition of TGF $\beta$  signaling restores cell cycle progression defects in stem cells. Our data highlight the significance of cell cycle dysregulation in stem cells in the aged brain and provide an attractive foundation for the development of anti-TGF $\beta$  regenerative therapies based on stimulating endogenous neural stem cells. *STEM CELLS* 2014;32:3257–3265

### INTRODUCTION

The production of new neurons, a process termed neurogenesis, persists during adulthood and is ensured by neural stem cells (NSCs) that are located in restricted regions of the mammalian brain: the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus in the hippocampus and the subventricular zone (SVZ) lining the lateral ventricles. In the adult SVZ, NSCs successively give rise to transit-amplifying cells (TACs) and to neuroblasts that migrate in chains to the olfactory bulbs (OB), where they differentiate into neurons and contribute to olfactory functions [1, 2].

Neurogenesis is greatly reduced during aging in rodents in both SGZ and SVZ correlating with some age-associated cognitive deficits [3, 4]. Remarkably, deficit in odor memory is already apparent at mid-age in mice, that is, 12 months old, and is correlated with a lower number of neurons in the OBs [5]. Many studies demonstrate that neurogenesis decline is due to the decrease in proliferation of NSCs and TACs observed in middle-aged mice and ultimately resulting in a dramatic reduction in elderly mice (i.e., 24 months old) [4, 6–8].

Progenitors from middle-aged mice presented a twofold decrease in the capacity to form neurospheres [7]. However, neural progenitors isolated from aged mouse SVZ retain

their in vitro capacity to proliferate and differentiate into functional neurons, similarly to progenitors from young adult mice, albeit with a lower efficacy [6, 7, 9, 10].

Conversely, proliferation of NSCs is altered during aging but it is still not known whether proliferation decline results from a loss of NSCs or from an impairment of their proliferation. Recent studies have proposed the transition of proliferating NSCs to a quiescent state [8, 11]. The decrease in proliferating NSCs could be explained by an exhaustion of their pool [10, 12]. Indeed, studies suggest that NSCs may be programmed for a limited number of divisions with a limited self-renewal capacity [13, 14]. In addition, conflicting results concerning the lengthening of the cell cycle during aging were obtained [4, 6].

Aging-associated decrease in EGFR signaling, a major pathway for NSC proliferation [15], has been reported in old neural progenitors [6, 7]. Recently, we have shown that the increase in TGF $\beta$  in middle-aged mice is an inhibitory signal for NSC proliferation in SVZ niches [16]. Interestingly, the blockade of TGF $\beta$  signaling increases NSC proliferation and allows neurogenesis to efficiently recover in the SVZ of aged mice [16]. Although age-related neurogenesis decline involves the alteration of the neurogenic niche, an important question that remains unanswered concerns

whether there is a decline in NSC pool or in their proliferation capacity. Resolving which of these regulatory mechanisms is involved, or whether there is a relative contribution of all elements, is a prerequisite for stimulation of NSCs in aged individuals.

Neural progenitors are maintained owing to relatively quiescent NSCs that can enter the cell cycle and convert into EGFR-expressing activated NSCs, particularly when SVZ repopulate after depletion from proliferating cells [1]. The detection by fluorescence-activated cell sorting (FACS) of EGFR expression combined with NSC markers has been successfully used to distinguish the various NSC populations and their progeny in the SVZ, as well as, to sort prospectively these populations [17, 18]. Herein, we observed that the pools of quiescent and activated NSCs remained unaltered in the SVZ from middle-aged mice. Furthermore, we demonstrate that the decrease in proliferation during aging in the SVZ roots in the lengthening of the G1 phase of activated NSCs through a TGF $\beta$ -dependent mechanism.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Young adult (2 months) and middle-aged (12 months) C57BL/6 mice were used in this study. The animals were maintained with access to food and water ad libitum in a colony room kept at a constant temperature (19°C–22°C) and humidity (40%–50%) on a 12:12 hours light/dark cycle. For cell cycle analysis, transgenic fluorescence ubiquitination cell cycle indicator (FUCCI) chromatin licensing and DNA replication factor 1 (Cdt1)-red mice with a C57BL/6 genetic background were used [19]. Animal experiments were performed in compliance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and were approved by our institution's ethics committee (CETEA 11-003).

### Anti-TGF $\beta$ Treatments

In vivo treatment involved intravenous administration of an antibody that neutralizes all TGF $\beta$ -1, -2, -3 forms (mAb1835, R&D, Lille, France, <http://www.rndsystems.com/distributors.aspx>) as previously described [16]. Fifty micrograms/injection per mice of anti-TGF $\beta$  neutralizing antibody diluted in 50  $\mu$ l of NaCl 0.9% were administered retro-orbitally under Ketamine-Medetomidine anesthesia 12 hours and 1 hour before sacrifice. For in vitro treatment, SB-505124 (1  $\mu$ M, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France, <http://www.sigmaldrich.com/france/contactez-nous.html>), a selective T $\beta$ RI inhibitor, was added to freshly plated cells.

### Preparation of SVZ Cells and FACS

Lateral ventricle walls containing cells from the SVZ were micro-dissected under a binocular dissection microscope and collected in a cold 0.6% glucose/PBS solution. SVZ cells were incubated for 10 minutes at 37°C with papain and then dissociated into single-cell suspensions by flushing the cells through a p1000 micropipette tip, as previously described [18]. For DNA content analysis, dissociated cells were incubated for 1 hour 30 minutes at 37°C with 5  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France, <http://www.sigmaldrich.com/france/contactez-nous.html>) in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12

medium supplemented with 2% B27 [20]. Then, the cells were washed in PBS containing 0.15% bovine serum albumin. For mouse cell-surface marker analysis, we used CD24 phycoerythrin-conjugated (rat IgG2b; 1:50 BD Biosciences, Le Pont de Claix, France, <https://www.bd.com/fr/contact/>), CD15/LeX fluorescein isothiocyanate-conjugated (mouse IgM; 1:50 BD Biosciences, Le Pont de Claix, France, <https://www.bd.com/fr/contact/>), and Alexa647-conjugated epidermal growth factor (EGF) ligand (1:200, Life Technologies, Saint Aubin, France, <http://www.lifetechnologies.com/fr/fr/home/technical-resources/contact-us.html>). Antibodies were titrated over a semi-log scale to determine the appropriate dilution in the PBS/0.15% bovine albumin serum solution and then incubated at 4°C for 25 minutes. The cells were washed prior to sorting or analysis. The cells were transferred to tubes containing a calibrated number of fluorescent beads (Trucount tubes; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France, <https://www.bd.com/fr/contact/>) enabling the determination of their absolute count. Prior to FACS sorting with FUCCI Red mice, the CD24-negative fraction was depleted of CD24 $^+$  cells using MACS LD separation columns (Miltenyi Biotec, Paris, France, <http://www.miltenyibiotec.com/en/about-us/locations/europe/france.aspx>). Immediately prior to FACS, propidium iodide or the nonvital Hoechst 33258 was added to a final concentration of 2  $\mu$ g/ml to label dead cells. The cells were analyzed on a LSRII (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France, <https://www.bd.com/fr/contact/>) and sorted on an INFLUX (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France, <https://www.bd.com/fr/contact/>) as previously reported [18]. Sorting gates were drawn according to fluorescence minus one (FMO) controls. The data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

### TGF $\beta$ Binding Assay

Binding with TGF $\beta$  was performed after the immunostaining using the Human TGF-beta 1 Biotinylated Fluorokine Kit as recommended by the provider (R&D, Lille, France, <http://www.rndsystems.com/distributors.aspx>). Streptavidin-PECy7 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France, <https://www.bd.com/fr/contact/>) was used to detect Biotinylated TGF $\beta$ 1. Cells were analyzed on a LSRII (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France, <https://www.bd.com/fr/contact/>). Dead cells excluded using the nonvital Hoechst 33258 as above. TGF $\beta$  binding was expressed as the mean fluorescence intensity relative to the negative control (FMO PECy7).

### Live Cell Imaging

Freshly sorted cells were plated at a density of 1–3  $\times$  10<sup>3</sup> cells/well in poly(D-Lysine)- (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France, <http://www.sigmaldrich.com/france/contactez-nous.html>) coated 24-well glass-bottomed culture plates (MatTek, Corp., Ashland, MA). The culture medium was composed of NeuroCult medium (STEMCELL Technologies, Grenoble, France, <http://www.stemcell.com/en>Contact-Us.aspx>) complemented with proliferation supplements (STEMCELL Technologies, Grenoble, France, <http://www.stemcell.com/en>Contact-Us.aspx>), 2  $\mu$ g/ml heparin, 20 ng/ml EGF, and 10 ng/ml FGF-2. Brightfield and fluorescent images for Cdt1-red were captured through a Plan Apo VC  $\times$ 20 DIC objective (NA: 0.75) on a Nikon A1R confocal laser scanning microscope system attached to an inverted ECLIPSE Ti (Nikon, Corp., Tokyo, Japan) thermostated at 37°C under 5% of CO<sub>2</sub>.

atmosphere. FUCCI Red fluorescence was excited at 561 nm and collected using a 595/50 nm filter set. Images were acquired using high speed resonant scanner at  $512 \times 512$  pixels format with a resolution equals to  $1.26 \mu\text{m}/\text{pixel}$  in xy. A square region of  $7 \times 7 \text{ mm}^2$  was photographed for each well. Live imaging started 20 hours after plating. Single-cell tracking was performed over periods of up to 24 hours with images taken at 20 minutes intervals in order to follow the fate of individual cells. The measurement of the cell cycle length was performed on the second division enabling the visualization of the entire cell cycle. Cell cycle length was also determined for following divisions for the cells undergoing at least one subsequent division, that is, the last cell cycle was not taken into account. When using FUCCI mice, the red fluorescence indicated that the cells were in G1 phase of the cell cycle [19]. Images and time-lapse video were analyzed with ImageJ and NIS-Elements AR.13.00 64-bit softwares.

### RNA Isolation and qRT-PCR

After sorting, cells were immediately lysed using lysis (RLT) buffer (QIAGEN, Courtaboeuf, France, <http://www.qiagen.com/about-us/contact/ordering-global/ordering-france/>). Total RNA was isolated with the RNeasy MICRO kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France, <http://www.qiagen.com/about-us/contact/ordering-global/ordering-france/>) according to the manufacturer's instructions.

Q-PCR was performed on an ABI PRISM 7900 Sequence Detector System using SYBR Green for RT-PCR. cDNA was synthesized using the Reverse Transcription High Capacity Master Mix (Applied Biosystems, Saint Aubin, France, <http://www.lifetechnologies.com/fr/fr/home/technical-resources/contact-us.html>) with specific primers (Supporting Information Table S1). Expression levels were normalized to GAPDH.

### Statistical Analyses

Nonparametric tests were conducted using StatView5 software (SAS Institute, Inc., Cary, NC); the Kruskal-Wallis test associated with Dunn's multiple comparison test was used for multiple comparisons, and the Mann-Whitney *U* test was used for two comparisons. The statistical significance was set at  $p < .05$ . The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

## RESULTS

### Proliferative Defect of NSCs in the SVZ of Middle-Aged Mice

Aging associated decrease in proliferating cells and neuroblasts has been reported in the SVZ of middle-aged mice [8, 12]. The total number of cells freshly dissociated from SVZ, estimated by FACS thanks to vials containing calibrated beads, was reduced by twofold in middle-aged (12 months) mice in comparison to young adults (2 months) ( $48.1 \text{ vs. } 87.4 \times 10^3/\text{mouse}$ ;  $p = .001$ ). In order to determine more precisely at which steps of the neurogenesis process this decrease occurs, we quantified NSCs and their progeny in the SVZ using our recently published FACS method [18] allowing the identification of quiescent NSCs ( $\text{LeX}^{\text{bright}}$ ), activated NSCs ( $\text{LeX-EGFR}^+$ ), TACs ( $\text{EGFR}^+$ ), immature neuroblasts ( $\text{CD24}^+\text{EGFR}^+$ ), and migrating neuroblasts ( $\text{CD24}^+$ ) (Supporting Information

Fig. S1). The cell fractions containing TACs ( $\text{EGFR}^+$ ), immature neuroblasts ( $\text{CD24}^+\text{EGFR}^+$ ) and neuroblasts ( $\text{CD24}^+$ ) were dramatically reduced in middle-aged mice by 75.4%, 84.5%, and 65.7%, respectively (Fig. 1C–E). By contrast, the cell fractions containing quiescent and activated NSCs, that is, respectively,  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  and  $\text{LeX}^+\text{EGFR}^+$ , were not altered, indicating that the pool of NSCs is not affected in middle-aged mice in contrary to their progeny (Fig. 1A, 1B). The proliferation status of these different SVZ populations was then determined by their DNA content using the vital DNA marker Hoechst 33342 [20]. In accordance with their quiescent status, almost none  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  NSCs had a DNA content  $> 2N$  in both young and middle-age mice (Fig. 1F). Conversely, the percentage of cells with a DNA content  $> 2N$  was dramatically decreased between 2 and 12 months in the SVZ cells fractions containing activated NSCs (Fig. 1G), but it was only slightly reduced in TACs and neuroblasts fractions (Fig. 1H–J).

Then, we sorted  $\text{LeX}^+\text{EGFR}^+$  and  $\text{EGFR}^+$  cells to analyze their capacity to generate neurospheres and to determine the expression of EGFR mRNA. As expected from the DNA content analysis, the number of neurospheres formed after 7 days was decreased for  $\text{LeX}^+\text{EGFR}^+$  cells in middle-aged mice as compared to young mice whereas it was not altered for  $\text{EGFR}^+$  cells (Supporting Information Fig. S2A). Of note, these cell cycle alterations were not due to the alteration of EGFR expression in middle-aged  $\text{LeX}^+\text{EGFR}^+$  and  $\text{EGFR}^+$  cells (Supporting Information Fig. S2B). Altogether, these data suggest that rather than a decrease of their pool, activated NSCs have a proliferation defect in middle-aged mice, eventually leading to the subsequent decrease of their progeny.

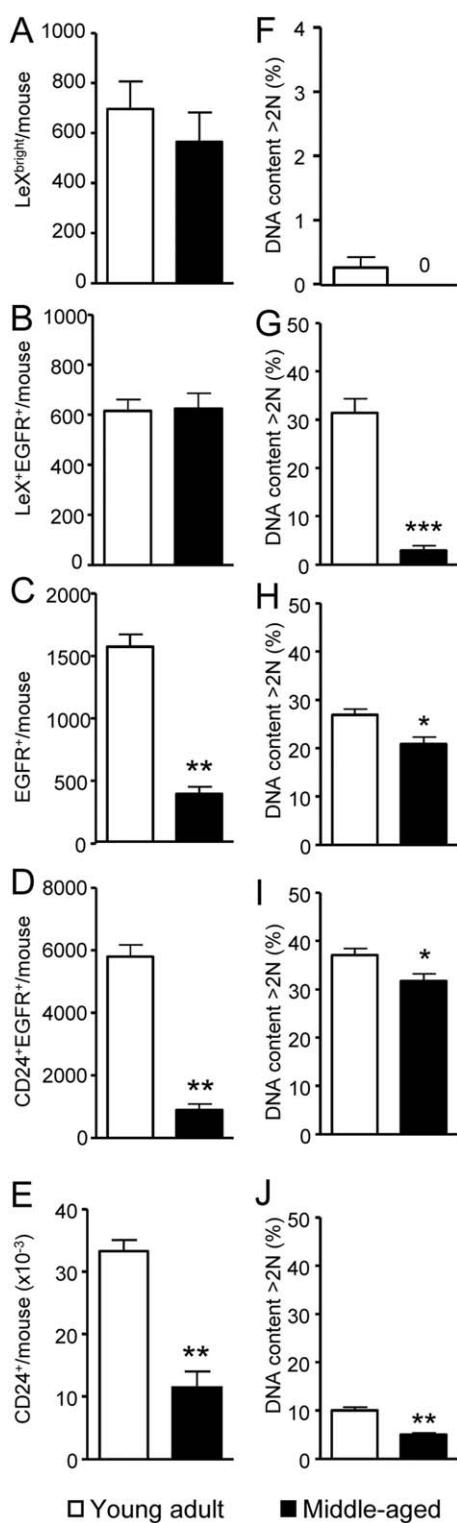
### Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Are Not Altered During Aging in Activated NSCs

Cyclin-dependent kinase inhibitors (cdki) block cell cycle progression at specific stages and have been involved in quiescence and senescence of NSCs [21, 22]. The expression of cdki was therefore assessed by qRT-PCR in sorted  $\text{LeX}^+\text{EGFR}^+$  and in sorted  $\text{EGFR}^+$  cells. Genes of the Ink4 family (p16, p18, and p19) and the Cip/Kip family (p21, p27, and p57) were expressed at similar levels in  $\text{LeX}^+\text{EGFR}^+$  and  $\text{EGFR}^+$  cells. Moreover, their expression was not altered in middle-aged mice (Supporting Information Fig. S5) strongly arguing that they are not associated with age-related proliferation defects of activated NSCs and TACs.

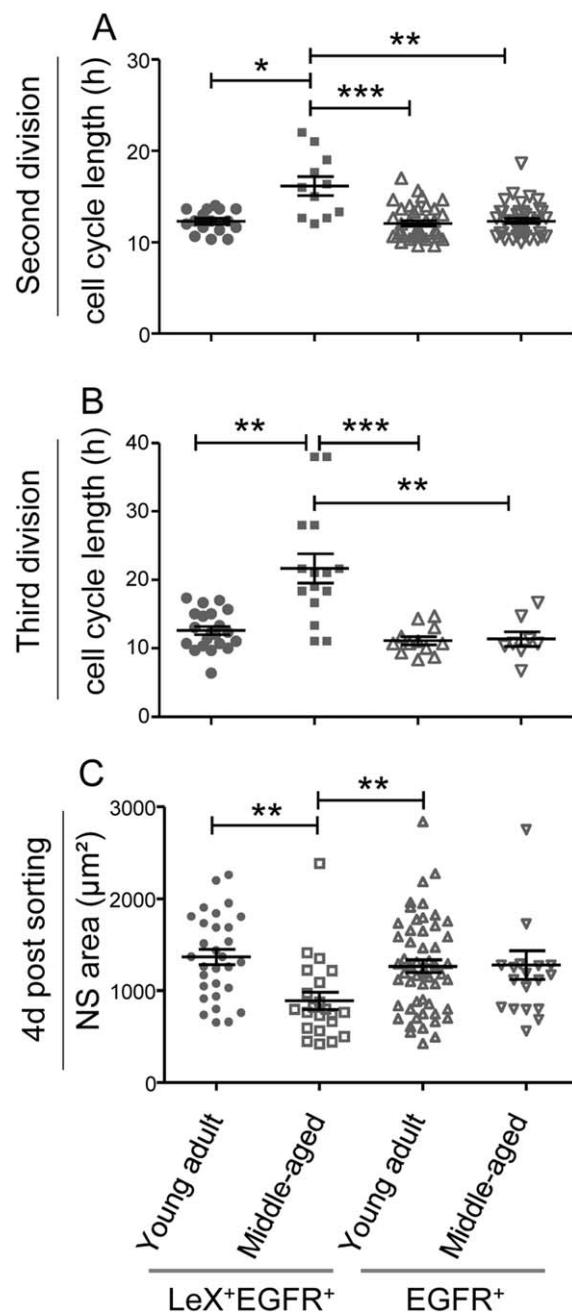
### Aging Lengthens G1 Phase of Activated NSCs

Thereafter, we analyzed the cell cycle progression of  $\text{LeX-EGFR}^+$  and  $\text{EGFR}^+$  cells isolated from young and middle-aged mice by time-lapse videomicroscopy. This could not be done with quiescent  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  NSCs since these cells do not proliferate in vitro [18].  $\text{LeX}^+\text{EGFR}^+$  and  $\text{EGFR}^+$  cells were cultured on poly(D-lysine) substrate in the presence of EGF and FGF-2 that markedly enhance symmetric cell division and maintained NSCs in an undifferentiated state for several divisions [23].

Assuming that it would be unreliable to follow completely the first division as cells are not synchronized, the cell cycle length was determined for the second (Fig. 2A) and third (Fig. 2B) divisions for cells that underwent at least another subsequent division to exclude any alteration due to cell cycle exit.  $\text{EGFR}^+$  cells had a cell cycle length of



**Figure 1.** Neural stem cells (NSCs) maintain their pool until mid-age but present a proliferative defect. **(A-E):** Quantification of the five different subventricular zone (SVZ) populations of NSCs and their progeny by fluorescence-activated cell sorting using TrueCount microbeads calibrated tubes in young and middle-aged mice. **(F-J):** The proliferating fraction (DNA content >2N) was determined for each SVZ population using the vital DNA marker Hoechst 33342. Data are represented as the mean  $\pm$  SD obtained from 7 (2 months) and 5 (12 months) independent experiments. \*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ .



**Figure 2.** Neural stem cell divisions are lengthened during aging. LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> and EGFR<sup>+</sup> cells were sorted by fluorescence-activated cell sorting from young and middle-aged mice then the length of the second **(A)** and the third **(B)** divisions was determined by time-lapse videomicroscopy. **(C):** Colony size was measured 4 days after plating, which gives an estimate of the amount of generated cells. Data are represented as the mean  $\pm$  SD obtained from analyses of cells isolated from two independent groups of minimum five mice. \*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ .

$12.1 \pm 1.8$  hours for young mice that is consistent with previous data obtained in vitro [23]. The cell cycle length of EGFR<sup>+</sup> cells was not altered during aging and similar results were obtained for the third division (Fig. 2A, 2B). The division length was of  $12.3 \pm 1.8$  hours for LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> cells (Fig. 2A) which is close to the 12.5 hours estimated by Costa

et al. [23] but shorter than the  $17.2 \pm 0.6$  hours reported in the absence of growth factor [23]. The division of LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells was lengthened during aging reaching  $16.2 \pm 3.4$  hours for middle-aged mice (Fig. 2A). A comparable slowdown of the cell cycle for LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells was observed for the subsequent division (Fig. 2B).

Cultures were followed until the fourth day and the colony size was measured giving an estimate of the amount of generated cells. As expected from a similar cell cycle length, young, and middle-aged EGFR<sup>+</sup> cells, as well as, young LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells generated colonies with a similar size (Fig. 2C). However, in accordance with the prolonged time required for middle-aged LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells to divide, colonies initiated by these cells had a smaller size in comparison to those initiated from young mice (Fig. 2C), highlighting that aged NSCs gave rise to a lower number of cells.

To explore more in detail the cell cycle progression in activated NSCs, we used transgenic fluorescence ubiquitination cell cycle indicator (FUCCI) mice in which cells are red during G1 phase and colorless for S/G2/M phases due to the oscillating levels of a red-Cdt1 reporter [19]. Analysis of FUCCI red fluorescence just after cell sorting showed that the G1 population was increased at middle-aged in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells but not in EGFR<sup>+</sup> cells (Supporting Information Fig. S3A), mirroring the decrease in S/G2/M obtained from DNA content (Fig. 1G). Then, we measured by time-lapse videomicroscopy the lengths of the G1 phase (FUCCI red fluorescence) and the S/G2/M phases (colorless) for cells that completed a full division and underwent at least another subsequent division to exclude any alteration due to cell cycle exit (Fig. 3A).

In young mice, the lengths of G1 and S/G2/M phases were similar in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and in EGFR<sup>+</sup> cells (Fig. 3B–3E). By contrast, the length of the G1 phase was significantly increased in CD24<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> immature neuroblasts (Supporting Information Fig S4A) and was in accordance with their differentiation [24]. The G1 length for EGFR<sup>+</sup> cells was not altered in middle-aged as compared to young adults while the length of the S/G2/M phases was only slightly lengthened during aging ( $+0.7$  hours) (Fig. 3D, 3E). Strikingly, the G1 phase was dramatically lengthened in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells rising from  $4.5 \pm 0.2$  to  $11.0 \pm 0.5$  hours in young and middle-aged mice, respectively (Fig. 3B). The length of S/G2/M phases was not altered in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells during aging (Fig. 3C).

Cells exiting the cell cycle for differentiation were reported to accumulate FUCCI red Cdt1 reporter and to have a bright red fluorescence [24]. At the completion of videomicroscopy experiments, about 50% of the cells in culture initiated by LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells displayed a FUCCI bright fluorescence without significant change with aging (Supporting Information Fig. S3B). Therefore, these data excluded that the G1 lengthening observed in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells could be associated with a definitive cell cycle exit. Therefore, our data demonstrate that the cell cycle lengthening of activated NSCs during aging concerned essentially the G1 phase and directly impacted on neurogenesis.

### TGF- $\beta$ Controls the G1 Length in NSCs from Middle-Aged Mice

We have recently demonstrated that elevation in TGF $\beta$  signaling in NSC niches inhibits neurogenesis during aging and that

anti-TGF $\beta$  therapy increases the percentage of proliferating NSCs in the SVZ [16]. We have reported that TGF $\beta$  RI and RII receptors were expressed on both NSCs and TACs [16], which was further confirmed by qRT-PCR and by TGF $\beta$ -binding assay but without any significant alteration in middle-aged mice (Supporting Information Fig. S6).

Moreover, we have previously shown that treatment of total SVZ cells with TGF $\beta$ 1 reduced the size of neurospheres arguing on a direct effect of TGF $\beta$  through differentiation and/or cell cycle progression of NSCs and TACs [16]. We showed that addition of TGF $\beta$ 1 in the culture medium did not influence the differentiation choice of freshly sorted LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> populations (Supporting Information Fig. S7). However, we observed that addition of TGF- $\beta$ 1 in vitro lengthened the G1 phase in both LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> sorted cells in young mice while it did not alter S/G2/M phase length (Fig. 4A, 4B). Of note, the increase in G1 length was not merely due to cell cycle exit as cell cycle length was analyzed only in cells undergoing a subsequent division.

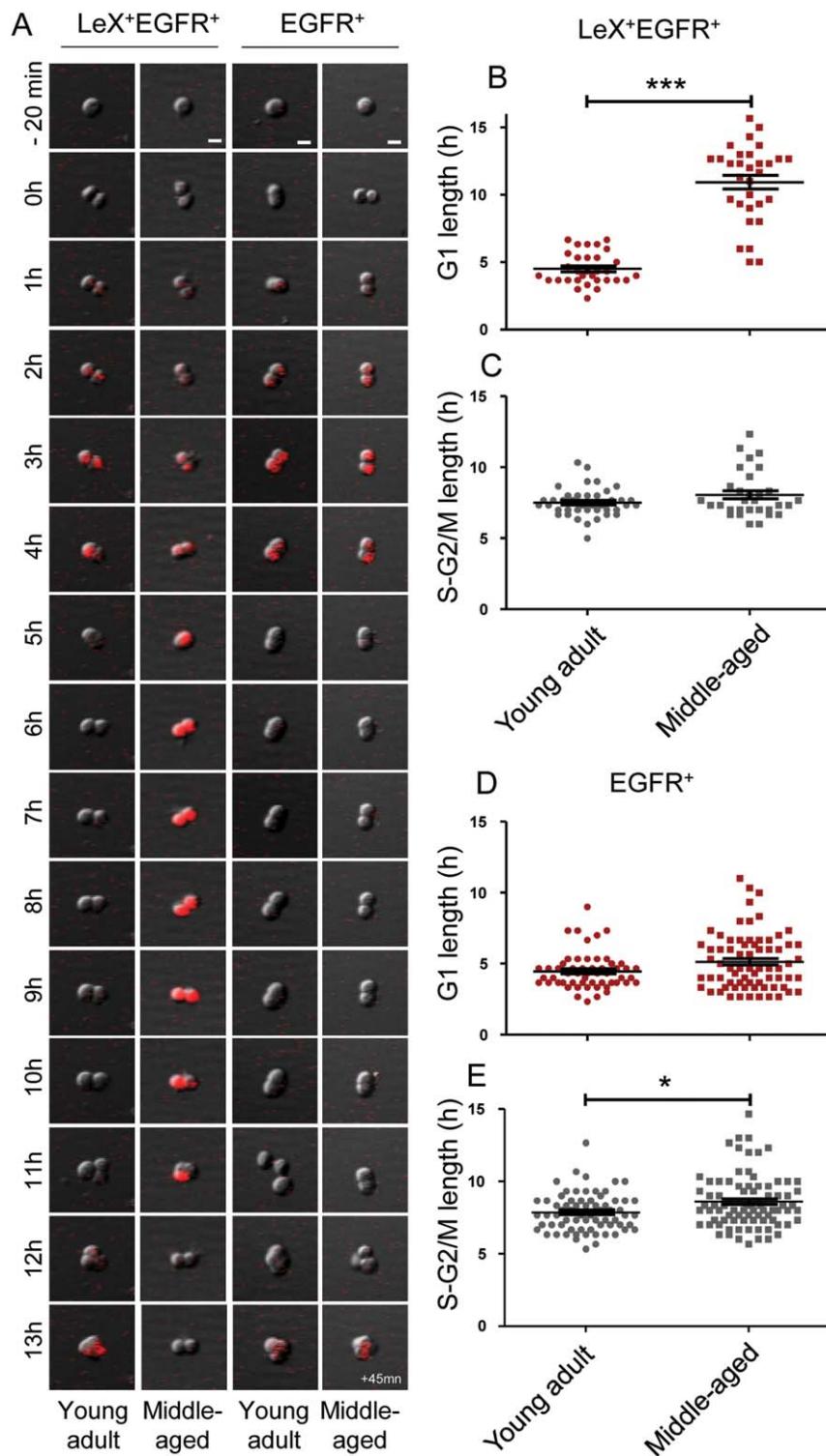
Therefore, it appears logical to hypothesize that an increase in TGF $\beta$  during aging could be involved in the G1 lengthening in NSCs. Two different approaches that have proven efficacy in aged mice on NSC proliferation and neurogenesis [16] were used to block TGF $\beta$  signaling in middle-aged FUCCI red mice: (a) administration of an anti-TGF $\beta$  neutralizing antibody; (b) addition of SB-505124, a selective inhibitor of TGF $\beta$ R1. SB-505124 was added to the culture after sorting and it specifically shortened G1 phase in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells from middle-aged mice while it had no effect on S/G2/M phases (Fig. 4C). Moreover, SB-505124 had no effect in EGFR<sup>+</sup> cells albeit a small increase in S/G2/M length was observed (Fig. 4D). Blockade of TGF $\beta$  signaling was also achieved by in vivo administration of anti-TGF $\beta$  neutralizing antibody 12 hours and 1 hour before sacrifice of the mice and cell sorting. Interestingly, the shortening of the G1 length was observed in middle-aged LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells by anti-TGF $\beta$  antibody (Fig. 4C). Obviously, no effects were observed on EGFR<sup>+</sup> cells (Fig. 4D). Altogether, our data demonstrate that the release of TGF $\beta$  within neurogenic niches was accountable for the G1 lengthening in activated NSCs from middle-aged mice.

### DISCUSSION

We point out in this study that one of the leading events involved in the decrease of neurogenesis and of neural progenitor proliferation during aging occurs at the stem cell level and is related to the alteration of the cell cycle machinery in NSCs. The G1 phase of the cell cycle is specifically prolonged in activated NSCs during aging and this can be overcome through the blockade of TGF $\beta$  signaling.

### NSCs Exhibit a Proliferation Defect But Their Pool Is Not Reduced in Middle-Aged Mice

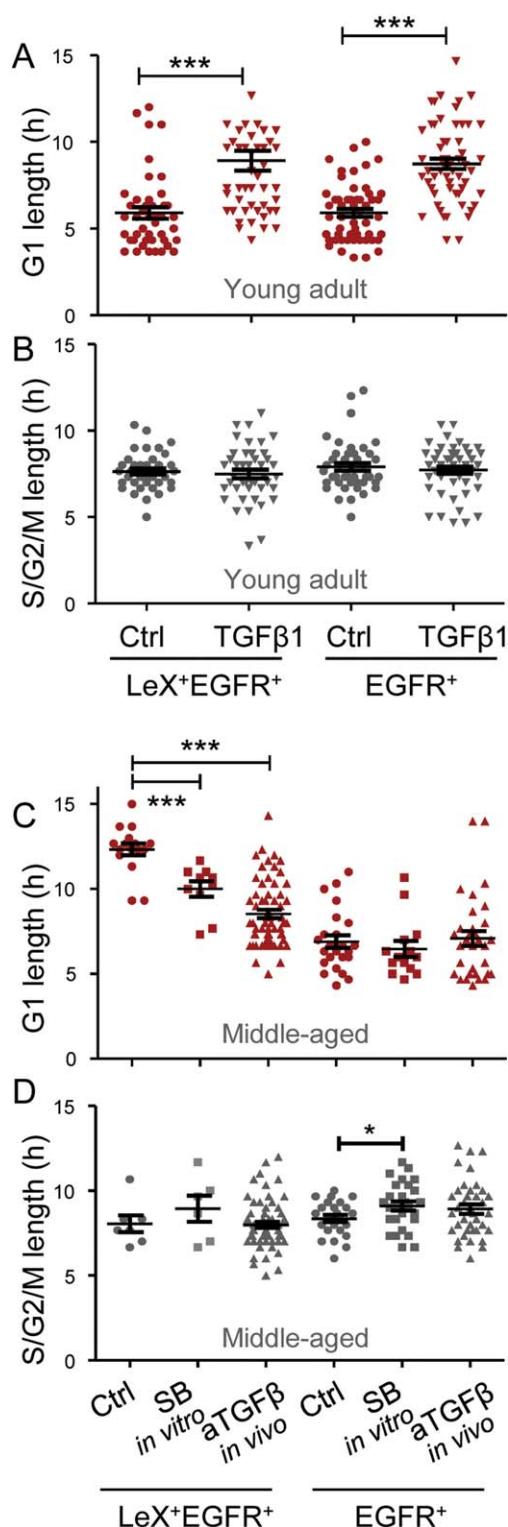
We have used our recently published FACS strategy [18] to estimate the pools of the different populations of neural progenitors in young and middle-aged mice along with their proliferation status. We estimated  $616 \pm 49$  LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells, that is, activated NSCs, in the SVZ of 2-month-old mice, which is in the same order of magnitude than  $533 \pm 17$  of activated type B1 cells estimated



**Figure 3.** Aging lengthens G1 phase in activated neural stem cells. **(A)**: Videomicroscopy with LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells sorted from fluorescence ubiquitination cell cycle indicator-red mice allows the tracking of the G1 phase with red fluorescence whereas the S-G2/M phases can be deduced when the red fluorescence switches off. **(B, C)**: LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells had a longer G1 phase in middle-aged mice but presented a similar S/G2/M length. **(D, E)**: Determination of G1 and S/G2/M phase length in EGFR<sup>+</sup> cells. Data are represented as the mean  $\pm$  SD obtained from analyses of cells isolated from three independent experiments with three to five mice. \*, p < .05; \*\*\*, p < .001. Scale bar for microscopy = 10  $\mu$ m.

by cumulative BrdU incorporation in GFP:GFAP-positive cells [25]. During aging, the amount of activated NSCs was not altered while their proliferation status (DNA > 2N) was decreased by 91%. In

addition, the level of LeX<sup>bright</sup> cells containing quiescent NSCs was also unaltered during aging. The maintaining of NSC pool with a reduced proliferation potential is in accordance with a recent



**Figure 4.** TGF- $\beta$  is involved in the G1 lengthening in aged neural stem cells. **(A, B):** TGF- $\beta$ 1 treatment of LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells obtained from young mice lengthens the G1 phase but has no effect on S/G2/M. **(C, D):** LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells were sorted from middle-aged fluorescence ubiquitination cell cycle indicator-red mice and TGF $\beta$  signaling was blocked either by in vivo administration of anti-TGF $\beta$  antibody or by in vitro treatment with SB505124, a selective TGF $\beta$ RI inhibitor. Data are represented as the mean  $\pm$  SD obtained from analyses of cells isolated from two independent experiments with three to five mice. \*,  $p < .05$ ; \*\*\*,  $p < .001$ .

study [26]. On a cytoarchitectural basis, Shook et al. reported on a loss of pinwheel structures in the SVZ neurogenic niches resulting in the decline in the number of ventricle-contacting NSCs already in middle-aged mice while their mitotic fraction appeared to be constant during aging [12]. Although they reported this decrease, the possibility that some NSCs are displaced in the aged brain and lose their ventricle-contacting cilia is presently unknown.

A few studies have reported on the stimulation of proliferation of endogenous NSCs in the SVZ from middle-aged mice and even from elderly mice using pharmacological compounds [27, 28]. In addition, physical exercise also stimulates the recovery of NSC-derived neurospheres in the SVZ of 12-month-old mice to a level similar to juvenile mice strongly arguing that endogenous NSCs persist in middle-aged mice [7]. Furthermore, we have previously shown that NSCs are still present in the aged brain but secreted inhibitory factor(s) in the aged microenvironment impact(s) on NSC proliferation and neurogenesis [16]. These studies sounded well with our observation that the pool of NSCs remains constant in middle-aged mice while activated NSCs entered a reversible quiescent state as suggested previously [8]. Therefore, the decline in neurogenesis associated with aging of the SVZ niche appears to be due to an alteration of proliferation of NSCs rather than an effect on their pools.

#### G1 Lengthening in NSCs Leads to Neurogenesis Decline with Aging

There have been few studies that have characterized the cell cycle length of the different SVZ populations in adult mouse SVZ either *in vivo* through incorporation of thymidine analogs [25] or *in vitro* [23]. Tropepe et al. have suggested a lengthening of the cell cycle with aging in the SVZ [6]. Our *ex vivo* technique allowed to distinguish the effects of aging on NSCs versus TACs, pointing out that cell cycle is specifically lengthened in activated NSCs from middle-aged mice, but not in TACs. It is noteworthy that the use of FUCCI mice [19] further allowed us for the first time to measure the G1 phase length in living NSCs and TACs and therefore to show that the G1 phase was specifically lengthened in activated NSCs but not in TACs.

The G1 phase is influenced by various cues from the microenvironment and might impact directly on neurogenesis in different pathophysiologic states such as aging or stress. Accumulating evidences associate the lengthening of the G1 phase with the commitment of neural progenitors into differentiation (reviewed in [29]). Contrariwise, the shortening of the G1 phase has been reported to be associated with the expansion of neuronal progenitors after stroke [30]. In our study, the G1 lengthening appeared unrelated to cell cycle exit, for example, differentiation, since LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells undergone subsequent divisions and, in addition, it was reversible by blockade of TGF $\beta$  (discussed thereafter). The observation that activated NSCs accumulated in G0/G1, that is, increase in FUCCI red (Supporting Information Fig. S3A) and decrease in DNA content  $> 2N$  (Fig. 1G), supports the G1 lengthening in middle-aged mice and corroborates the age-associated decrease in neurosphere formation. This accumulation in G0/G1 of activated NSCs appeared not to be influenced by cdk1 [21, 22]. Nonetheless, this does not rule out the possibility that

NSCs undergo quiescence with the acquisition of a LeX<sup>bright</sup> phenotype. Actually, this accumulation in G0/G1 might also reflect a definitive NSC cell cycle exit. Indeed, NSCs appeared to have a limited number of divisions [13, 14] in the hippocampus where they produce neural progenitors and ultimately differentiate into astrocytes [31]. Importantly, the G1 lengthening was directly correlated with a lower number of progeny in vitro as evidenced by smaller clones. Therefore, both G1 lengthening and cell cycle exit, which are not exclusive mechanisms, might be together the main forces driving the age-related decline in neurogenesis.

### TGF $\beta$ Is Involved in G1 Lengthening and Reduced Neurogenesis

We recently reported the expression of TGF $\beta$  receptor on both activated NSCs and TACs, and the upregulation of TGF $\beta$  in the vascular niche during aging which perturbs neurogenesis [16]. TGF $\beta$  participates in definitive cell cycle exit of NSCs and TACs through cell death [16]. Whether TGF $\beta$  induces cell death through autophagy merits to be examined [32]. Moreover, addition of TGF $\beta$  in vitro slows the G1 phase for NSCs and TACs in young adult mice (Fig. 4A). Thus, it was likely that persistent TGF $\beta$  expression in aged mice prolongs the G1 phase, thereby reducing cell proliferation. Here, we applied two suitable approaches to block TGF $\beta$  signaling [16] and demonstrated that TGF $\beta$  specifically lengthens the G1 phase in activated NSCs but not in TACs. The observation that TGF $\beta$ -dependent G1 lengthening was observed only in activated NSCs might be explained by the organization of the SVZ. Indeed, the NSCs contact blood vessels at sites devoid of pericytes [33] and have access to the increased TGF $\beta$ 1 production by endothelial cells that is worsen in old brain due to a decreased coverage of SVZ capillaries with aging [16]. This hypothesis is strengthened by the fact that in vivo intravenous administration of anti-TGF $\beta$ , targeting primarily the vascular compartment, restored a normal G1 length in activated NSCs.

### CONCLUSION

We have shown that the G1 length of young NSCs treated with TGF $\beta$ 1 does not reach value as high as old NSCs and,

conversely, G1 length of old NSCs treated with anti-TGF $\beta$  does not return to value of young NSCs. Therefore, one might envision that loss of EGFR or Wnt signalings which have been involved in the defect of NSC proliferation during aging [6, 7, 26] are also involved in the G1 lengthening of NSCs. Interestingly, culture of neural progenitors from human SVZ has been initiated even in old patients [34], thus it might be advantageous to control the cell cycle in order to improve recovery in old patients. Our data highlight the importance of NSC cell-cycle regulation and provide an attractive basis for the development of regenerative therapies based on stimulating endogenous neurogenesis.

### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to C. Joubert, V. Neuville, J. Tilliet, and all the staff of animal facilities; to I. Baier, N. Dechamps for cell sorting, to T. Kortulewski for imaging facility; O. Etienne for technical assistance, and A. Gouret for her administrative assistance. This work was supported by grants of ANR-SEST (Neurorad), INCA (Tetrapips, PLBIO10-030), and Electricité de France (EDF). M.D. has a fellowship from La Ligue Contre le Cancer, J.R.P. from Fondation de France (N° Engt: 2013-00042632), and L.M. from Région Ile-de-France (DIM Biothérapies).

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.D.: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, and manuscript writing; J.R.P., A.C., L.R.G., and L.M.: collection and/or assembly of data; F.D.B.: financial support, data analysis and interpretation, and manuscript writing final approval of manuscript; M.A.M.: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing, and final approval of manuscript.

### DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### REFERENCES

- Doetsch F, Caille I, Lim DA et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999;97:703–716.
- Lepousez G, Valley MT, Lledo PM. The impact of adult neurogenesis on olfactory bulb circuits and computations. *Annu Rev Physiol* 2013;75:339–363.
- Lee SW, Clemenson GD, Gage FH. New neurons in an aged brain. *Behav Brain Res* 2011;227:497–507.
- Enwere E, Shingo T, Gregg C et al. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 2004;24:8354–8365.
- Rey NL, Sacquet J, Veyrac A et al. Behavioral and cellular markers of olfactory aging and their response to enrichment. *Neurobiol Aging* 2011;33:e626.e629–e626.e623.
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM et al. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 1997;17:7850–7859.
- Blackmore DG, Golmohammadi MG, Large B et al. Exercise increases neural stem cell number in a growth hormone-dependent manner, augmenting the regenerative response in aged mice. *STEM CELLS* 2009;27:2044–2052.
- Bouab M, Paliouras GN, Aumont A et al. Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: Evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* 2011;173:135–149.
- Ahlenius H, Visan V, Kokai M et al. Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci* 2009;29:4408–4419.
- Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ et al. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci* 2004;24:1726–1733.
- Lugert S, Basak O, Knuckles P et al. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 2010;6:445–456.
- Shook BA, Manz DH, Peters JJ et al. Spatiotemporal changes to the subventricular zone stem cell pool through aging. *J Neurosci* 2012;32:6947–6956.

- 13** Balordi F, Fishell G. Mosaic removal of hedgehog signaling in the adult SVZ reveals that the residual wild-type stem cells have a limited capacity for self-renewal. *J Neurosci* 2007;27:14248–14259.
- 14** Sii-Felice K, Etienne O, Hoffschir F et al. Fanconi DNA repair pathway is required for survival and long-term maintenance of neural progenitors. *EMBO J* 2008;27:770–781.
- 15** Doetsch F, Petreanu L, Caille I et al. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 2002;36:1021–1034.
- 16** Pineda JR, Daynac M, Chicheportiche A et al. Vascular-derived TGF-beta increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO Mol Med* 2013;5:548–562.
- 17** Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:6387–6392.
- 18** Daynac M, Chicheportiche A, Pineda JR et al. Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. *Stem Cell Res* 2013;11:516–528.
- 19** Sakae-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 2008;132:487–498.
- 20** Mouthon M-A, Fouchet P, Mathieu C et al. Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the 'side population'. *J Neurochem* 2006;99:807–817.
- 21** Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM et al. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 2006;443:448–452.
- 22** Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D. p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev* 2005;19:756–767.
- 23** Costa MR, Ortega F, Brill MS et al. Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development* 2011;138:1057–1068.
- 24** Roccio M, Schmitter D, Knobloch M et al. Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. *Development* 2013;140:459–470.
- 25** Ponti G, Obernier K, Guinto C et al. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:E1045–1054.
- 26** Piccin D, Tufford A, Morshead CM. Neural stem and progenitors in aged subependyma are activated by young niche. *Neurobiol Aging* 2014;35:1669–1679.
- 27** Blackmore DG, Vukovic J, Waters MJ et al. GH mediates exercise-dependent activation of SVZ neural precursor cells in aged mice. *PLoS One* 2012;7:e49912.
- 28** Jin K, Sun Y, Xie L et al. Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell* 2003;2:175–183.
- 29** Salomoni P, Calegari F. Cell cycle control of mammalian neural stem cells: Putting a speed limit on G1. *Trends Cell Biol* 2010;20:233–243.
- 30** Zhang RL, Zhang ZG, Lu M et al. Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:857–863.
- 31** Encinas JM, Michurina TV, Peunova N et al. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 2011;8:566–579.
- 32** Yu SW, Baek SH, Brennan RT et al. Autophagic death of adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal. *STEM CELLS* 2008;26:2602–2610.
- 33** Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V et al. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2008;3:279–288.
- 34** Leonard BW, Mastroeni D, Grover A et al. Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *J Comp Neurol* 2009;515:269–294.



See [www.StemCells.com](http://www.StemCells.com) for supporting information available online.

## **Supplementary Figure Legends**

### **Figure S1: Fluorescence activated cell sorting of NSCs**

Illustration of the five main populations of NSCs and their progeny in the SVZ that have been sorted by FACS using LeX, EGFR and CD24 membrane markers as previously reported (Daynac et al. 2013).

### **Figure S2: Neurosphere formation is decreased in aged LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells.**

(A) The number of neurospheres was counted 7 days after plating the sorted LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells obtained from young adult and middle-aged mice. (B) QRT-PCR analyses of FACS LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> sorted populations show that no loss of EGFR expression was observed with aging. Data are represented as the mean ± SD obtained from analyses of cells isolated from independent experiments as indicated within bars with 3 to 5 mice. \* p<0.05; n.s.: not significant.

### **Figure S3: The percentage of FUCCI positive cells is higher in the middle-aged LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> population but accumulation FUCCI red Cdt1 *in vitro* is not altered with aging.**

(A) FACS analyses prior to culture reveal that the proportion of cells in G1 (FUCCI red-positive) is higher in middle-aged LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells. (B) The amount of FUCCI red bright cells, i.e. cells exiting definitively the cell cycle [24], was determined at the completion of videomicroscopy experiments. Data are represented as the mean ± SD obtained from analyses of cells isolated from 2 independent experiments with 3 to 5 mice. \* p<0.05.

### **Figure S4: CD24<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> immature neuroblasts divide more slowly but no cell cycle alteration is observed with aging.**

(A-B) The lengths of G1 and of S/G2/M phases were determined for CD24<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells obtained from young and middle-aged FUCCI red mice then compared to LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells obtained from young adult mice. Kruskall & Wallis + Dunn's multiple comparisons are shown. Data are represented as the mean ± SD obtained from analyses of cells isolated from 2 independent experiments with 3 to 5 mice. \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure S5: Expression of cdki in young and middle-aged LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells.**

The expression of cdki was determined by qRT-PCR on freshly sorted NSCs (A) and TACs (B) and it was not altered in middle-aged mice as compared to young mice. Data are represented as the mean  $\pm$  SD obtained from 2-5 independent experiments. ND: not detectable.

**Figure S6: Expression of TGF $\beta$  receptor on young and middle-aged LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells.**

(A) The expression of TGF $\beta$ RI and RII chains was determined by qRT-PCR on freshly sorted EGFR<sup>+</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells. (B) The binding of TGF $\beta$  was determined by flow cytometry on EGFR<sup>+</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>. Data are represented as the mean  $\pm$  SD obtained from 3 to 5 mice. Data for the four groups were compared using Kruskall-Wallis test. \* p<0.05.

**Figure S7: Effects of TGF $\beta$  on the differentiation of LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells.**

Freshly sorted LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> (A) and EGFR<sup>+</sup> (B) cells were differentiated for 7 days in DMEM:F12 supplemented with 2% B27 on poly-D lysine in the absence or the presence of TGF $\beta$ 1 (10 ng/ml). Then, triple immunostaining was performed to quantify neuronal (doublecortin), astroglial (GFAP) and oligodendrocytic (O4) differentiation. Data are represented as the mean  $\pm$  SD obtained from 3 independent experiments.

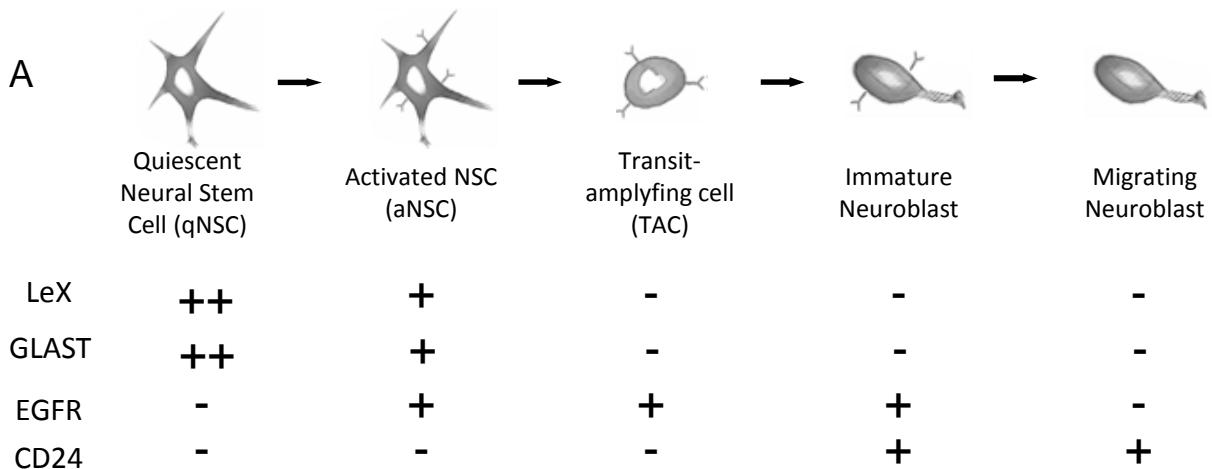


Figure S1

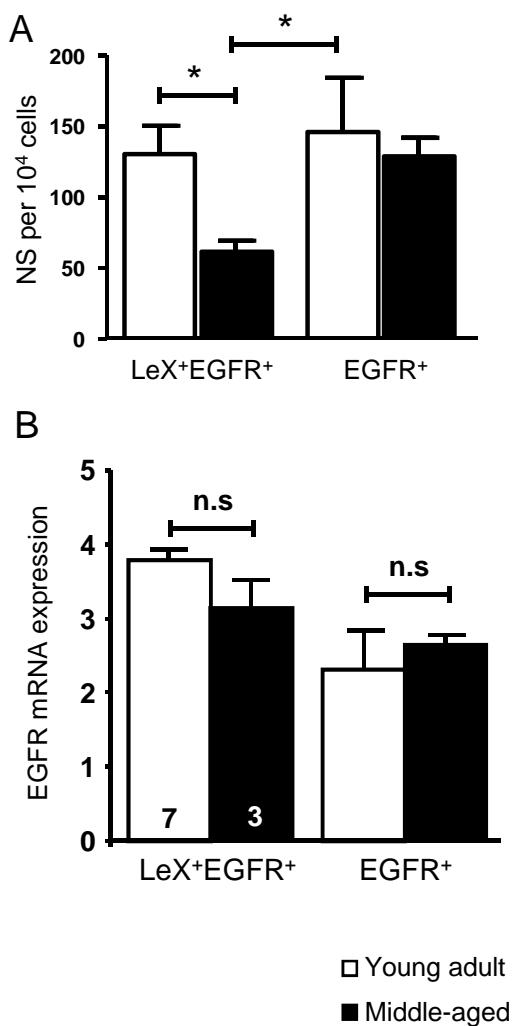


Figure S2

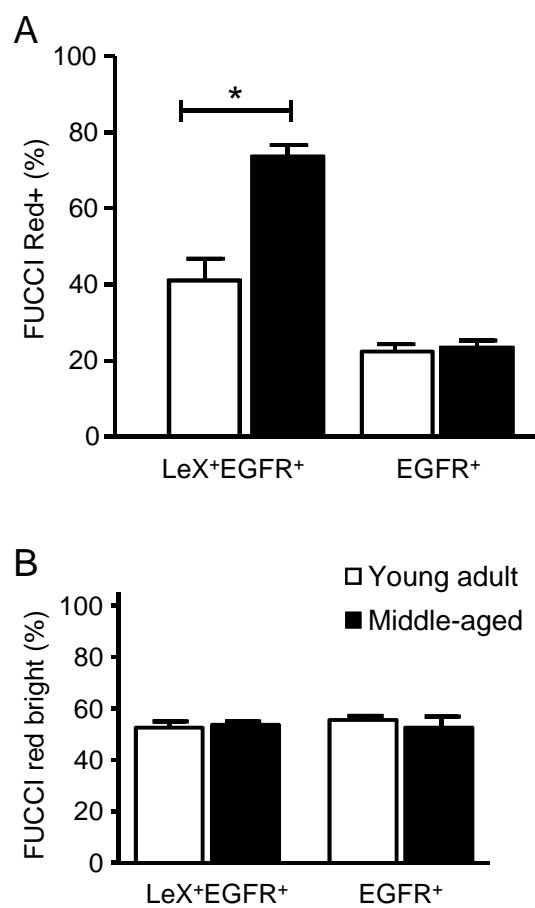
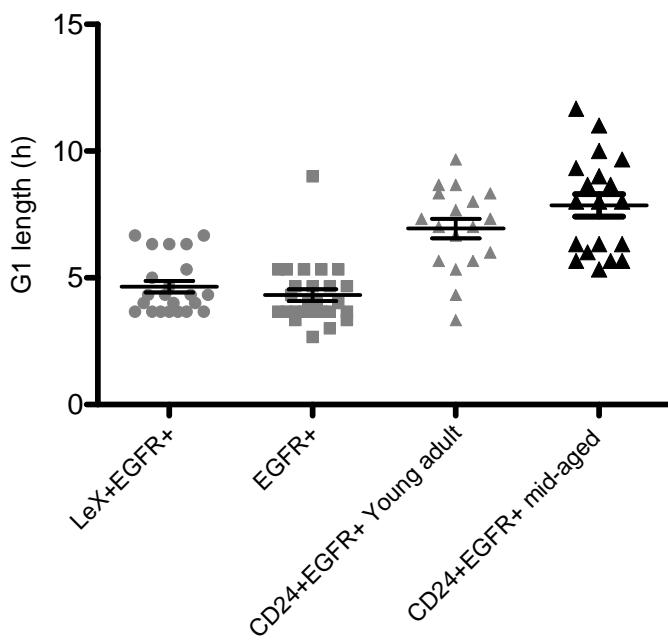


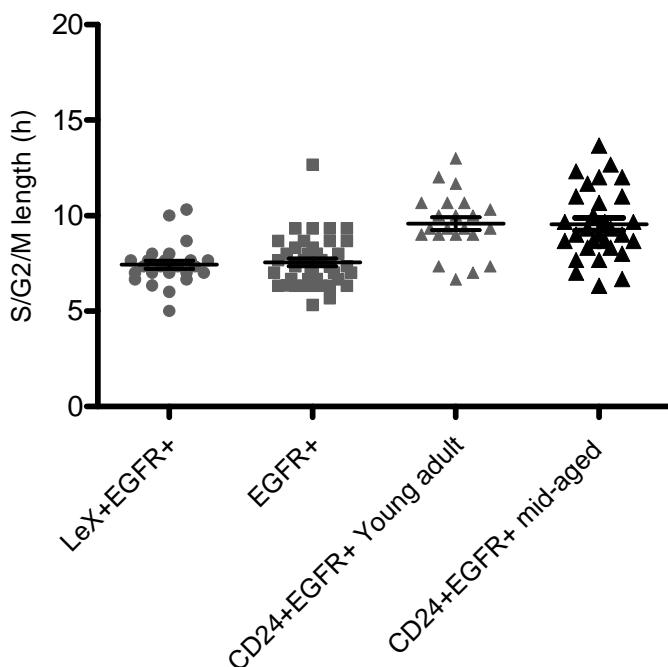
Figure S3

A



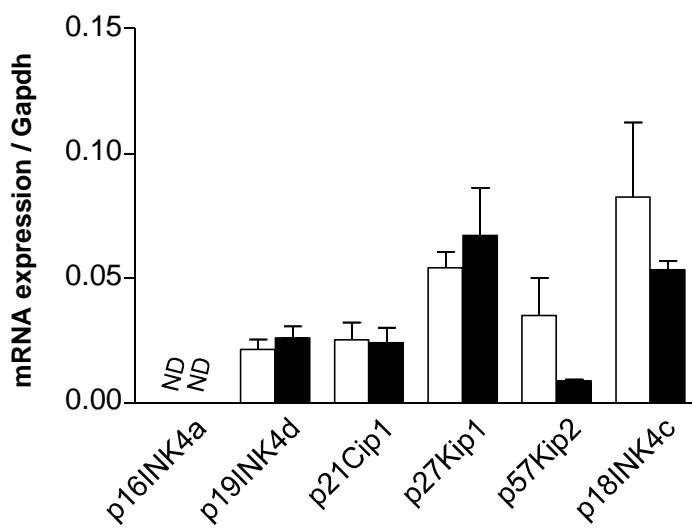
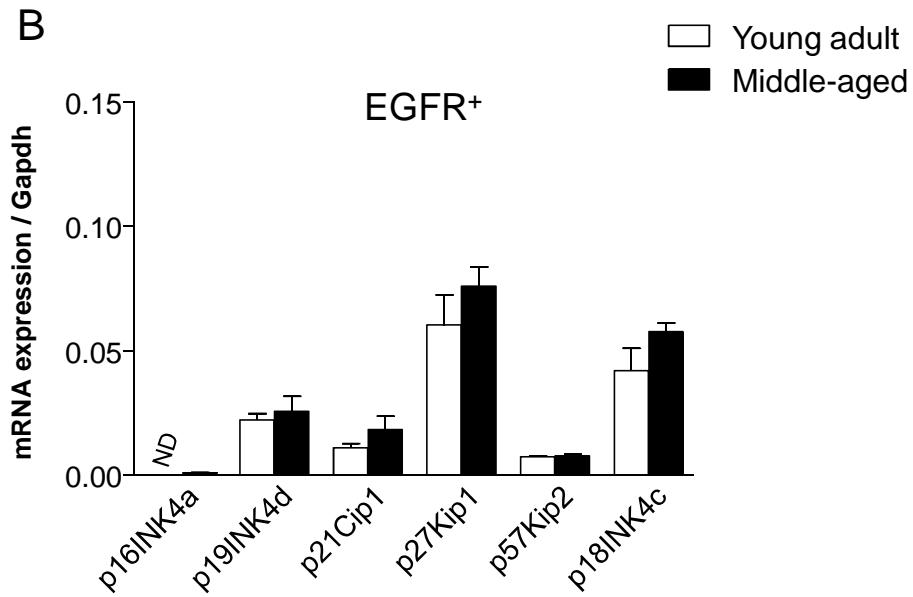
K&W + Dunn's Multiple Comparison Test G1 phase	Mean Diff.	Significant? P < 0.05?	Summary
LeX+EGFR+ vs EGFR+	0,331	No	ns
LeX+EGFR+ vs CD24+EGFR+ Young adult	-2,293	Yes	**
LeX+EGFR+ vs CD24+EGFR+ mid-aged	-3,208	Yes	***
EGFR+ vs CD24+EGFR+ Young adult	-2,624	Yes	***
EGFR+ vs CD24+EGFR+ mid-aged	-3,539	Yes	***
CD24+EGFR+ Young adult vs CD24+EGFR+ mid-aged	-0,9152	No	ns

B

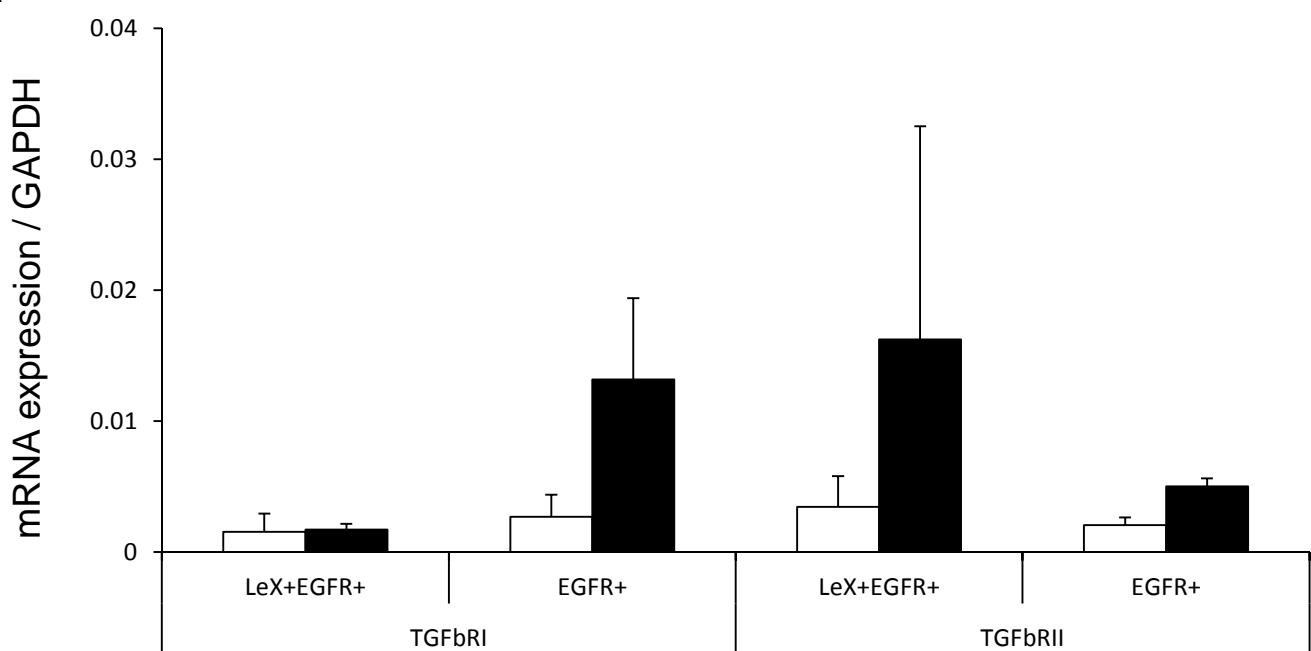


K&W + Dunn's Multiple Comparison Test S/G2-M phase	Mean Diff.	Significant? P < 0.05?	Summary
LeX+EGFR+ vs EGFR+	-0,1233	No	ns
LeX+EGFR+ vs CD24+EGFR+ Young adult	-2,149	Yes	***
LeX+EGFR+ vs CD24+EGFR+ mid-aged	-2,118	Yes	***
EGFR+ vs CD24+EGFR+ Young adult	-2,026	Yes	***
EGFR+ vs CD24+EGFR+ mid-aged	-1,994	Yes	***
CD24+EGFR+ Young adult vs CD24+EGFR+ mid-aged	0,03131	No	ns

Figure S4

**A**LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>**B**EGFR<sup>+</sup>**Figure S5**

A



B

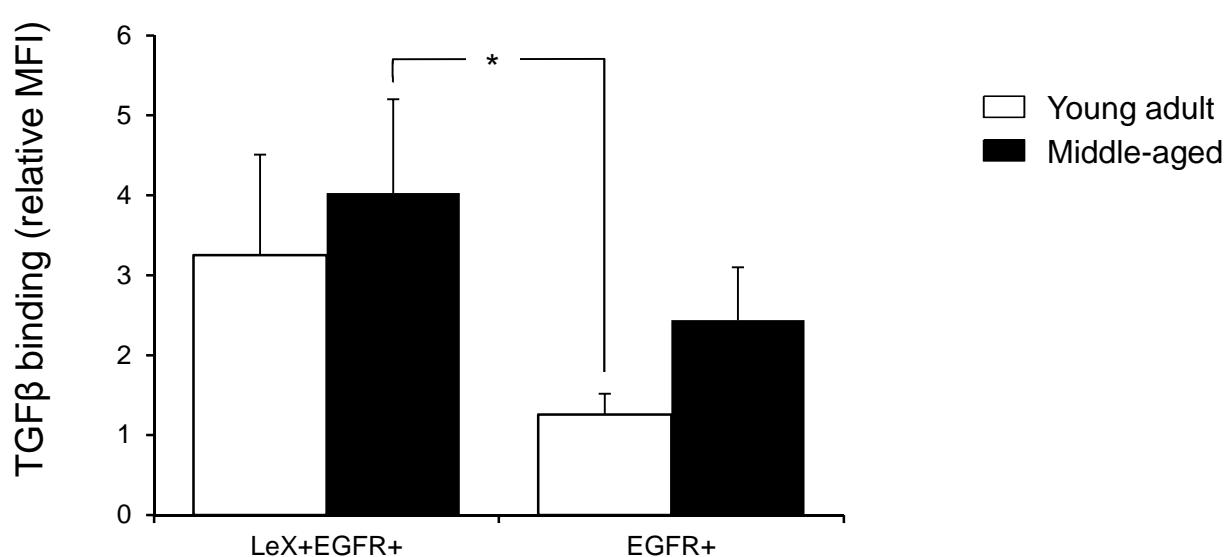


Figure S6

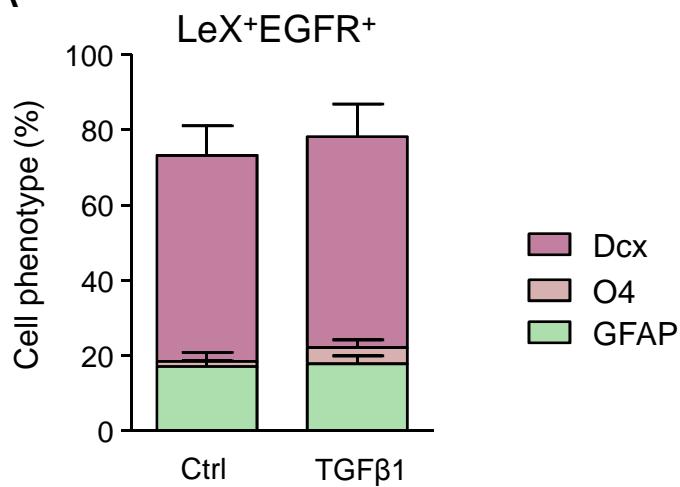
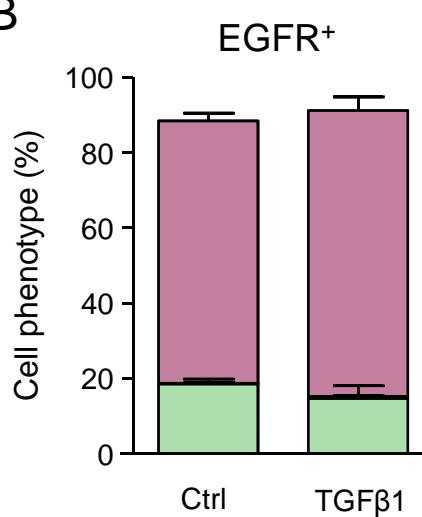
**A****B**

Figure S7

Supplementary Table 1 : List of primers.

Target gene	Forward	Reverse
Gapdh	CCAGTATGACTCCACTCACG	GACTCCACGACATACTCAGC
EGFR	ACTGCCATCAGCGGGGACCT	GTTCAGGCCAACGACCGCCA
p16INK4a	SA Biosciences PPM04789E-200	
p19INK4d	SA Biosciences PPM02897A-200	
p21Cip1	AAGCCTGATTCTGATGTGGC	TGACGAAGTCAAAGTTCCACC
p27Kip1	CCCCAGCCTACGCTCCGACT	GCGCAGCTCGAGGCTTCAGT
p57Kip2	AGCAGAACAGCGATGGAACG	AAGTTGAAGTCCCAGCGGTT
p18INK4c	CTTGGGGGAACGAGTTGGC	GGCAATCTCCGGATTCAA
TGFbRI	CCTTCTGCTGCCCCCTGGC	GGGGCACCCCTACCCAAT
TGFbRII	GCCCAGAAAGATGCATCCAC	GAAGCTTGACCGCACCGCCA



## **ARTICLE 3**

### **Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells**

Mathieu Daynac\*, Lise Morizur\*, Alexandra Chicheportiche, Marc-André Mouthon<sup>\$</sup>,  
François D. Boussin<sup>\$</sup>

\* Premiers auteurs associés

Publié dans **Scientific Reports (2016)**



### Résumé de l'article 3

Nous venons de voir dans l'article n°2 que le déclin de la neurogenèse observé à 12 mois est lié, non pas à une perte des CSN, mais à une réduction de leur prolifération. Ces résultats font partie d'une longue liste de travaux qui se sont intéressés au vieillissement des niches neurogéniques chez l'adulte au-delà de 12 mois (Seki and Arai, 1995; Kuhn et al., 1996; Tropepe et al., 1997; Enwere et al., 2004; Maslov et al., 2004; Luo et al., 2006; Tanaka et al., 2007; Ben Abdallah et al., 2010; Bouab et al., 2011; Shook et al., 2012; Piccin et al., 2014). Cependant, très peu d'études ont étudié les modifications précoce des niches neurogéniques.

Nous avons cherché à savoir dans un premier temps si les populations cellulaires neurogéniques de la ZSV adulte étaient modifiées chez des souris âgées de 2-4-6-9-12 mois. Nous montrons pour la première fois que la perte des progéniteurs neuronaux observée à 12 mois est en fait un phénomène qui débute très tôt chez le jeune adulte avec dès 4 mois une diminution de plus de 40% du nombre de cellules de la progénie neurale. Nous avons ensuite regardé si l'organisation générale de la niche était également modifiée au cours du temps. Bien que le nombre total de cellules de la ZSV diminue fortement à 4 mois, la proportion de chaque population cellulaire est conservée, ce qui n'est pas le cas à 6 mois avec une surreprésentation des CSN par rapport aux progéniteurs intermédiaires et neuroblastes. Nous avons donc décidé de nous placer à 2 mois et à 6 mois pour étudier plus en avant les mécanismes cellulaires associés aux changements précoce de la ZSV.

Similairement à ce qui avait été observé à 12 mois (voir l'article 2), nous montrons une forte baisse de la prolifération des CSN activées à 6 mois qui s'accompagne d'un rallongement spécifique de la durée de la phase G<sub>1</sub>. Afin de continuer à étudier les changements des CSN activées entre 2 mois et 6 mois, nous avons réalisé une étude transcriptomique sur des puces Affymetrix MOE430 2.0. L'analyse comparative des gènes différentiellement exprimés entre les CSN activées issues de souris âgées de 2 mois et de 6 mois ( $p\text{-value} < 0,05$ , différentiel d'expression  $> \times 2$ , expression  $> 50$ ) montre

la surexpression de 562 gènes à 2 mois et de 483 gènes à 6 mois. De plus, nos analyses d'ontogénie génique montrent pour la première fois une claire évolution moléculaire précoce dans le cerveau adulte murin à 6 mois. Nous avons ensuite cherché à savoir si les modifications transcriptomiques des CSN activées liées au cycle cellulaire corroboraient la dérégulation du cycle cellulaire observée *ex vivo*. De manière intéressante, nous montrons que 67,6% des gènes liés au cycle cellulaire sont spécifiques des phases S-G<sub>2</sub>/M à 2 mois, tandis qu'à 6 mois 81,3% sont liés à la phase G<sub>1</sub>. Enfin, nous montrons que la voie du TGFβ, qui est impliquée dans le vieillissement de la ZSV à 12 mois (voir l'article 2) et à 24 mois (Pineda et al., 2013), est modifiée dès 6 mois, suggérant un rôle dans le déclin précoce de la neurogenèse adulte.

En raison du manque de données sur l'évolution précoce de la ZSV adulte et de la neurogenèse bulbaire associée dans la littérature, les souris âgées de 2 mois à 6 mois sont considérées indifféremment comme de jeunes souris adultes (Hamilton et al, 2013). Nos données montrent pour la première fois que de nombreux changements se produisent pendant cette période de temps au niveau de la ZSV. Notre étude transcriptomique constitue par ailleurs une ressource importante pour l'identification de nouveaux réseaux de gènes impliqués dans la régulation de la neurogenèse adulte.

Note: en raison de sa taille, la Table S2 n'est pas présentée.

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells

Received: 18 November 2015

Accepted: 21 January 2016

Published: 19 February 2016

Mathieu Daynac<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Lise Morizur<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Alexandra Chicheportiche<sup>1,2,3,4</sup>, Marc-André Mouthon<sup>1,2,3,4</sup> & François D. Boussin<sup>1,2,3,4</sup>

Although neural stem cells (NSCs) sustain continuous neurogenesis throughout the adult lifespan of mammals, they progressively exhibit proliferation defects that contribute to a sharp reduction in subventricular neurogenesis during aging. However, little is known regarding the early age-related events in neurogenic niches. Using a fluorescence-activated cell sorting technique that allows for the prospective purification of the main neurogenic populations from the subventricular zone (SVZ), we demonstrated an early decline in adult neurogenesis with a dramatic loss of progenitor cells in 4 month-old young adult mice. Whereas the activated and quiescent NSC pools remained stable up to 12 months, the proliferative status of activated NSCs was already altered by 6 months, with an overall extension of the cell cycle resulting from a specific lengthening of G<sub>1</sub>. Whole genome analysis of activated NSCs from 2- and 6-month-old mice further revealed distinct transcriptomic and molecular signatures, as well as a modulation of the TGFβ signalling pathway. Our microarray study constitutes a cogent identification of new molecular players and signalling pathways regulating adult neurogenesis and its early modifications.

Neurogenesis occurs throughout the adult lifespan in specific neurogenic zones of the mammalian brain, but mainly in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) of the hippocampus<sup>1,2</sup>. Adult neurogenesis within the SVZ is conferred by a stock of quiescent neural stem cells (qNSCs)<sup>3</sup> that can enter the cell cycle and convert into their activated form, expressing the EGFR protein<sup>4–8</sup>. Activated NSCs (aNSCs) successively give rise to transit amplifying cells (TACs)<sup>9</sup>, immature neuroblasts (Im. Nbs) and migrating neuroblasts (Mig. Nbs) that differentiate into neurons once they have reached the olfactory bulbs<sup>10,11</sup>. Most studies agree on a progressive reduction in the number of proliferating progenitor cells in the SGZ and SVZ, which explains the dramatic drop in the number of neurons that are produced during aging<sup>12–16</sup>. Middle-aged (12 months) or elderly mice (24 months) have been intensively studied to understand the underlying mechanisms. Although the pool of NSCs remains stable until middle age<sup>17,18</sup>, NSCs progressively lose their proliferative capacities<sup>18–20</sup> and enter quiescence<sup>16,21</sup>. On the other hand, a dramatic loss of progenitor cells is observed with aging<sup>15,18,22,23</sup>. We have previously shown that both pools of qNSCs and aNSCs are maintained until middle age, but aNSCs proliferation is affected by a lengthening of their G<sub>1</sub> phase through a TGFβ-dependent mechanism, leading to a decrease in neurogenesis<sup>18,24</sup>.

Surprisingly, few studies have investigated early events in the neurogenic niches from young adults. Some studies have shown a significant decline in bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in progenitor cells by 6

<sup>1</sup>CEA DSV iRCM SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. <sup>2</sup>INSERM, UMR967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. <sup>3</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. <sup>4</sup>Université Paris Sud, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. \*These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.A.M. (email: marc-andre.mouthon@cea.fr) or F.D.B. (email: boussin@cea.fr)

months, associated with a decrease by half of the number of colonies (neurospheres) produced by SVZ progenitors *in vitro*<sup>13,15</sup>.

Novel fluorescent-activated cell sorting (FACS)-based methods allow for the identification and isolation of SVZ cells and a better understanding of the evolution of the neurogenic niche during aging<sup>4–6,25,26</sup>. The cell surface carbohydrate Lewis-X (LeX) has been shown as a potent and reliable marker to label and sort NSCs in the adult SVZ<sup>5,27–29</sup>. Herein, we used our previously published FACS technique<sup>5,29</sup> to follow different cell populations in the SVZ in 2- to 12-month old mice. We observed that although the NSC pool stayed constant, there was an early decrease in the number of progenitor cells and neuroblasts in young adult mice. We demonstrated a specific decrease in aNSC proliferation with a lengthening of their G<sub>1</sub> phase of the cell cycle as early as 6 months. Finally, a microarray analysis using whole-genome arrays showed, for the first time, a clear cellular evolution in aNSCs from 2- and 6-month-old mice with distinct transcriptional profiles.

## Materials and Methods

**Animals.** Two, 4, 6, 9 and 12 month-old C57Bl/6 mice were used in this study. The animals were maintained with access to food and water *ad libitum* in a colony room kept at a constant temperature (19–22 °C) and humidity (40–50%) on a 12:12-hour light/dark cycle. For cell cycle analysis, we used mice transgenic for fluorescence ubiquitination cell cycle indicator (FUCCI) chromatin licensing and DNA replication factor 1 (Cdt1)-red (FUCCI-Red), (Gem)-green (FUCCI-green), or (Cdt1)-red/(Gem)-green<sup>30</sup>. Animal experiments were approved by Comité d’Ethique en Expérimentation Animale, Direction des Sciences du Vivant, CEA (ref 12–034). All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 22th September 2010 (EC/2010/63).

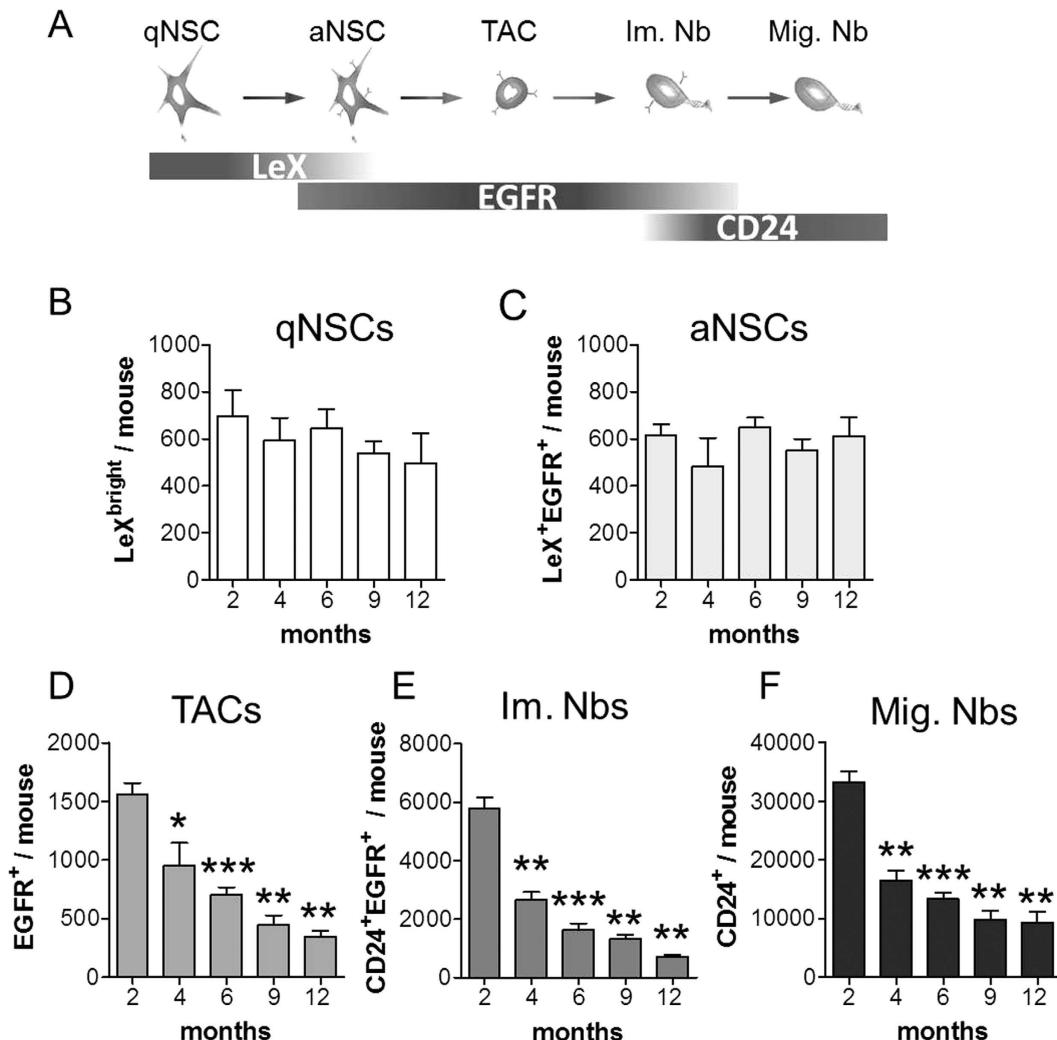
**Preparation of SVZ cells and FACS.** Lateral ventricle walls containing cells from the SVZ were dissected and dissociated as previously described<sup>5,29</sup>. For DNA content analysis, dissociated cells were incubated with the vital DNA marker Hoechst 33342 (Sigma)<sup>5,31</sup>. The antibodies to identify different cell populations were the CD24 phycoerythrin [PE]-conjugated (rat IgG2b; 1:50 BD Biosciences), CD24 phycoerythrin-cyanine7 [PC7]-conjugated (Rat IgG2b; 1:100 Life Technologies), CD15/LeX fluorescein isothiocyanate [FITC]-conjugated (clone MMA, mouse IgM; 1:50 BD Biosciences), mouse anti-human LeX-antibody (1:50 BD Biosciences) and Alexa647-conjugated EGF ligand (1:200 Life Technologies), which were incubated as reported<sup>5</sup>. To perform absolute cell counts, single cell suspensions were transferred to tubes containing a calibrated number of fluorescent beads (TruCount tubes, BD Biosciences). Prior to FACS sorting with FUCCI-Green mice, LeX-positive and LeX-negative fractions were separated using MACS LS separation columns (Miltenyi Biotec). Immediately prior to FACS, propidium iodide (PI) or Hoechst 33258 was added to a final concentration of 2 µg/mL to label the dead cells. Cells were analysed on an LSRII (BD Biosciences) and sorted on an INFLUX cell sorter (BD Biosciences) as reported<sup>5,29</sup>. Sorting gates were drawn according to fluorescence-minus-one (FMO)-controls. The data were analysed with FlowJo data analysis software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

**In vitro assays.** For neurosphere cultures, FACS-purified populations were plated at a density of 700 cells/well in 24-well tissue culture plates (TPP, Switzerland) for 7 days. Cells were grown in NeuroCult NSC basal medium supplemented with a proliferation supplement (STEMCELL Technologies), 2 µg/mL of heparin, 20 ng/mL of EGF and 10 ng/mL of FGF-2 (Sigma). For live cell imaging, freshly sorted cells from FUCCI mice were plated at a density of 1–3 × 10<sup>3</sup> cells/well on poly-D-Lysine (Sigma)-coated 96-well glass bottom culture plates (MatTek Corp., Ashland, MA) in neurosphere medium. Brightfield and fluorescent images for FUCCI fluorescence were captured through a Plan Apo VC 20X DIC objective (Numerical Aperture: 0.75) on a Nikon A1R confocal laser scanning microscope system attached to an inverted ECLIPSE Ti (Nikon Corp., Tokyo, Japan) maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. FUCCI Red fluorescence was excited at 561 nm and collected using a 595/50 nm filter set. Images were acquired and analysed as previously described<sup>18,29</sup>.

**Determination of BrdU incorporation.** Mice were initially injected intraperitoneally with 100 mg BrdU/kg body mass then given BrdU in their drinking water (1 mg/mL BrdU, 1% glucose) for 14 consecutive days until sacrifice. Cells were then FACS sorted as described above and plated without mitogens on poly-D-lysine- and laminin-coated 8-well glass slides (Millicell) for 2 hours and then fixed in 2% paraformaldehyde. For BrdU detection, cells were permeabilized for 5 minutes at RT in 0.5% Triton X-100 PBS. Incubation in blocking solution (PBS, 0.05% Tween 20, 4% BSA) at 37 °C for 1 hour was followed by a 30-minute incubation at 37 °C with anti-BrdU at 1/150 (GE Healthcare) in DNase incubation buffer (0.5X PBS, 30 mM Tris-HCl pH 8, 0.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM 2-mercaptoethanol, 0.5% BSA and 10 µg/mL DNase I). After several washes, cells were incubated with an Alexa fluor-conjugated donkey secondary antibody at 1:500 (Invitrogen).

**RNA isolation, amplification and hybridization to microarray.** Sorted cells from 4 independent experiments were immediately lysed in RLT buffer (QIAGEN), and total RNA was isolated with the RNeasy Micro Kit (Qiagen) with DNase treatment according to the manufacturer’s instructions. cDNA was synthesized and amplified using the Ovation Pico WTA System (NuGEN) before being hybridized on Affymetrix MOE430 2.0 arrays (45,000 probe sets) according to the Affymetrix standard protocols at PartnerShip (Evry, France). The data were quality controlled with the Expression Console software (Affymetrix) following normalization with the MAS5 algorithm.

**Data normalization and statistical analyses.** Microarray data were normalized with GC-robust multi-array analysis (GC-RMA) using log<sub>2</sub> transformed expression levels in Genespring GX12. Differentially expressed probes were filtered by an average expression greater than 50 in at least 1 population, a differential expression of at least 2-fold and a Student’s t-test p-value < 0.05. A statistical overrepresentation analysis of GO



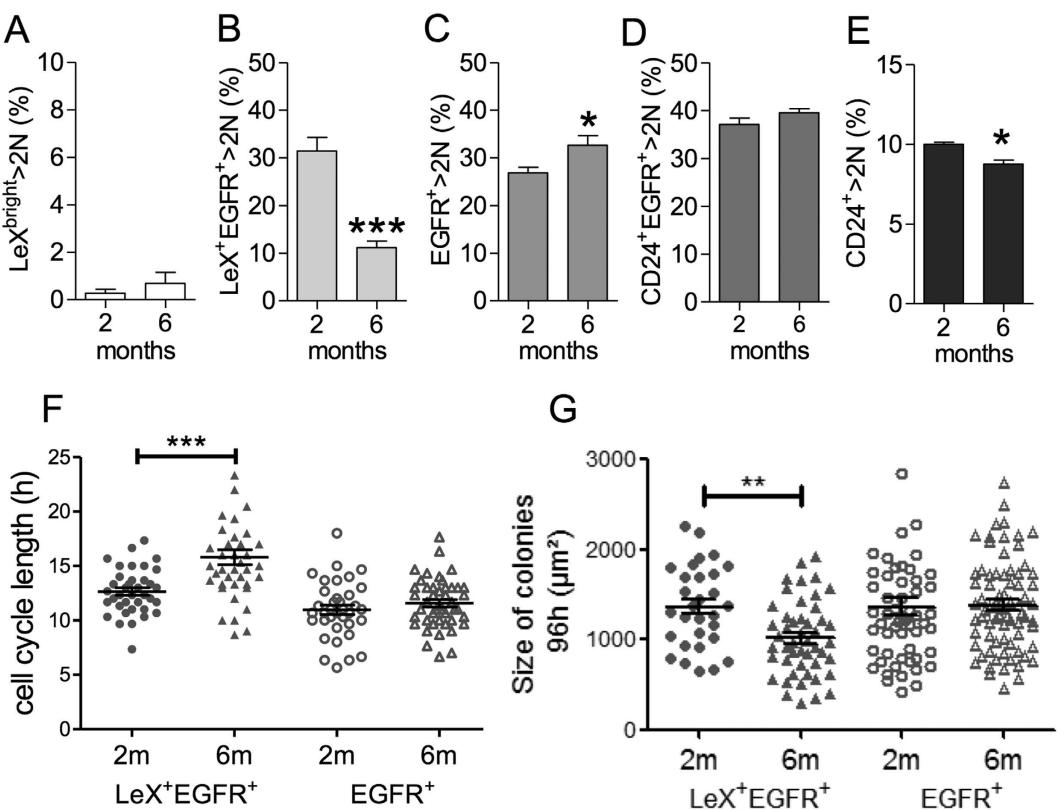
**Figure 1.** Decrease in the number of progenitor cells in the SVZ starts at 4 months. (A) LeX/EGFR/CD24 triple staining strategy allowing the purification of the main neurogenic populations from the adult SVZ as previously reported<sup>5</sup>. (B–F) Quantification of the 5 different SVZ populations of NSCs and their progeny by FACS using TrueCount microbead-calibrated tubes on mice aged 2 to 12 months. The data are represented as the mean  $\pm$  SEM and were obtained from at least 4 independent mice for each time point. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

biological processes ( $p < 0.05$ ) was performed with PANTHER software (<http://www.pantherdb.org>) using binomial statistics with Bonferroni correction. For hierarchical clustering, expression values for all biological replicates were clustered using Pearson correlation (centred) and complete linkage. The expression levels among differentially expressed probes that map to the same gene were averaged in heat maps depicting gene expression changes between aNSCs from 2- and 6-month old mice.

**Statistical analyses.** Non-parametric Mann-Whitney test was conducted using StatView5 software (SAS Institute Inc., Cary, NC). Significance was set at  $p < 0.05$ . The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

## Results

**Early loss of progenitors from the SVZ starts at 4 months of age.** Although it is now well known that SVZ neurogenesis decreases in the aging adult mouse brain<sup>13,16,18,23</sup>, its early decline with age and the underlying molecular mechanisms have not been elucidated to date. To accurately determine the progression of SVZ neurogenesis with age, we quantified NSCs and their progeny by FACS at 2 (young adult), 4, 6, 9 and 12 months (middle-aged) based on the detection of 3 different cell surface markers, LeX, CD24 and EGFR, as previously reported<sup>5,18,29</sup>. These markers allow for the identification of the following 5 neurogenic cell populations (Fig. 1A; for clarity, the negative markers are not indicated): (i) LeX<sup>bright</sup> cells, i.e., qNSCs; (ii) LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells, i.e., aNSCs; (iii) EGFR<sup>+</sup> cells, i.e., TACs; (iv) EGFR<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup>, i.e., Im. Nbs; and (v) CD24<sup>+</sup>, i.e., Mig. Nbs. As shown in Fig. 1B,C, both the pools of qNSCs and aNSCs remained stable with age in the mouse SVZ, consistent with previous reports<sup>16,18,21</sup>. In contrast, the cell fractions containing their progeny decreased constantly from 2 to 12 months. Surprisingly, the absolute numbers of TACs, Im. Nbs and Mig. Nbs were already decreased at 4 months



**Figure 2. NSCs specifically exhibit proliferation defects at 6 months.** (A–E) Proliferation status (S-G<sub>2</sub>/M %) of the SVZ populations of 2- and 6-month-old mice was determined by DNA content analysis using the vital DNA marker Hoechst 33342. (F) The length of the second division was determined by time-lapse videomicroscopy. (G) Colony size was measured 4 days after plating and provides an estimate of the amount of generated cells. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM and were obtained from at least 4 independent mice (A–E) and isolated cells from 2 independent groups of 3 to 5 mice (F–G) for each time point. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

compared with 2 months by 39.0%, 53.8% and 50.5%, respectively (Fig. 1D–F). To evaluate the overall changes that occur within the SVZ niche, we quantified the proportion of each cellular population relative to the total number of cells in the SVZ (Fig. S1). Despite the sharp decrease in size of the SVZ at 4 months (Fig. S1A), the niche organization was relatively preserved except for a small decrease in the proportion of Im.Nbs (Fig. S1E). In contrast, the niche was dramatically altered after 6 months of age with a progressive over-representation of stem cells compared to progenitors and neuroblasts (Fig. S1B–F).

Together, these data show that the decrease in SVZ neurogenesis is a continuous process that starts very early during the adult mouse life, which progressively reduces the production of TACs and Nbs, whereas the NSC pool remains stable.

**The activated NSC cell cycle is altered at 6 months.** To investigate further into the mechanism of neurogenesis disruption in young adults, we first compared the cell cycle status of the SVZ cell populations from 2- and 6-month-old mice by determining the S-G<sub>2</sub>/M fraction (DNA content  $> 2\text{N}$ ) using the vital DNA marker Hoechst 33342<sup>31</sup>. In accordance with their quiescent status, LeX<sup>bright</sup> cells had a low percentage of cells in the S-G<sub>2</sub>/M phase regardless of age (Fig. 2A). Strikingly, the percentage of cycling LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells was dramatically reduced by 6 months (Fig. 2B), whereas that of the EGFR<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup>, and CD24<sup>+</sup> populations remained somehow stable or were moderately altered (Fig. 2C–E)<sup>18</sup>. Importantly, this decrease in aNSC proliferation was not associated with a permanent exit of the cell cycle as revealed by 14-day BrdU administration experiments (Fig. S2). Indeed, similar percentages of BrdU-positive cells were found among LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells at 2 and 6 months (Fig. S2).

We then used a colony-forming neurosphere assay<sup>32</sup> to determine whether the decreased numbers of TACs at 6 months was related to a change in the clonogenic capacity of aNSCs and/or TACs. Interestingly, the quantification of primary neurospheres generated from LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup>-sorted cells at 2 and 6 months showed no significant difference, confirming the absence of cell cycle exit of aNSCs at 6 months (Fig. S3).

We thus further investigated whether LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells had a defect in cell cycle progression using time-lapse video microscopy. Cell cycle lengths were determined during the second division after cell plating, taking advantage of culture conditions that maintain the cells in an undifferentiated state, i.e., in the presence of EGF and FGF2<sup>18,29,33</sup>. The cell cycle length of EGFR<sup>+</sup> cells (TACs) was not altered between 2 and 6 months (Fig. 2F), leading

to colonies with comparable sizes 4 days after plating (Fig. 2G). In contrast, the division of LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells (aNSCs) was lengthened by more than 3 hours in 6 month-old mice compared with 2-month-old mice (Fig. 2F;  $12.6 \pm 0.3$  vs.  $15.8 \pm 0.7$  hours, respectively), leading to significantly smaller colonies (Fig. 2G).

**Specific G<sub>1</sub> lengthening in activated NSCs at 6 months.** To explore the cell cycle of aNSCs and TACs in more detail, we used Fluorescence Ubiquitination Cell Cycle Indicator (FUCCI) mice<sup>18,29,30</sup>. FUCCI-Red cells allow for the visualization of the G<sub>1</sub> phase through a G<sub>1</sub> specific red-Cdt1 reporter, whereas FUCCI-Green cells exhibit green-fluorescent S-G<sub>2</sub>/M phases<sup>30</sup>. We found that a specific increase in the percentage of LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells in G<sub>1</sub> (FUCCI-Red cells) was associated with a decrease of the S-G<sub>2</sub>/M fraction (FUCCI-Green cells) in 6-month-old mice compared with 2-month-old mice (Fig. 3A). As expected, these cell cycle alterations were not observed in EGFR<sup>+</sup> cells (Fig. 3B).

Sorted cells from the FUCCI-Red mice were then plated under adherent conditions to visualize the cell-cycle phases at a single-cell level. A specific G<sub>1</sub> lengthening was observed in LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells, rising from  $4.8 \pm 0.2$  to  $7.3 \pm 0.3$  hours at 2 and 6 months, respectively (Fig. 3C,F), whereas the S-G<sub>2</sub>/M phase was found unchanged (Fig. 3E). Again, no difference was observed between the EGFR<sup>+</sup> cells from 2- and 6-month-old mice (Fig. 3D–F), confirming the lack of change in the proliferative capacities of TACs, even though the pool of these cells is dramatically reduced by 6 months.

The overall lengthening of the cell cycle observed in aNSCs at 6 months (Fig. 2F) nicely correlates with their increased percentage of FUCCI-red cells (Fig. 3A) and with the increased length of their G<sub>1</sub> phase (Fig. 3F). Our results therefore hint at a causal factor that arises from cell cycle changes within the aNSC pool but not in their progeny, leading to a progressive neurogenesis decline. We previously reported proliferative defects coupled with G<sub>1</sub> lengthening in aNSCs from 12-month-old mice<sup>18</sup>. To our knowledge, it is the first study to report such alterations as early as 6 months.

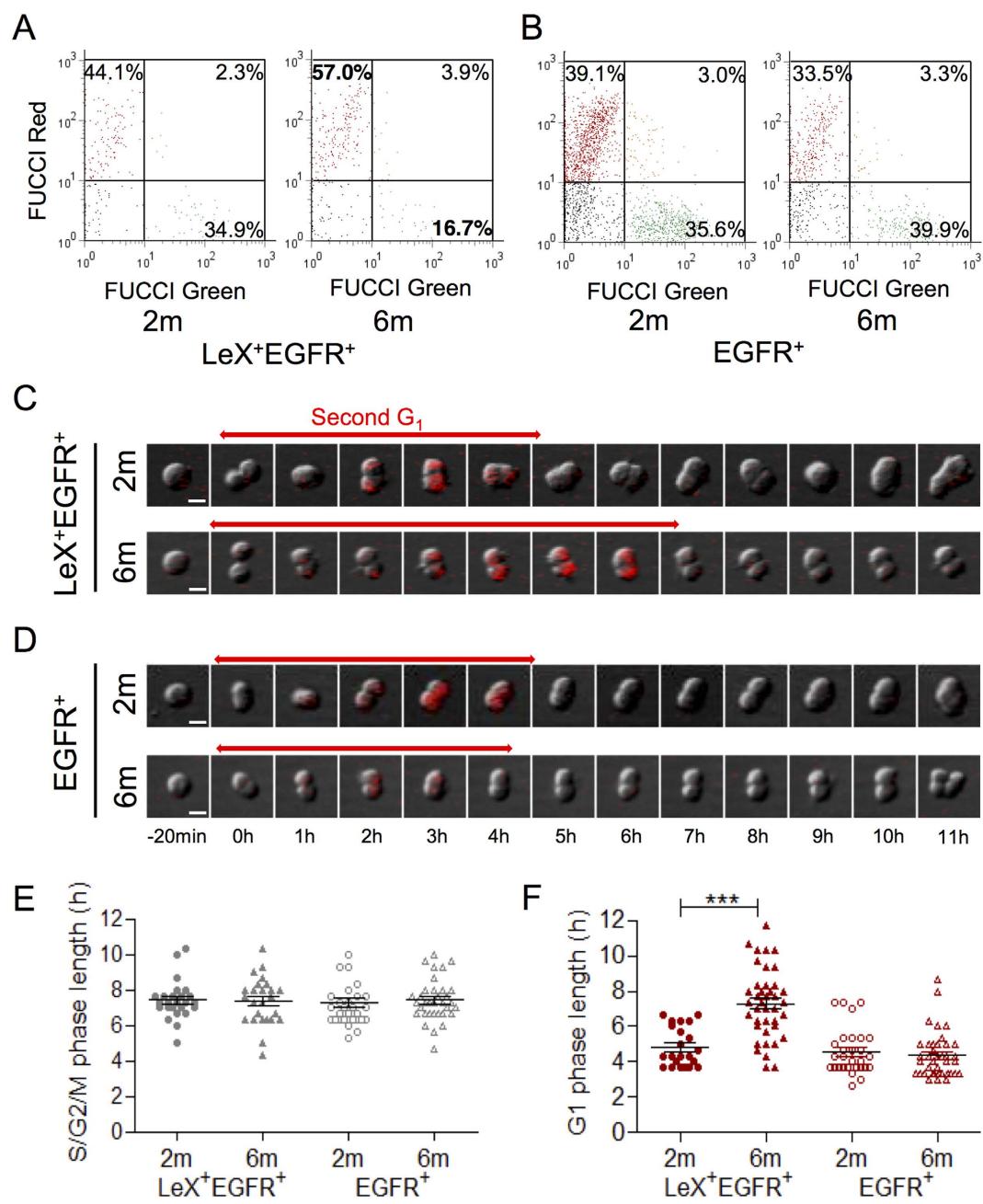
**Distinct molecular signature of 6 month-old aNSCs: modulation of the cell cycle machinery and the TGF $\beta$  signalling pathway.** To investigate the molecular mechanisms occurring in aNSCs that may cause the progressive decline in neurogenesis in the young adult, we performed a microarray analysis using whole-genome Affymetrix MOE430 2.0 arrays on LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells sorted from 2-month-old and 6-month-old mice. The comparative gene expression profile revealed an altered expression of 1,045 genes (Fig. 4A). The resulting set of LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup>-enriched genes in 2-month-old mice included 562 genes (601 probe sets, Table S1), whereas 483 genes were upregulated at 6 months (560 probe sets, supplementary dataset 1). Hierarchical clustering of the expression data from all of the biological replicates resulted in the separation of the two cell populations (Fig. 4B), highlighting the distinct transcriptomic signature of 6-month-old LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells.

A Gene Ontology (GO) term analysis was then performed using a statistical overrepresentation test in PANTHER with Bonferroni correction<sup>34</sup> to identify GO terms associated with each cellular state. As expected due to their highly proliferative status, the LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells from young mice were enriched in the GO categories of “cell cycle” and “regulation of transcription”<sup>6,35</sup> (Fig. 4C; see supplementary dataset 2 for the complete list of GO terms and associated p-values). Moreover, the LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells from 6-month-old mice showed an overrepresentation of processes such as “negative regulation of neurogenesis” and “regulation of cell proliferation”, which was consistent with the modification of the neurogenic and proliferative properties of aNSCs described above (Fig. 4D; see supplementary dataset 2). In addition, several significantly enriched GO categories were linked to differentiation processes at 6 months (Fig. 4D).

We then investigated whether the cell cycle-related transcriptomic changes between 2- and 6-month-old aNSCs corroborated the cell cycle alterations observed *ex vivo* at 6 months. Among the differentially expressed genes associated with the cell cycle, 50 have literature references to specific phases, including the G<sub>1</sub>/S transition, the S phase, the G<sub>2</sub>-M phases or the M-G<sub>1</sub> phases (Fig. 5A,B)<sup>36–38</sup>. Note that a majority of the genes was assigned to 2 consecutive phases, such as M-G<sub>1</sub>, as their transcripts were previously found to be persistently expressed over 2 distinct phases of the cell cycle<sup>36,37</sup>. Interestingly, we found that 67.6% of the cell cycle genes enriched in LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells from 2-month-old mice were linked to the S-G<sub>2</sub>/M phase (Fig. 5A) in accordance with their proliferative status, as shown above (Figs 2B and 3B). On the other hand, a large majority (81.3%) of the 6-month enriched cell cycle genes were associated with the G<sub>1</sub> phase (Fig. 5A,B), which is also in concordance with the G<sub>1</sub> lengthening observed at 6 months in the LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells (Fig. 3). Finally, the enrichment in transcripts linked to the G<sub>1</sub>/S transition in aNSCs from the 2-month-old mice further correlated with the altered cell-cycle dynamics of aNSCs at 6 months (Fig. 5A).

We have recently demonstrated an increase in TGF $\beta$ 1 secretion in the aged (12–24 month-old) mouse SVZ that negatively impacts NSC proliferation, whereas a selective blockade of TGF $\beta$  signalling restores neurogenesis in aged mice<sup>18,24</sup>. TGF $\beta$  signalling in NSCs was thus shown as a key player in the regulation of neurogenesis during aging through inhibitory signals. We investigated whether this pathway was also modulated between cells isolated from 2- and 6-month-old mice. Consistent with the modulation of the TGF $\beta$  signalling pathway, transcripts of the genes in this pathway were upregulated in LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells isolated from 6-month-old mice (Fig. 5C). For example, TGF $\beta$ R3 is overexpressed by aNSCs at 6 months in association with an endogenous overexpression of TGF $\beta$ 2, suggesting a possible autocrine mechanism linked to the TGF $\beta$  signalling in aNSCs that could be involved in their lengthening of G<sub>1</sub>. HtrA1, which is a member of the HtrA serine protease family, has the ability to repress TGF $\beta$  signalling<sup>39,40</sup> and has been shown to promote TGF $\beta$ 1 degradation<sup>41</sup>. Interestingly, HtrA1 is upregulated at 6 months and could therefore counteract, to some extent, the role of TGF $\beta$  in age-related neurogenesis decline.

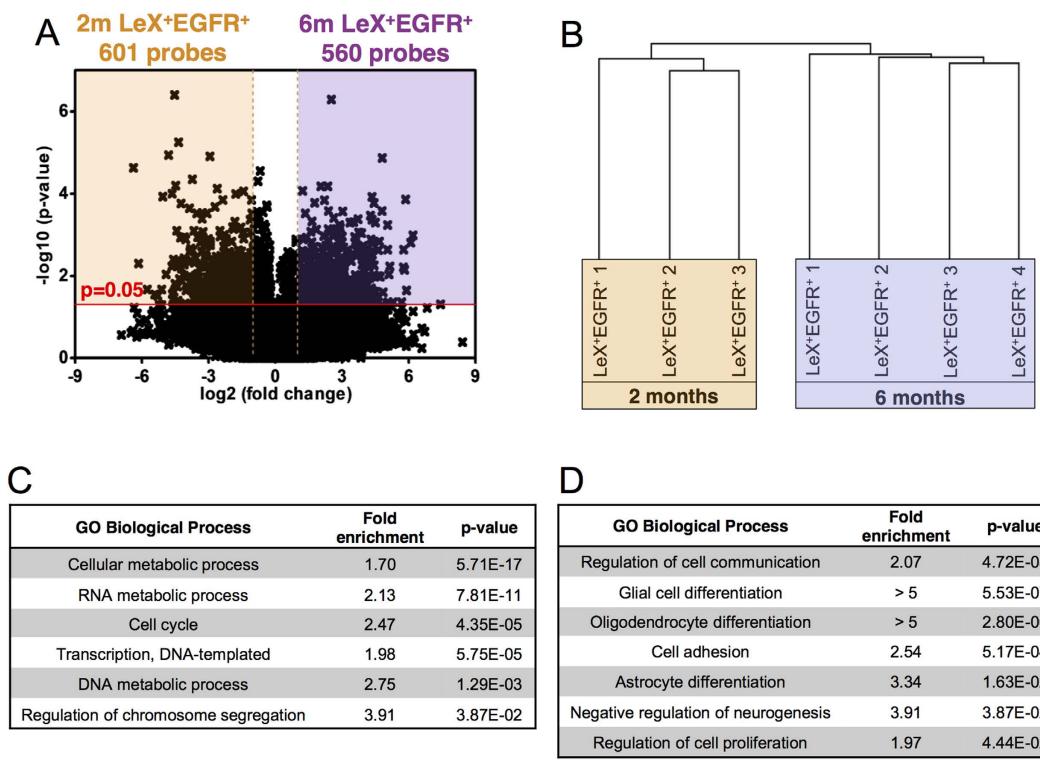
Our microarray analysis corroborates the cell cycle lengthening observed *ex vivo* and *in vitro* in aNSCs from young adult mice. Our analysis also suggests that the modulation of the TGF $\beta$  signalling pathway occurs earlier than previously anticipated, hinting at its potential role in an early neurogenesis decline.



**Figure 3. G<sub>1</sub> lengthening in activated NSCs at 6 months.** FUCCI mice (red and green fluorescent) were used to evidence an increase of the G<sub>1</sub> proportion (FUCCI-Red cells) associated with a decrease of the S-G<sub>2</sub>/M proportion (FUCCI-green cells) specifically in (A) LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells, but not in (B) EGFR<sup>+</sup> cells in 6-month-old mice. Videomicroscopy of (C) LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> and (D) EGFR<sup>+</sup> cells sorted from FUCCI-Red mice allowing the tracking of the G<sub>1</sub> phase with red fluorescence and the S-G<sub>2</sub>/M phase (colourless). (E) LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells presented a similar S-G<sub>2</sub>/M phase length at 6 months, whereas (F) LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells had a longer G<sub>1</sub> phase. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM and were obtained from analyses of cells isolated from at least 3 independent mice (A,B) and isolated cells from 2 independent groups of 3 to 5 mice (C–F) for each time point. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001. Scale bar for microscopy, 10  $\mu$ m.

## Discussion

Our study demonstrates that one of the first main events leading to a major decrease in the number of SVZ progenitor cells and, consequently, adult neurogenesis occurs between 2 and 6 months in mice and is related to a deregulation of the NSC cell cycle machinery. Although the pools of TACs and Im. Nbs are already reduced by 4 months, no change in their proliferative capacities was observed, hinting at a causal factor arising from the aNSC pool. Indeed, aNSCs specifically exhibit a proliferation deficit with the lengthening of their G<sub>1</sub> phase, resulting in the decrease of progenitor cells at 6 months. Our gene expression profile analysis reveals their distinct transcriptomic signature compared with their 2-month-old counterparts and the modulation of the TGF $\beta$  signalling pathway. Together,



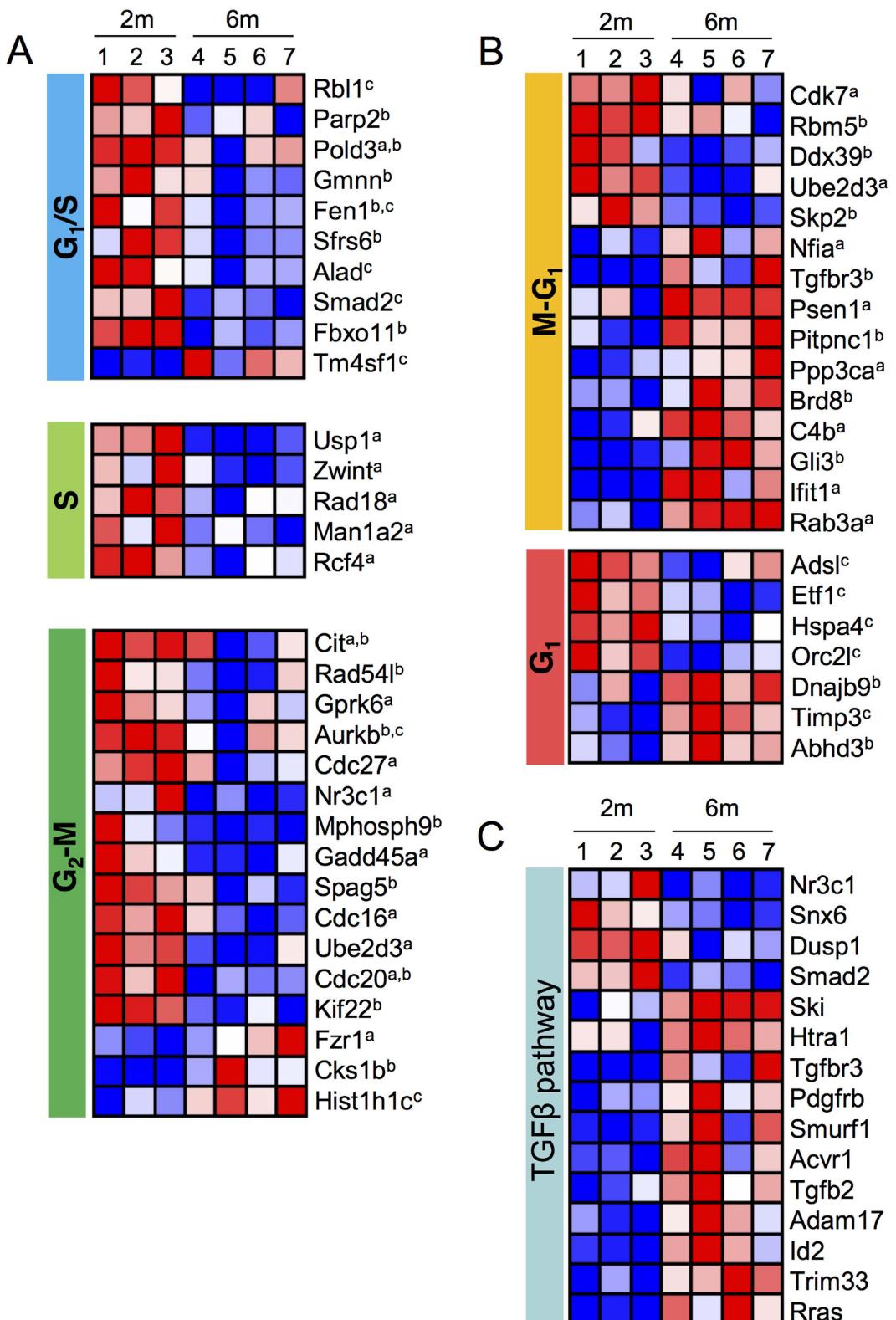
**Figure 4.** Microarray analysis reveals a distinct molecular signature of activated NSCs at 6 months.

(A) Volcano plot of differentially expressed probesets in LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells from 2- (orange) and 6-month-old (purple) mice. (B) Hierarchical clustering of the expression data from all the biological replicates shows high reproducibility of the sortings and distinct transcriptional signature of LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup> cells from 6-month-old mice. (C,D) Selected sets of significantly enriched GO categories using a statistical overrepresentation test for differentially expressed genes ( $p < 0.05$ ) in (C) 2- and (D) 6-month-old LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells.

our data highlight the importance of the NSC cell cycle regulation across the adult lifespan in mice and provide an attractive data resource for the development of regenerative therapies based on stimulating endogenous NSCs.

**Alteration of activated NSC proliferation is a main event leading to early neurogenesis decline.** The recent emergence of FACS strategies has allowed the isolation and characterization of the different cell populations of the SVZ<sup>4-6,8,25,26</sup>. Using our published FACS method that allows for the characterization of 5 main neurogenic populations from the SVZ niche<sup>5,29</sup>, we showed that the pools of qNSCs and aNSCs were relatively stable until 12 months, in contrast to those of progenitor cells, which drastically decreased. Few studies have reported an alteration of NSCs within the first months, and they agree on the fact that the pool of NSCs is not altered between 2 and 6 months, either by FACS or pinwheel counting (present study<sup>16,23</sup>). Consistent with our results, and based on NSC apical GFAP-expressing process across the ventricle surface in a “pinwheel architecture”<sup>42</sup>, Shook *et al.* reported that the number of NSCs/mm<sup>2</sup> is stable between 3 months and 6 months<sup>23</sup>. Similarly, reduced neurogenesis during aging in the adult hippocampus has been linked to an overall reduction of NSC proliferation rather than a loss of NSCs<sup>21</sup>. However, compelling evidence indicate that the pool of NSCs is reduced in elderly mice (24 month-old)<sup>43</sup> suggesting that it is irreversibly depleted between middle-aged and elderly mice.

Few studies have explored the cell cycle of NSCs and their progenitors in the adult mouse brain *in vivo*<sup>44</sup> or *in vitro*<sup>18,33</sup>. Our study shows that major intrinsic changes in the proliferation of aNSCs occur as early as 6 months within the SVZ. Indeed, combining acute FACS sorting and the use of FUCCI mice coupled with time-lapse video microscopy demonstrates for the first time that the cell cycle lengthening observed at 6 months is specific to aNSCs and not TACs and only impacts the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. While the total cell cycle length of TACs is not altered a higher proportion of cells are in S-G2/M phase, probably to compensate the large decrease in aNSC proliferation (Fig. 2B,C). The aNSC G<sub>1</sub> lengthening is progressive, as the cell cycle is lengthened by 3 hours between 2- and 6-month-old mice (present study) and by 6.5 hours between 2- and 12-month-old mice<sup>18</sup>. Moreover, despite evidence that associates the G<sub>1</sub> lengthening in neural progenitors with a differentiation commitment during brain development<sup>45</sup>, in our study, the observed aNSC G<sub>1</sub> lengthening was not associated with differentiation as only cells undergoing subsequent divisions were analysed, and thus, not cells exiting the cell cycle. Therefore, this G<sub>1</sub> lengthening apparent by 6 months is specific to proliferative NSCs and results in a slowing down of the cell cycle, decreasing the number of generated cells. Our transcriptomic analysis of 2- and 6-month-old aNSCs further corroborated the cell cycle alterations observed at 6 months as a large majority of the genes enriched at 6 months and linked to the cell cycle were G<sub>1</sub>-specific genes, in contrast to those at 2 months. Our analysis also sheds light on a transcriptional signature of aNSCs at 6 months, at which significant changes



**Figure 5. Genes implicated in the cell cycle regulation and the TGFβ pathway are modulated at 6 months in activated NSCs.** Heat maps showing differences in transcript levels in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells from 2- and 6-month-old mice. Blue colour indicates low expression, and red indicates high expression (log2 scale). Replicate samples are shown for each group. (A,B) Cell cycle specific transcripts were classified by the cell cycle phase according to either <sup>a</sup>Whitfield *et al.*<sup>36</sup>, <sup>b</sup>Bar-Joseph *et al.*<sup>37</sup> or <sup>c</sup>Ishida *et al.*<sup>38</sup>. (B) Modulation of the TGFβ pathway.

are associated with cellular functions and pathways previously shown to play key roles in the regulation of neurogenesis within the SVZ.

**Pathways involved in early alteration of aNSCs.** We recently reported an overproduction of TGF $\beta$ 1 by the vascular niche in middle-aged mice, which leads to a neurogenesis decline that can be counteracted by selective anti-TGF $\beta$  blockage<sup>24</sup>. Using two different anti-TGF $\beta$  approaches to block TGF $\beta$  signalling, we demonstrated that TGF $\beta$  specifically lengthens the G<sub>1</sub> phase in aNSCs but not in TACs from middle-aged mice<sup>18</sup>. The modulation of the expression of several actors of the TGF $\beta$  pathway observed here at 6 months in aNSCs suggests that this pathway could play a key role in the progressive loss of progenitor cells very early in the young adult. Unexpectedly, our transcriptomic analysis also suggests a possible autocrine regulation through the synthesis of TGF $\beta$ 2 in aNSCs. Importantly, the maintenance of the aNSC pool over time and previous results on anti-TGF $\beta$  strategies suggest that aNSCs can be recruited to stimulate neurogenesis<sup>16,18,21</sup>. Our transcriptomic data could therefore help identify the signalling pathways that are altered with age in aNSCs, which may serve as future *in vivo* drug candidates in the context of aging and regenerative therapies based on stimulating endogenous NSCs. Due to the lack of data on early aging of SVZ neurogenesis, review articles have been forced to classify 2- and 6-month-old mice as “young adults”<sup>46</sup>. We suggest here that many dramatic changes happen during that time period at the stem cell level, making it necessary to study the early aging of neurogenic niches within the adult mammalian brain in more detail.

In summary, the neurogenesis decline observed during aging is a progressive process starting in the young adult mouse and is not caused by a loss of NSCs within the SVZ, as the pools of aNSCs and qNSCs remain stable with age. Instead, their progeny is dramatically reduced by the age of 4 months. Interestingly we report similar proliferative properties of TACs and Nbs at 2 and 6 months, whereas aNSCs exhibit a specific G<sub>1</sub> lengthening at 6 months, a finding corroborated by our transcriptional study. Our study provides a solid data-resource for the identification of gene regulatory networks implicated in the regulation of adult neurogenesis.

## References

- Fuentealba, L. C., Obernier, K. & Alvarez-Buylla, A. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell* **10**, 698–708, doi: 10.1016/j.stem.2012.05.012 (2012).
- Aimone, J. B. *et al.* Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev* **94**, 991–1026 (2014).
- Morshead, C. M. *et al.* Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* **13**, 1071–1082 (1994).
- Pastrana, E., Cheng, L. C. & Doetsch, F. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 6387–6392 (2009).
- Daynac, M. *et al.* Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. *Stem Cell Res* **11**, 516–528, doi: 10.1016/j.scr.2013.02.008 (2013).
- Codega, P. *et al.* Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their *in vivo* niche. *Neuron* **82**, 545–559, doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.039 (2014).
- Luo, Y. *et al.* Single-cell transcriptome analyses reveal signals to activate dormant neural stem cells. *Cell* **161**, 1175–1186, doi: 10.1016/j.cell.2015.04.001 (2015).
- Llorens-Bobadilla, E. *et al.* Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell*, 329–40, doi: 10.1016/j.stem.2015.07.002 (2015).
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703–716. (1999).
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Chain migration of neuronal precursors. *Science* **271**, 978–981, doi: 10.1126/science.271.5251.978 (1996).
- Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* **32**, 149–184 (2009).
- Tropepe, V., Craig, C. G. & Morshead, C. M. & vanderKooy, D. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* **17**, 7850–7859 (1997).
- Enwere, E. *et al.* Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* **24**, 8354–8365, doi: 10.1523/Jneurosci.2751-04.2004 (2004).
- Maslov, A. Y., Barone, T. A., Plunkett, R. J. & Pruitt, S. C. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci* **24**, 1726–1733, doi: 10.1523/Jneurosci.4608-03.2004 (2004).
- Blackmore, D. G., Golmohammadi, M. G., Large, B., Waters, M. J. & Rietze, R. L. Exercise Increases Neural Stem Cell Number in a Growth Hormone-Dependent Manner, Augmenting the Regenerative Response in Aged Mice. *Stem Cells* **27**, 2044–2052, doi: 10.1002/stem.120 (2009).
- Bouab, M., Palioras, G. N., Aumont, A., Forest-Berard, K. & Fernandes, K. J. L. Aging of the Subventricular Zone Neural Stem Cell Niche: Evidence for Quiescence-Associated Changes between Early and Mid-Adulthood. *Neuroscience* **173**, 135–149, doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.032 (2011).
- Piccin, D., Tufford, A. & Morshead, C. M. Neural stem and progenitor cells in the aged subependyma are activated by the young niche. *Neurobiol Aging* **35**, 1669–1679, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.026 (2014).
- Daynac, M. *et al.* TGF $\beta$  lengthens the G<sub>1</sub> phase of stem cells in aged mouse brain. *Stem Cells* **32**, 3257–3265, doi: 10.1002/stem.1815 (2014).
- Ahlenius, H., Visan, V., Kokaia, M., Lindvall, O. & Kokaia, Z. 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, doi: 10.1523/Jneurosci.6003-08.2009 (2009).
- Capilla-Gonzalez, V., Cebrian-Silla, A., Guerrero-Cazares, H., Garcia-Verdugo, J. M. & Quinones-Hinojosa, A. Age-Related Changes in Astrocytic and Ependymal Cells of the Subventricular Zone. *Glia* **62**, 790–803, doi: 10.1002/glia.22642 (2014).
- Lugert, S. *et al.* 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, doi: 10.1016/j.stem.2010.03.017 (2010).
- Balordi, F. & Fishell, G. Mosaic removal of hedgehog signaling in the adult SVZ reveals that the residual wild-type stem cells have a limited capacity for self-renewal. *J Neurosci* **27**, 14248–14259 (2007).
- Shook, B. A., Manz, D. H., Peters, J. J., Kang, S. & Conover, J. C. Spatiotemporal Changes to the Subventricular Zone Stem Cell Pool through Aging. *J Neurosci* **32**, 6947–6956, doi: 10.1523/Jneurosci.5987-11.2012 (2012).
- Pineda, J. R. *et al.* Vascular-derived TGF- $\beta$  increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *Embo Mol Med* **5**, 548–562 (2013).

25. Fischer, J. *et al.* Prospective isolation of adult neural stem cells from the mouse subependymal zone. *Nat Protoc* **6**, 1981–1989, doi: 10.1038/nprot.2011.412 (2011).
26. Mich, J. K. *et al.* Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *Elife* **3**, e02669 (2014).
27. Capela, A. & Temple, S. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* **35**, 865–875 (2002).
28. Obermair, F. J. *et al.* A novel classification of quiescent and transit amplifying adult neural stem cells by surface and metabolic markers permits a defined simultaneous isolation. *Stem Cell Res* **5**, 131–143, doi: 10.1016/j.scr.2010.05.001 (2010).
29. Daynac, M., Morizur, L., Kortulewski, T., Gauthier, L. R., Ruat, M., Mouthon, M. A. & Boussin, F. D. Cell Sorting of Neural Stem and Progenitor Cells from the Adult Mouse Subventricular Zone and Live-imaging of their Cell Cycle Dynamics. *J. Vis. Exp.*, doi: 10.3791/53247 (2015).
30. Sakaue-Sawano, A. *et al.* Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* **132**, 487–498 (2008).
31. Mouthon, M. A. *et al.* Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the ‘side population’. *J Neurochem* **99**, 807–817 (2006).
32. Reynolds, B. A. & Weiss, S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central-Nervous-System. *Science* **255**, 1707–1710, doi: 10.1126/science.1553558 (1992).
33. Costa, M. R. *et al.* Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression *in vitro*. *Development* **138**, 1057–1068, doi: 10.1242/dev.061663 (2011).
34. Mi, H. Y., Muruganujan, A. & Thomas, P. D. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research* **41**, D377–D386, doi: 10.1093/nar/gks1118 (2013).
35. Beckervordersandforth, R. *et al.* *In vivo* fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 744–758, doi: 10.1016/j.stem.2010.11.017 (2010).
36. Whitfield, M. L. *et al.* Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell* **13**, 1977–2000, doi: 10.1091/mbc.02-02-0030. (2002).
37. Bar-Joseph, Z. *et al.* Genome-wide transcriptional analysis of the human cell cycle identifies genes differentially regulated in normal and cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 955–960, doi: 10.1073/pnas.0704723105 (2008).
38. Ishida, S. *et al.* Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* **21**, 4684–4699, doi: 10.1128/MCB.21.14.4684-4699.2001 (2001).
39. Oka, C. *et al.* HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgf beta family proteins. *Development* **131**, 1041–1053, |doi: 10.1242/dev.00999 (2004).
40. Graham, J. R. *et al.* Serine Protease HTRA1 Antagonizes Transforming Growth Factor-beta Signaling by Cleaving Its Receptors and Loss of HTRA1 *In Vivo* Enhances Bone Formation. *Plos One* **8**, doi: ARTN e7409410.1371/journal.pone.0074094 (2013).
41. Shiga, A. *et al.* Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF-beta 1 via cleavage of proTGF-beta 1. *Hum Mol Genet* **20**, 1800–1810, doi: 10.1093/hmg/ddr063 (2011).
42. Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* **3**, 265–278, doi: 10.1016/j.stem.2008.07.004 (2008).
43. Capilla-Gonzalez, V., Cebrian-Silla, A., Guerrero-Cazares, H., Garcia-Verdugo, J. M. & Quinones-Hinojosa, A. Age-related changes in astrocytic and ependymal cells of the subventricular zone. *Glia* **62**, 790–803, doi: 10.1002/glia.22642 (2014).
44. Ponti, G. *et al.* Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, E1045–1054, doi: 10.1073/pnas.1219563110 (2013).
45. Salomoni, P. & Calegari, F. Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. *Trends Cell Biol* **20**, 233–243, doi: 10.1016/j.tcb.2010.01.006 (2010).
46. Hamilton, L. K., Joppe, S. E., Cochard, L. M. & Fernandes, K. J. L. Aging and neurogenesis in the adult forebrain: what we have learned and where we should go from here. *Eur J Neurosci* **37**, 1978–1986, doi: 10.1111/ejn.12207 (2013).

## Acknowledgements

We are indebted to C. Joubert, V. Neuville, V. Barroca, J. Tilliet and the staff of the animal facilities, to J. Baijer and N. Dechamps for cell sorting, to O. Etienne and T. Kortulewski for technical assistance, and to A. Gouret for her administrative assistance. Flow cytometry and cell sorting were performed at the iRCM Flow Cytometry Shared Resource, established by equipment grants from DIM-Stem-Pôle, INSERM, Foundation ARC, and CEA. This work was supported by grants from Electricité de France (EDF). L.M. has a fellowship from Région Ile-de-France (DIM Biothérapies) and M.D. from La Ligue Contre le Cancer.

## Author Contributions

M.D. and L.M. conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis, interpretation and manuscript writing. A.C. collection and/or assembly of data. M.A.M. conception and design, data analysis, interpretation and manuscript writing. F.D.B. conceived and designed the project, provided financial support, data analysis and interpretation, manuscript writing and final approval of the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Daynac, M. *et al.* Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells. *Sci. Rep.* **6**, 21505; doi: 10.1038/srep21505 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

# Supplementary information

## Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells

Mathieu Daynac<sup>1234\*</sup>, Lise Morizur<sup>1234\*</sup>, Alexandra Chicheportiche<sup>1234</sup>, Marc-André Mouthon<sup>1234</sup>, François D. Boussin<sup>1234</sup>

### Supplementary Figure Legends

**Figure S1. Decrease in total SVZ cell number with aging is associated with a disorganization of the niche.**  
(A) Evolution of the total number of cells in the SVZ during aging. (B-F) Quantification of the proportion of the main neurogenic populations relative to the total number of cells in the SVZ in mice aged 2 to 12 months. The data are represented as the mean±SEM and were obtained from at least 4 independent mice for each time point.  
\* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

**Figure S2. No permanent cell cycle exit at 6 months for activated NSCs and TACs.**

Frequency of BrdU-positive LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells following a 14-day BrdU administration in 2- and 6-month-old mice (n=3, mean±SEM).

**Figure S3. Neurosphere formation of activated NSCs and TACs is not altered at 6 months.**

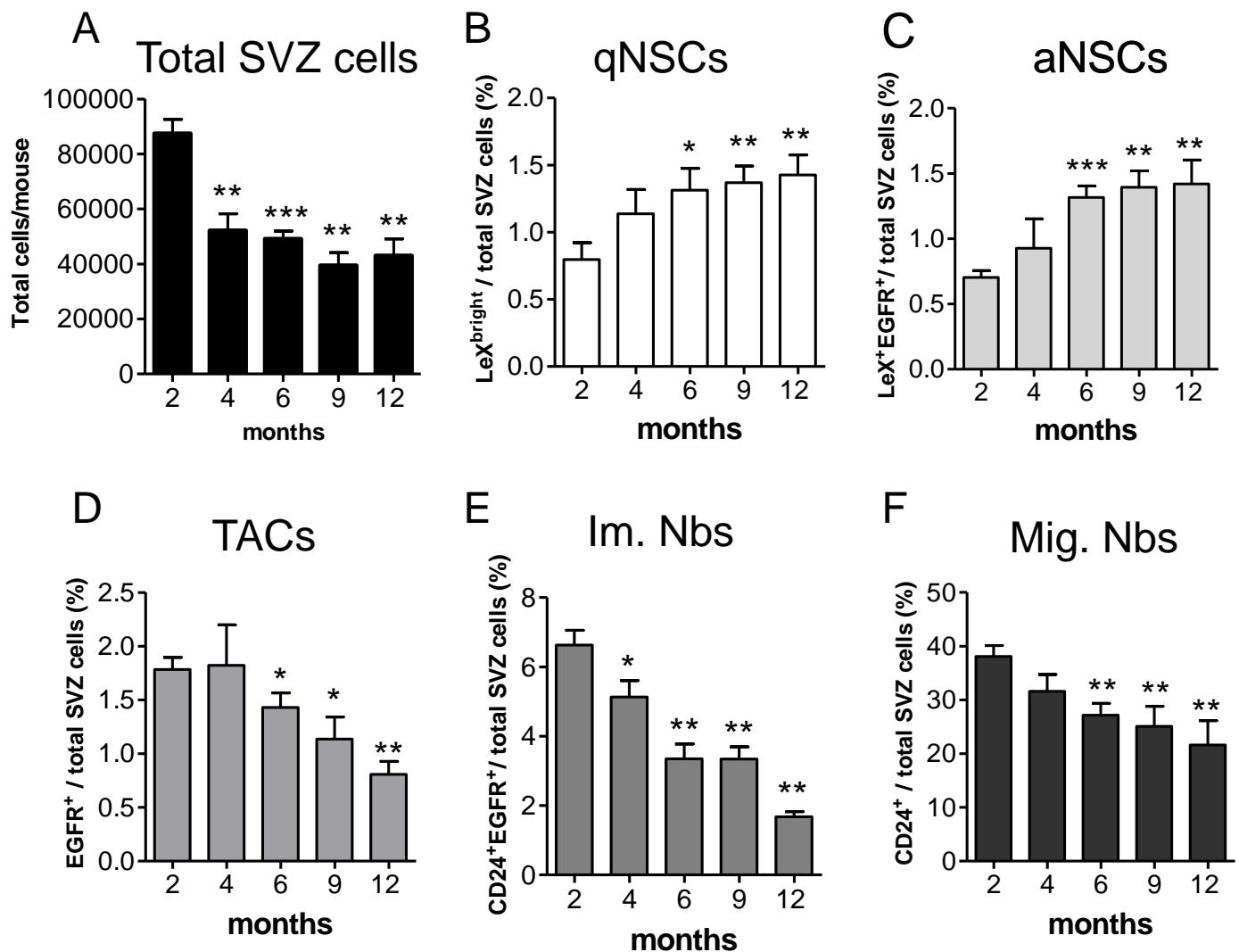
The number of primary neurospheres was counted 7 days after plating LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> sorted cells from 2- and 6-month-old mice in the presence of EGF and FGF-2 (n=4, mean±SEM).

### Supplementary dataset legends (supplementary .xls files)

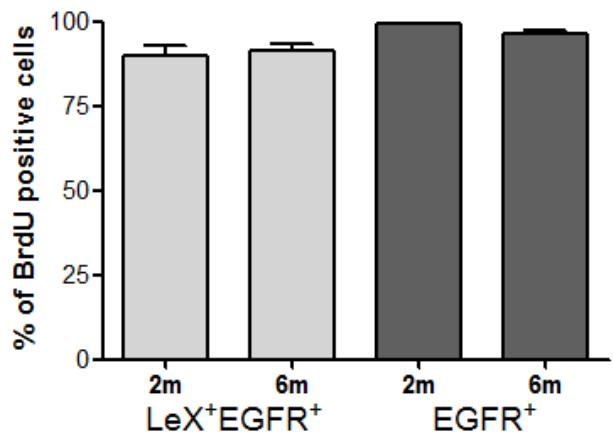
**Table S1: Overrepresentation test and related GO categories of genes enriched in aNSCs from 2 month-old vs 6 months-old mice**

**Table S2: List of genes enriched in aNSCs from 2 month-old vs 6 months-old mice**

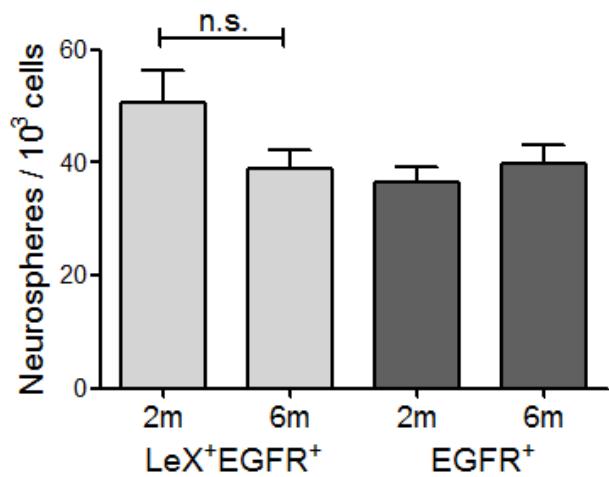
**Figure S1**



**Figure S2**



**Figure S3**



## 2 months-enriched genes: overrepresentation test and related GO categories

GO Ontology database Released 2015-02-17

GO biological process complete	Mus musculus	Box Input	Box Input (expected)	over(+) or under(-)-representation of the GO category	Fold Enrichment	p-value
Unclassified	1670	8	34.34	-	.23	0.00E00
cellular macromolecule metabolic process	5022	199	103.26	+	1.93	2.03E-19
macromolecule metabolic process	5628	213	115.72	+	1.84	5.87E-19
metabolic process	7721	257	158.75	+	1.62	4.20E-17
cellular metabolic process	6634	232	136.40	+	1.70	5.71E-17
organic substance metabolic process	7108	242	146.15	+	1.66	1.26E-16
primary metabolic process	6824	228	140.31	+	1.62	7.26E-14
heterocycle metabolic process	3447	144	70.87	+	2.03	7.66E-14
gene expression	2541	118	52.25	+	2.26	1.07E-13
cellular nitrogen compound metabolic process	3579	147	73.59	+	2.00	1.31E-13
nucleic acid metabolic process	2954	129	60.74	+	2.12	2.60E-13
cellular aromatic compound metabolic process	3479	142	71.53	+	1.99	1.05E-12
nitrogen compound metabolic process	3902	152	80.23	+	1.89	3.18E-12
organic cyclic compound metabolic process	3667	145	75.40	+	1.92	6.30E-12
nucleobase-containing compound metabolic process	3310	135	68.06	+	1.98	8.97E-12
RNA metabolic process	2536	111	52.14	+	2.13	7.81E-11
G-protein coupled receptor signaling pathway	1843	3	37.89	-	< 0.2	5.87E-10
macromolecule biosynthetic process	2612	109	53.71	+	2.03	3.22E-09
cellular macromolecule biosynthetic process	2589	108	53.23	+	2.03	4.37E-09
cellular biosynthetic process	3255	126	66.93	+	1.88	5.16E-09
organic substance biosynthetic process	3350	127	68.88	+	1.84	1.73E-08
biosynthetic process	3416	127	70.24	+	1.81	6.62E-08
cellular process	12735	331	261.85	+	1.26	1.15E-07
cellular component organization or biogenesis	4054	141	83.35	+	1.69	3.63E-07
detection of stimulus	1267	1	26.05	-	< 0.2	4.53E-07
cellular component organization	3922	137	80.64	+	1.70	5.87E-07
cellular nitrogen compound biosynthetic process	2229	92	45.83	+	2.01	6.35E-07
heterocycle biosynthetic process	2183	90	44.89	+	2.01	1.14E-06
organelle organization	2367	95	48.67	+	1.95	1.28E-06
sensory perception of chemical stimulus	1197	1	24.61	-	< 0.2	1.96E-06
cell surface receptor signaling pathway	3037	22	62.44	-	.35	3.04E-06
detection of stimulus involved in sensory perception	1174	1	24.14	-	< 0.2	3.17E-06
cellular protein metabolic process	2441	95	50.19	+	1.89	6.34E-06
aromatic compound biosynthetic process	2190	88	45.03	+	1.95	6.74E-06
system process	2190	12	45.03	-	.27	1.04E-05
organic cyclic compound biosynthetic process	2290	90	47.09	+	1.91	1.23E-05
sensory perception	1526	5	31.38	-	< 0.2	2.23E-05
cell cycle	983	50	20.21	+	2.47	4.35E-05
transcription, DNA-templated	1894	77	38.94	+	1.98	5.75E-05
nucleic acid-templated transcription	1895	77	38.96	+	1.98	5.88E-05
protein metabolic process	3086	109	63.45	+	1.72	5.92E-05
RNA biosynthetic process	1902	77	39.11	+	1.97	6.88E-05
neurological system process	1825	9	37.52	-	.24	7.24E-05
regulation of primary metabolic process	4493	143	92.38	+	1.55	1.11E-04
nucleobase-containing compound biosynthetic process	2121	82	43.61	+	1.88	1.58E-04
macromolecule modification	2026	79	41.66	+	1.90	2.11E-04
biological_process	20605	450	423.66	+	1.06	2.37E-04
regulation of macromolecule metabolic process	4558	143	93.72	+	1.53	2.80E-04
regulation of cellular metabolic process	4692	146	96.47	+	1.51	3.14E-04
regulation of transcription, DNA-templated	2802	99	57.61	+	1.72	3.53E-04
regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	3155	108	64.87	+	1.66	3.68E-04
regulation of nucleic acid-templated transcription	2816	99	57.90	+	1.71	4.49E-04
regulation of nitrogen compound metabolic process	3213	109	66.06	+	1.65	4.97E-04
regulation of RNA biosynthetic process	2822	99	58.02	+	1.71	4.97E-04
single-organism organelle organization	1643	67	33.78	+	1.98	5.64E-04
regulation of RNA metabolic process	2907	101	59.77	+	1.69	5.64E-04
regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	3067	104	63.06	+	1.65	1.13E-03
chromosome organization	748	39	15.38	+	2.54	1.21E-03
DNA metabolic process	602	34	12.38	+	2.75	1.29E-03
regulation of metabolic process	5228	156	107.49	+	1.45	1.33E-03
cell cycle process	724	38	14.89	+	2.55	1.49E-03
regulation of gene expression	3365	111	69.19	+	1.60	1.53E-03
mitotic cell cycle process	482	29	9.91	+	2.93	3.02E-03
cellular localization	1674	65	34.42	+	1.89	4.99E-03
macromolecular complex subunit organization	1647	64	33.86	+	1.89	5.99E-03
regulation of cellular biosynthetic process	3299	107	67.83	+	1.58	6.17E-03
regulation of macromolecule biosynthetic process	3182	104	65.43	+	1.59	6.50E-03
mitotic cell cycle	502	29	10.32	+	2.81	6.76E-03
cellular protein modification process	1921	71	39.50	+	1.80	8.50E-03
protein modification process	1921	71	39.50	+	1.80	8.50E-03
regulation of organelle organization	750	37	15.42	+	2.40	9.22E-03
regulation of chromosome segregation	50	9	1.03	+	> 5	9.31E-03
negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	1045	46	21.49	+	2.14	1.03E-02
negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	1090	47	22.41	+	2.10	1.37E-02
regulation of biosynthetic process	3372	107	69.33	+	1.54	1.71E-02
negative regulation of nitrogen compound metabolic process	1112	47	22.86	+	2.06	2.32E-02
negative regulation of macromolecule biosynthetic process	1101	46	22.64	+	2.03	3.99E-02
chromatin modification	468	26	9.62	+	2.70	4.87E-02

## 6 months-enriched genes: overrepresentation test and related GO categories

GO Ontology database Released 2015-02-17

GO biological process complete	Mus musculus	Box Input	Box Input (expected)	over(+) or under(-) -representation of the GO category	Fold Enrichment	p-value
Unclassified	1670	17	31.64	-	.54	0.00E00
system development	3372	139	63.88	+	2.18	4.56E-16
anatomical structure development	3976	152	75.33	+	2.02	4.24E-15
single-organism process	11794	312	223.44	+	1.40	4.84E-15
developmental process	4486	164	84.99	+	1.93	6.00E-15
single-organism developmental process	4464	163	84.57	+	1.93	9.33E-15
multicellular organismal development	3918	148	74.23	+	1.99	4.86E-14
positive regulation of biological process	4349	156	82.39	+	1.89	4.48E-13
nervous system development	1701	84	32.23	+	2.61	4.74E-12
regulation of multicellular organismal process	2235	98	42.34	+	2.31	1.97E-11
single-organism cellular process	10395	277	196.93	+	1.41	2.33E-11
regulation of response to stimulus	2713	109	51.40	+	2.12	1.22E-10
cellular process	12735	315	241.26	+	1.31	4.28E-10
negative regulation of biological process	3888	136	73.66	+	1.85	9.76E-10
neurogenesis	1275	66	24.15	+	2.73	1.30E-09
positive regulation of cellular process	3870	135	73.32	+	1.84	1.55E-09
negative regulation of cellular process	3561	127	67.46	+	1.88	2.41E-09
localization	3958	136	74.98	+	1.81	3.78E-09
single-multicellular organism process	5905	180	111.87	+	1.61	4.10E-09
regulation of cellular component organization	1734	78	32.85	+	2.37	7.48E-09
biological regulation	10168	265	192.63	+	1.38	7.67E-09
multicellular organismal process	6071	181	115.02	+	1.57	2.63E-08
regulation of developmental process	1968	83	37.28	+	2.23	3.36E-08
regulation of signaling	2385	94	45.18	+	2.08	4.01E-08
regulation of cell communication	2392	94	45.32	+	2.07	4.72E-08
gliogenesis	162	21	3.07	+	> 5	8.65E-08
single-organism localization	2536	97	48.04	+	2.02	9.04E-08
regulation of signal transduction	2095	85	39.69	+	2.14	1.28E-07
single-organism transport	2338	91	44.29	+	2.05	1.88E-07
cellular developmental process	3091	110	58.56	+	1.88	2.05E-07
cell differentiation	2942	106	55.74	+	1.90	2.63E-07
regulation of biological process	9743	251	184.58	+	1.36	4.27E-07
glial cell differentiation	126	18	2.39	+	> 5	5.53E-07
establishment of localization	3187	111	60.38	+	1.84	5.94E-07
transport	3085	108	58.45	+	1.85	8.79E-07
ion transport	1051	53	19.91	+	2.66	1.05E-06
generation of neurons	1198	57	22.70	+	2.51	1.71E-06
cellular component organization	3922	127	74.30	+	1.71	1.80E-06
anion transport	423	31	8.01	+	3.87	2.09E-06
oligodendrocyte differentiation	50	12	.95	+	> 5	2.80E-06
positive regulation of response to stimulus	1459	64	27.64	+	2.32	3.11E-06
regulation of localization	1986	78	37.62	+	2.07	4.65E-06
cell development	1404	62	26.60	+	2.33	4.69E-06
negative regulation of signaling	971	49	18.40	+	2.66	5.40E-06
negative regulation of cell communication	974	49	18.45	+	2.66	5.97E-06
cellular component organization or biogenesis	4054	128	76.80	+	1.67	7.56E-06
glial cell development	69	13	1.31	+	> 5	9.43E-06
negative regulation of signal transduction	862	45	16.33	+	2.76	1.02E-05
regulation of biological quality	2450	89	46.42	+	1.92	1.06E-05
negative regulation of response to stimulus	1098	52	20.80	+	2.50	1.34E-05
regulation of cellular process	9322	237	176.61	+	1.34	1.63E-05
positive regulation of metabolic process	2672	94	50.62	+	1.86	1.64E-05
organic anion transport	289	24	5.48	+	4.38	2.14E-05
regulation of cell differentiation	1405	60	26.62	+	2.25	3.15E-05
detection of chemical stimulus	1146	1	21.71	-	< 0.2	3.51E-05
organ development	2466	87	46.72	+	1.86	6.75E-05
ensheathment of neurons	83	13	1.57	+	> 5	8.20E-05
axon ensheathment	83	13	1.57	+	> 5	8.20E-05
anatomical structure morphogenesis	1894	72	35.88	+	2.01	9.18E-05
response to stress	2297	82	43.52	+	1.88	1.20E-04
negative regulation of multicellular organismal process	904	44	17.13	+	2.57	1.21E-04
regulation of multicellular organismal development	1473	60	27.91	+	2.15	1.71E-04
central nervous system development	638	35	12.09	+	2.90	2.31E-04
regulation of intracellular signal transduction	1306	55	24.74	+	2.22	2.39E-04

regulation of neurogenesis	609	34	11.54	+	2.95	2.42E-04
detection of stimulus involved in sensory perception	1174	2	22.24	-	< 0.2	2.51E-04
positive regulation of cellular metabolic process	2339	82	44.31	+	1.85	2.64E-04
regulation of cell morphogenesis	417	27	7.90	+	3.42	3.71E-04
regulation of molecular function	1929	71	36.54	+	1.94	4.19E-04
cellular lipid metabolic process	686	36	13.00	+	2.77	4.32E-04
response to stimulus	6668	178	126.33	+	1.41	4.56E-04
cell adhesion	852	41	16.14	+	2.54	5.17E-04
myelination	81	12	1.53	+	> 5	5.42E-04
regulation of cell development	757	38	14.34	+	2.65	5.61E-04
carboxylic acid transport	199	18	3.77	+	4.77	5.92E-04
biological adhesion	860	41	16.29	+	2.52	6.62E-04
organic acid transport	201	18	3.81	+	4.73	6.85E-04
response to organic substance	1692	64	32.05	+	2.00	8.09E-04
oligodendrocyte development	29	8	.55	+	> 5	8.40E-04
regulation of nervous system development	676	35	12.81	+	2.73	9.10E-04
cellular metabolic process	6634	176	125.68	+	1.40	9.23E-04
lipid metabolic process	908	42	17.20	+	2.44	1.02E-03
primary metabolic process	6824	179	129.28	+	1.38	1.50E-03
cell projection organization	789	38	14.95	+	2.54	1.56E-03
neuron projection development	478	28	9.06	+	3.09	1.58E-03
locomotion	868	40	16.44	+	2.43	2.27E-03
organic substance metabolic process	7108	184	134.66	+	1.37	2.28E-03
positive regulation of multicellular organismal process	1257	51	23.81	+	2.14	2.43E-03
detection of stimulus	1267	4	24.00	-	< 0.2	2.64E-03
tube development	555	30	10.51	+	2.85	3.09E-03
regulation of transport	1455	56	27.56	+	2.03	3.25E-03
platelet-derived growth factor receptor signaling pathway	35	8	.66	+	> 5	3.43E-03
tissue development	1430	55	27.09	+	2.03	4.26E-03
regulation of anatomical structure morphogenesis	791	37	14.99	+	2.47	4.52E-03
enzyme linked receptor protein signaling pathway	475	27	9.00	+	3.00	4.60E-03
cellular component morphogenesis	802	37	15.19	+	2.44	6.24E-03
positive regulation of signaling	1227	49	23.25	+	2.11	6.58E-03
cation transport	705	34	13.36	+	2.55	6.75E-03
positive regulation of signal transduction	1085	45	20.56	+	2.19	7.08E-03
metabolic process	7721	194	146.27	+	1.33	7.53E-03
positive regulation of cell communication	1235	49	23.40	+	2.09	7.90E-03
cellular response to chemical stimulus	1465	55	27.75	+	1.98	8.87E-03
regulation of neuron differentiation	493	27	9.34	+	2.89	9.22E-03
phosphate-containing compound metabolic process	1544	57	29.25	+	1.95	9.33E-03
circulatory system development	717	34	13.58	+	2.50	9.74E-03
cardiovascular system development	717	34	13.58	+	2.50	9.74E-03
neuron development	620	31	11.75	+	2.64	9.95E-03
organic substance transport	1472	55	27.89	+	1.97	1.02E-02
positive regulation of cellular component movement	353	22	6.69	+	3.29	1.19E-02
regulation of cell migration	565	29	10.70	+	2.71	1.32E-02
tube morphogenesis	356	22	6.74	+	3.26	1.36E-02
response to external stimulus	1265	49	23.97	+	2.04	1.53E-02
regulation of cellular component movement	666	32	12.62	+	2.54	1.53E-02
positive regulation of locomotion	359	22	6.80	+	3.23	1.56E-02
regulation of phospholipase activity	43	8	.81	+	> 5	1.56E-02
positive regulation of cell migration	332	21	6.29	+	3.34	1.63E-02
cellular response to organic substance	1121	45	21.24	+	2.12	1.66E-02
response to endogenous stimulus	878	38	16.63	+	2.28	1.97E-02
positive regulation of macromolecule metabolic process	2225	73	42.15	+	1.73	1.99E-02
behavior	547	28	10.36	+	2.70	2.10E-02
phosphorus metabolic process	1589	57	30.10	+	1.89	2.23E-02
neuron differentiation	781	35	14.80	+	2.37	2.34E-02
ion transmembrane transport	647	31	12.26	+	2.53	2.34E-02
astrocyte differentiation	32	7	.61	+	> 5	2.38E-02
regulation of growth	551	28	10.44	+	2.68	2.41E-02
response to oxygen levels	161	14	3.05	+	4.59	2.52E-02
positive regulation of cell motility	342	21	6.48	+	3.24	2.56E-02
neuron projection morphogenesis	343	21	6.50	+	3.23	2.68E-02
regulation of metabolic process	5228	140	99.04	+	1.41	2.70E-02
positive regulation of phospholipase activity	33	7	.63	+	> 5	2.90E-02
regulation of locomotion	657	31	12.45	+	2.49	3.18E-02
regulation of cell motility	594	29	11.25	+	2.58	3.43E-02
homeostatic process	1117	44	21.16	+	2.08	3.47E-02
actin cytoskeleton organization	349	21	6.61	+	3.18	3.48E-02
regulation of cellular metabolic process	4692	128	88.89	+	1.44	3.52E-02

regulation of phosphate metabolic process	1344	50	25.46	+	1.96	3.62E-02
negative regulation of neurogenesis	216	16	4.09	+	3.91	3.87E-02
regulation of phosphorus metabolic process	1349	50	25.56	+	1.96	4.01E-02
protein metabolic process	3086	92	58.46	+	1.57	4.30E-02
regulation of cell proliferation	1316	49	24.93	+	1.97	4.44E-02
heart development	416	23	7.88	+	2.92	4.85E-02
negative regulation of intracellular signal transduction	357	21	6.76	+	3.10	4.88E-02
organic acid transmembrane transport	85	10	1.61	+	> 5	4.92E-02
localization of cell	672	31	12.73	+	2.43	4.94E-02
cell motility	672	31	12.73	+	2.43	4.94E-02

## **ARTICLE 4**

### **Gene profiling analysis of quiescent and activated neural stem cells from the adult mouse subventricular zone**

**Lise Morizur**, Alexandra Chicheportiche, Mathieu Daynac, François D. Boussin<sup>§</sup>, Marc-André Mouthon<sup>§</sup>

En cours de préparation



## Résumé de l'article 4

Les cellules souches présentes au sein des tissus adultes se caractérisent par leur capacité à maintenir un état de dormance non prolifératif, la quiescence, qu'elles peuvent quitter pour entrer dans le cycle cellulaire en présence de stimuli afin d'assurer l'homéostasie cellulaire (Li and Clevers, 2010). Les CSN des niches neurogéniques adultes sont principalement quiescentes et une régulation stricte de la balance entre quiescence et prolifération est indispensable pour éviter l'épuisement de leur stock (Cheung and Rando, 2013). En effet, de nombreuses études montrent que la dérégulation et/ou la perte de quiescence entraîne une prolifération incontrôlée des CSN qui mène à l'épuisement du stock de cellules souches et à la perte des progéniteurs neuraux (Molofsky et al., 2003; Kippin et al., 2005; Mira et al., 2010; Ottone et al., 2014). La rareté des CSN ainsi que le manque de marqueurs pour les identifier ont pendant longtemps limité l'étude de leur propriétés cellulaires et des mécanismes moléculaires régulant la transition quiescence-prolifération.

A l'aide de la technique de tri cellulaire décrite dans l'article 1, nous avons montré au cours d'une précédente étude que les cellules LeX<sup>bright</sup> ne proliféraient pas et qu'elles étaient radio-résistantes contrairement aux cellules de la progénie neurale (Daynac et al., 2013). Afin d'étudier leur répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire, nous avons utilisé des souris FUCCI-Rouge permettant de suivre les cellules en phase G<sub>1</sub> à l'aide d'une fluorescence rouge (Sakaue-Sawano et al., 2008). En accord avec leur statut prolifératif, nous montrons que les cellules LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> sont réparties entre les phases S-G<sub>2</sub>/M et G<sub>1</sub> tandis que les cellules LeX<sup>bright</sup> sont pour la majorité en G<sub>1</sub> et en G<sub>0</sub>. De plus, alors que 89,7% des cellules LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> incorporent le BrdU après 15 jours d'administration continue dans l'eau de boisson des souris, la totalité d'entre elles le perde par dilution au cours des divisions successives après 14 jours. A l'inverse, nous montrons que bien que seulement 6,8% des cellules LeX<sup>bright</sup> incorporent le BrdU après 15 jours, plus de la moitié d'entre elles retiennent le BrdU après 15 jours et 30 jours de chasse. Nous vérifions donc que les cellules LeX<sup>bright</sup> correspondent bien à une population de *label-retaining cells in vivo*, une propriété des cellules quiescentes (Morshead et al., 1994). Nous montrons également que la majorité des cellules LeX<sup>bright</sup> et LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> sont générées au cours du développement embryonnaire entre E14,5 et E15,5 puis restent

relativement quiescentes jusqu'à l'âge adulte, en accord avec deux études récentes (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015).

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui régulent la quiescence des CSN, nous avons ensuite réalisé une étude comparative du transcriptome des cellules LeX<sup>bright</sup> et LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> issues de jeunes souris adultes. Nous mettons en évidence l'expression différentielle de 996 gènes, dont 433 plus abondants dans les cellules LeX<sup>bright</sup> et 563 plus abondants dans les cellules LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup>. Les analyses d'ontologie et d'enrichissement génique révèlent des caractéristiques moléculaires distinctes. En accord avec le statut prolifératif des CSN activées, le transcriptome des cellules LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> est enrichi en gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, ainsi que la transcription et la traduction. Similairement, nous montrons que plus de 80% des facteurs de transcription et co-facteurs dont l'expression est modulée sont surexprimés par les cellules LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup>. De manière importante, nous retrouvons des facteurs de transcription déjà impliqués dans la régulation de la prolifération des CSN adultes, par exemple Ascl1/Mash1 (Urban et al., 2016) dont les transcrits sont 200 fois plus élevés dans les cellules LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup>.

A l'inverse, nos analyses montrent que les cellules LeX<sup>bright</sup> sont enrichies en processus liées à l'adhésion cellulaire, au transport et à la communication cellulaire, soulignant la régulation de l'état quiescent par de multiples signaux en provenance du microenvironnement. Ceci se retrouve dans la localisation des protéines codées par les gènes surexprimés dans les cellules LeX<sup>bright</sup> qui sont principalement liées à la membrane cellulaire. Nous montrons également que ces gènes sont pour la plupart des molécules d'adhésion ou des récepteurs membranaires, parmi lesquels certains ont déjà été impliqués dans la régulation de la quiescence des CSN adultes (par exemple : VCAM1, récepteurs au GABA, récepteur Ptch1 de la voie Sonic Hedgehog). Nous nous sommes par la suite plus particulièrement intéressés aux membres de la famille des syndécans : les sdc2 et sdc4 sont surexprimés dans les cellules LeX<sup>bright</sup> tandis que le sdc1 est surexprimé dans les cellules LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup>. Nous confirmons par ailleurs au niveau protéique que le sdc1 est plus fortement exprimé par les populations cellulaires de la ZSV qui prolifèrent, et permet donc de discriminer les CSN quiescentes des CSN activées. Enfin, nous montrons dans un modèle de quiescence induite par l'ajout de BMP4 en culture que les niveaux d'expression des sdc1-2-4 sont directement modulés par le statut

prolifératif des cellules. En effet, l'expression du *sdc1* – spécifique des cellules en prolifération - diminue, tandis que l'expression des *sdc2* et *sdc4* – spécifiques des cellules *LeX<sup>bright</sup>* – augmente. L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle des syndécans dans la régulation de la balance entre quiescence et prolifération des CSN adultes.

La mise au point de techniques de purification des CSN quiescentes a ouvert la voie à l'étude de leur propriétés fonctionnelles et de leur dynamique cellulaire. Il est également possible d'étudier les mécanismes intrinsèques et extrinsèques régulant le fin équilibre entre quiescence et prolifération des CSN adultes. Notre étude transcriptomique constitue en ce sens une ressource importante pour l'identification de nouveaux marqueurs des CSN quiescentes et activées, en plus de proposer de possibles régulateurs de la balance quiescence-prolifération des CSN adultes.

Note: en raison de leur taille, les Table S2 et Table S4 ne sont pas présentées.



# **Gene profiling analysis of quiescent and activated neural stem cells from the adult mouse subventricular zone**

**Lise Morizur<sup>1,2,3,4</sup>, Alexandra Chicheportiche<sup>1,2,3,4</sup>, Mathieu Daynac<sup>1,2,3,4</sup>, François D.  
Boussin\*<sup>1,2,3,4</sup> & Marc-André Mouthon\*<sup>1,2,3,4</sup>**

<sup>1</sup> CEA DSV iRCM SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>2</sup> INSERM, UMR967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>3</sup> Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>4</sup> Université Paris Sud, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France.

Correspondence to [boussin@cea.fr](mailto:boussin@cea.fr) or [marc-andre.mouthon@cea.fr](mailto:marc-andre.mouthon@cea.fr)

\*These authors contributed equally to this work.

KEYWORDS: neural stem cells, cell sorting, microarray, quiescence.

## Abstract

Deciphering the mechanisms regulating the quiescence of adult neural stem cells (NSCs) is a key step for the development of new therapeutic strategies based on the stimulation of their endogenous regenerative potential in the damaged brain. Here, we show that LeX<sup>bright</sup> cells sorted from the adult mouse subventricular zone (SVZ) exhibit all the characteristic features of quiescent NSCs. Indeed, they are generated during embryonic development and constitute a subpopulation of slow dividing cells in the adult SVZ. Comparative transcriptomic analyses show that they express hallmarks of NSCs but display a distinct molecular signature from activated NSCs (LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells). These data provide a comprehensive data resource to investigate cellular quiescence in adult neurogenic niches, which highlights the central role of the microenvironment. We further reveal different expression patterns of the members of the syndecan family between quiescent and activated NSCs suggesting their potential role in adult NSC regulation.

## Introduction

Adult stem cells reside within specialized microenvironments that integrate intricate signals critical for maintaining stem cell populations in an undifferentiated state, guiding cell fate decisions and modulating the regenerative potential of the niche (Conover and Notti, 2008). In the adult mammalian brain, neural stem cells (NSCs) continuously generate neurons throughout life in two discrete regions: the subventricular zone (SVZ) along the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus. NSCs from the adult SVZ successively give rise to transit-amplifying cells and neuroblasts that differentiate into neurons once they have reached the olfactory bulbs (Lim and Alvarez-Buylla, 2014). A key feature of NSCs is their remarkable proliferative capacity that sustains repetitive regeneration of damaged tissue (Cheung and Rando, 2013) through the activation of quiescent stem cells (Morshead et al., 1994; Doetsch et al., 1999; Daynac et al., 2013; Codega et al., 2014; Mich et al., 2014; Llorens-Bobadilla et al., 2015).

In contrast to their progeny, most adult NSCs are quiescent and a tight regulation of the balance between their quiescent and proliferative states appears essential for their long-term maintenance in neurogenic niches. Indeed, dysregulation and/or loss of quiescence often results in premature proliferation of NSCs ultimately leading to stem cell and progenitor depletion (Molofsky et al., 2003; Kippin et al., 2005; Mira et al., 2010; Ottone et al., 2014). Deciphering the functional properties of quiescent NSCs and the associated regulatory mechanisms are thus important to develop new approaches for NSC-based regenerative medicine.

The complexity of neurogenic niches, rare number of resident NSCs as well as the lack of specific cellular markers have long hampered the study of NSCs. The recent development of flow cytometry-based cell sorting strategies has enabled the identification and

the isolation of quiescent and proliferating NSCs from their niche and opened new doors for the study of the regulation of stem cell quiescence (Daynac et al., 2013; Codega et al., 2014; Mich et al., 2014; Llorens-Bobadilla et al., 2015). While all of the cell sorting strategies rely on the use of the EGF receptor to discriminate the two subpopulations of NSCs, several combinations of markers have been used to identify the stem cell population, among which CD133 (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014), Glast (Mich et al., 2014; Llorens-Bobadilla et al., 2015), LeX (Daynac et al., 2013; Daynac et al., 2015) and GFAP (Codega et al., 2014).

Using our recently developed cell sorting strategy to isolate  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  cells and  $\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$  cells from the adult SVZ (Daynac et al., 2013; Daynac et al., 2015), we previously showed that the vast majority of  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  cells are radio-resistant and are responsible for the regeneration of the irradiated niche, corresponding to quiescent NSCs (Daynac et al., 2013). With the advent of transcriptome analyses, it has also become possible to study molecular hallmarks and gene regulatory networks governing NSC behavior (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Daynac et al., 2016a).

Herein, we show that  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  cells are slow dividing cells *in vivo* that are generated during embryonic development. The comparative analysis of the transcriptomic profiles of  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  and  $\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$  cells further reveals that the quiescent state is tightly regulated by the microenvironment and provides a comprehensive data resource to investigate cellular quiescence in adult neurogenic niches.

## **Materials and methods**

### ***Animals and BrdU treatments***

Young adult C57Bl/6 mice (2-3 months) were maintained in standard cages with access to food and water *ad libitum* in a colony room kept at a constant temperature (19-22°C) and humidity (40-50%) on a 12:12-hour light/dark cycle. For cell cycle analysis, we used mice transgenic for fluorescence ubiquitination cell cycle indicator (FUCCI) chromatin licensing and DNA replication factor 1 (Cdt1)-red (Sakaue-Sawano et al., 2008).

For embryonic BrdU administration, pregnant mice were repeatedly injected BrdU intraperitoneally between E14.5 and E15.5 (1mg/mouse, 3 times/day, 4 hours apart) as previously described (Fuentealba et al., 2015). Mice were killed 21 days after birth for cell sorting. For adult BrdU administration, 2 month-old mice were initially injected intraperitoneally with 100 mg BrdU/kg body mass then maintained with drinking water containing BrdU given (1 mg/mL, 1% glucose) for 14 consecutive days followed by a 2 and 4-week chase period until sacrifice.

Animal experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 22th September 2010 (EC/2010/63) and were approved by Comité d’Ethique CEtEA (#12-034).

### ***SVZ cell preparation***

Adult SVZs were dissected, dissociated and labelled as previously described (Daynac et al., 2015). Briefly, dissected SVZs were digested with papain (1 mg/ml, Worthington) supplemented with 0.01 mg/ml DNase I (Sigma) for 10 min at 37°C. The minced tissue was then mechanically dissociated into a single-cell suspension in ovomucoid solution (0.7 mg/ml, Sigma). Aggregates were removed with 20 µm nylon filters (BD Biosciences) and cells were

centrifuged at 300 g for 20 min at 4°C without brake in 22% Percoll (GE Healthcare) to remove myelin. Finally, cells were incubated for 20 min with the following antibodies: CD24 phycoerythrin [PE]-conjugated (rat IgG2b; 1:50 BD Biosciences), CD15/LeX fluorescein isothiocyanate [FITC]-conjugated (clone MMA, mouse IgM; 1:50 BD Biosciences) and Alexa647-conjugated EGF ligand (1:250 Life Technologies). Immediately prior to FACS, Hoechst 33258 was added to a final concentration of 1 $\mu$ g/mL to label dead cells. Cells were sorted on an INFLUX cell sorter equipped with an 80  $\mu$ m nozzle at 45 psi (BD Biosciences). Gates were set using Fluorescence Minus One (FMO) controls on SVZ cells.

### ***Immunofluorescence***

Sorted cells were recovered in DMEM:F12 medium supplemented with 2% B27 then plated without mitogen on poly-D-lysine- and laminin-coated 8-well glass slides (Millicell) in an incubator at 37°C 5% CO<sub>2</sub> for 2-4 hours and fixed in 2% paraformaldehyde. After 1 hour in blocking solution PBS-0.1% Triton-X100–1% BSA at RT, cells were incubated overnight at 4°C with anti-mouse CD138/Sdc1 primary antibody (1:100, BD Pharmingen). After three washes in PBS, cells were incubated with AlexaFluor donkey secondary antibodies at 1:500 (Invitrogen). For BrdU detection, cells were permeabilized for 5 mn at RT in 0.5% Triton X-100 in PBS. Incubation in blocking solution (PBS, 0.05% Tween 20, 4% BSA) for 1 hour was followed by a 30 min incubation at 37 °C with anti-BrdU at 1/300 (GE Healthcare) in DNase incubation buffer (0.5X PBS, 30 mM Tris-HCl pH 8, 0.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM 2-mercaptoethanol, 0.5% BSA and 10  $\mu$ g/mL DNase I). After several washes, cells were incubated with an Alexa fluor 488-conjugated donkey secondary antibody at 1:500 (Invitrogen).

### ***Cell culture***

Dissociated SVZ cell suspensions were grown at 37°C 5% CO<sub>2</sub> as neurospheres in medium composed of DMEM/F12 (Life Technologies) supplemented with 0.6% Glucose (Sigma), 1x Insulin-Selenium-Transferrin (Life Technologies), N-2 supplement (Life Technologies) and B-27 supplement (Life Technologies) in the presence of 20 ng/ml EGF (Millipore) or 25 ng/mL hBMP4 (R&D Systems). After 7 days, neurospheres were mechanically dissociated and cells were plated at a density of 1.4 cells/μl in 24 well plates. Cells were then counted at day 3 and lysed in RLT buffer for qRT-PCR experiments.

### ***RNA isolation, microarrays and qRT-PCR***

NSCs were sorted into tubes containing RLT lysis buffer and total RNAs were isolated with the RNeasy Micro Kit with DNase treatment according to the manufacturer's instructions (Qiagen). For microarray experiments, cDNAs were synthesized and amplified using the Ovation Pico WTA System (NuGEN) before being hybridized on Affymetrix MOE430 2.0 arrays (45,000 probe sets) according to the Affymetrix standard protocols at PartnerShip (Evry, France). The data were quality controlled with the Expression Console software (Affymetrix) following normalization with the MAS5 algorithm.

For qRT-PCR experiments, total RNAs were reverse-transcribed into cDNA using the Reverse Transcription High Capacity Master Mix (Applied Biosystems) with specific primers listed in Table S1 (Sigma-Aldrich). q-PCR was performed on an ABI PRISM 7900 Sequence Detector System using SYBR Green for RT-PCR. Expression levels were normalized to GAPDH.

### ***Microarrays analysis***

Microarray data were normalized with GC-robust multi-array analysis (GC-RMA) using log2 transformed expression levels in Genespring GX12 (Agilent Technologies). For analysis of the transcriptomic profiles, differentially expressed probes were filtered by an average expression greater than 50 in at least 1 population, at least 2-fold change and a Student's t-test corrected p-value <0.05. A statistical overrepresentation analysis of GO biological processes ( $p<0.05$ ) (<http://www.pantherdb.org>) using binomial statistics with Bonferroni correction and cellular component ontology analysis were performed with PANTHER software. GO terms were hand-curated into thematic categories to highlight transcriptional differences between the two cell populations. The expression levels among differentially expressed probes that match to the same gene were averaged in heat maps depicting gene expression changes between  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  and  $\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$  cells that were generated with Gene-E (<https://software.broadinstitute.org/GENE-E/>).

### ***Statistical analyses***

The data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Non-parametric Mann-Whitney test was conducted to compare qRT-PCR data using GraphPad PRISM software (GraphPad, San Diego, CA). Significance was set at  $p<0.05$ .

## Results and discussion

### *Quiescent NSCs exhibit distinct cell cycle properties in vivo*

We recently developed a simple cell sorting strategy based on the detection of the surface markers LeX, CD24 and EGFR to simultaneously isolate quiescent NSCs (CD24<sup>-</sup>LeX<sup>bright</sup>, hereafter LeX<sup>bright</sup> cells), activated NSCs (CD24<sup>-</sup>LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>, hereafter LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells) and transit-amplifying cells (CD24<sup>-</sup>EGFR<sup>+</sup>, hereafter EGFR<sup>+</sup> cells) from the adult SVZ (Fig. 1A) (Daynac et al., 2013; Daynac et al., 2015). In contrast to the other cell populations, we previously showed that the vast majority of LeX<sup>bright</sup> cells are not proliferating and are radio-resistant (Daynac et al., 2013). To explore their cell cycle in more detail, we used Fluorescence Ubiquitination Cell Cycle Indicator (FUCCI)-Red mice (Sakaue-Sawano et al., 2008), which allow the visualization of cells in G<sub>1</sub> (FUCCI-Red<sup>positive</sup> cells) through a G<sub>1</sub> specific red-Cdt1 reporter whereas FUCCI-Red-negative cells FUCCI-Red<sup>negative</sup> cells represent the cells in S-G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle. Moreover, FUCCI-Red<sup>bright</sup> cells have been shown to be cells exiting or out of the cell cycle (G<sub>0</sub>) (Roccio et al., 2013; Daynac et al., 2015). Whereas the majority of LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells were in S-G<sub>2</sub>/M phases (55.8 ± 3.4%), LeX<sup>bright</sup> cells were for the most part distributed in G<sub>1</sub> (25.6 ± 2.5%) and in G<sub>0</sub> (71.9 ± 2.47%) in accordance with their quiescent state (Fig. 1B).

To further characterize the cell cycle dynamics of LeX<sup>bright</sup> cells *in vivo*, we performed a BrdU label retention assay to assess their ability to retain labeling for extended chase periods (Fig. 1C). Immediately after a two-week pulse of BrdU incorporation, 89.7 ± 3.0% of LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells were BrdU-positive while they had almost all lost the BrdU labeling after 2 and 4 weeks of chase due to its progressive dilution with each round of cell division (Fig. 1C). On the other hand, only 6.8 ± 0.4% of LeX<sup>bright</sup> cells had incorporated BrdU after 2 weeks and 3.7 ± 1.6% and 4.4 ± 0.8% of LeX<sup>bright</sup> cells were still BrdU-positive after 2 and 4 weeks of

chase (Fig. 1C). These data confirmed that LeX<sup>bright</sup> cells correspond to a subpopulation of slow dividing NSCs *in vivo*.

Two recent studies have suggested that the majority of NSCs in the young adult SVZ are produced during the embryonic development between E13.5 and E15.5 and remain largely quiescent until they become reactivated postnatally (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015). We thus investigated whether our sorted cell populations were formed during this embryonic window time and retained BrdU labeling postnatally. We first verified that our sorted cell populations at postnatal day 21 (P21) expressed the NSC transcription factor Sox2 as expected from its expression in NSCs and progenitors (Ferri et al., 2004) (Fig. 1D). Next, BrdU was administrated to pregnant mice between E14.5 and E15.5 and LeX<sup>bright</sup> as well as LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells were sorted at P21 as previously reported (Fuentealba et al., 2015) (Fig. 1E). Interestingly, 67.7% of LeX<sup>bright</sup> cells were BrdU-positive confirming that they were formed during E14.5-15.5 and were maintained in a quiescent state postnatally (Fig. 1D). Moreover, most of LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> (85.1%) were also positive for BrdU regardless of their proliferative status suggesting that they were generated from a quiescent population after a limited number of rounds of division (Fig. 1E).

Taken together, our data support that LeX<sup>bright</sup> cells are generated during embryonic development and are largely quiescent until they divide with a slow rate during the adulthood, corresponding to quiescent NSCs in the adult SVZ.

### ***Distinct molecular signatures of quiescent and activated NSCs***

In order to gain insights into the mechanisms regulating stem cell quiescence, we performed a microarray analysis of LeX<sup>bright</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells sorted from 2-month-old mice using whole-genome Affymetrix MOE430 2.0 arrays. We first compared their global

mRNA expression patterns to those obtained from previous studies either characterizing NSCs (Codega et al., 2014) or differentiated cells (Cahoy et al., 2008) using principal component analysis (PCA) (Fig. 2A). PCA is an unsupervised pattern recognition and visualization tool used to reduce the dimensionality of datasets derived from transcriptomic arrays, making it possible to visually assess similarities and differences between cell populations (Ringner, 2008). Direct comparison of LeX<sup>bright</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> transcriptome profiles revealed that they were clustered away from differentiated cells (astrocytes, oligodendrocytes and neurons) (Fig. 2A). Moreover, the clear separation of LeX<sup>bright</sup> cells from LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells confirmed their distinct cellular identity (Fig. 2A). Importantly, LeX<sup>bright</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells were closely clustered to GFAP::GFP<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> and GFAP::GFP<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells, previously shown to correspond to quiescent and proliferating NSCs in the adult SVZ (Codega et al., 2014), providing additional validation of our cell sorting approach (Fig. 2A). Besides, transcriptional hallmarks of NSCs such as Slc1a3/Glast, prominin1/CD133, Nr2e1/Tlx, Hes5 and Sox2 were found expressed at similar levels in both LeX<sup>bright</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells (Table S2). It is noteworthy to note that our cell sorting technique does not require transgene expression to identify the stem cell population and is thus easily transferable to any other mouse model.

To further define genes enriched in each cellular state, the transcriptomes of LeX<sup>bright</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells were compared. Probes were filtered by an average expression greater than 50 in at least 1 population, a differential expression of at least 2-fold and a Student's t-test corrected p-value < 0.05.

As shown on the volcano plot, the comparative gene expression profile of LeX<sup>bright</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells revealed an altered expression of 1278 probes (Fig. 2B). The resulting set of LeX<sup>bright</sup>-enriched genes included 433 genes (548 probe sets, Table S2), whereas 563 genes were upregulated in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells (730 probe sets, Table S2) (Fig. 2B).

Gene Ontology (GO) term analysis was then performed using a statistical overrepresentation test to delineate the molecular features of quiescent and activated NSCs. In accordance with their proliferating state, the transcriptome of LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells was enriched in genes linked to the cell cycle, DNA repair, DNA/RNA metabolism, transcription and translation (Fig 2.C-D, Table S3 and Table S4). In contrast, the vast majority of the genes enriched in LeX<sup>bright</sup> cells were related to GO categories linked to transport, response to stimulus, cell localization, cell communication and cell adhesion (Fig. 2.C-D, Table S3 and Table S4), emphasizing the key role played by the microenvironment in the regulation of the quiescent state.

Strikingly, cellular component analysis also revealed a drastically different cellular location of the differentially expressed gene products. As expected due to their transcriptionally active state, 15.3% of the genes enriched in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells, as opposed to 2.3% of those enriched in LeX<sup>bright</sup> cells, encoded proteins associated with the nucleus (Fig. 2E). On the other hand, 15.0% of the genes enriched in LeX<sup>bright</sup> cells encoded proteins associated with the membrane, as opposed to only 2.3% of those enriched in LeX+EGFR+, (Fig. 2E). This observation again suggested the importance of molecular interactions between NSCs and their microenvironment to regulate stem cell quiescence in the adult SVZ.

#### ***Transcription factors enriched in quiescent and activated NSCs***

In order to identify putative transcriptional regulators of the quiescent and proliferative states of adult NSCs, we focused on transcription factors (TFs) and co-factors either enriched in LeX<sup>bright</sup> or LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells. Analysis of our dataset using public databases (Zhang et al., 2012) revealed a total of 75 differentially expressed TFs – 14 of which were upregulated in LeX<sup>bright</sup> cells and the remaining 61 in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells (Fig. 3).

Among the TFs upregulated in LeX<sup>bright</sup> cells were Sox9 and Id2 in accordance to recent single-cell RNA sequencing data performed on acutely isolated quiescent NSCs (Llorens-Bobadilla et al., 2015) (Fig. 3). Klf9, a member of the family of Kruppel-like transcription factors, was also enriched in LeX<sup>bright</sup> cells (Fig. 3). Interestingly, Klf9 has been found upregulated in quiescent muscle satellite stem cells when compared to their proliferative counterparts (Pallafacchina et al., 2010).

Among the TFs and co-factors that were the most enriched in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells, several were linked to the cell cycle (E2F1, E2F2, Rbl1, Ccne1, Trp53 and Tfdp1) (Fig. 3). Of particular interest, LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells expressed high levels of 3 members of the high-mobility group box (HMGB) protein family - Hmgb1/2/3 (Fig. 3). Besides the broad role of HMGs in the control of transcription, replication as well as recombination, recent studies have linked HMGBs to the control of the proliferation and maintenance of embryonic and adult NSCs (Abraham et al., 2013a; Abraham et al., 2013b; Wang et al., 2014). The proliferative state was also associated with the expression of the immediate early gene Fos and SoxC factors (Sox4 and Sox11). Additionally, transcripts for the TF Ascl1 were more than 200 times higher in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells compared to LeX<sup>bright</sup> cells (Fig. 3) in accordance to recent studies that have reported its key role in the proliferation of NSCs and in the exit of stem cells from quiescence in both the adult DG and SVZ (Andersen et al., 2014; Urban et al., 2016).

### ***Quiescent NSCs integrate signals from the microenvironment***

Evidence from recent studies suggest that the balance of NSCs between quiescence and proliferation is tightly regulated by extrinsic signals from the stem cell niche through various signalling pathways (Kokovay et al., 2012; Daynac et al., 2013; Kawaguchi et al., 2013; Ottone et al., 2014; Porlan et al., 2014; Daynac et al., 2016b). Accordingly, we found that most genes enriched in LeX<sup>bright</sup> cells were linked to the cell membrane (Fig. 2E).

Among the cell-cell adhesion molecules overexpressed in LeX<sup>bright</sup> cells are notably neural cell adhesion molecule 1 and 2 (NCAM1, NCAM2), cell adhesion molecule 1 and 2 (IGSF4A, IGSF4D) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) (Fig. 4A). Interestingly, disruption of VCAM1 was previously shown to lead to a massive activation of quiescent NSCs and consequent depletion of the NSC population (Kokovay et al., 2012). Attachment of stem cells to their niche is also mediated by members of the cadherin superfamily through cell-cell adhesion (Marthiens et al., 2010). Importantly, cadherins were reported to regulate the proliferative behavior of NSCs, as illustrated by the N-cadherin-mediated anchorage of NSC to ependymocytes in the adult murine SVZ that directly modulates their quiescence (Porlan et al., 2014). Here, the expression of 2 cadherins (Cdh10, Cdh20) and 4 protocadherins (Pcdh7, Pcdh9, Pcdh10, Pcdhb19) were upregulated in LeX<sup>bright</sup> cells (Fig. 4A-B).

We then looked for receptors that were differentially expressed between LeX<sup>bright</sup> and LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> cells in an attempt to identify additional markers of quiescent and activated NSCs as well as signalling pathways involved in the regulation of NSC behaviour (Table 1). In the adult SVZ, gamma-aminobutyric acid (GABA) produced by neuroblasts decreased the proliferation of adult NSCs (Liu et al., 2005) Moreover, GABA signaling inhibition through the GABA<sub>A</sub> receptors led to an entry in proliferation of LeX<sup>bright</sup> cells (Daynac et al., 2013). Interestingly, transcripts for several GABAA receptor chains ( $\alpha$ 4,  $\beta$ 1,  $\gamma$ 1 and  $\gamma$ 3) were expressed in LeX<sup>bright</sup> cells with the  $\gamma$ 1 chain (Gabrg1) being almost 40 times higher in comparison to LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> cells (Table 1). Moreover, Lrig1, a pan ErbB inhibitor that has been used as a marker of epidermal as well as intestinal quiescent stem cells and was shown to negatively regulate proliferation (Jensen and Watt, 2006; Jensen et al., 2009; Powell et al., 2012), was also enriched in LeX<sup>bright</sup> cells (Table 1). Another receptor well described in neurogenesis is Ptch1, a member of the patched gene family and main receptor for sonic

hedgehog (Shh), overexpressed in LeX<sup>bright</sup> cells (Ahn and Joyner, 2005; Balordi and Fishell, 2007; Ferent et al., 2014). We have recently shown that the activation of the Shh pathway through deletion of the Patched receptor in NSCs resulted in an increase of the pool of quiescent NSCs and in a concomitant sharp decrease in the numbers of proliferating NSCs and their progeny (Daynac et al., 2016b).

Receptors listed in Table 1 could therefore be used as markers of quiescent NSCs and/or could act as putative regulators of the balance between quiescence and proliferation.

***Syndecan family members are potential markers and modulators of the quiescent and proliferative states of adult NSCs***

Syndecans are transmembrane heparan sulfate proteoglycans that have roles in cell-matrix interactions and act as ligand gatherers, recruiting to the cell surface soluble growth factors known to promote the proliferation of neuronal precursors, such as FGF, EGF, VEGF and HGF (Kwon et al., 2012). Among the receptors that were found differentially expressed between LeX<sup>bright</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells (Table 1), the pattern of expression of three out of the four members of the syndecan family was particularly interesting as they were either enriched in LeX<sup>bright</sup> cells (sdc2 and sdc4) or strongly upregulated in LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells (sdc1), emphasizing their possible use as markers to discriminate quiescent NSCs from proliferating NSCs (Table 1, Fig. 5A). The specificity of Sdc1 to actively dividing cells, i.e. LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> and EGFR<sup>+</sup> cells, was further confirmed at the protein level (Fig. 5B). Similarly, it has been shown that Sdc1-positive cells sorted by flow cytometry from the embryonic telencephalon were enriched in neurosphere-forming cells (Nagato et al., 2005). Besides, its knockdown during cortical neurogenesis has been reported to reduce the maintenance and proliferation of NPCs (Wang et al., 2012), hinting at its possible role in the regulation of NSC quiescence.

To further determine whether the members of the syndecan family were linked to the quiescent/proliferative status of NSCs, we modeled NSC quiescence in culture with BMP4 as previously described (Mathieu et al., 2008; Martynoga et al., 2013) (Fig. 5C-D). We confirmed that addition of BMP4 to proliferating SVZ cells drastically reduced the formation of neurospheres and that the total number of cells was decreased (Fig. 5C-D). The members of the syndecan family that were found enriched in LeX<sup>bright</sup> cells - sdc2 and sdc4 - saw their transcripts increased after BMP4 treatment while those of sdc1 - highly enriched in proliferative cells - decreased (Fig. 5E). Our data suggest that the members of the syndecan family could regulate the transition of adult NSCs between quiescence and proliferation. Interestingly, expression of sdc1 was consistently found in malignant glioma cells but was undetectable in non-neoplastic brain tissues (Watanabe et al., 2006). Besides, higher sdc1 expression in malignant glioma has been associated with ascending tumor WHO grades and poor diagnostic (Xu et al., 2012). Studying the regulation of adult NSC proliferation in relation to the syndecan family could thus provide insight into adult NSC behavior and its modulation in health and disease.

## Conclusion

Using our recently published cell sorting technique, we isolated quiescent NSCs ( $\text{LeX}^{\text{bright}}$  cells) and activated NSCs ( $\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$  cells) from the adult SVZ and showed that they exhibited very different cell cycle properties *in vivo*. We also demonstrate that  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  and  $\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$  cells are generated during embryonic development and remained relatively quiescent in the postnatal brain. We performed an in depth microarray analysis of freshly purified quiescent and activated NSCs from their *in vivo* niche. We showed that quiescent NSCs expressed a higher number of membrane receptors and cell adhesion molecules to actively sense and respond to changes in their microenvironment. Finally, we identified the syndecan family and its members as potential new markers to selectively identify quiescent or activated NSCs and hint at their possible role in the regulation of NSC quiescence. Our study provides a comprehensive data resource to investigate cellular quiescence in adult neurogenic niches in the context of NSC-based brain tissue regeneration strategies.

## **Acknowledgements**

We are indebted to C. Joubert, V. Neuville, V. Barroca, J. Tilliet and the staff of the animal facilities, to J. Baijer and N. Dechamps for cell sorting, and to A. Gouret and A. Leliard for their administrative assistance. Flow cytometry and cell sorting were performed at the iRCM Flow Cytometry Shared Resource, established by equipment grants from DIM-Stem-Pôle, INSERM, Foundation ARC and CEA. This work was supported by grants from Electricité de France (EDF). L.M. has a fellowship from Région Ile-de-France (DIM Biothérapies) and M.D. from La Ligue Contre le Cancer.

## **Author Contributions**

L.M: conception and design, collection and/or assembly of data, bioinformatic analysis, data analysis, interpretation and manuscript writing. A.C, M.D: collection and/or assembly of data. M.A.M: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis, interpretation and manuscript writing. F.D.B: conception and design, financial support, data analysis and interpretation, manuscript writing.

## References

- Abraham AB, Bronstein R, Chen EI, Koller A, Ronfani L, Maletic-Savatic M, Tsirka SE (2013a) Members of the high mobility group B protein family are dynamically expressed in embryonic neural stem cells. *Proteome science* 11:18.
- Abraham AB, Bronstein R, Reddy AS, Maletic-Savatic M, Aguirre A, Tsirka SE (2013b) Aberrant neural stem cell proliferation and increased adult neurogenesis in mice lacking chromatin protein HMGB2. *PloS one* 8:e84838.
- Ahn S, Joyner AL (2005) In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437:894-897.
- Andersen J, Urban N, Achimastou A, Ito A, Simic M, Ullom K, Martynoga B, Lebel M, Goritz C, Frisen J, Nakafuku M, Guillemot F (2014) A transcriptional mechanism integrating inputs from extracellular signals to activate hippocampal stem cells. *Neuron* 83:1085-1097.
- Baldordi F, Fishell G (2007) Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:5936-5947.
- Beckervordersandforth R, Tripathi P, Ninkovic J, Bayam E, Lepier A, Stempfhuber B, Kirchhoff F, Hirrlinger J, Haslinger A, Lie DC, Beckers J, Yoder B, Irmler M, Gotz M (2010) In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell stem cell* 7:744-758.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:264-278.
- Cheung TH, Rando TA (2013) Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature reviews Molecular cell biology* 14:329-340.
- Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, Deleo AM, Pastrana E, Doetsch F (2014) Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* 82:545-559.
- Conover JC, Notti RQ (2008) The neural stem cell niche. *Cell and tissue research* 331:211-224.
- Daynac M, Chicheportiche A, Pineda JR, Gauthier LR, Boussin FD, Mounthon MA (2013) Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. *Stem cell research* 11:516-528.
- Daynac M, Morizur L, Chicheportiche A, Mounthon MA, Boussin FD (2016a) Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells. *Scientific reports* 6:21505.
- Daynac M, Morizur L, Kortulewski T, Gauthier LR, Ruat M, Mounthon MA, Boussin FD (2015) Cell Sorting of Neural Stem and Progenitor Cells from the Adult Mouse Subventricular Zone and Live-imaging of their Cell Cycle Dynamics. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Daynac M, Tirou L, Faure H, Mounthon MA, Gauthier LR, Hahn H, Boussin FD, Ruat M (2016b) Hedgehog Controls Quiescence and Activation of Neural Stem Cells in the Adult Ventricular-Subventricular Zone. *Stem cell reports*.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:11619-11624.
- Ferent J, Cochard L, Faure H, Taddei M, Hahn H, Ruat M, Traiffort E (2014) Genetic activation of Hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions. *Stem cell reports* 3:312-323.
- Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S, Nicolis SK (2004) Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131:3805-3819.

- Fuentealba LC, Rompani SB, Parraguez JI, Obernier K, Romero R, Cepko CL, Alvarez-Buylla A (2015) Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161:1644-1655.
- Furutachi S, Miya H, Watanabe T, Kawai H, Yamasaki N, Harada Y, Imayoshi I, Nelson M, Nakayama KI, Hirabayashi Y, Gotoh Y (2015) Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nature neuroscience* 18:657-665.
- Jensen KB, Collins CA, Nascimento E, Tan DW, Frye M, Itami S, Watt FM (2009) Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell stem cell* 4:427-439.
- Jensen KB, Watt FM (2006) Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: Lrig1 is a regulator of stem cell quiescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:11958-11963.
- Kawaguchi D, Furutachi S, Kawai H, Hozumi K, Gotoh Y (2013) Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nature communications* 4:1880.
- Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D (2005) p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes & development* 19:756-767.
- Kokovay E, Wang Y, Kusek G, Wurster R, Lederman P, Lowry N, Shen Q, Temple S (2012) VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell stem cell* 11:220-230.
- Kwon MJ, Jang B, Yi JY, Han IO, Oh ES (2012) Syndecans play dual roles as cell adhesion receptors and docking receptors. *FEBS letters* 586:2207-2211.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A (2014) Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in neurosciences* 37:563-571.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nature neuroscience* 8:1179-1187.
- Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Baser A, Saiz-Castro G, Zwadlo K, Martin-Villalba A (2015) Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell stem cell* 17:329-340.
- Marthiens V, Kazanis I, Moss L, Long K, Ffrench-Constant C (2010) Adhesion molecules in the stem cell niche--more than just staying in shape? *Journal of cell science* 123:1613-1622.
- Martynoga B, Mateo JL, Zhou B, Andersen J, Achimastou A, Urban N, van den Berg D, Georgopoulou D, Hadjur S, Wittbrodt J, Ettwiller L, Piper M, Gronostajski RM, Guillemot F (2013) Epigenomic enhancer annotation reveals a key role for NFIX in neural stem cell quiescence. *Genes & development* 27:1769-1786.
- Mathieu C, Sii-Felice K, Fouchet P, Etienne O, Haton C, Mabondzo A, Boussin FD, Moutoun MA (2008) Endothelial cell-derived bone morphogenetic proteins control proliferation of neural stem/progenitor cells. *Molecular and cellular neurosciences* 38:569-577.
- Mich JK, Signer RA, Nakada D, Pineda A, Burgess RJ, Vue TY, Johnson JE, Morrison SJ (2014) Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *eLife* 3:e02669.
- Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortiguera R, Marques-Torrejon MA, Nakashima K, Colak D, Gotz M, Farinas I, Gage FH (2010) Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell stem cell* 7:78-89.
- Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ (2003) Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425:962-967.
- 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.

- Nagato M, Heike T, Kato T, Yamanaka Y, Yoshimoto M, Shimazaki T, Okano H, Nakahata T (2005) Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using a combination of surface markers. *Journal of neuroscience research* 80:456-466.
- Ottone C, Krusche B, Whitby A, Clements M, Quadrato G, Pitulescu ME, Adams RH, Parrinello S (2014) Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nature cell biology* 16:1045-1056.
- Pallafacchina G, Francois S, Regnault B, Czarny B, Dive V, Cumano A, Montarras D, Buckingham M (2010) An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. *Stem cell research* 4:77-91.
- Porlan E, Marti-Prado B, Morante-Redolat JM, Consiglio A, Delgado AC, Kypta R, Lopez-Otin C, Kirstein M, Farinas I (2014) MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. *Nature cell biology* 16:629-638.
- Powell AE, Wang Y, Li Y, Poulin EJ, Means AL, Washington MK, Higginbotham JN, Juchheim A, Prasad N, Levy SE, Guo Y, Shyr Y, Aronow BJ, Haigis KM, Franklin JL, Coffey RJ (2012) The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* 149:146-158.
- Ringner M (2008) What is principal component analysis? *Nature biotechnology* 26:303-304.
- Roccio M, Schmitter D, Knobloch M, Okawa Y, Sage D, Lutolf MP (2013) Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. *Development* 140:459-470.
- Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H, Miyawaki A (2008) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132:487-498.
- Urban N, van den Berg DL, Forget A, Andersen J, Demmers JA, Hunt C, Ayrault O, Guillemot F (2016) Return to quiescence of mouse neural stem cells by degradation of a proactivation protein. *Science* 353:292-295.
- Wang L, Yu L, Zhang T, Wang L, Leng Z, Guan Y, Wang X (2014) HMGB1 enhances embryonic neural stem cell proliferation by activating the MAPK signaling pathway. *Biotechnology letters* 36:1631-1639.
- Wang Q, Yang L, Alexander C, Temple S (2012) The niche factor syndecan-1 regulates the maintenance and proliferation of neural progenitor cells during mammalian cortical development. *PloS one* 7:e42883.
- Watanabe A, Mabuchi T, Satoh E, Furuya K, Zhang L, Maeda S, Naganuma H (2006) Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor-kappaB in upregulation of syndecan-1 expression. *Journal of neuro-oncology* 77:25-32.
- Xu Y, Yuan J, Zhang Z, Lin L, Xu S (2012) Syndecan-1 expression in human glioma is correlated with advanced tumor progression and poor prognosis. *Molecular biology reports* 39:8979-8985.
- Zhang HM, Chen H, Liu W, Liu H, Gong J, Wang H, Guo AY (2012) AnimalTFDB: a comprehensive animal transcription factor database. *Nucleic acids research* 40:D144-149.

## Figure legends

### Figure 1: LeX<sup>bright</sup> cells are slow dividing cells generated during embryonic development

(A) LeX/EGFR/CD24 triple staining strategy allowing the purification by flow cytometry of quiescent (LeX<sup>bright</sup>), activated NSCs (LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>) and transit-amplifying cells (EGFR<sup>+</sup>) (Daynac et al, 2013). (B) Cell cycle analysis of NSCs from FUCCI-Red mice shows that almost all LeX<sup>bright</sup> cells were distributed in G1 (FUCCI red positive) and G0 (FUCCI red bright). n=9. (C) Quantification of cells positive for BrdU immediately after a continuous 14-day exposure to BrdU at 2 months (dark blue) and after a chase of 2 weeks (light blue) or 4 weeks (green) revealed that LeX<sup>bright</sup> are long term BrdU label-retaining cells. n=3-4. (D) Quantification of Sox2-positive cells determined by immunostaining after cell sorting at postnatal day 21. n=6. (E) Pregnant mice received BrdU between E14.5 and E15.5 before cells of the offspring were sorted 21 days after birth. Quantification revealed that BrdU was retained postnatally in the majority of LeX<sup>bright</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells. n=6.

Data are represented as the mean  $\pm$  SEM and were obtained from independent experiments with several mice per group.

### Figure 2: Comparative transcriptome analysis reveals the close interaction between quiescent NSCs and their microenvironment.

(A) Principal component analysis (PCA) of gene expression datasets of freshly sorted LeX<sup>bright</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells compared to those obtained from studies either characterizing NSCs (Codega et al., 2014) or differentiated cells (Cahoy et al., 2008). (B) Volcano plot of differentially expressed probesets in LeX<sup>bright</sup> cells (blue) and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells (red). (C) Significantly enriched GO categories were identified for LeX<sup>bright</sup> and LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> cells using a statistical overrepresentation test for differentially expressed genes ( $p<0.05$ ) and were hand curated into thematic categories. (D) Selected sets of enriched GO categories in LeX<sup>bright</sup> and

$\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$  cells. (E) Predicted cellular location of gene products differentially expressed in  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  and  $\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$  cells.

**Figure 3: Transcription factors and co-factors differentially expressed in quiescent and activated NSCs.** Heat maps showing transcript expression levels for replicate samples of  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  and  $\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$  cells. Blue color indicates low expression and red high expression (log2 scale).

**Table 1: List of differentially expressed membrane receptors on quiescent and activated NSCs.**

**Figure 4: Enrichment of genes implicated in cell adhesion in quiescent NSCs.**

(A) Heat maps showing transcript expression levels of genes for adhesion molecules and extracellular matrix components in  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  and  $\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$  cells. Blue color indicates low expression and red high expression (log2 scale). Replicate samples are shown for each group. (B) Gene expression levels of selected adhesion genes were confirmed by qRT-PCR. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM and were obtained from 3 independent experiments. \*  $p < 0.05$

**Figure 5: Members of the syndecan family are potential markers of the quiescent and proliferative states in adult NSCs.**

(A) Expression of Syndecan-1, 2 and 4 in  $\text{LeX}^{\text{bright}}$  and  $\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$  cells was confirmed by qRT-PCR. ND: not detectable. (B) Preferential expression of Sdc1 on actively proliferating  $\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$  and  $\text{EGFR}^+$  cells was confirmed by immunostaining (scale bar: 5 $\mu\text{m}$ ). Exposition of proliferating neural stem and progenitor cells to BMP4 for 3 days led to a strong decrease in the number of neurospheres formed (C) and in the total number of cells (D). (E) The

expression of the members of the syndecan family after BMP4 treatment was determined by qRT-PCR. \* p<0.05

**Supplementary dataset legends (supplementary .xls files)**

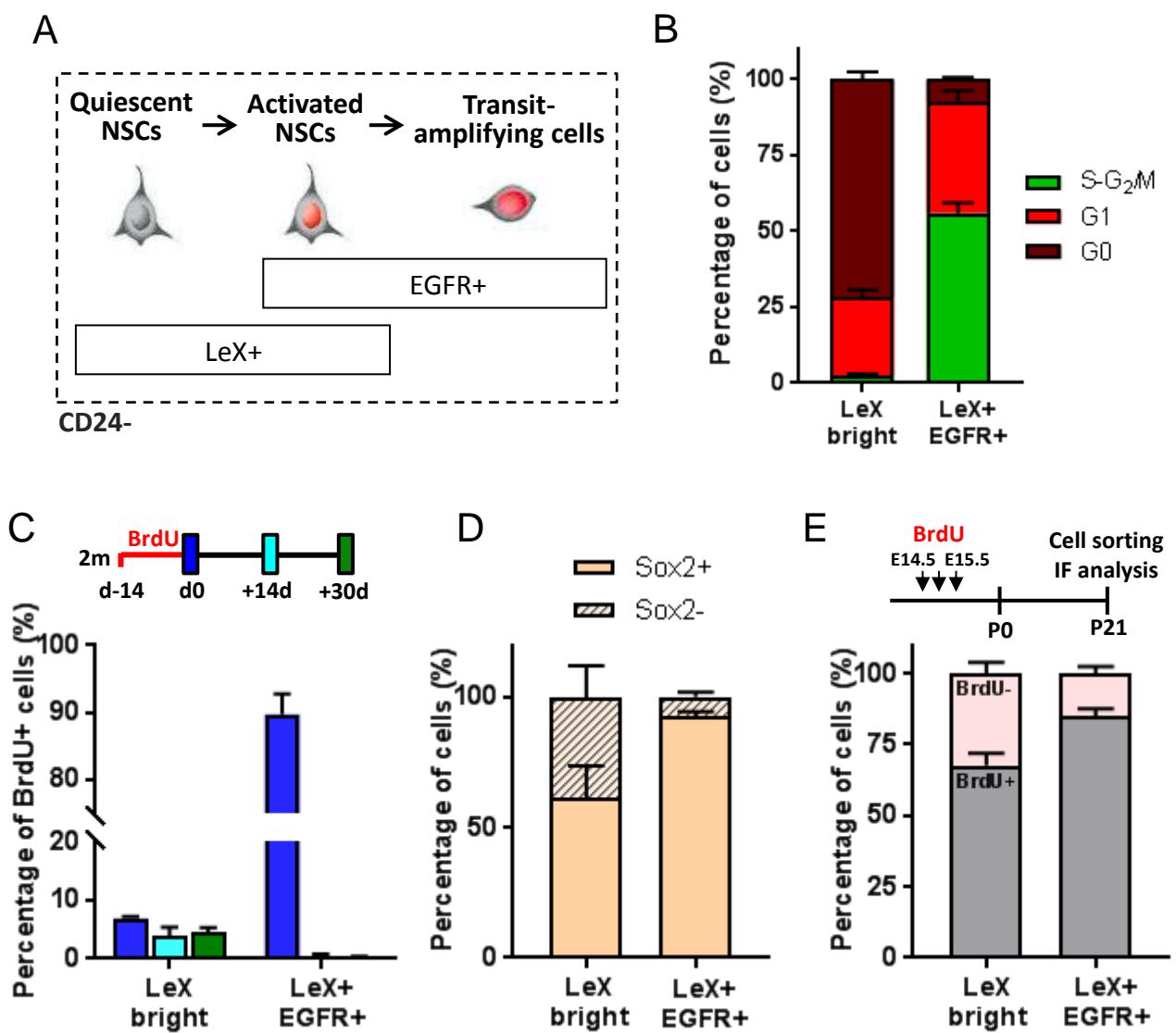
**Table S1: Primer sequences.**

**Table S2: Genes differentially expressed between quiescent and activated NSCs.**

**Table S3: Overrepresentation test and related GO terms** for genes differentially expressed between quiescent and activated NSCs.

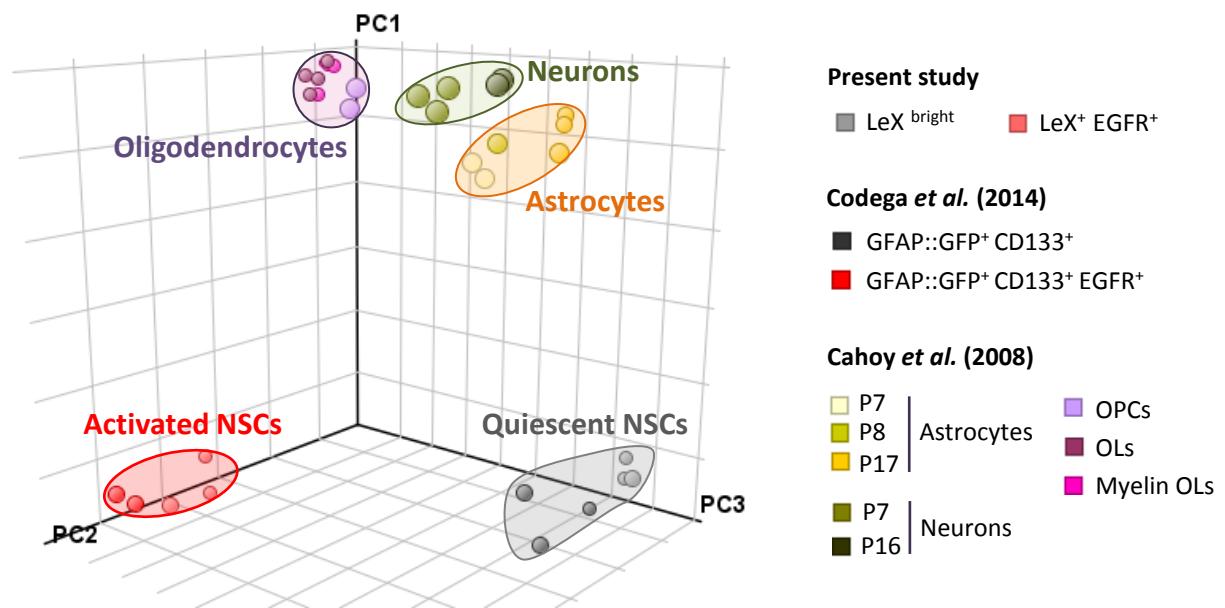
**Table S4: Hand-curated GO categories** derived from Table S3.

Figure 1

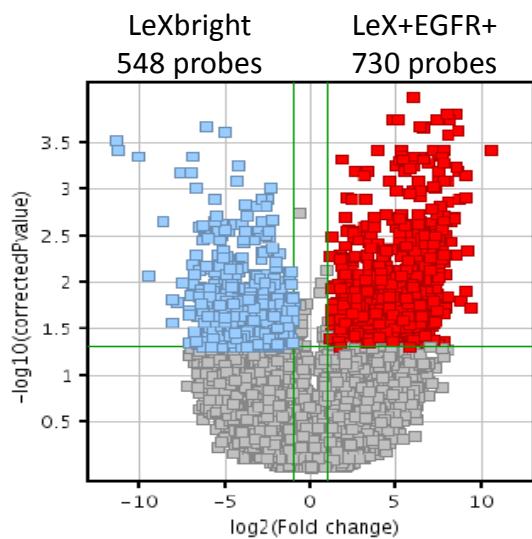


**Figure 2**

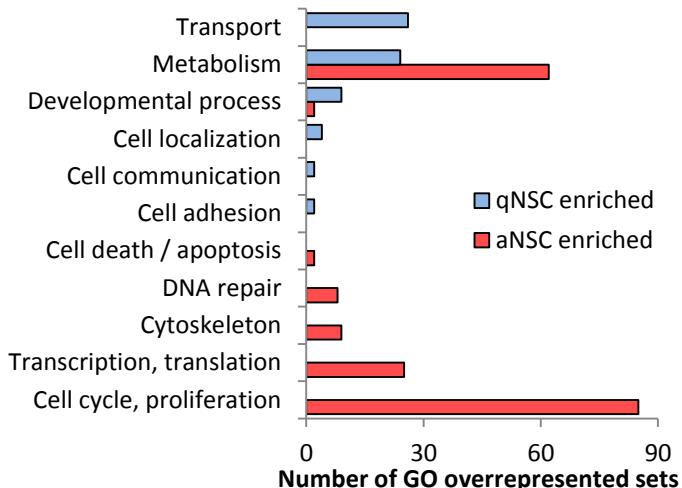
**A**



**B**



**C**



**D**

GO Biological Process		p-value
<b>LeX bright</b>	Lipid metabolic process	9.11E-13
	Localization	1.36E-11
	Transport	2.72E-10
	Regulation of cell communication	1.56E-08
	Regulation of signaling	3.38E-08
	Cell adhesion	4.72E-03
<b>LeX<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup></b>	Cell cycle	1.31E-76
	Cell division	3.10E-48
	Nucleic acid metabolic process	3.65E-41
	DNA metabolic process	3.07E-40
	Chromosome organization	1.85E-25
	Regulation of transcription	3.46E-11

**E**

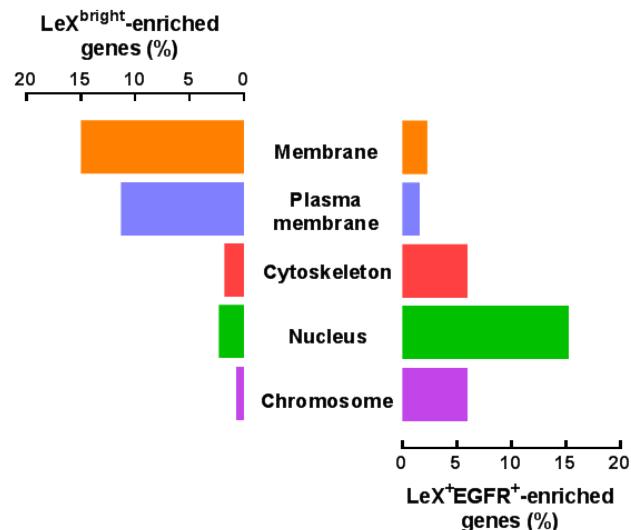


Figure 3

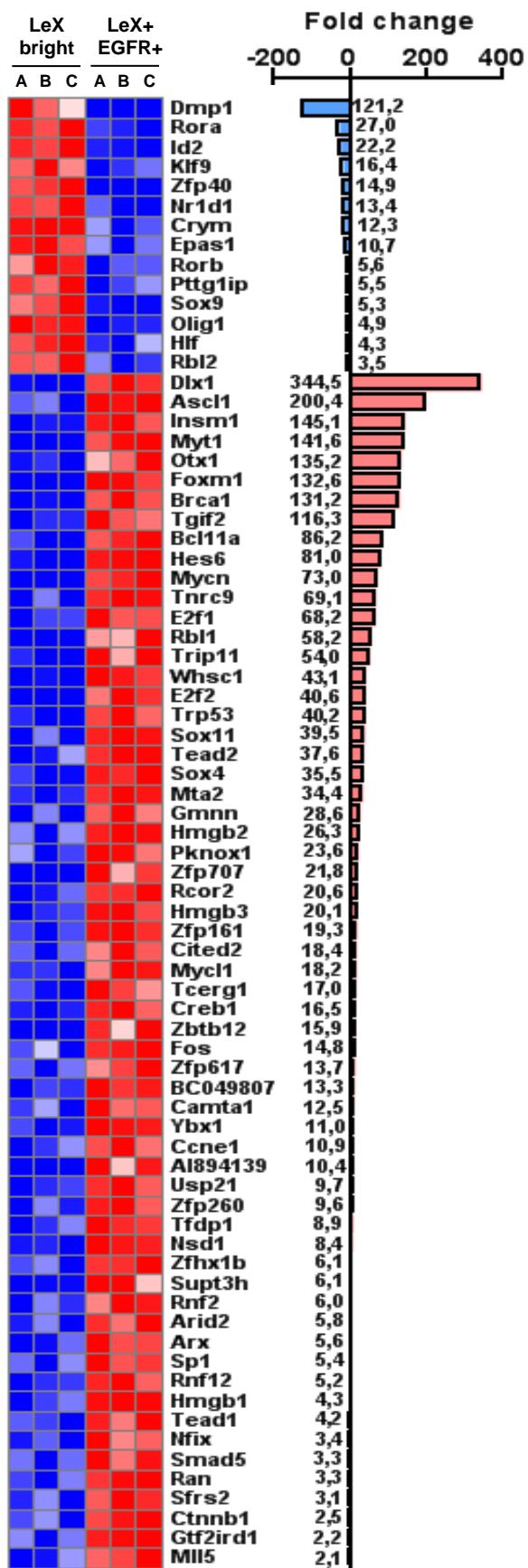
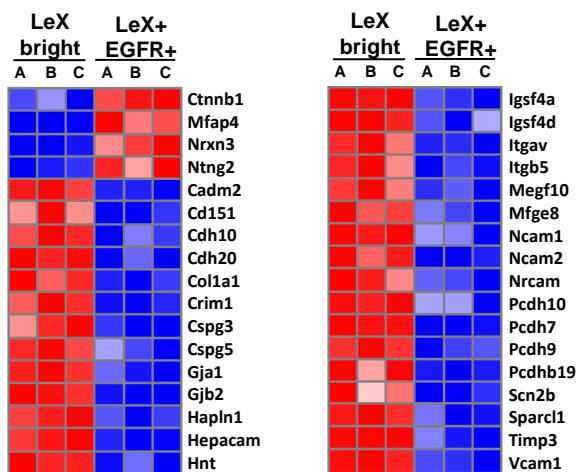


Table 1

Gene Symbol	Gene Title	Average expression		
		LeX <sup>bright</sup>	LeX <sup>bright</sup> EGFR <sup>+</sup>	Fold change
<b>LeX<sup>bright</sup> - enriched receptors</b>				
Tril	TLR4 Interactor With Leucine-Rich Repeats	4710	328	14.4
Adcyap1r1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1	3408	605	5.6
Adora2b	adenosine A2b receptor	199	6	33.8
Cd302	CD302 antigen	289	9	31.0
Cd47	CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)	3479	912	3.8
Dner	delta/notch-like EGF-related receptor	3747	510	7.3
Edg1	endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	9942	1488	6.7
Ednra	endothelin receptor type A	103	5	19.4
Ednrb	endothelin receptor type B	4916	1037	-4.7
Evi2a	ecotropic viral integration site 2a	115	6	17.8
F3	coagulation factor III	2073	116	17.9
Fcgrt	Fc receptor, IgG, alpha chain transporter	308	25	12.4
Fgfr2	fibroblast growth factor receptor 2	3399	713	4.8
Fgfr3	fibroblast growth factor receptor 3	3050	135	22.6
Fzd6	frizzled homolog 6 ( <i>Drosophila</i> )	392	14	27.1
Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA-B) receptor, 1	374	75	5.0
Gabrg1	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit gamma 1	3672	93	39.7
Ghr	growth hormone receptor	533	8	63.7
Gpr146	G protein-coupled receptor 146	915	19	48.5
Gpr155	G protein-coupled receptor 155	996	25	39.4
Gpr177	G protein-coupled receptor 177	563	9	65.1
Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	2077	346	6.0
Grid2	glutamate receptor, ionotropic, delta 2	676	7	91.0
Grm3	glutamate receptor, metabotropic 3	10233	1077	9.5
Itpr2	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 2	254	8	32.7
LRIG1	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	4719	311	15.2
Lrp4	low density lipoprotein receptor-related protein 4	1395	263	5.3
Lsamp	Limbic system-associated membrane protein	144	12	12.5
Mag	myelin-associated glycoprotein	458	6	75.6
P2rx4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4	245	12	20.0
Paqr7	Progesterin and adipoQ receptor family member VII	1272	77	16.5
Pdgfrb	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	1654	72	22.9
Ptch1	patched homolog 1	3769	1553	2.4
Ptprd	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	785	17	45.4
Rgma	RGM domain family, member A	852	34	24.8
Sdc2	Syndecan 2	2319	374	6.2
Sdc4	Syndecan 4	4045	411	9.9
Tlr3	toll-like receptor 3	473	6	77.4
<b>LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup> - enriched receptors</b>				
Egfr	epidermal growth factor receptor	560	2766	4.9
Epha3	Eph receptor A3	6	355	58.3
Grin1a	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A	175	806	4.6
Hmmr	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)	6	279	50.1
Neto2	neuropilin (NRP) and tollloid (TLL)-like 2	90	573	6.4
Nrxn3	neurexin III	5	158	30.0
Plxna2	plexin A2	5	154	29.3
Sdc1	Syndecan 1	7	491	65.8

Figure 4

A



B

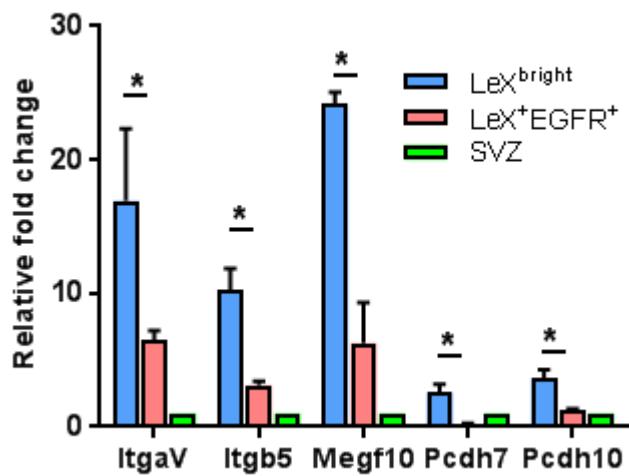
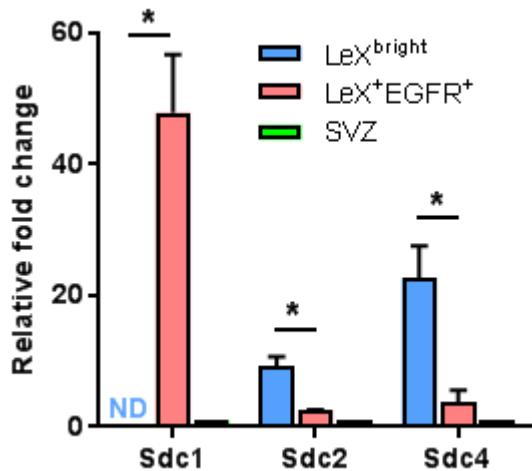
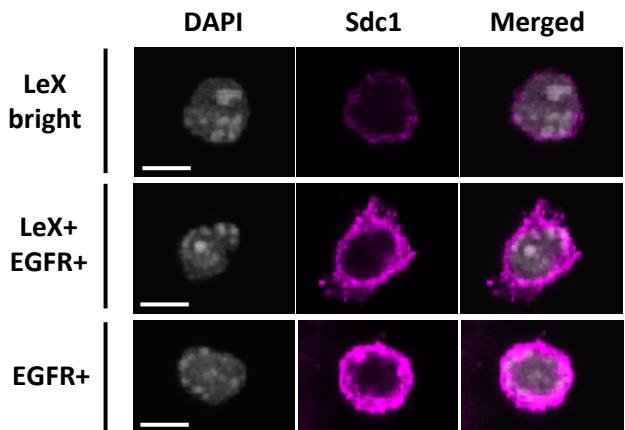


Figure 5

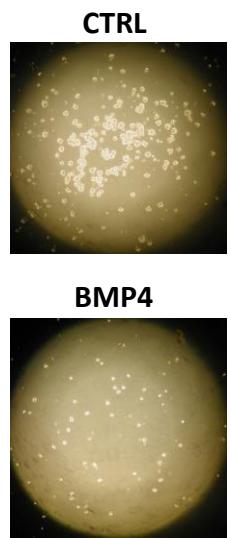
A



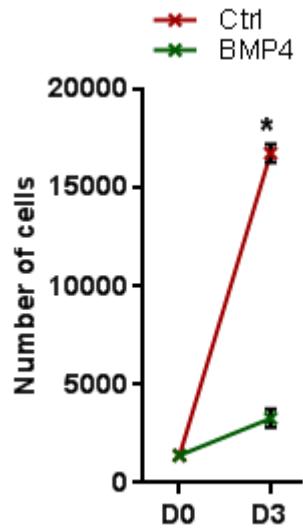
B



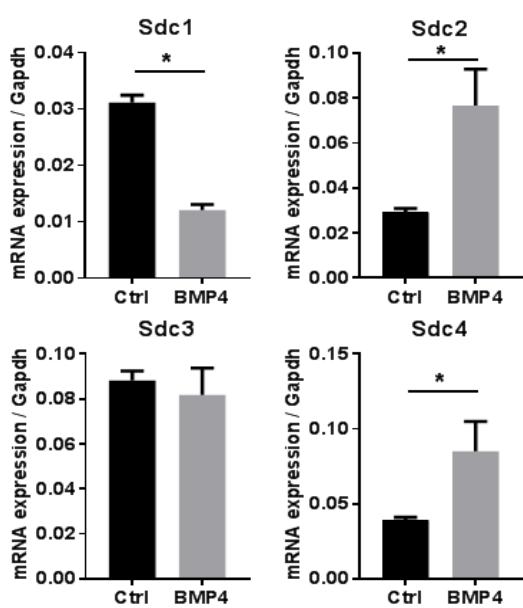
C



D



E



**Supplemental Table 1: Primer sequences**

Target gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
GAPDH	CCAGTATGACTCCACTCACG	GAATCCACGACATACTCAGC
Pcdh7	GGAGCCTAACAGAGCCTGG	GCCTGGTAGCGGACTAGAAC
Pcdh10	ACAGTGAAAGAGGCGGTGAG	TGAAGGAAGACTTGAGGCGG
ItgaV	CAGAAAACCAAACTCGGCAGG	GAAGACCAGCGAGCAGTTGA
Itgb5	GCCC GTT ATGAAATGGCTC	AGGCGAAATCGACAGTGTGT
Megf10	ACGGCACAGAATCAGCTACC	GCAACACTGGGATTGCGTC
Sdc1	AAGTGCTGGGAGGTGT CATTG	TTGGTGGGTTCTGGTAGGC
Sdc2	TTATCCGGTAGGAGCCACA	CTGTTCTCGTCTCGCGGAC
Sdc3	GGTGCTCGTAGCCGTGAT	TGTAGCTGCCCTCGTCCTTC
Sdc4	GAGGTCTTGGCAGCTTGAT	GTCGTAAC TGCC TCGTCCT

Supplemental Table S3

LeXbright -enriched genes: overrepresentation test and related GO categories

GO Ontology database Released 2015-03-10

GO biological process complete	Mus musculus	Box Input	Box Input (expected)	over(+) or under(-)-representation of the GO category	Fold enrichment	p-value
Unclassified	1649	11	27.91	-	.39	0.00E00
single-organism process	11876	291	201.00	+	1.45	5.04E-18
single-organism cellular process	10482	263	177.41	+	1.48	2.96E-15
lipid metabolic process	911	56	15.42	+	3.63	9.11E-13
single-organism localization	2572	101	43.53	+	2.32	2.89E-12
cellular lipid metabolic process	687	47	11.63	+	4.04	6.82E-12
single-organism transport	2372	95	40.15	+	2.37	8.77E-12
localization	3989	132	67.51	+	1.96	1.36E-11
establishment of localization	3210	112	54.33	+	2.06	1.56E-10
transport	3105	109	52.55	+	2.07	2.72E-10
cellular process	12843	284	217.37	+	1.31	4.20E-09
regulation of cell communication	2477	90	41.92	+	2.15	1.56E-08
nervous system development	1715	71	29.03	+	2.45	1.83E-08
ion transport	1061	53	17.96	+	2.95	2.07E-08
regulation of signaling	2470	89	41.80	+	2.13	3.38E-08
transmembrane transport	877	47	14.84	+	3.17	3.86E-08
single-organism metabolic process	3313	108	56.07	+	1.93	4.23E-08
regulation of multicellular organismal process	2271	84	38.44	+	2.19	4.26E-08
response to endogenous stimulus	883	46	14.94	+	3.08	1.69E-07
regulation of response to stimulus	2790	94	47.22	+	1.99	2.90E-07
single-organism developmental process	4474	130	75.72	+	1.72	3.61E-07
developmental process	4496	130	76.09	+	1.71	5.06E-07
positive regulation of biological process	4468	129	75.62	+	1.71	6.95E-07
regulation of lipid metabolic process	251	23	4.25	+	>5	8.47E-07
regulation of localization	2037	75	34.48	+	2.18	9.57E-07
ion transmembrane transport	658	37	11.14	+	3.32	2.29E-06
single-multicellular organism process	5932	156	100.40	+	1.55	2.88E-06
regulation of biological quality	2516	85	42.58	+	2.00	2.96E-06
regulation of signal transduction	2178	77	36.86	+	2.09	3.29E-06
multicellular organismal process	6104	159	103.31	+	1.54	3.51E-06
anion transport	429	29	7.26	+	3.99	3.68E-06
chemical homeostasis	735	39	12.44	+	3.14	3.77E-06
anatomical structure development	4001	117	67.72	+	1.73	3.93E-06
system development	3389	104	57.36	+	1.81	4.04E-06
positive regulation of transport	748	39	12.66	+	3.08	6.14E-06
neurogenesis	1289	54	21.82	+	2.48	7.59E-06
cation transmembrane transport	480	30	8.12	+	3.69	1.11E-05
regulation of intracellular signal transduction	1386	56	23.46	+	2.39	1.30E-05
multicellular organismal development	3922	113	66.38	+	1.70	2.15E-05
positive regulation of cellular process	3943	113	66.73	+	1.69	2.92E-05
regulation of transport	1500	58	25.39	+	2.28	3.11E-05
generation of neurons	1212	50	20.51	+	2.44	5.56E-05
homeostatic process	1137	48	19.24	+	2.49	5.65E-05
cation transport	712	36	12.05	+	2.99	6.20E-05
organic anion transport	292	22	4.94	+	4.45	7.25E-05
response to organic substance	1703	62	28.82	+	2.15	7.91E-05
ion homeostasis	505	29	8.55	+	3.39	1.31E-04
small molecule metabolic process	1333	52	22.56	+	2.30	1.66E-04
detection of stimulus involved in sensory perception	1175	1	19.89	-	<0.2	2.10E-04
response to stimulus	6715	164	113.65	+	1.44	2.11E-04
phospholipid metabolic process	233	19	3.94	+	4.82	2.21E-04
biological regulation	10298	227	174.29	+	1.30	2.50E-04
organic acid transmembrane transport	85	12	1.44	+	>5	2.71E-04
monocarboxylic acid metabolic process	435	26	7.36	+	3.53	3.37E-04
detection of chemical stimulus	1147	1	19.41	-	<0.2	3.38E-04
cation homeostasis	468	27	7.92	+	3.41	3.75E-04
lipid biosynthetic process	380	24	6.43	+	3.73	4.14E-04
amino acid transmembrane transport	72	11	1.22	+	>5	4.59E-04
cellular cation homeostasis	384	24	6.50	+	3.69	5.00E-04
detection of stimulus	1269	2	21.48	-	<0.2	5.01E-04
sodium ion transport	151	15	2.56	+	>5	5.35E-04
response to stress	2317	74	39.21	+	1.89	5.35E-04
organophosphate metabolic process	607	31	10.27	+	3.02	5.65E-04
inorganic ion homeostasis	482	27	8.16	+	3.31	6.71E-04
cellular chemical homeostasis	452	26	7.65	+	3.40	7.04E-04
protein stabilization	93	12	1.57	+	>5	7.08E-04
oxoacid metabolic process	753	35	12.74	+	2.75	7.61E-04
cellular ion homeostasis	396	24	6.70	+	3.58	8.72E-04
regulation of cellular component organization	1781	61	30.14	+	2.02	9.11E-04
positive regulation of lipid metabolic process	115	13	1.95	+	>5	9.36E-04
sodium ion transmembrane transport	96	12	1.62	+	>5	9.90E-04
anion transmembrane transport	182	16	3.08	+	>5	1.01E-03
organic acid metabolic process	770	35	13.03	+	2.69	1.28E-03
positive regulation of response to stimulus	1468	53	24.85	+	2.13	1.39E-03
carboxylic acid metabolic process	703	33	11.90	+	2.77	1.44E-03
inorganic ion transmembrane transport	470	26	7.95	+	3.27	1.48E-03
regulation of cellular component movement	673	32	11.39	+	2.81	1.68E-03
cellular homeostasis	542	28	9.17	+	3.05	1.95E-03
neuron differentiation	788	35	13.34	+	2.62	2.19E-03
regulation of developmental process	2002	65	33.88	+	1.92	2.22E-03
cell differentiation	2964	86	50.17	+	1.71	2.47E-03
organic substance transport	1502	53	25.42	+	2.08	2.81E-03

cell development	1420	51	24.03	+	2.12	2.85E-03
regulation of biological process	9865	215	166.96	+	1.29	3.27E-03
carboxylic acid transport	200	16	3.38	+	4.73	3.48E-03
regulation of molecular function	2075	66	35.12	+	1.88	3.65E-03
positive regulation of phosphorus metabolic process	882	37	14.93	+	2.48	3.88E-03
positive regulation of phosphate metabolic process	882	37	14.93	+	2.48	3.88E-03
organic acid transport	202	16	3.42	+	4.68	3.96E-03
positive regulation of molecular function	1193	45	20.19	+	2.23	4.03E-03
RNA metabolic process	2556	16	43.26	-	.37	4.31E-03
phospholipid biosynthetic process	132	13	2.23	+	> 5	4.35E-03
cellular metal ion homeostasis	342	21	5.79	+	3.63	4.40E-03
nucleic acid metabolic process	2976	21	50.37	-	.42	4.69E-03
cell adhesion	852	36	14.42	+	2.50	4.72E-03
inorganic cation transmembrane transport	406	23	6.87	+	3.35	5.05E-03
metal ion homeostasis	409	23	6.92	+	3.32	5.71E-03
metal ion transport	539	27	9.12	+	2.96	5.74E-03
biological adhesion	860	36	14.56	+	2.47	5.84E-03
response to decreased oxygen levels	159	14	2.69	+	> 5	5.99E-03
positive regulation of metabolic process	2798	81	47.36	+	1.71	6.58E-03
organic hydroxy compound metabolic process	352	21	5.96	+	3.52	6.91E-03
fatty acid metabolic process	295	19	4.99	+	3.81	7.59E-03
response to oxygen-containing compound	871	36	14.74	+	2.44	7.81E-03
glycerolipid metabolic process	214	16	3.62	+	4.42	8.31E-03
behavior	551	27	9.33	+	2.90	8.66E-03
response to oxygen levels	165	14	2.79	+	> 5	9.18E-03
cellular response to endogenous stimulus	622	29	10.53	+	2.75	9.23E-03
single-organism biosynthetic process	879	36	14.88	+	2.42	9.61E-03
regulation of blood circulation	217	16	3.67	+	4.36	9.92E-03
cellular developmental process	3113	87	52.69	+	1.65	9.99E-03
gene expression	2560	17	43.33	-	.39	1.17E-02
positive regulation of catalytic activity	934	37	15.81	+	2.34	1.46E-02
divalent inorganic cation homeostasis	310	19	5.25	+	3.62	1.55E-02
regulation of steroid metabolic process	84	10	1.42	+	> 5	1.68E-02
response to hormone	506	25	8.56	+	2.92	1.88E-02
positive regulation of ion transport	229	16	3.88	+	4.13	1.96E-02
monovalent inorganic cation transport	378	21	6.40	+	3.28	2.08E-02
cellular divalent inorganic cation homeostasis	288	18	4.87	+	3.69	2.20E-02
regulation of cellular process	9449	204	159.92	+	1.28	2.31E-02
amino acid transport	109	11	1.84	+	> 5	2.53E-02
response to hypoxia	156	13	2.64	+	4.92	2.66E-02
cellular response to chemical stimulus	1496	50	25.32	+	1.97	2.84E-02
oxidation-reduction process	847	34	14.34	+	2.37	2.93E-02
response to organonitrogen compound	454	23	7.68	+	2.99	3.17E-02
negative regulation of biological process	3945	102	66.77	+	1.53	3.20E-02
positive regulation of cell communication	1254	44	21.22	+	2.07	3.47E-02
regulation of phosphate metabolic process	1390	47	23.53	+	2.00	4.23E-02
single-organism behavior	398	21	6.74	+	3.12	4.52E-02
response to nitrogen compound	533	25	9.02	+	2.77	4.55E-02
regulation of phosphorus metabolic process	1395	47	23.61	+	1.99	4.65E-02
regulation of metal ion transport	306	18	5.18	+	3.48	4.97E-02

Supplemental Table S3

LeX+EGFR+ -enriched genes: overrepresentation test and related GO categories

GO Ontology database Released 2015-03-10

GO biological process complete	Mus musculus	Box Input	Box Input (expected)	over(+) or under(-) -representation of the GO category	Fold enrichment	p-value
Unclassified	1649	18	35.83	-	.50	0.00E00
cell cycle	989	149	21.49	+	> 5	1.31E-76
cell cycle process	729	120	15.84	+	> 5	5.93E-64
mitotic cell cycle	505	100	10.97	+	> 5	2.23E-59
mitotic cell cycle process	485	97	10.54	+	> 5	8.53E-58
cell division	434	84	9.43	+	> 5	3.10E-48
cellular macromolecule metabolic process	5064	255	110.03	+	2.32	1.74E-42
mitotic nuclear division	304	68	6.61	+	> 5	4.17E-42
nucleic acid metabolic process	2976	189	64.66	+	2.92	3.65E-41
nuclear division	404	74	8.78	+	> 5	2.37E-40
DNA metabolic process	603	87	13.10	+	> 5	3.07E-40
nucleobase-containing compound metabolic process	3333	199	72.42	+	2.75	4.71E-40
heterocycle metabolic process	3470	202	75.40	+	2.68	3.22E-39
organelle fission	432	74	9.39	+	> 5	2.02E-38
cellular aromatic compound metabolic process	3502	201	76.09	+	2.64	4.90E-38
cellular nitrogen compound metabolic process	3650	204	79.31	+	2.57	4.36E-37
macromolecule metabolic process	5668	260	123.16	+	2.11	3.74E-36
organic cyclic compound metabolic process	3690	202	80.18	+	2.52	2.96E-35
regulation of cell cycle	703	87	15.28	+	> 5	3.15E-35
nitrogen compound metabolic process	3927	207	85.33	+	2.43	4.95E-34
organelle organization	2431	156	52.82	+	2.95	1.45E-32
cellular metabolic process	6683	272	145.21	+	1.87	4.10E-29
cellular process	12843	400	279.06	+	1.43	4.66E-28
single-organism organelle organization	1687	121	36.66	+	3.30	5.97E-28
cellular component organization or biogenesis	4143	199	90.02	+	2.21	1.29E-26
primary metabolic process	6870	271	149.27	+	1.82	1.70E-26
cellular macromolecule biosynthetic process	2602	151	56.54	+	2.67	1.93E-26
macromolecule biosynthetic process	2625	151	57.04	+	2.65	4.95E-26
chromosome organization	770	78	16.73	+	4.66	1.85E-25
organic substance metabolic process	7151	274	155.38	+	1.76	8.85E-25
chromosome segregation	193	42	4.19	+	> 5	2.68E-24
cellular component organization	4007	188	87.07	+	2.16	2.97E-23
regulation of cell cycle process	396	55	8.60	+	> 5	3.13E-23
gene expression	2560	142	55.62	+	2.55	1.83E-22
DNA replication	155	37	3.37	+	> 5	1.97E-22
cellular biosynthetic process	3273	164	71.12	+	2.31	3.29E-22
metabolic process	7804	283	169.57	+	1.67	5.43E-22
positive regulation of cell cycle	243	42	5.28	+	> 5	1.61E-20
organic substance biosynthetic process	3367	163	73.16	+	2.23	2.05E-20
biosynthetic process	3435	164	74.64	+	2.20	6.03E-20
regulation of macromolecule metabolic process	4608	192	100.12	+	1.92	1.09E-17
regulation of mitotic cell cycle	340	45	7.39	+	> 5	1.19E-17
DNA repair	356	45	7.74	+	> 5	6.92E-17
cellular response to DNA damage stimulus	548	55	11.91	+	4.62	9.65E-17
regulation of microtubule cytoskeleton organization	117	28	2.54	+	> 5	2.31E-16
sister chromatid segregation	78	24	1.69	+	> 5	4.32E-16
RNA metabolic process	2556	128	55.54	+	2.30	7.69E-16
regulation of primary metabolic process	4564	186	99.17	+	1.88	8.74E-16
macromolecular complex subunit organization	1684	99	36.59	+	2.71	9.83E-16
positive regulation of cell cycle process	175	32	3.80	+	> 5	1.10E-15
regulation of metabolic process	5368	207	116.64	+	1.77	1.12E-15
regulation of microtubule-based process	141	29	3.06	+	> 5	2.66E-15
regulation of cellular metabolic process	4767	190	103.58	+	1.83	3.15E-15
regulation of chromosome segregation	50	20	1.09	+	> 5	3.82E-15
regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	3204	146	69.62	+	2.10	4.06E-15
regulation of nitrogen compound metabolic process	3265	147	70.94	+	2.07	8.59E-15
regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	3096	142	67.27	+	2.11	8.75E-15
mitotic sister chromatid segregation	67	21	1.46	+	> 5	6.32E-14
regulation of macromolecule biosynthetic process	3215	143	69.86	+	2.05	9.10E-14
cell cycle phase transition	112	25	2.43	+	> 5	1.20E-13
regulation of gene expression	3402	147	73.92	+	1.99	3.26E-13
DNA-dependent DNA replication	64	20	1.39	+	> 5	4.04E-13
microtubule cytoskeleton organization	299	37	6.50	+	> 5	4.19E-13
heterocycle biosynthetic process	2200	110	47.80	+	2.30	7.25E-13
regulation of cellular biosynthetic process	3355	144	72.90	+	1.98	1.41E-12
regulation of organelle organization	781	59	16.97	+	3.48	1.59E-12
nucleobase-containing compound biosynthetic process	2138	107	46.46	+	2.30	2.02E-12
aromatic compound biosynthetic process	2207	109	47.95	+	2.27	2.43E-12
cellular nitrogen compound biosynthetic process	2272	111	49.37	+	2.25	2.54E-12
negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	1105	71	24.01	+	2.96	4.08E-12
G-protein coupled receptor signaling pathway	1844	2	40.07	-	< 0.2	4.87E-12
regulation of RNA metabolic process	2933	130	63.73	+	2.04	6.67E-12
cellular protein metabolic process	2471	116	53.69	+	2.16	7.68E-12
regulation of biosynthetic process	3428	144	74.48	+	1.93	8.56E-12
negative regulation of nitrogen compound metabolic process	1130	71	24.55	+	2.89	1.24E-11
organic cyclic compound biosynthetic process	2307	110	50.13	+	2.19	1.88E-11
DNA conformation change	184	28	4.00	+	> 5	1.96E-11
translation	266	33	5.78	+	> 5	1.97E-11
regulation of nucleic acid-templated transcription	2840	126	61.71	+	2.04	2.05E-11
regulation of RNA biosynthetic process	2846	126	61.84	+	2.04	2.40E-11
positive regulation of cellular process	3943	157	85.68	+	1.83	2.61E-11
regulation of transcription, DNA-templated	2826	125	61.40	+	2.04	3.46E-11
mitotic cell cycle phase transition	107	22	2.32	+	> 5	5.37E-11
cell cycle checkpoint	135	24	2.93	+	> 5	7.27E-11
spindle organization	86	20	1.87	+	> 5	9.62E-11
sensory perception	1557	1	33.83	-	< 0.2	1.56E-10
chromatin organization	556	46	12.08	+	3.81	1.73E-10

negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	1057	66	22.97	+	2.87	1.85E-10
DNA packaging	144	24	3.13	+	> 5	2.86E-10
positive regulation of biological process	4468	168	97.08	+	1.73	3.01E-10
negative regulation of macromolecule biosynthetic process	1113	67	24.18	+	2.77	6.16E-10
microtubule-based process	466	41	10.13	+	4.05	6.84E-10
negative regulation of gene expression	1173	69	25.49	+	2.71	7.33E-10
regulation of mitotic cell cycle phase transition	151	24	3.28	+	> 5	7.78E-10
negative regulation of macromolecule metabolic process	1824	90	39.63	+	2.27	1.81E-09
negative regulation of RNA metabolic process	1007	62	21.88	+	2.83	2.24E-09
regulation of cell cycle phase transition	160	24	3.48	+	> 5	2.61E-09
negative regulation of metabolic process	2130	99	46.28	+	2.14	3.12E-09
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1595	82	34.66	+	2.37	3.20E-09
negative regulation of cellular biosynthetic process	1160	67	25.20	+	2.66	3.98E-09
positive regulation of macromolecule metabolic process	2259	102	49.08	+	2.08	7.15E-09
negative regulation of biosynthetic process	1182	67	25.68	+	2.61	9.16E-09
negative regulation of transcription, DNA-templated	940	58	20.42	+	2.84	1.29E-08
negative regulation of RNA biosynthetic process	968	59	21.03	+	2.81	1.34E-08
negative regulation of cellular metabolic process	1911	90	41.52	+	2.17	2.31E-08
negative regulation of nucleic acid-templated transcription	954	58	20.73	+	2.80	2.32E-08
regulation of cytoskeleton organization	368	34	8.00	+	4.25	2.59E-08
regulation of DNA metabolic process	271	29	5.89	+	4.92	3.42E-08
system process	2217	10	48.17	-	.21	3.87E-08
regulation of cellular process	9449	280	205.31	+	1.36	4.53E-08
protein complex subunit organization	1113	63	24.18	+	2.61	4.95E-08
regulation of cell division	220	26	4.78	+	> 5	5.26E-08
negative regulation of cellular process	3616	138	78.57	+	1.76	6.29E-08
cellular response to stress	1092	62	23.73	+	2.61	6.54E-08
negative regulation of biological process	3945	146	85.72	+	1.70	1.16E-07
positive regulation of mitotic cell cycle	114	19	2.48	+	> 5	1.30E-07
spindle assembly	53	14	1.15	+	> 5	1.72E-07
cytoskeleton organization	738	48	16.04	+	2.99	2.15E-07
chromatin modification	469	37	10.19	+	3.63	2.50E-07
chromosome condensation	27	11	.59	+	> 5	2.67E-07
DNA replication initiation	14	9	.30	+	> 5	3.10E-07
regulation of biological process	9865	286	214.35	+	1.33	3.15E-07
negative regulation of cell cycle	299	29	6.50	+	4.46	3.40E-07
cellular component biogenesis	1664	79	36.16	+	2.18	4.35E-07
single-organism process	11876	328	258.05	+	1.27	5.06E-07
regulation of attachment of spindle microtubules to kinetochore	10	8	.22	+	> 5	6.85E-07
regulation of cellular component organization	1781	82	38.70	+	2.12	7.74E-07
cell cycle G1/S phase transition	72	15	1.56	+	> 5	8.70E-07
G1/S transition of mitotic cell cycle	72	15	1.56	+	> 5	8.70E-07
RNA biosynthetic process	1918	86	41.68	+	2.06	9.20E-07
positive regulation of gene expression	1441	71	31.31	+	2.27	9.80E-07
single-organism cellular process	10482	297	227.76	+	1.30	1.31E-06
protein metabolic process	3114	120	67.66	+	1.77	1.38E-06
detection of chemical stimulus	1147	1	24.92	-	< 0.2	1.50E-06
positive regulation of metabolic process	2798	111	60.80	+	1.83	1.59E-06
neurological system process	1852	8	40.24	-	< 0.2	1.59E-06
transcription, DNA-templated	1910	85	41.50	+	2.05	1.74E-06
nucleic acid-templated transcription	1911	85	41.52	+	2.05	1.78E-06
positive regulation of cellular metabolic process	2393	98	52.00	+	1.88	4.76E-06
positive regulation of mitotic cell cycle phase transition	46	12	1.00	+	> 5	5.24E-06
positive regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	1445	69	31.40	+	2.20	6.78E-06
positive regulation of nitrogen compound metabolic process	1478	70	32.11	+	2.18	7.06E-06
biological regulation	10298	290	223.76	+	1.30	7.48E-06
positive regulation of cell cycle phase transition	48	12	1.04	+	> 5	8.41E-06
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	698	43	15.17	+	2.84	1.21E-05
detection of stimulus	1269	3	27.57	-	< 0.2	1.53E-05
positive regulation of RNA metabolic process	1267	62	27.53	+	2.25	2.17E-05
regulation of chromosome organization	179	20	3.89	+	> 5	3.55E-05
cytokinesis	82	14	1.78	+	> 5	4.38E-05
mitotic chromosome condensation	11	7	.24	+	> 5	4.90E-05
DNA biosynthetic process	46	11	1.00	+	> 5	6.47E-05
positive regulation of cell division	117	16	2.54	+	> 5	8.01E-05
regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle	37	10	.80	+	> 5	9.87E-05
DNA integrity checkpoint	88	14	1.91	+	> 5	1.05E-04
macromolecule modification	2053	84	44.61	+	1.88	1.09E-04
regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity	74	13	1.61	+	> 5	1.09E-04
regulation of cell cycle G2/M phase transition	38	10	.83	+	> 5	1.26E-04
mitotic cell cycle checkpoint	90	14	1.96	+	> 5	1.38E-04
positive regulation of macromolecule biosynthetic process	1398	64	30.38	+	2.11	1.43E-04
positive regulation of chromosome segregation	13	7	.28	+	> 5	1.52E-04
macromolecular complex assembly	999	51	21.71	+	2.35	1.68E-04
meiotic cell cycle	160	18	3.48	+	> 5	1.87E-04
mRNA metabolic process	401	29	8.71	+	3.33	2.23E-04
positive regulation of nucleic acid-templated transcription	1224	58	26.60	+	2.18	2.24E-04
positive regulation of transcription, DNA-templated	1224	58	26.60	+	2.18	2.24E-04
positive regulation of RNA biosynthetic process	1226	58	26.64	+	2.18	2.37E-04
regulation of nuclear division	129	16	2.80	+	> 5	3.02E-04
negative regulation of organelle organization	246	22	5.35	+	4.12	3.07E-04
negative regulation of mitotic cell cycle	147	17	3.19	+	> 5	3.09E-04
protein complex assembly	841	45	18.27	+	2.46	3.18E-04
protein complex biogenesis	843	45	18.32	+	2.46	3.40E-04
cellular component assembly	1499	66	32.57	+	2.03	3.58E-04
cellular protein modification process	1945	79	42.26	+	1.87	4.31E-04
protein modification process	1945	79	42.26	+	1.87	4.31E-04
RNA processing	416	29	9.04	+	3.21	4.81E-04
centrosome organization	57	11	1.24	+	> 5	5.53E-04
negative regulation of cell cycle process	137	16	2.98	+	> 5	6.75E-04
regulation of DNA repair	59	11	1.28	+	> 5	7.78E-04
spindle checkpoint	25	8	.54	+	> 5	7.86E-04
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	963	48	20.92	+	2.29	8.99E-04
base-excision repair	36	9	.78	+	> 5	1.00E-03
microtubule cytoskeleton organization involved in mitosis	26	8	.56	+	> 5	1.06E-03
negative regulation of cellular component organization	488	31	10.60	+	2.92	1.27E-03
positive regulation of cellular biosynthetic process	1524	65	33.11	+	1.96	1.42E-03

mRNA processing	340	25	7.39	+	3.38	1.48E-03
microtubule organizing center organization	64	11	1.39	+	> 5	1.73E-03
mitotic spindle organization	39	9	.85	+	> 5	1.94E-03
DNA damage checkpoint	81	12	1.76	+	> 5	2.36E-03
centrosome cycle	29	8	.63	+	> 5	2.39E-03
protein localization to chromosome, centromeric region	12	6	.26	+	> 5	2.42E-03
cellular macromolecular complex assembly	479	30	10.41	+	2.88	2.69E-03
double-strand break repair	116	14	2.52	+	> 5	2.89E-03
positive regulation of biosynthetic process	1557	65	33.83	+	1.92	2.99E-03
meiotic nuclear division	118	14	2.56	+	> 5	3.53E-03
protein localization to chromosome	31	8	.67	+	> 5	3.92E-03
DNA recombination	158	16	3.43	+	4.66	4.37E-03
protein phosphorylation	658	36	14.30	+	2.52	4.50E-03
mitotic spindle assembly	22	7	.48	+	> 5	5.11E-03
establishment of chromosome localization	44	9	.96	+	> 5	5.24E-03
chromosome localization	44	9	.96	+	> 5	5.24E-03
transmembrane transport	877	2	19.06	-	< 0.2	5.57E-03
chromatin assembly or disassembly	123	14	2.67	+	> 5	5.73E-03
regulation of microtubule polymerization or depolymerization	58	10	1.26	+	> 5	5.90E-03
covalent chromatin modification	294	22	6.39	+	3.44	5.98E-03
ion transport	1061	4	23.05	-	< 0.2	6.59E-03
protein-DNA complex subunit organization	144	15	3.13	+	4.79	6.93E-03
regulation of centrosome cycle	34	8	.74	+	> 5	7.76E-03
regulation of cellular protein metabolic process	1774	70	38.55	+	1.82	7.77E-03
positive regulation of cell cycle G2/M phase transition	15	6	.33	+	> 5	8.72E-03
positive regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle	15	6	.33	+	> 5	8.72E-03
metaphase plate congression	35	8	.76	+	> 5	9.61E-03
cytoskeleton-dependent cytokinesis	36	8	.78	+	> 5	1.18E-02
regulation of double-strand break repair	25	7	.54	+	> 5	1.18E-02
RNA splicing	260	20	5.65	+	3.54	1.25E-02
regulation of cytokinesis	49	9	1.06	+	> 5	1.25E-02
positive regulation of organelle organization	358	24	7.78	+	3.09	1.27E-02
meiotic cell cycle process	96	12	2.09	+	> 5	1.35E-02
regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	115	13	2.50	+	> 5	1.52E-02
mitotic cytokinesis	26	7	.56	+	> 5	1.53E-02
nucleosome organization	116	13	2.52	+	> 5	1.67E-02
regulation of mitotic nuclear division	99	12	2.15	+	> 5	1.85E-02
histone modification	291	21	6.32	+	3.32	1.85E-02
mitotic metaphase plate congression	27	7	.59	+	> 5	1.95E-02
cell surface receptor signaling pathway	3045	34	66.16	-	.51	2.05E-02
developmental process	4496	140	97.69	+	1.43	2.05E-02
protein localization to kinetochore	10	5	.22	+	> 5	2.35E-02
positive regulation of cytokinesis	28	7	.61	+	> 5	2.47E-02
phosphorylation	932	43	20.25	+	2.12	2.96E-02
posttranscriptional regulation of gene expression	430	26	9.34	+	2.78	3.01E-02
regulation of cell death	1359	56	29.53	+	1.90	3.01E-02
regulation of sister chromatid segregation	29	7	.63	+	> 5	3.10E-02
protein-DNA complex assembly	123	13	2.67	+	4.86	3.11E-02
regulation of protein metabolic process	1957	73	42.52	+	1.72	3.28E-02
regulation of transferase activity	660	34	14.34	+	2.37	3.34E-02
regulation of response to DNA damage stimulus	124	13	2.69	+	4.82	3.39E-02
mitotic spindle midzone assembly	5	4	.11	+	> 5	3.74E-02
mitotic spindle elongation	5	4	.11	+	> 5	3.74E-02
peptidyl-amino acid modification	577	31	12.54	+	2.47	3.91E-02
chromatin assembly	107	12	2.32	+	> 5	4.02E-02
single-organism developmental process	4474	138	97.21	+	1.42	4.16E-02
ribosome biogenesis	189	16	4.11	+	3.90	4.18E-02
regulation of apoptotic process	1244	52	27.03	+	1.92	4.62E-02
negative regulation of mitotic cell cycle phase transition	74	10	1.61	+	> 5	4.96E-02

# **DISCUSSION**

---

---



## **1. Le tri cellulaire comme outil d'étude de la neurogenèse adulte**

### **1.1 Vers l'identification et la purification des CSN adultes**

La capacité des cellules à former *in vitro* des neurosphères capables de s'autorenouveler et de se différencier dans les trois lignages neuraux - neurones, astrocytes, oligodendrocytes - a pendant longtemps été considérée comme une preuve de leur caractère souche (Reynolds and Weiss, 1992). Utilisant la capacité des cellules à former des neurosphères multipotentes comme indicateur de la présence de cellules souches, des études précurseurs ont ainsi permis un enrichissement significatif en CSN à partir de la ZSV adulte en développant différentes approches de tri cellulaire par cytométrie en flux, à partir des populations nestin<sup>+</sup> (Kawaguchi et al., 2001), PNA<sup>faible</sup>HSA/CD24<sup>faible</sup> (Rietze et al., 2001), LeX<sup>+</sup> (Capela and Temple, 2002), EGFR<sup>+</sup> (Ciccolini et al., 2005) et GFAP<sup>+</sup> Prominin1/CD133<sup>+</sup> (Beckervordersandforth et al., 2010). Cependant, la grande majorité des marqueurs utilisés ici étaient communs à plusieurs populations neurogéniques de la lignée neurale et ne permettaient pas de distinguer les CSN des progéniteurs intermédiaires. Ces études ont toutefois constitué une étape clé dans les premiers pas de la caractérisation de l'identité souche des CSN et ont souligné l'importance de travailler dans des conditions se rapprochant le plus possible du *vivo* pour se défaire des biais induits par la culture. Ceci est particulièrement bien illustré par la quasi absence de chevauchement entre le transcriptome de CSN activées fraîchement isolées par cytométrie en flux (Beckervordersandforth et al., 2010) de celui de cellules issues de cultures de neurosphères, pourtant elles aussi enrichies en CSN activées (Ivanova et al., 2002). Une étude est allée plus loin en purifiant simultanément les CSN activées, les progéniteurs intermédiaires et les neuroblastes, mais ne permettait pas d'isoler les CSN quiescentes (Pastrana et al., 2009). L'identification de nouveaux marqueurs spécifiques des différentes populations cellulaires neurogéniques de la ZSV, ainsi que l'amélioration des techniques de tri cellulaire par cytométrie en flux existantes restent, à ce jour, cruciales pour définir la dynamique cellulaire des CSN *ex vivo* mais également *in vivo*.

## **1.2 Purification des CSN quiescentes, des CSN activées et de la progénie neurale**

Nous avons mis au point au sein du laboratoire une technique de purification par cytométrie en flux combinant le suivi de l'expression de trois marqueurs membranaires pour identifier et isoler les principales populations cellulaires de la ZSV adulte : 1/ le LeX qui est présent sur les CSN et les progéniteurs intermédiaires (Capela and Temple, 2002; Aguirre et al., 2004), 2/ le CD24 qui est exprimé par les neuroblastes et par les cellules épendymaires (Calaora et al., 1996; Pastrana et al., 2009), et enfin 3/ le récepteur de l'EGF porté par les cellules de la ZSV en prolifération par l'intermédiaire d'un ligand (Ciccolini et al., 2005). En plus de permettre pour la première fois la purification ciblée des CSN quiescentes ( $\text{LeX}^{\text{bright}}$ ) et des CSN activées ( $\text{LeX}^+ \text{EGFR}^+$ ), notre stratégie permet également d'isoler les progéniteurs intermédiaires ( $\text{EGFR}^+$ ) ainsi que les neuroblastes ( $\text{CD24}^+$ ) de la ZSV murine adulte.

Notre technique de tri cellulaire ne requiert pas l'utilisation de souris transgéniques à l'inverse des techniques récemment mises au point par d'autres laboratoires de recherche (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014). Ceci constitue l'une des forces de notre approche puisqu'il n'est pas nécessaire d'avoir des souris exprimant un gène rapporteur comme la GFAP ou le GLAST pour identifier les CSN. Cela permet de coupler facilement notre stratégie de suivi des populations neurogéniques de la ZSV à n'importe quel modèle de souris chez lesquelles l'expression d'un ou plusieurs gènes cibles est inactivée, ou chez lesquelles l'expression d'un gène est suivie à l'aide d'un gène rapporteur. Par exemple, nous avons montré que notre stratégie de purification pouvait être couplée au système FUCCI (Sakaue-Sawano et al., 2008) et ainsi permettre de visualiser en temps réel la progression des cellules dans le cycle cellulaire.

### **1.3 Hétérogénéité cellulaire des populations neurogéniques triées**

Les marqueurs utilisés dans les stratégies de tri cellulaire développées pour l'heure ne sont pas suffisamment spécifiques pour permettre de travailler avec des populations cellulaires pures, qui sont toutefois fortement enrichies pour un type cellulaire donné. Ceci est en grande partie dû à la difficulté d'identifier des marqueurs spécifiques des différentes populations cellulaires présentes au sein des niches neurogéniques adultes. Ainsi, aucun marqueur spécifique des CSN quiescentes n'ayant été identifié pour l'heure, ces dernières sont distinguées des CSN activées par l'absence du récepteur à l'EGF à leur membrane (Daynac et al., 2013; Codega et al., 2014; Mich et al., 2014). L'hétérogénéité cellulaire des CSN quiescentes triées est pourtant bien apparente, par exemple au regard de leur répartition dans le cycle cellulaire et des différences d'expression du facteur de transcription Sox2 (Codega et al., 2014).

Il faut également rappeler que les CSN de la ZSV adulte possèdent une identité régionale qu'elles héritent de leur localisation au cours du développement embryonnaire et qui les prédispose à générer des sous-types neuronaux distincts, ou des oligodendrocytes (Merkle et al., 2007; Ventura and Goldman, 2007; Young et al., 2007; Ortega et al., 2013; Azim et al., 2015). Pour l'heure, les différentes techniques de tri cellulaire pour isoler les CSN quiescentes et activées de la ZSV adulte ne prennent pas en compte l'origine régionale des cellules (Daynac et al., 2013; Codega et al., 2014; Mich et al., 2014) quand bien même elle pourrait être en partie responsable de leur hétérogénéité cellulaire. Il serait intéressant de combiner ces stratégies de marquage à des modèles de souris transgéniques permettant le suivi de l'expression des facteurs de transcription Emx1, Gsx1/2, Nkx2.1, Nkx6.2 et Zic1/3 qui sont chacun spécifique d'une origine embryonnaire distincte (Young et al., 2007; Fiorelli et al., 2015). Une approche plus simple à mettre en place pourrait consister à disséquer les différentes régions de la ZSV adulte (Azim et al., 2015). Ceci permettrait de déterminer si l'hétérogénéité régionale des CSN adultes participe à l'hétérogénéité cellulaire des CSN triées.

Le caractère souche et multipotent des CSN triées par cytométrie en flux a été démontré *in vivo* par des expériences de transplantation intracérébrale (Codega et al., 2014; Llorens-Bobadilla et al., 2015). Toutefois, il n'a pas été examiné dans ces

expériences si les neurones ou oligodendrocytes générés provenaient de sous-populations distinctes parmi toutes les CSN transplantées. Il n'est donc pas possible de savoir si toutes les CSN triées sont multipotentes *in vivo*, et dans quelle mesure l'hétérogénéité des CSN quiescentes serait attribuable à des potentiels neurogéniques différents. Un moyen de réponse pourrait être de trier les CSN issues de souris Glast-CreERT2 croisées avec la lignée rapportrice R26R-Confetti permettant de réaliser des analyses clonales grâce à l'expression aléatoire de 4 protéines fluorescentes dans les cellules, pour ensuite les transplanter le long des ventricules et suivre leur devenir de façon clonale (Calzolari et al., 2015). L'identification de marqueurs additionnels permettant de cibler plus spécifiquement les différentes sous-populations de CSN quiescentes et de CSN activées constitue donc une étape importante pour le futur.

## 2. Les CSN, entre quiescence et activation

### 2.1 Caractérisation fonctionnelle des CSN quiescentes

Les CSN sont présentes sous deux états cellulaires distincts qui coexistent au sein des niches neurogéniques dans le cerveau adulte : 1/ en état de dormance non prolifératif où les cellules sont hors du cycle cellulaire ou en phase G<sub>1</sub> très longue (état dit relativement quiescent), ce qui leur confère des propriétés de résistance aux traitements anti-mitotiques et à l'irradiation , et 2/ en prolifération (état dit activé) (Morshead et al., 1994; Doetsch et al., 1999a; Tada et al., 1999; Lugert et al., 2010; Cheung and Rando, 2013; Daynac et al., 2013). A l'aide de notre technique de tri cellulaire par cytométrie en flux, nous avons identifié les populations cellulaires LeX<sup>bright</sup> et LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> comme correspondant respectivement aux CSN quiescentes et activées (Daynac et al., 2013). A la différence des cellules LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> qui sont en prolifération et donc sensibles aux agents anti-mitotiques, les cellules LeX<sup>bright</sup> sont en majorité hors du cycle cellulaire et seraient responsables de la régénération de la ZSV après irradiation de par leur radio-résistance (Daynac et al., 2013).

Des expériences d'administration continue de BrdU dans l'eau de boisson sur 15 jours suivie d'une période de chasse de 15 jours montrent que les cellules LeX<sup>bright</sup> retiennent le marquage BrdU du fait d'un cycle cellulaire lent, et correspondent donc aux *label-retaining cells* (Morshead et al., 1994). Similairement à ce qui a été précédemment rapporté (Codega et al., 2014; Mich et al., 2014), nous montrons qu'environ 6% des cellules LeX<sup>bright</sup> incorporent du BrdU en 15 jours et que plus de 50% d'entre elles conservent le marquage après une chasse de 30 jours. Par ailleurs, des données récentes suggèrent que la majorité des CSN sont produites au cours du développement embryonnaire (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015). Nous montrons que la majeure partie des cellules LeX<sup>bright</sup> est formée au cours du développement embryonnaire entre E14,5 et E15,5 puis est maintenue dans un état quiescent jusqu'à l'âge postnatal P21. Il serait intéressant d'étudier les effets d'une irradiation *in utero* autour de cette période embryonnaire pour déterminer quelles pourraient être les conséquences à l'âge adulte sur les populations neurogéniques et sur les fonctions

cognitives liées à l'olfaction avec des études comportementales. De plus, bien que nous ayons montré que les cellules LeX<sup>bright</sup> étaient capables de générer les cellules de la progénie neurale *in vivo* à l'aide de souris Glast-CreERT2 dans lesquelles la corrélation entre les cellules LeX<sup>bright</sup> et Glast<sup>bright</sup> a été démontrée (Daynac et al., 2016) (données non montrées), ce résultat reste à confirmer par des expériences de transplantation le long des ventricules latéraux.

En accord avec la forte proportion de cellules en S-G<sub>2</sub>/M, les cellules LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> sont hautement clonogéniques *ex vivo*. A l'inverse, les cellules LeX<sup>bright</sup> ne forment que très rarement des colonies. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la faible clonogénérité des cellules LeX<sup>bright</sup> en culture. Tout d'abord, il est très probable que les techniques de culture cellulaire utilisées pour étudier les populations neurogéniques ne soient pas adaptées à l'étude des CSN quiescentes. En effet, les techniques de cultures en neurosphères ou en adhésion permettent l'étude de populations cellulaires qui se divisent activement et dont le nombre peut être rapidement amplifié en présence de mitogènes (Pastrana et al., 2011). Ne connaissant pas pour l'heure les composants essentiels de la niche requis pour l'activation des CSN quiescentes, par exemple des facteurs de croissance ou des éléments de la matrice extracellulaire, les conditions de cultures optimales restent à déterminer. Ceci pourrait expliquer très certainement en grande partie les échecs de mise en culture des CSN quiescentes (Daynac et al., 2013; Mich et al., 2014) et les taux de clonogénérité inférieurs à 1% lorsque leur culture est possible (Codega et al., 2014). Il est également possible que les CSN quiescentes possèdent des propriétés intrinsèques qui limitent toute expansion rapide en présence de facteurs de croissance en raison de leur cycle cellulaire lent, ou qu'une limitation intrinsèque existe quant au nombre de fois où elles peuvent se diviser.

## 2.2 La quiescence, un état cellulaire dynamique

La quiescence a pendant longtemps été considérée comme un état cellulaire de dormance au cours duquel les cellules sont hors du cycle cellulaire. Des données récentes suggèrent que l'état quiescent est en fait constitué d'un continuum de stades cellulaires (Codega et al., 2014; Rodgers et al., 2014; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Shin et al., 2015). Des expériences de séquençage à haut débit de l'ARN (ou RNA-Seq) cellule par cellule sur des CSN issues de la ZSV ou de la ZSG adulte en conditions physiologiques ont ainsi mis en évidence que la transition de l'état de quiescence à l'état activé s'effectue via un état intermédiaire de sortie de quiescence amorcée (Llorens-Bobadilla et al., 2015; Shin et al., 2015). De manière intéressante, l'équipe d'Ana Martin-Villalba montre par ailleurs que la sortie progressive de quiescence des CSN peut être reproduite dans un modèle d'ischémie où la grande majorité des CSN quiescentes progressent d'un état de dormance à un état de sortie de quiescence amorcée en 2 jours (Llorens-Bobadilla et al., 2015). Les similitudes observées entre la sortie de quiescence amorcée dans le cerveau adulte et celle décrite pour les cellules souches satellites du muscle suite à une blessure suggèrent qu'il pourrait exister un mécanisme commun à l'activation des cellules souches quiescentes dans différents organes (Rodgers et al., 2014).

Nous avons montré que les cellules LeX<sup>bright</sup> étaient radio-résistantes et qu'elles entraient en cycle 48 heures après une irradiation de 4 Gy pour régénérer la ZSV endommagée (Daynac et al., 2013). Afin d'identifier de nouveaux acteurs de l'activation des CSN quiescentes, nous avons initié une étude comparative du transcriptome des cellules LeX<sup>bright</sup> avant et 48 heures après irradiation. Nos résultats préliminaires sont particulièrement intéressants au regard des données récentes évoquées ci-dessus (Llorens-Bobadilla et al., 2015; Shin et al., 2015). En effet, bien que seul un faible pourcentage des cellules LeX<sup>bright</sup> entrent en cycle 48 heures après irradiation, nous observons un enrichissement en gènes liés au cycle cellulaire, à l'activité ribosomale et à la phosphorylation oxydative mitochondriale (données non montrées) similairement à ce qui a été rapporté pour l'état de sortie de quiescence amorcée des CSN dans l'hippocampe (Shin et al., 2015).

Afin de poursuivre la caractérisation des mécanismes régulant la transition quiescence-prolifération des CSN, nous avons réalisé une étude comparative du transcriptome des cellules LeX<sup>bright</sup> et LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> issues de jeunes souris adultes. De manière intéressante, nos analyses d'ontologie et d'enrichissement génique révèlent des caractéristiques moléculaires distinctes. En accord avec l'état prolifératif des CSN activées *in vivo*, le transcriptome des cellules LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup> est enrichi en gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la transcription et la traduction. A l'inverse, les cellules LeX<sup>bright</sup> sont enrichies en processus liés à la communication cellulaire, la réponse à un stimulus et l'adhésion cellulaire. De plus, la majeure partie des gènes surexprimés dans les cellules LeX<sup>bright</sup> sont liés à la membrane cellulaire, soulignant la régulation de l'état quiescent par le microenvironnement. Ces résultats sont en accord avec des études récentes qui ont montré que l'équilibre entre quiescence et activation des CSN est étroitement régulé par des signaux extrinsèques en provenance de la niche par différentes voies de signalisation médiées par les récepteurs de surface et les interactions avec les cellules environnantes (Kokovay et al., 2012; Daynac et al., 2013; Kawaguchi et al., 2013; Ottone et al., 2014; Porlan et al., 2014; Daynac et al., 2016) .

Nous nous sommes par la suite intéressés aux membres d'une famille de protéoglycans transmembranaires à héparane sulfate, les syndécans (sdc). Leur profil d'expression est en effet pertinent puisque les sdc2 et sdc4 sont plus abondants les cellules LeX<sup>bright</sup> tandis que le sdc1 est fortement surexprimé par les cellules LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>. Le sdc1 a été montré nécessaire au maintien et à la prolifération des CSN et progéniteurs neuraux au cours du développement cortical (Wang et al., 2012), et la mise en culture des cellules embryonnaires Sdc1<sup>+</sup> montre un enrichissement significatif en cellules capables d'initier des neurosphères *ex vivo* (Nagato et al., 2005). En accord avec ces données, nous montrons que le sdc1 est spécifiquement présent sur les populations cellulaires de la ZSV qui prolifèrent. De plus, nous avons mis en évidence que le niveau d'expression des sdc1-2-4 est directement modulé par le statut prolifératif des cellules. Il serait intéressant dans la suite de ce travail de caractériser les rôles fonctionnels des

membres de la famille des syndécans dans la balance quiescence-prolifération des CSN adultes.

Il est important de noter que bien que la capacité des CSN quiescentes à s'activer après un stress *in vivo* pour maintenir l'homéostasie tissulaire de la ZSV adulte ait été décrite (Daynac et al., 2013; Codega et al., 2014; Mich et al., 2014; Llorens-Bobadilla et al., 2015), aucune donnée ne permet pour le moment de savoir s'il existe un retour en quiescence des CSN activées en conditions physiologiques. La question se pose alors quant aux mécanismes qui permettent leur maintien au cours du vieillissement.

### **3. Le vieillissement comme modèle d'étude des mécanismes régulant la neurogenèse adulte**

#### **3.1 Acquisition d'un phénotype quiescent au cours du vieillissement**

La diminution de la neurogenèse chez des souris d'âge moyen (12 mois) ou âgées (18-24 mois) au sein des niches neurogéniques et le déclin des fonctions cognitives associées ont été très largement documentés (Seki and Arai, 1995; Kuhn et al., 1996; Enwere et al., 2004; Bouab et al., 2011; Ming and Song, 2011). Toutefois, les origines cellulaires et moléculaires de ces altérations au cours du vieillissement restent peu connues. Il est cependant probable que la diminution de la prolifération observée au sein des niches neurogéniques au cours du vieillissement vienne d'un problème au niveau des CSN. Plusieurs hypothèses qui ne sont pas nécessairement mutuellement exclusives sont alors envisageables: l'épuisement de leur stock (potentiel prolifératif limité), l'augmentation de leur différenciation, l'augmentation de leur mort cellulaire, ou encore l'acquisition d'un phénotype quiescent avec l'âge (diminution de la fraction en prolifération et/ou allongement de la durée du cycle cellulaire).

A l'aide de notre technique de tri cellulaire par cytométrie en flux, nous montrons que la diminution de la neurogenèse à 12 mois ne semble pas venir d'une perte des CSN dont le nombre reste stable. Nos résultats sont en apparence contradiction avec une précédente étude qui montrait une diminution de plus de 70% du nombre de CSN à 12 mois (Shook et al., 2012). Ces différences peuvent s'expliquer par les approches expérimentales utilisées pour estimer le nombre de CSN. En effet, l'équipe de Joanne Conover a compté *in situ* le nombre de CSN contactant le ventricule via le cil primaire qu'elles projettent à travers le tapis de cellules épendymaires (Shook et al., 2012). Toutefois, l'organisation structurale de la ZSV est modifiée au cours du vieillissement et la majeure partie des CSN perdent leur contact avec le ventricule (Capilla-Gonzalez et al, 2014). A l'inverse, notre technique de tri cellulaire par cytométrie en flux ne prend pas en compte la position des CSN le long de la surface ventriculaire (Daynac et al., 2013).

Alors que le nombre de CSN semble rester constant jusqu'à 12 mois, nous montrons que la fraction des CSN activées en prolifération diminue de plus de 90% à 12 mois. Nous mettons également en évidence que ce déficit prolifératif des CSN activées apparaît dès 6 mois, plus tôt qu'anticipé. Couplant le système FUCCI (Sakaue-Sawano et al., 2008) à notre technique de tri cellulaire, nous avons pu distinguer pour la première fois les phases  $G_1$  et  $S-G_2/M$  du cycle cellulaire des différentes populations neurogéniques de la ZSV adulte. Nous rapportons un allongement progressif de la phase  $G_1$  spécifiquement dans les CSN activées à 6 mois (+2,5h) et à 12 mois (+6,5 heures), rallongeant la durée totale du cycle cellulaire. De manière importante, alors que l'allongement de la phase  $G_1$  des précurseurs neuraux a été montré comme étant une condition à la fois nécessaire et suffisante pour induire leur différenciation (Salomoni and Calegari, 2010; Roccio et al., 2013), nous montrons que l'allongement observé chez les CSN activées est indépendant d'une entrée en différenciation. Cette altération du cycle cellulaire est corroborée par l'étude comparative du transcriptome de cellules  $\text{LeX}^+\text{EGFR}^+$  issues de souris âgées de 2 mois et de 6 mois. En effet, nous constatons que la majorité des gènes liés au cycle cellulaire à 2 mois sont associés à la phase  $S-G_2/M$  tandis qu'à 6 mois ils sont pour la plupart associés à la phase  $G_1$ . Le déficit prolifératif des CSN activées à 6 mois et à 12 mois pourrait être du, entre autres, à leur perte de contact avec le ventricule et donc avec le liquide céphalo-rachidien (LCR) qui est une source importante de facteurs promouvant la prolifération des CSN adultes (Silva-Vargas et al., 2016). Ceci pose alors la question de savoir si les CSN qui perdent le contact avec le ventricule au cours du vieillissement sont toujours mobilisables. Par ailleurs, le rallongement de la phase  $G_1$  à 6 mois des CSN activées n'est pas nécessairement le résultat d'un vieillissement précoce de la ZSV et pourrait correspondre à un processus développemental chez la jeune souris adulte (He et al., 2009).

### **3.2 Le microenvironnement, acteur majeur du vieillissement de la ZSV**

La régulation de la neurogenèse bulbaire adulte par la niche est largement documentée (pour revue, voir (Lim and Alvarez-Buylla, 2016)). La morphologie bipolaire des CSN leur permet de recevoir et d'intégrer une multitude de signaux en provenance du système vasculaire et du LCR qui modulent directement leurs propriétés, en plus de maintenir l'intégrité de la ZSV (Fuentealba et al., 2012). Toutefois, cela les rend également plus sensibles aux changements physiologiques de l'organisme, par exemple au cours du vieillissement (Silva-Vargas et al., 2013). En effet, de nombreuses études montrent que la dérégulation de facteurs extrinsèques et la désorganisation de l'architecture de la ZSV au cours du vieillissement participent directement à la diminution de la neurogenèse (Conover and Shook, 2011; Capilla-Gonzalez et al., 2015).

Parmi les facteurs extrinsèques impliqués dans la diminution de la neurogenèse adulte, le TGF $\beta$ 1 avait précédemment été montré comme inhibant la prolifération des CSN et des progéniteurs intermédiaires de l'hippocampe adulte qui s'accumulaient alors en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle cellulaire (Buckwalter et al., 2006; Wachs et al., 2006). Similairement, nous montrons que la diminution de la prolifération des CSN activées entre 2 mois et 6-12 mois suite au rallongement de la durée de leur phase G<sub>1</sub> est directement liée à la surexpression du TGF $\beta$ 1. En effet, l'ajout en culture du TGF $\beta$ 1 allonge la phase G<sub>1</sub> des CSN activées et des progéniteurs intermédiaires *in vitro*, tandis que le blocage de la voie du TGF $\beta$  *in vivo* chez des souris âgées raccourcit spécifiquement la durée de la phase G<sub>1</sub> des CSN activées. Nous montrons également pour la première fois une augmentation de la transcription des gènes de cette voie dans les CSN activées dès 6 mois dans notre étude transcriptomique.

Alors que les CSN et les progéniteurs intermédiaires expriment tous deux les chaînes T $\beta$ RI et T $\beta$ RII nécessaires à la signalisation du TGF $\beta$ 1 (Moustakas and Heldin, 2009; Pineda et al., 2013), nous pouvons nous demander pourquoi le rallongement de la durée de la phase G<sub>1</sub> est spécifique aux CSN dans la ZSV adulte. Une des explications pourrait venir de l'organisation de la niche et de son interconnexion avec le système vasculaire. Nous avons déjà montré au sein du laboratoire que les cellules endothéliales sont responsables de l'augmentation en TGF $\beta$ 1 observée dans les ZSV de souris âgées de

12 et 24 mois (Pineda et al., 2013). Alors que l'on retrouve la grande majorité des CSN et des progéniteurs intermédiaires en prolifération à proximité directe des vaisseaux sanguins parcourant la niche, seules les CSN contactent directement les cellules endothéliales à l'aide de leurs longs prolongements apicaux à des endroits où la barrière hémato-encéphalique est particulièrement perméable (Tavazoie et al., 2008; Fuentealba et al., 2012). Ceci pourrait expliquer qu'une exposition *in vitro* au TGF $\beta$ 1 des progéniteurs intermédiaires rallonge la durée de leur phase G<sub>1</sub>, tandis qu'aucun effet n'est observé *in vivo* chez des souris de 12 mois en raison de l'absence de contact direct avec les cellules endothéliales produisant le TGF $\beta$ 1.



# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---

---



La stimulation du potentiel régénératif des CSN endogènes présentes dans les niches neurogéniques adultes pourrait constituer une stratégie thérapeutique particulièrement intéressante dans différentes pathologies du système nerveux central. Leur mise au point dépend d'une excellente compréhension des mécanismes régulant leur quiescence et leur prolifération. En effet, la majorité des CSN présentes dans le cerveau adulte chez l'Homme sont quiescentes mais conservent leur capacité à proliférer et à se différencier dans les principaux types de cellules neurales - neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Kukekov et al., 1999; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressée plus spécifiquement aux mécanismes de régulation de la quiescence et de la prolifération des CSN présentes dans la ZSV de la souris adulte. Bien que la neurogenèse sous-ventriculaire chez l'Homme reste marginale à l'âge adulte (Sanai et al., 2011; Bergmann et al., 2012; Wang et al., 2014), le modèle expérimental murin est pertinent pour étudier la régulation des CSN en conditions physiologiques et pathologiques. En effet, des CSN persistent le long des ventricules latéraux de la ZSV humaine adulte et sont mobilisables à la suite d'une lésion pour régénérer la zone touchée, par exemple à la suite d'une ischémie (Martí-Fabregas et al., 2010) similairement à ce qui est observé chez les rongeurs (Kernie and Parent, 2010). De plus, l'étude de la diminution de la neurogenèse de la ZSV au cours du vieillissement chez les rongeurs peut permettre de mieux comprendre les mécanismes responsables de la chute brutale de la neurogenèse chez le jeune enfant après 18 mois (Sanai et al., 2011; Wang et al., 2011).

Deux approches complémentaires ont été employées au cours de ce travail : 1) l'étude de la diminution de la neurogenèse au cours du vieillissement afin de mieux appréhender les facteurs essentiels au maintien d'une neurogenèse adulte, et 2) la caractérisation des mécanismes moléculaires associés à la balance quiescence-prolifération des CSN. Deux publications récentes illustrent parfaitement comment l'étude du vieillissement des niches neurogéniques peut permettre d'identifier de nouveaux régulateurs de la prolifération des CSN adultes. Partant de l'observation que l'exposition d'une vieille souris au LCR ou à l'environnement vasculaire d'une jeune souris rétablissait la neurogenèse à un niveau similaire au jeune adulte et/ou augmentait la prolifération des CSN, deux groupes ont cherché à caractériser les facteurs

responsables via la comparaison de leur protéome entre le jeune adulte et la souris âgée (Katsimpardi et al., 2014; Silva-Vargas et al., 2016). Ces travaux ont permis d'identifier le *growth differentiation factor 11* (GDF11), la BMP5 et l'IGF1 comme nouveaux régulateurs clés de la neurogenèse adulte et de la prolifération des CSN adultes. Par ailleurs, il serait intéressant de tester les candidats qui participent à la sortie de quiescence des CSN pour regarder s'il est possible de restaurer la prolifération des CSN chez des souris âgées et ainsi rétablir la neurogenèse à un niveau similaire aux jeunes adultes.

Parmi les défis actuels reste la mise en culture des CSN quiescentes. En effet, elles ne forment que très rarement des neurosphères ou des colonies adhérentes *ex vivo*. Pour l'heure, seule l'équipe de Fiona Doetsch a réussi à faire proliférer les CSN quiescentes *ex vivo* mais avec un rendement extrêmement faible puisque moins de 1% des cellules forment des colonies au bout de 2 semaines (Codega et al., 2014). Deux hypothèses expliqueraient la difficulté de mettre en culture les CSN quiescentes : d'une part, un verrou moléculaire qui pourrait être éventuellement levé par son identification à l'aide des approches développées ci-dessous, et d'autre part, la persistance d'une trop grande hétérogénéité cellulaire dans les populations triées. Nous avons montré que les cellules LeX<sup>bright</sup> constituent une population hétérogène au regard de leur répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire. En effet, l'utilisation de souris FUCCI-Rouge (Sakaue-Sawano et al., 2008) nous a permis de mettre en évidence qu'environ 30% d'entre elles sont en phase G<sub>1</sub> et 70% hors du cycle cellulaire. Partant de l'hypothèse que les cellules LeX<sup>bright</sup> en phase G<sub>1</sub> seraient les CSN quiescentes les plus susceptibles d'entrer en cycle *ex vivo*, il serait intéressant de trier cette sous-population et d'étudier leur potentiel clonogénique.

Afin d'identifier de nouveaux régulateurs de la balance entre quiescence et prolifération des CSN adultes qui pourraient être utilisés pour activer les CSN quiescentes, nous avons réalisé une étude comparative du transcriptome des CSN quiescentes (LeX<sup>bright</sup>) et des CSN activées (LeX<sup>+EGFR<sup>+</sup></sup>) isolées à partir de ZSV issues de jeunes souris adultes. Nous mettons en évidence que l'état de quiescence est régulé par le microenvironnement grâce aux nombreux récepteurs membranaires portés par les CSN quiescentes et via des molécules d'adhésion qui leur permettent d'interagir avec les cellules environnantes de la niche. Parmi les récepteurs différentiellement exprimés

entre les cellules LeX<sup>bright</sup> et LeX<sup>+</sup>EGFR<sup>+</sup>, nous avons identifié les membres de la famille des syndécans comme marqueurs et potentiels régulateurs des états de quiescence et de prolifération des CSN adultes. De manière intéressante, les syndécans sont capables de recruter à la surface cellulaire des facteurs de croissance connus pour moduler la prolifération des précurseurs neuronaux (Kwon et al., 2012). Le sdc1 apparaît comme le candidat le plus prometteur pour réguler la prolifération des CSN adultes. En effet, nous montrons qu'il n'est pas exprimé par les CSN quiescentes mais est présent sur toutes les populations de la progénie neurale qui prolifèrent au niveau de la ZSV. Par ailleurs, l'inhibition de son expression au cours du développement cortical diminue fortement le maintien et la prolifération des CSN et progéniteurs neuronaux (Wang et al., 2012). Il serait intéressant de caractériser plus en détail son rôle dans la neurogenèse adulte en étudiant l'effet d'un plasmide shRNA réduisant l'expression du sdc1 dans des cultures de neurosphères. Il faudrait également étudier l'effet de la surexpression du sdc1 *in vivo* sur la prolifération des populations cellulaires neurogéniques de la ZSV, et plus particulièrement des cellules LeX<sup>bright</sup>. A l'inverse, les sdc2 et sdc4 pourraient être impliqués dans le maintien en quiescence des CSN. Nous pourrions étudier si l'inhibition de leur signalisation à l'aide d'anticorps bloquants ou de shRNA entraîne l'entrée en cycle des cellules LeX<sup>bright</sup>.

Dans le but de mettre à jour d'autres verrous moléculaires régulant la sortie de quiescence des CSN adultes, il serait intéressant de s'appuyer sur un modèle expérimental qui permet d'activer les CSN quiescentes *in vivo*, à savoir la recolonisation de la ZSV après injection dans le ventricule latéral de l'agent anti-mitotique Ara-C ou après irradiation (Daynac et al., 2013). De manière intéressante, bien que les CSN quiescentes entrent rapidement en prolifération pour régénérer la niche endommagée *in vivo*, les CSN quiescentes irradiées ou exposées à l'Ara-C ne montrent pas d'augmentation de leur capacité à proliférer *in vitro* (Codega et al., 2014). Cette observation suggère que des facteurs en provenance de la niche sont nécessaires à leur entrée en cycle. Le système vasculaire et le LCR sécrété par le plexus choroïde ont tous deux déjà été impliqués dans la régulation de la prolifération des CSN adultes en conditions physiologiques (Silva-Vargas et al., 2016). Nous pourrions mettre en place des co-cultures de cellules endothéliales irradiées et de cellules LeX<sup>bright</sup>, ou bien préparer un milieu conditionné à partir des cellules endothéliales avant et après irradiation dans

lequel les cellules LeX<sup>bright</sup> seraient mises en culture. De la même manière, le LCR pourrait être prélevé sur des souris irradiées, ou un milieu conditionné pourrait être préparé à partir du plexus choroïde. Dans le cas où ces systèmes permettraient l'entrée en cycle des cellules LeX<sup>bright</sup>, la composition protéique du milieu conditionné pourra être comparée avant et après irradiation afin d'identifier de potentiels régulateurs de la sortie de quiescence des CSN.

L'étude de l'évolution avec l'âge de la ZSV nous a permis de montrer une diminution spécifique de la prolifération des CSN activées associée à une dérégulation de la machinerie du cycle cellulaire. Ainsi, les CSN activées acquièrent progressivement un phénotype quiescent avec l'allongement de la phase G<sub>1</sub> dès 6 mois, médié par une augmentation du TGF $\beta$ 1, puis la diminution de leur clonogénicité à partir de 12 mois. De manière importante, ce changement intervient alors que le nombre de CSN reste inchangé. Nos résultats montrent que malgré la diminution de la neurogenèse au cours du temps, les CSN endogènes encore présentes peuvent servir de cibles thérapeutiques pour restaurer la production de progéniteurs neuraux et ainsi palier à la baisse de production de nouveaux neurones. Nous pourrions tester les candidats qui participent à la régulation de la balance entre quiescence et prolifération des CSN, par exemple le sdc1, sur des souris âgées pour évaluer s'il est possible de restaurer la prolifération des CSN activées et ainsi rétablir la neurogenèse à un niveau similaire aux jeunes adultes. Une telle mobilisation des CSN est également envisageable chez l'Homme puisque les CSN conservent leur capacité à proliférer et à se différencier même chez des personnes très âgées et atteintes de maladies neurodégénératives (van den Berge et al., 2010).

Pris dans leur ensemble, nos résultats montrent que de nombreux mécanismes et voies de signalisation sont impliqués, d'une part, dans la régulation de l'entrée en cycle des CSN quiescentes, et d'autre part, dans le maintien de la prolifération des CSN au cours du vieillissement. Dans le cadre d'une stratégie thérapeutique, il serait intéressant de cibler simultanément les facteurs inhibiteurs apparaissant au cours du vieillissement dans les niches neurogéniques et les facteurs stimulant l'entrée dans le cycle des CSN quiescentes. Il faudra alors s'assurer que l'activation des CSN ne perturbe pas leur capacité à s'autorenouveler pour éviter de provoquer un épuisement précoce de leur stock et ne modifie pas leur capacité à se différencier dans les trois lignages neuraux.

## Bibliographie

- Aberg MA, Aberg ND, Hedbäcker H, Oscarsson J, Eriksson PS (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:2896-2903.
- Aberg MA, Aberg ND, Palmer TD, Alborn AM, Carlsson-Skwirut C, Bang P, Rosengren LE, Olsson T, Gage FH, Eriksson PS (2003) IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Molecular and cellular neurosciences* 24:23-40.
- Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, Rakic P (2011) Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nature reviews Neuroscience* 12:269-283.
- Ables JL, Decarolis NA, Johnson MA, Rivera PD, Gao Z, Cooper DC, Radtke F, Hsieh J, Eisch AJ (2010) Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:10484-10492.
- Achanta P, Capilla-Gonzalez V, Purger D, Reyes J, Sailor K, Song H, Garcia-Verdugo JM, Gonzalez-Perez O, Ford E, Quinones-Hinojosa A (2012) Subventricular zone localized irradiation affects the generation of proliferating neural precursor cells and the migration of neuroblasts. *Stem cells* 30:2548-2560.
- Agostini M, Tucci P, Chen H, Knight RA, Bano D, Nicotera P, McKeon F, Melino G (2010) p73 regulates maintenance of neural stem cell. *Biochemical and biophysical research communications* 403:13-17.
- Aguirre AA, 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. *The Journal of cell biology* 165:575-589.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:4408-4419.
- Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH (2014) Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological reviews* 94:991-1026.
- Allen E (1912) The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *Journal of Comparative Neurology* 22:547-568.
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127-1128.
- Altman J (1963) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *The Anatomical record* 145:573-591.
- Altman J (1969) 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. *The Journal of comparative neurology* 137:433-457.
- Altman J, Das GD (1965a) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology* 124:319-335.
- Altman J, Das GD (1965b) Post-natal origin of microneurones in the rat brain. *Nature* 207:953-956.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature reviews Neuroscience* 2:287-293.

- Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT (2008) The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 73:357-365.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in brain research* 163:3-22.
- Amiri A, Cho W, Zhou J, Birnbaum SG, Sinton CM, McKay RM, Parada LF (2012) Pten deletion in adult hippocampal neural stem/progenitor cells causes cellular abnormalities and alters neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:5880-5890.
- Andreu-Agullo C, Morante-Redolat JM, Delgado AC, Farinas I (2009) Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nature neuroscience* 12:1514-1523.
- Andreu Z, Khan MA, Gonzalez-Gomez P, Negueruela S, Hortiguela R, San Emeterio J, Ferron SR, Martinez G, Vidal A, Farinas I, Lie DC, Mira H (2015) The cyclin-dependent kinase inhibitor p27 kip1 regulates radial stem cell quiescence and neurogenesis in the adult hippocampus. *Stem cells* 33:219-229.
- Angevine JB, Jr., Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192:766-768.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature medicine* 8:963-970.
- Azim K, Fischer B, Hurtado-Chong A, Draganova K, Cantu C, Zemke M, Sommer L, Butt A, Raineteau O (2014) Persistent Wnt/beta-catenin signaling determines dorsalization of the postnatal subventricular zone and neural stem cell specification into oligodendrocytes and glutamatergic neurons. *Stem cells* 32:1301-1312.
- Azim K, Hurtado-Chong A, Fischer B, Kumar N, Zweifel S, Taylor V, Raineteau O (2015) Transcriptional Hallmarks of Heterogeneous Neural Stem Cell Niches of the Subventricular Zone. *Stem cells* 33:2232-2242.
- Balordi F, Fishell G (2007) Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:5936-5947.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A (2004) Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29:450-460.
- Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moyse E (2005) In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130:75-90.
- Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH (2015) Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7:a020362.
- Beckervordersandforth R, Tripathi P, Ninkovic J, Bayam E, Lepier A, Stempfhuber B, Kirchhoff F, Hirrlinger J, Haslinger A, Lie DC, Beckers J, Yoder B, Irmler M, Gotz M (2010) In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell stem cell* 7:744-758.
- Bedard A, Cossette M, Levesque M, Parent A (2002) Proliferating cells can differentiate into neurons in the striatum of normal adult monkey. *Neuroscience letters* 328:213-216.

- Ben Abdallah NM, Slomianka L, Vyssotski AL, Lipp HP (2010) Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiology of aging* 31:151-161.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes & development* 23:781-783.
- Bergmann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MS, Steier P, Kutschera W, Johnson L, Landen M, Druid H, Spalding KL, Frisen J (2012) The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74:634-639.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A (2002) Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:11464-11469.
- Berry M, Rogers AW (1965) The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *Journal of anatomy* 99:691-709.
- Bonaguidi MA, McGuire T, Hu M, Kan L, Samanta J, Kessler JA (2005) LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development* 132:5503-5514.
- Bonfanti L, Peretto P (2007) Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Progress in neurobiology* 83:24-36.
- Borghese L, Dolezalova D, Opitz T, Haupt S, Leinhaas A, Steinfartz B, Koch P, Edenhofer F, Hampl A, Brustle O (2010) Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo. *Stem cells* 28:955-964.
- Bouab M, Palouras GN, Aumont A, Forest-Berard K, Fernandes KJ (2011) Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* 173:135-149.
- Bowman AN, van Amerongen R, Palmer TD, Nusse R (2013) Lineage tracing with Axin2 reveals distinct developmental and adult populations of Wnt/beta-catenin-responsive neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:7324-7329.
- Bracko O, Singer T, Aigner S, Knobloch M, Winner B, Ray J, Clemenson GD, Jr., Suh H, Couillard-Despres S, Aigner L, Gage FH, Jessberger S (2012) Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:3376-3387.
- Braun KM, Niemann C, Jensen UB, Sundberg JP, Silva-Vargas V, Watt FM (2003) Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development* 130:5241-5255.
- Brezun JM, Daszuta A (1999) Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89:999-1002.
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* 467:1-10.
- Bruggeman SW, Valk-Lingbeek ME, van der Stoop PP, Jacobs JJ, Kieboom K, Tanger E, Hulsmans D, Leung C, Arsenijevic Y, Marino S, van Lohuizen M (2005) Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes & development* 19:1438-1443.

- Brus M, Meurisse M, Gheusi G, Keller M, Lledo PM, Levy F (2013) Dynamics of olfactory and hippocampal neurogenesis in adult sheep. *The Journal of comparative neurology* 521:169-188.
- Buckwalter MS, Yamane M, Coleman BS, Ormerod BK, Chin JT, Palmer T, Wyss-Coray T (2006) Chronically increased transforming growth factor-beta1 strongly inhibits hippocampal neurogenesis in aged mice. *The American journal of pathology* 169:154-164.
- Buczacki SJ, Zecchini HI, Nicholson AM, Russell R, Vermeulen L, Kemp R, Winton DJ (2013) Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* 495:65-69.
- Calabrese P, Schlegel U (2009) Neurotoxicity of treatment. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 171:165-174.
- Calaora V, Chazal G, Nielsen PJ, Rougon G, Moreau H (1996) mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience* 73:581-594.
- Calvo CF, Fontaine RH, Soueid J, Tammela T, Makinen T, Alfaro-Cervello C, Bonnaud F, Miguez A, Benhaim L, Xu Y, Barallobre MJ, Moutkine I, Lyttikka J, Tatlisumak T, Pytowski B, Zalc B, Richardson W, Kessaris N, Garcia-Verdugo JM, Alitalo K, Eichmann A, Thomas JL (2011) Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis. *Genes & development* 25:831-844.
- Calzolari F, Michel J, Baumgart EV, Theis F, Gotz M, Ninkovic J (2015) Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone. *Nature neuroscience* 18:490-492.
- Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 435:406-417.
- Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM (2004) Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *The American journal of psychiatry* 161:598-607.
- Campisi J (2013) Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology* 75:685-705.
- Cancino GI, Yiu AP, Fatt MP, Dugani CB, Flores ER, Frankland PW, Josselyn SA, Miller FD, Kaplan DR (2013) p63 Regulates adult neural precursor and newly born neuron survival to control hippocampal-dependent Behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:12569-12585.
- Capela A, Temple S (2002) LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35:865-875.
- Capilla-Gonzalez V, Cebrian-Silla A, Guerrero-Cazares H, Garcia-Verdugo JM, Quinones-Hinojosa A (2014) Age-related changes in astrocytic and ependymal cells of the subventricular zone. *Glia* 62:790-803.
- Capilla-Gonzalez V, Herranz-Perez V, Garcia-Verdugo JM (2015) The aged brain: genesis and fate of residual progenitor cells in the subventricular zone. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:365.
- Chadashvili T, Peterson DA (2006) Cytoarchitecture of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR-2) immunoreactivity in astrocytes of neurogenic and non-neurogenic regions of the young adult and aged rat brain. *The Journal of comparative neurology* 498:1-15.

- Chambers CB, Peng Y, Nguyen H, Gaiano N, Fishell G, Nye JS (2001) Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development* 128:689-702.
- Chebib M, Johnston GA (1999) The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 26:937-940.
- Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT (2000) Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287:1804-1808.
- Cheung TH, Rando TA (2013) Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature reviews Molecular cell biology* 14:329-340.
- Chumley MJ, Catchpole T, Silvany RE, Kernie SG, Henkemeyer M (2007) EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:13481-13490.
- Ciccolini F, Mandl C, Holzl-Wenig G, Kehlenbach A, Hellwig A (2005) Prospective isolation of late development multipotent precursors whose migration is promoted by EGFR. *Developmental biology* 284:112-125.
- Clemenson GD, Deng W, Gage FH (2015) Environmental enrichment and neurogenesis: from mice to humans. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 4: 56–62.
- Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, Deleo AM, Pastrana E, Doetsch F (2014) Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their *in vivo* niche. *Neuron* 82:545-559.
- Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A (2000) Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nature neuroscience* 3:1091-1097.
- Conover JC, Shook BA (2011) Aging of the subventricular zone neural stem cell niche. *Aging and disease* 2:49-63.
- Corotto FS, Henegar JR, Maruniak JA (1994) Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 61:739-744.
- Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Locatelli F, Papadimitriou D, Salani S, Del Bo R, Ghezzi S, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP (2007) Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Experimental neurology* 205:547-562.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *The European journal of neuroscience* 21:1-14.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:2649-2658.
- Culican SM, Baumrind NL, Yamamoto M, Pearlman AL (1990) Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10:684-692.

- Cunningham JJ, Roussel MF (2001) Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 12:387-396.
- Curtis MA, Penney EB, Pearson J, Dragunow M, Connor B, Faull RL (2005) The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington's disease human brain. *Neuroscience* 132:777-788.
- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E (2001) Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:12796-12801.
- Daignan-Fornier B, Sagot I (2011) Proliferation/Quiescence: When to start? Where to stop? What to stock? *Cell division* 6:20.
- Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA (2005) New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *The Journal of cell biology* 168:415-427.
- Daynac M, Chicheportiche A, Pineda JR, Gauthier LR, Boussin FD, Mouthon MA (2013) Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. *Stem cell research* 11:516-528.
- Daynac M, Tirou L, Faure H, Mouthon MA, Gauthier LR, Hahn H, Boussin FD, Ruat M (2016) Hedgehog Controls Quiescence and Activation of Neural Stem Cells in the Adult Ventricular-Subventricular Zone. *Stem cell reports*.
- Didier M, Harandi M, Aguera M, Bancel B, Tardy M, Fages C, Calas A, Stagaard M, Mollgard K, Belin MF (1986) Differential immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic (GFA) protein, S-100 protein and glutamine synthetase in the rat subcommissural organ, nonspecialized ventricular ependyma and adjacent neuropil. *Cell and tissue research* 245:343-351.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999a) 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999b) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:11619-11624.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.
- Douet V, Arikawa-Hirasawa E, Mercier F (2012) Fractone-heparan sulfates mediate BMP-7 inhibition of cell proliferation in the adult subventricular zone. *Neuroscience letters* 528:120-125.
- Douet V, Kerever A, Arikawa-Hirasawa E, Mercier F (2013) Fractone-heparan sulphates mediate FGF-2 stimulation of cell proliferation in the adult subventricular zone. *Cell proliferation* 46:137-145.
- Ehm O, Goritz C, Covic M, Schaffner I, Schwarz TJ, Karaca E, Kempkes B, Kremmer E, Pfrieger FW, Espinosa L, Bigas A, Giachino C, Taylor V, Frisen J, Lie DC (2010) RBPJkappa-

dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:13794-13807.

Eisch AJ, Petrik D (2012) Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science* 338:72-75.

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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:8354-8365.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* 4:1313-1317.

Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisen J (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156:1072-1083.

Ernst A, Frisen J (2015) Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals. *PLoS biology* 13:e1002045.

Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:10074-10086.

Fabel K, Wolf SA, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Kempermann G (2009) Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Frontiers in neuroscience* 3:50.

Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadi M, Twardzik D, Patel S, Loughlin S (2000) In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:14686-14691.

Feierstein CE, Lazarini F, Wagner S, Gabellec MM, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Boussin FD, Lledo PM, Gheusi G (2010) Disruption of Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb Affects Social Interaction but not Maternal Behavior. *Frontiers in behavioral neuroscience* 4:176.

Ferent J, Cochard L, Faure H, Taddei M, Hahn H, Ruat M, Traiffort E (2014) Genetic activation of Hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions. *Stem cell reports* 3:312-323.

Fernando RN, Eleuteri B, Abdelhady S, Nussenzweig A, Andang M, Ernfors P (2011) Cell cycle restriction by histone H2AX limits proliferation of adult neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:5837-5842.

Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S, Nicolis SK (2004) Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131:3805-3819.

Fiorelli R, Azim K, Fischer B, Raineteau O (2015) Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis. *Development* 142:2109-2120.

Font E, Desfilis E, Perez-Canellas MM, Garcia-Verdugo JM (2001) Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain, behavior and evolution* 58:276-295.

Fontan-Lozano A, Saez-Cassanelli JL, Inda MC, de los Santos-Arteaga M, Sierra-Dominguez SA, Lopez-Lluch G, Delgado-Garcia JM, Carrion AM (2007) Caloric restriction increases

- learning consolidation and facilitates synaptic plasticity through mechanisms dependent on NR2B subunits of the NMDA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:10185-10195.
- Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A (2012) Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell stem cell* 10:698-708.
- Fuentealba LC, Rompani SB, Parraguez JI, Obernier K, Romero R, Cepko CL, Alvarez-Buylla A (2015) Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161:1644-1655.
- Fukada S, Uezumi A, Ikemoto M, Masuda S, Segawa M, Tanimura N, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S (2007) Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem cells* 25:2448-2459.
- Furutachi S, Miya H, Watanabe T, Kawai H, Yamasaki N, Harada Y, Imayoshi I, Nelson M, Nakayama KI, Hirabayashi Y, Gotoh Y (2015) Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nature neuroscience* 18:657-665.
- Gadisseux JF, Evrard P, Misson JP, Caviness VS (1989) Dynamic structure of the radial glial fiber system of the developing murine cerebral wall. An immunocytochemical analysis. *Brain research Developmental brain research* 50:55-67.
- Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J (1995) Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:11879-11883.
- Gaiano N, Nye JS, Fishell G (2000) Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26:395-404.
- Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P (2014) Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et biophysica acta* 1840:2506-2519.
- Ge S, Sailor KA, Ming GL, Song H (2008) Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *The Journal of physiology* 586:3759-3765.
- Giachino C, Taylor V (2009) Lineage analysis of quiescent regenerative stem cells in the adult brain by genetic labelling reveals spatially restricted neurogenic niches in the olfactory bulb. *The European journal of neuroscience* 30:9-24.
- Gil-Perotin S, Marin-Husstege M, Li J, Soriano-Navarro M, Zindy F, Roussel MF, Garcia-Verdugo JM, Casaccia-Bonelli P (2006) Loss of p53 induces changes in the behavior of subventricular zone cells: implication for the genesis of glial tumors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:1107-1116.
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:2390-2394.
- Gonzales-Roybal G, Lim DA (2013) Chromatin-based epigenetics of adult subventricular zone neural stem cells. *Frontiers in genetics* 4:194.
- Gould E (2007) How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature reviews Neuroscience* 8:481-488.
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E (1999) Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:5263-5267.
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L (2003) SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39:749-765.
- Greer EL, Brunet A (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24:7410-7425.

- Gregorian C, Nakashima J, Le Belle J, Ohab J, Kim R, Liu A, Smith KB, Groszer M, Garcia AD, Sofroniew MV, Carmichael ST, Kornblum HI, Liu X, Wu H (2009) Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:1874-1886.
- Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Dougherty JD, Le Belle J, Zack JA, Geschwind DH, Liu X, Kornblum HI, Wu H (2006) PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:111-116.
- Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, Kornblum HI, Liu X, Wu H (2001) Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* 294:2186-2189.
- Han J, Calvo CF, Kang TH, Baker KL, Park JH, Parras C, Levittas M, Birba U, Pibouin-Fragner L, Fragner P, Bilguvar K, Duman RS, Nurmi H, Alitalo K, Eichmann AC, Thomas JL (2015) Vascular endothelial growth factor receptor 3 controls neural stem cell activation in mice and humans. *Cell reports* 10:1158-1172.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Developmental biology* 229:15-30.
- Hastings NB, Gould E (1999) Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *The Journal of comparative neurology* 413:146-154.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3196-3201.
- He S, Nakada D, Morrison SJ (2009) Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual review of cell and developmental biology* 25:377-406.
- Hodge RD, Garcia AJ, 3rd, Elsen GE, Nelson BR, Mussar KE, Reiner SL, Ramirez JM, Hevner RF (2013) Tbr2 expression in Cajal-Retzius cells and intermediate neuronal progenitors is required for morphogenesis of the dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:4165-4180.
- Holmberg J, Armulik A, Senti KA, Edoff K, Spalding K, Momma S, Cassidy R, Flanagan JG, Frisen J (2005) Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes & development* 19:462-471.
- Hopewell JW, Cavanagh JB (1972) Effects of X irradiation on the mitotic activity of the subependymal plate of rats. *The British journal of radiology* 45:461-465.
- Hsieh J, Gage FH (2004) Epigenetic control of neural stem cell fate. *Current opinion in genetics & development* 14:461-469.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R (2010) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:3489-3498.
- Ishibashi M, Moriyoshi K, Sasai Y, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R (1994) Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *The EMBO journal* 13:1799-1805.
- Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR (2002) A stem cell molecular signature. *Science* 298:601-604.
- Jessberger S, Gage FH (2008) Stem-cell-associated structural and functional plasticity in the aging hippocampus. *Psychology and aging* 23:684-691.

- Jiao J, Chen DF (2008) Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. *Stem cells* 26:1221-1230.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:4710-4715.
- Jin K, Sun Y, Xie L, Batteur S, Mao XO, Smelick C, Logvinova A, Greenberg DA (2003) Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging cell* 2:175-183.
- Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg DA (2006) Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:13198-13202.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:11946-11950.
- Kaplan MS, Bell DH (1984) Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4:1429-1441.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Karpowicz P, Willaime-Morawek S, Balenci L, DeVeale B, Inoue T, van der Kooy D (2009) E-Cadherin regulates neural stem cell self-renewal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:3885-3896.
- Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, Miller CM, Loffredo FS, Wojtkiewicz GR, Chen JW, Lee RT, Wagers AJ, Rubin LL (2014) Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science* 344:630-634.
- Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, Takashita N, Murayama A, Akamatsu W, Ogawa M, Okabe M, Tano Y, Goldman SA, Okano H (2001) Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Molecular and cellular neurosciences* 17:259-273.
- Kawaguchi D, Furutachi S, Kawai H, Hozumi K, Gotoh Y (2013) DII1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nature communications* 4:1880.
- Kelsch W, Mosley CP, Lin CW, Lois C (2007) Distinct mammalian precursors are committed to generate neurons with defined dendritic projection patterns. *PLoS biology* 5:e300.
- Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002) Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Annals of neurology* 52:135-143.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391-399.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kerever A, Schnack J, Vellinga D, Ichikawa N, Moon C, Arikawa-Hirasawa E, Efird JT, Mercier F (2007) Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the

- neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem cells* 25:2146-2157.
- Kernie SG, Parent JM (2010) Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiology of disease* 37:267-274.
- Khodosevich K, Watanabe Y, Monyer H (2011) EphA4 preserves postnatal and adult neural stem cells in an undifferentiated state in vivo. *Journal of cell science* 124:1268-1279.
- Kim WY, Sharpless NE (2006) The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127:265-275.
- Kim Y, Wang WZ, Comte I, Pastrana E, Tran PB, Brown J, Miller RJ, Doetsch F, Molnar Z, Szele FG (2010) Dopamine stimulation of postnatal murine subventricular zone neurogenesis via the D3 receptor. *Journal of neurochemistry* 114:750-760.
- Kingsley DM (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & development* 8:133-146.
- Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D (2005) p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes & development* 19:756-767.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310:679-683.
- Kokovay E, Wang Y, Kusek G, Wurster R, Lederman P, Lowry N, Shen Q, Temple S (2012) VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell stem cell* 11:220-230.
- Kornack DR, Rakic P (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:5768-5773.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* 32:149-184.
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G (2003) Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *The Journal of comparative neurology* 467:455-463.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:2027-2033.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:5820-5829.
- Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA (1999) Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Experimental neurology* 156:333-344.
- Kwon MJ, Jang B, Yi JY, Han IO, Oh ES (2012) Syndecans play dual roles as cell adhesion receptors and docking receptors. *FEBS letters* 586:2207-2211.
- Lawrence YR, Li XA, el Naqa I, Hahn CA, Marks LB, Merchant TE, Dicker AP (2010) Radiation dose-volume effects in the brain. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 76:S20-27.

- Lazarini F, Lledo PM (2011) Is adult neurogenesis essential for olfaction? Trends in neurosciences 34:20-30.
- Lazarini F, Mounthon MA, Gheusi G, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Lamarque S, Abrous DN, Boussin FD, Lledo PM (2009) Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. PLoS one 4:e7017.
- Lee KJ, Jessell TM (1999) The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. Annual review of neuroscience 22:261-294.
- Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, Maynard T, Gonzalez D, Kim S, Ye P, D'Ercole AJ, Wong ET, LaMantia AS, Walsh CA (2011) The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. Neuron 69:893-905.
- Leonard BW, Mastroeni D, Grover A, Liu Q, Yang K, Gao M, Wu J, Pootrakul D, van den Berg SA, Hol EM, Rogers J (2009) Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. The Journal of comparative neurology 515:269-294.
- Li G, Fang L, Fernandez G, Pleasure SJ (2013) The ventral hippocampus is the embryonic origin for adult neural stem cells in the dentate gyrus. Neuron 78:658-672.
- Li L, Clevers H (2010) Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. Science 327:542-545.
- Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, Lynch CD, Sonntag WE, Riddle DR (2001) Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. Neuroscience 107:603-613.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A (2014) Adult neural stem cells stake their ground. Trends in neurosciences 37:563-571.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A (2016) The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in biology 8.
- 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.
- Liu C, Teng ZQ, Santistevan NJ, Szulwach KE, Guo W, Jin P, Zhao X (2010) Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. Cell stem cell 6:433-444.
- Liu HK, Belz T, Bock D, Takacs A, Wu H, Lichter P, Chai M, Schutz G (2008) The nuclear receptor tailless is required for neurogenesis in the adult subventricular zone. Genes & development 22:2473-2478.
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR (1998) Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 18:7768-7778.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. Nature neuroscience 8:1179-1187.
- Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Baser A, Saiz-Castro G, Zwadlo K, Martin-Villalba A (2015) Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. Cell stem cell 17:329-340.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90:2074-2077.

- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- Lopez-Juarez A, Howard J, Ullom K, Howard L, Grande A, Pardo A, Waclaw R, Sun YY, Yang D, Kuan CY, Campbell K, Nakafuku M (2013) Gsx2 controls region-specific activation of neural stem cells and injury-induced neurogenesis in the adult subventricular zone. *Genes & development* 27:1272-1287.
- 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, Lennington 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:3804-3813.
- Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.
- Macas J, Nern C, Plate KH, Momma S (2006) Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:13114-13119.
- Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G (2003) Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39:937-950.
- Mak GK, Enwere EK, 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. *Nature neuroscience* 10:1003-1011.
- Mak GK, Weiss S (2010) Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons. *Nature neuroscience* 13:753-758.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:9104-9110.
- Manev H, Uz T, Smalheiser NR, Manev R (2001) Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. *European journal of pharmacology* 411:67-70.
- Marazziti D, Baroni S, Catena-Dell'Osso M, Schiavi E, Ceresoli D, Conversano C, Dell'Osso L, Picano E (2012) Cognitive, psychological and psychiatric effects of ionizing radiation exposure. *Current medicinal chemistry* 19:1864-1869.
- Marti-Fabregas J, Romaguera-Ros M, Gomez-Pinedo U, Martinez-Ramirez S, Jimenez-Xarrie E, Marin R, Marti-Vilalta JL, Garcia-Verdugo JM (2010) Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke. *Neurology* 74:357-365.
- Martynoga B, Drechsel D, Guillemot F (2012) Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Martynoga B, Mateo JL, Zhou B, Andersen J, Achimastou A, Urban N, van den Berg D, Georgopoulou D, Hadjur S, Wittbrodt J, Ettwiller L, Piper M, Gronostajski RM,

- Guillemot F (2013) Epigenomic enhancer annotation reveals a key role for NFIX in neural stem cell quiescence. *Genes & development* 27:1769-1786.
- Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC (2004) Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:1726-1733.
- Mathieu C, Sii-Felice K, Fouchet P, Etienne O, Hatton C, Mabondzo A, Boussin FD, Mouthon MA (2008) Endothelial cell-derived bone morphogenetic proteins control proliferation of neural stem/progenitor cells. *Molecular and cellular neurosciences* 38:569-577.
- McDonald HY, Wojtowicz JM (2005) Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience letters* 385:70-75.
- Meletis K, Wirta V, Hede SM, Nister M, Lundeberg J, Frisen J (2006) p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development* 133:363-369.
- Mercier F (2016) Fractones: extracellular matrix niche controlling stem cell fate and growth factor activity in the brain in health and disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Mercier F, Douet V (2014) Bone morphogenetic protein-4 inhibits adult neurogenesis and is regulated by fractone-associated heparan sulfates in the subventricular zone. *Journal of chemical neuroanatomy* 57-58:54-61.
- Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI (2002) Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *The Journal of comparative neurology* 451:170-188.
- Merkle FT, Fuentealba LC, Sanders TA, Magno L, Kessaris N, Alvarez-Buylla A (2014) Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nature neuroscience* 17:207-214.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A (2007) Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317:381-384.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:17528-17532.
- Mich JK, Signer RA, Nakada D, Pineda A, Burgess RJ, Vue TY, Johnson JE, Morrison SJ (2014) Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *eLife* 3:e02669.
- Migaud M, Batailler M, Segura S, Duittoz A, Franceschini I, Pillon D (2010) Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *The European journal of neuroscience* 32:2042-2052.
- Milward EA, Lundberg CG, Ge B, Lipsitz D, Zhao M, Duncan ID (1997) Isolation and transplantation of multipotential populations of epidermal growth factor-responsive, neural progenitor cells from the canine brain. *Journal of neuroscience research* 50:862-871.
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual review of neuroscience* 28:223-250.
- Ming GL, Song H (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70:687-702.

- Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortiguela R, Marques-Torrejon MA, Nakashima K, Colak D, Gotz M, Farinas I, Gage FH (2010) Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell stem cell* 7:78-89.
- 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.
- Mizumatsu S, Monje ML, Morhardt DR, Rola R, Palmer TD, Fike JR (2003) Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer research* 63:4021-4027.
- Moffat SD, Zonderman AB, Resnick SM (2001) Age differences in spatial memory in a virtual environment navigation task. *Neurobiology of aging* 22:787-796.
- Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardal R (2005) Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes & development* 19:1432-1437.
- Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ (2003) Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425:962-967.
- Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Morrison SJ (2006) Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 443:448-452.
- Mori T, Tanaka K, Buffo A, Wurst W, Kuhn R, Gotz M (2006) Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* 54:21-34.
- Morrison SJ, Spradling AC (2008) Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132:598-611.
- 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.
- Moustakas A, Heldin CH (2009) The regulation of TGF $\beta$  signal transduction. *Development* 136:3699-3714.
- Murao N, Noguchi H, Nakashima K (2016) Epigenetic regulation of neural stem cell property from embryo to adult. *Neuroepigenetics* 5: 1–10.
- Nagato M, Heike T, Kato T, Yamanaka Y, Yoshimoto M, Shimazaki T, Okano H, Nakahata T (2005) Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using a combination of surface markers. *Journal of neuroscience research* 80:456-466.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-441.
- Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ (2008) Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135:227-239.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* 7:136-144.

- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Kriegstein AR (2007) Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. *Archives of neurology* 64:639-642.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Kriegstein AR (2008) Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* 508:28-44.
- Nottebohm F (1981) A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. *Science* 214:1368-1370.
- Nyfeler Y, Kirch RD, Mantei N, Leone DP, Radtke F, Suter U, Taylor V (2005) Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal. *The EMBO journal* 24:3504-3515.
- Ohtsuka T, Sakamoto M, Guillemot F, Kageyama R (2001) Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. *The Journal of biological chemistry* 276:30467-30474.
- Olariu A, Cleaver KM, Cameron HA (2007) Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle. *The Journal of comparative neurology* 501:659-667.
- Ortega F, Gascon S, Masserdotti G, Deshpande A, Simon C, Fischer J, Dimou L, Chichung Lie D, Schroeder T, Berninger B (2013) Oligodendroglionic and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nature cell biology* 15:602-613.
- Ottone C, Krusche B, Whitby A, Clements M, Quadrato G, Pitulescu ME, Adams RH, Parrinello S (2014) Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nature cell biology* 16:1045-1056.
- Paez-Gonzalez P, Asrican B, Rodriguez E, Kuo CT (2014) Identification of distinct ChAT(+) neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis. *Nature neuroscience* 17:934-942.
- Paik JH, Ding Z, Narurkar R, Ramkissoon S, Muller F, Kamoun WS, Chae SS, Zheng H, Ying H, Mahoney J, Hiller D, Jiang S, Protopopov A, Wong WH, Chin L, Ligon KL, DePinho RA (2009) FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. *Cell stem cell* 5:540-553.
- Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH (2001) Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 411:42-43.
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1997) The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Molecular and cellular neurosciences* 8:389-404.
- Panagiotakos G, Alshamy G, Chan B, Abrams R, Greenberg E, Saxena A, Bradbury M, Edgar M, Gutin P, Tabar V (2007) Long-term impact of radiation on the stem cell and oligodendrocyte precursors in the brain. *PloS one* 2:e588.
- Panchision DM, McKay RD (2002) The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Current opinion in genetics & development* 12:478-487.
- Parasuraman R, Giambra L (1991) Skill development in vigilance: effects of event rate and age. *Psychology and aging* 6:155-169.
- Parent JM, Tada E, Fike JR, Lowenstein DH (1999) Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:4508-4519.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM (2002) Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Annals of neurology* 52:802-813.

- Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F (2004) Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *The EMBO journal* 23:4495-4505.
- Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F (2009) Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:6387-6392.
- Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F (2011) Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell stem cell* 8:486-498.
- Paton JA, Nottebohm FN (1984) Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225:1046-1048.
- Perera TD, Coplan JD, Lisanby SH, Lipira CM, Arif M, Carpio C, Spitzer G, Santarelli L, Scharf B, Hen R, Rosoklja G, Sackeim HA, Dwork AJ (2007) Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:4894-4901.
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:6106-6113.
- Piccin D, Morshead CM (2011) Wnt signaling regulates symmetry of division of neural stem cells in the adult brain and in response to injury. *Stem cells* 29:528-538.
- Piccin D, Tufford A, Morshead CM (2014) Neural stem and progenitor cells in the aged subependyma are activated by the young niche. *Neurobiology of aging* 35:1669-1679.
- Pineda JR, Daynac M, Chicheportiche A, Cebrian-Silla A, Sii Felice K, Garcia-Verdugo JM, Boussin FD, Mouton MA (2013) Vascular-derived TGF-beta increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO molecular medicine* 5:548-562.
- Porlan E, Marti-Prado B, Morante-Redolat JM, Consiglio A, Delgado AC, Kypta R, Lopez-Otin C, Kirstein M, Farinas I (2014) MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. *Nature cell biology* 16:629-638.
- Qiu J, Takagi Y, Harada J, Topalkara K, Wang Y, Sims JR, Zheng G, Huang P, Ling Y, Scadden DT, Moskowitz MA, Cheng T (2009) p27Kip1 constrains proliferation of neural progenitor cells in adult brain under homeostatic and ischemic conditions. *Stem cells* 27:920-927.
- 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. *Nature cell biology* 12:31-40; sup pp 31-39.
- Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006) Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *The Journal of comparative neurology* 494:415-434.
- Rakic P (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241:170-176.
- 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. *Nature neuroscience* 9:331-339.
- Ramón y Cajal S (1893) Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. *Ann Soc Esp Hist Nat* 1893;22.
- 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. *The European journal of neuroscience* 21:464-476.
- Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, Deloulme JC (2007) S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 55:165-177.
- Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DA, Brett JO, Webb AE, Villeda SA, Thekkat PU, Guillerey C, Denko NC, Palmer TD, Butte AJ, Brunet A (2009) FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell stem cell* 5:527-539.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Ricard D, Idbaih A, Ducray F, Lahutte M, Hoang-Xuan K, Delattre JY (2012) Primary brain tumours in adults. *Lancet* 379:1984-1996.
- Riese DJ, 2nd, Stern DF (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 20:41-48.
- Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF (2001) Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 412:736-739.
- Ringrose L, Paro R (2007) Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* 134:223-232.
- Roccio M, Schmitter D, Knobloch M, Okawa Y, Sage D, Lutolf MP (2013) Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. *Development* 140:459-470.
- Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:2679-2689.
- Rodgers JT, King KY, Brett JO, Cromie MJ, Charville GW, Maguire KK, Brunson C, Mastey N, Liu L, Tsai CR, Goodell MA, Rando TA (2014) mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(Alert). *Nature* 510:393-396.
- Rolando C, Taylor V (2014) Neural stem cell of the hippocampus: development, physiology regulation, and dysfunction in disease. *Current topics in developmental biology* 107:183-206.
- Roman DD, Sperduto PW (1995) Neuropsychological effects of cranial radiation: current knowledge and future directions. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 31:983-998.
- Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H, Miyawaki A (2008) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132:487-498.
- Salomoni P, Calegari F (2010) Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. *Trends in cell biology* 20:233-243.
- Salthouse TA (1996) The processing-speed theory of adult age differences in cognition. *Psychological review* 103:403-428.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM, Rowitch DH, Alvarez-Buylla A (2011) Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478:382-386.

- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740-744.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.
- Sauvageot CM, Stiles CD (2002) Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Current opinion in neurobiology* 12:244-249.
- Sawada M, Matsumoto M, Sawamoto K (2014) Vascular regulation of adult neurogenesis under physiological and pathological conditions. *Frontiers in neuroscience* 8:53.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-632.
- Scadden DT (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441:1075-1079.
- Seki T, Arai Y (1995) Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6:2479-2482.
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW (1996) Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:3908-3913.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304:1338-1340.
- 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.
- Shi Y, Chichung Lie D, Taupin P, Nakashima K, Ray J, Yu RT, Gage FH, Evans RM (2004) Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature* 427:78-83.
- Shin J, Berg DA, Zhu Y, Shin JY, Song J, Bonaguidi MA, Enikolopov G, Nauen DW, Christian KM, Ming GL, Song H (2015) Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Cell stem cell* 17:360-372.
- Shook BA, Manz DH, Peters JJ, Kang S, Conover JC (2012) Spatiotemporal changes to the subventricular zone stem cell pool through aging. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:6947-6956.
- Shukitt-Hale B, Casadesus G, McEwen JJ, Rabin BM, Joseph JA (2000) Spatial learning and memory deficits induced by exposure to iron-56-particle radiation. *Radiation research* 154:28-33.
- Sidman RL, Rakic P (1973) Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain research* 62:1-35.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell stem cell* 7:483-495.
- Silber JH, Radcliffe J, Peckham V, Perilongo G, Kishnani P, Fridman M, Goldwein JW, Meadows AT (1992) Whole-brain irradiation and decline in intelligence: the influence

- of dose and age on IQ score. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 10:1390-1396.
- Silva-Vargas V, Crouch EE, Doetsch F (2013) Adult neural stem cells and their niche: a dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging. *Current opinion in neurobiology* 23:935-942.
- Silva-Vargas V, Maldonado-Soto AR, Mizrak D, Codega P, Doetsch F (2016) Age-Dependent Niche Signals from the Choroid Plexus Regulate Adult Neural Stem Cells. *Cell stem cell*.
- Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, Gu Y, Meletis K, Huang ZJ, Ge S, Enikolopov G, Deisseroth K, Luscher B, Christian KM, Ming GL, Song H (2012) Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489:150-154.
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Bostrom E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisen J (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153:1219-1227.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:10-18.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G (2004) Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46:41-52.
- Stump G, Durrer A, Klein AL, Lutolf S, Suter U, Taylor V (2002) Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mechanisms of development* 114:153-159.
- Sun G, Alzayady K, Stewart R, Ye P, Yang S, Li W, Shi Y (2010) Histone demethylase LSD1 regulates neural stem cell proliferation. *Molecular and cellular biology* 30:1997-2005.
- Sun G, Yu RT, Evans RM, Shi Y (2007) Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:15282-15287.
- Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X, Wu H (1999) PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6199-6204.
- Surma-aho O, Niemela M, Vilki J, Kouri M, Brander A, Salonen O, Paetau A, Kallio M, Pyykkonen J, Jaaskelainen J (2001) Adverse long-term effects of brain radiotherapy in adult low-grade glioma patients. *Neurology* 56:1285-1290.
- Szulwach KE, Li X, Smrt RD, Li Y, Luo Y, Lin L, Santistevan NJ, Li W, Zhao X, Jin P (2010) Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *The Journal of cell biology* 189:127-141.
- Tada E, Parent JM, Lowenstein DH, Fike JR (2000) X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience* 99:33-41.
- Tada E, Yang C, Gobbel GT, Lamborn KR, Fike JR (1999) Long-term impairment of subependymal repopulation following damage by ionizing irradiation. *Experimental neurology* 160:66-77.

- Takeichi M (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current opinion in cell biology* 7:619-627.
- Talos F, Abraham A, Vaseva AV, Holembowski L, Tsirka SE, Scheel A, Bode D, Dobbelstein M, Bruck W, Moll UM (2010) p73 is an essential regulator of neural stem cell maintenance in embryonal and adult CNS neurogenesis. *Cell death and differentiation* 17:1816-1829.
- Tanaka A, Watanabe Y, Kato H, Araki T (2007) Immunohistochemical changes related to ageing in the mouse hippocampus and subventricular zone. *Mechanisms of ageing and development* 128:303-310.
- Tanaka R, Yamashiro K, Mochizuki H, Cho N, Onodera M, Mizuno Y, Urabe T (2004) Neurogenesis after transient global ischemia in the adult hippocampus visualized by improved retroviral vector. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35:1454-1459.
- 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.
- Toner CK, Pirogovsky E, Kirwan CB, Gilbert PE (2009) Visual object pattern separation deficits in nondemented older adults. *Learning & memory* 16:338-342.
- Tong CK, Chen J, Cebrian-Silla A, Mirzadeh Z, Obernier K, Guinto CD, Tecott LH, Garcia-Verdugo JM, Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2014) Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell stem cell* 14:500-511.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature neuroscience* 11:901-907.
- Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cerebral cortex* 13:580-587.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:7850-7859.
- Urban N, Guillemot F (2014) Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:396.
- Urban N, van den Berg DL, Forget A, Andersen J, Demmers JA, Hunt C, Ayraut O, Guillemot F (2016) Return to quiescence of mouse neural stem cells by degradation of a proactivation protein. *Science* 353:292-295.
- Valley MT, Mullen TR, Schultz LC, Sagdullaev BT, Firestein S (2009) Ablation of mouse adult neurogenesis alters olfactory bulb structure and olfactory fear conditioning. *Frontiers in neuroscience* 3:51.
- van den Berge SA, Middeldorp J, Zhang CE, Curtis MA, Leonard BW, Mastroeni D, Voorn P, van de Berg WD, Huitinga I, Hol EM (2010) Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP-delta. *Aging cell* 9:313-326.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience* 2:266-270.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:8680-8685.

- Ventura RE, Goldman JE (2007) Dorsal radial glia generate olfactory bulb interneurons in the postnatal murine brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:4297-4302.
- Videbech P, Ravnkilde B (2004) Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *The American journal of psychiatry* 161:1957-1966.
- Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Despres S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T (2011) The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477:90-94.
- Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, Castellano JM, Mosher KI, Luo J, Smith LK, Bieri G, Lin K, Berdnik D, Wabl R, Udeochu J, Wheatley EG, Zou B, Simmons DA, Xie XS, Longo FM, Wyss-Coray T (2014) Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nature medicine* 20:659-663.
- Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L (2006) Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65:358-370.
- Wang C, Liu F, Liu YY, Zhao CH, You Y, Wang L, Zhang J, Wei B, Ma T, Zhang Q, Zhang Y, Chen R, Song H, Yang Z (2011) Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell research* 21:1534-1550.
- Wang C, You Y, Qi D, Zhou X, Wang L, Wei S, Zhang Z, Huang W, Liu Z, Liu F, Ma L, Yang Z (2014) Human and monkey striatal interneurons are derived from the medial ganglionic eminence but not from the adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:10906-10923.
- Wang Q, Yang L, Alexander C, Temple S (2012) The niche factor syndecan-1 regulates the maintenance and proliferation of neural progenitor cells during mammalian cortical development. *PloS one* 7:e42883.
- Watt FM, Hogan BL (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287:1427-1430.
- Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB (1997) Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:12425-12430.
- Westerlund U, Moe MC, Varghese M, Berg-Johnsen J, Ohlsson M, Langmoen IA, Svensson M (2003) Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture. *Experimental cell research* 289:378-383.
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lio P, Macdonald HR, Trumpp A (2008) Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135:1118-1129.
- Wong ML, Licinio J (2001) Research and treatment approaches to depression. *Nature reviews Neuroscience* 2:343-351.
- Xu L, Tang X, Wang Y, Xu H, Fan X (2015) Radial glia, the keystone of the development of the hippocampal dentate gyrus. *Molecular neurobiology* 51:131-141.
- Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Ide C (2005) Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Experimental neurology* 192:251-264.

- Young KM, Fogarty M, Kessaris N, Richardson WD (2007) Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:8286-8296.
- Yuan H, Chen R, Wu L, Chen Q, Hu A, Zhang T, Wang Z, Zhu X (2015) The regulatory mechanism of neurogenesis by IGF-1 in adult mice. *Molecular neurobiology* 51:512-522.
- Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M (2001) Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 105:33-41.
- Zhao C, Sun G, Li S, Lang MF, Yang S, Li W, Shi Y (2010) MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:1876-1881.
- Zhao C, Sun G, Li S, Shi Y (2009) A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nature structural & molecular biology* 16:365-371.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:3-11.
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:7925-7930.
- Zheng W, Nowakowski RS, Vaccarino FM (2004) Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Developmental neuroscience* 26:181-196.
- Ziabreva I, Perry E, Perry R, Minger SL, Ekonomou A, Przyborski S, Ballard C (2006) Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of psychosomatic research* 61:311-316.
- Ziegler AN, Levison SW, Wood TL (2015) Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. *Nature reviews Endocrinology* 11:161-170.
- Ziegler AN, Schneider JS, Qin M, Tyler WA, Pintar JE, Fraidenraich D, Wood TL, Levison SW (2012) IGF-II promotes stemness of neural restricted precursors. *Stem cells* 30:1265-1276.





**Titre :** Régulation de la quiescence et de la prolifération des cellules souches neurales dans le cerveau adulte.

**Mots clés :** neurogenèse adulte, zone sous-ventriculaire, cellules souches neurales, cytométrie en flux, vieillissement, quiescence.

**Résumé :** La production de nouveaux neurones, un processus appelé neurogenèse, persiste à l'âge adulte et est assurée par les cellules souches neurales (CSN) au sein de niches spécialisées telle que la zone sous-ventriculaire (ZSV). Cependant, la neurogenèse adulte diminue à la suite de diverses atteintes cérébrales et au cours du vieillissement, provoquant des déclins cognitifs pour l'heure irréversibles.

A l'aide d'une méthode de cytométrie en flux développée au laboratoire, nous avons montré que le déclin progressif de la neurogenèse de la ZSV au cours du vieillissement est lié, non pas à une diminution du nombre des CSN, mais à une forte réduction de leur prolifération due, notamment, à l'allongement spécifique de la phase G1 médiée par l'augmentation du TGF $\beta$ 1.

Par ailleurs, nous avons isolé les CSN quiescentes et les CSN en prolifération afin de caractériser leurs propriétés cellulaires et établir leur profil d'expression génique. L'analyse comparative de ces deux populations de CSN a révélé plusieurs niveaux de régulation de la balance entre quiescence et prolifération, telles que l'intégration de signaux en provenance du microenvironnement et l'existence de programmes de transcription distincts.

L'ensemble de ces résultats ouvrent des perspectives pour l'utilisation des CSN quiescentes endogènes comme cibles thérapeutiques au cours du vieillissement ou pour régénérer les tissus cérébraux lésés.

**Title :** Regulation of quiescence and proliferation of neural stem cells in the adult brain.

**Keywords :** adult neurogenesis, subventricular zone, neural stem cells, flow cytometry, aging, quiescence.

**Abstract :** The production of new neurons, a process called neurogenesis, persists during adulthood and is ensured by neural stem cells (NSCs) that are located in specialized niches in the mammalian brain such as the subventricular zone (SVZ). However, adult neurogenesis declines dramatically following brain damage and during aging leading to irreversible cognitive deficits.

Using a flow cytometry-based cell sorting strategy, we show that the progressive age-related decline in SVZ neurogenesis is not caused by a loss of NSCs but rather by a proliferation deficit of NSCs with the lengthening of their G1 phase due to increased levels of TGF $\beta$ 1.

We then sorted quiescent and proliferative NSCs to characterize their functional properties and define their gene expression profiles. Comparative analysis of the two populations of NSCs reveals that the balance between quiescence and proliferation is regulated at multiple levels with the integration of external signals from the microenvironment and distinct transcriptional programs.

Taken together, our results open new vistas into the potential use of endogenous quiescent NSCs as therapeutic targets to increase neurogenesis in the aged brain and to participate to the regeneration of damaged brain tissue.

