



## Thèse de doctorat de l'Université d'Aix-Marseille

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université d'Aix-Marseille**

Discipline : Neurosciences

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Sophie DUTHEIL**

le 1<sup>er</sup> Juin 2012

Sujet de Thèse

### **Une nouvelle zone de Neurogenèse réactionnelle et fonctionnelle chez le mammifère adulte : les Noyaux Vestibulaires**

*Mise en évidence et implication fonctionnelle dans différents modèles de désafférentation vestibulaire*

Directeur de Thèse : Docteur Brahim TIGHILET

#### **Jury**

M. Emmanuel MOYSE, Professeur des Universités, Tours  
M. Christian CHABBERT, Chargé de Recherche, Montpellier  
Mme Nora ABROUS, Directeur de Recherche, Bordeaux  
Mme Myriam CAYRE, Directeur de Recherche, Marseille  
Mme Lydia KERKERIAN-LE GOFF, Directeur de Recherche, Marseille  
M. Brahim TIGHILET, Maître de Conférences, Marseille

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse





## Thèse de doctorat de l'Université d'Aix-Marseille

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université d'Aix-Marseille**

Discipline : Neurosciences

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Sophie DUTHEIL**

le 1<sup>er</sup> Juin 2012

Sujet de Thèse

### **Une nouvelle zone de Neurogenèse réactionnelle et fonctionnelle chez le mammifère adulte : les Noyaux Vestibulaires**

*Mise en évidence et implication fonctionnelle dans différents modèles de désafférentation vestibulaire*

Directeur de Thèse : Docteur Brahim TIGHILET

#### **Jury**

M. Emmanuel MOYSE, Professeur des Universités, Tours  
M. Christian CHABBERT, Chargé de Recherche, Montpellier  
Mme Nora ABROUS, Directeur de Recherche, Bordeaux  
Mme Myriam CAYRE, Directeur de Recherche, Marseille  
Mme Lydia KERKERIAN-LE GOFF, Directeur de Recherche, Marseille  
M. Brahim TIGHILET, Maître de Conférences, Marseille

Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur  
Directeur de thèse



*Je dédie ce mémoire à mon père,  
à toute ma famille proche, à mes chers amis  
et à tous ceux qui ont égayé mon chemin jusqu'ici*



## Remerciements

*« Il n'y a pas de raccourci vers les endroits dignes d'intérêt »*

Ce mémoire de thèse clôture d'enrichissantes années passées dans le Laboratoire de Neurosciences Intégratives et Adaptatives de l'Université d'Aix-Marseille. À cette occasion, je tiens à remercier « quelques » personnes sans lesquelles cette aventure n'aurait certainement pas été si sympathique. De telles conditions de travail ont été idéales pour moi.

Mes premiers remerciements vont vers le Docteur Brahim Tighilet aux côtés de qui mon cheminement de doctorante a été extrêmement constructif sur le plan scientifique et même humain. Je lui serai toujours reconnaissante de la grande disponibilité dont il a fait preuve toutes ces années, ainsi que de la confiance, la bienveillance et le soutien qu'il m'a toujours témoignés.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux Docteurs Christian Chabbert et Emmanuel Moyse pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon Jury. Qu'ils soient assurés de ma sincère reconnaissance pour l'attention portée à ce manuscrit et le temps consacré à son évaluation.

J'adresse mes plus respectueux remerciements aux Docteurs Nora Abrous, Myriam Cayre et Lydia Kerkerian-Le Goff qui me font l'honneur de participer à ce Jury en tant qu'examineurs, et d'apporter ainsi leur expertise à ces travaux de thèse.

Je voudrais remercier vivement le Docteur Michel Lacour pour ses critiques fort constructives tout au long de nos collaborations scientifiques, ainsi que pour sa bonne humeur quotidienne. Je remercie également le Docteur Christian Xerri pour l'amabilité et le soutien dont il a toujours fait preuve envers moi.

Je tiens à remercier sincèrement les Docteurs Elizabeth Gould, Gerd Kempermann, Antonio Campos Torres et Patrizia Ferreti pour m'avoir aimablement accordé l'autorisation de réutiliser certaines de leurs illustrations dans mon mémoire de thèse.

Parce qu'elle m'a donné le déclic pour bifurquer du domaine de la psychologie vers celui des neurosciences, je resterai toujours reconnaissante envers le Docteur Yoh'i Zennou-Azogui, qui m'a permis de découvrir mes deux vocations pour la recherche et l'enseignement. Je la remercie aussi pour sa présence réconfortante et la grande gentillesse qui la caractérisent.

Parmi toutes les personnes qui me sont chères, je voudrais également remercier Liliane Borel, dont j'admire la droiture et la franchise (et dont j'adore l'éclat de rire), Jako Leonard, l'irremplaçable soleil du labo, Aurélie Dos Santos et Christophe Lopez (alias le bonbon), qu'il est un bonheur de croiser chaque jour tant leur jovialité est communicative.

Je remercie de tout cœur Elodie Salebert pour son humour décapant, sa sollicitude et ses conseils toujours avisés, ainsi que Nadia Melili dont j'apprécie particulièrement la dimension humaine et la simplicité avec laquelle elle l'incarne.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Nadia Tir pour son sérieux, son professionnalisme et sa gentillesse.

Que Valérie Gilbert, Elodie Mansour, et tous ceux ayant contribué au bien-être des animaux en soient également remerciés.

J'ai particulièrement été sensible aux marques de soutien de Karina Sadlaoud, Marieke Longcamp et Bruno Truchet la semaine qui a précédé la remise de mon mémoire, aussi, je les remercie chaleureusement.

Les personnes ci-après ont toutes joué un rôle important à divers moments de ma thèse : j'adresse par conséquent un grand Merci à Djahida Kerzabi, Sylvie Mansani, Valérie Demare, Marlyse Jacquet, Stéphane Girard, Martine Migliorati, Marie-Hélène Martinez et Christiane Checa-Montalban pour leur bonne humeur, leur prévenance et les petites joies que chacun et chacune a pu me donner çà et là.

Merci à mes très sympathiques colocataires de bureaux : Maxime Delcour et Sophie Cavé, et plus particulièrement Brandon Farley pour sa bonté, sa patience sans bornes et sa présence anglophone d'une grande richesse.

Merci également à Anne Kavounoudias, Régine Roll, Frédéric Albert, Caroline Blanchard, Jean-Pierre Roll, Jean-Marc Aimonetti, Patricia Romaguere et Edith Ribot-Ciscar pour nous avoir accueillis avec bienveillance dans leurs locaux.

J'adresse mes remerciements à Ali Gharbi pour ses plaisanteries et sa serviabilité ; Loïc Bonnier pour son assistance informatique hors pair ; Guy Escoffier et Fatma Kirmaci pour leur investissement professionnel visant à améliorer les dispositifs expérimentaux ; Jean-Michel Brezun pour son aide immunohistochimique à mes débuts et son humour singulier ; Abdessadek El Ahmadi pour sa sagesse et sa générosité, et Gary Burkhart pour les précieux conseils qu'il a dispensés au fil de mon parcours.

Je remercie vivement Eléonore Duvelle, Niko Rochet, Thierry Deltheil, Davide Rigoni, Candie Cohen, Magdalena Wutte, Mathieu Servant, Isabelle Suarez, Sandie Thomaty, Isabelle Watabe, David Pericat, Arnaud Norena, NicoOolas Catz, Magali Nicollo et Nassima El Maï pour tous les sympathiques moments passés ensemble, souvent lors de pauses déjeuner riches en plaisanteries et en bonne humeur. De tels instants sont importants pour la vie harmonieuse d'une unité de recherche.

Qu'Amaria Rehail, Valérie Pollo, France Deias, Florence Lanon, Olivier Chabrol et Dilchad Souleyman soient à leur tour remerciés pour leur générosité, leur humour et ces petites parenthèses de rire qu'ils m'ont offertes lorsque je passais à l'UFR SVT. Merci également à M. Marvaldi pour sa présence aimable et discrète.

Des personnes qui me sont tout aussi sympathiques travaillent à la conciergerie : je remercie Didier et Eliane Leveillé, Michèle Huynh, Jo et leurs collaborateurs pour leur accueil des plus appréciables depuis que je fréquente l'Université.

Je ne saurais oublier de témoigner ma gratitude envers celles et ceux qui facilitent au quotidien les fonctions relatives à l'enseignement : Philippe Martinasso et Joris Bouchard dont le sérieux et le professionnalisme sont exemplaires, Pierre Cauvin qui également effectue ses tâches avec compétence et prévenance, ainsi que le personnel de la reprographie qui m'a toujours donné entière satisfaction.

Je tiens d'ailleurs à exprimer ma reconnaissance à tous les étudiants que j'ai eus en cours. Leur gentillesse, leur écoute et leur énergie positive m'ont beaucoup apporté. Je suis ravie d'avoir découvert grâce à eux ce qu'était la passion d'enseigner, car alliée à celle de la recherche, toutes deux sont un moteur remarquable pour progresser et se dépasser.

Pour terminer les remerciements ayant trait aux personnes travaillant à l'Université, j'aimerais redire à Gaëlle Giraudie-Capraz, Christiane Mourre, Nathalie Lorenzo, Franck Vidal, Evelyne Marchetti, François Roman, Christine Redon, Laurence Casini, Franck Chaillan, Nathalie Baril, Christine Manrique, Francesca Sargolini et Boris Burle à quel point j'ai été touchée par leur témoignages d'amitié et de soutien. Que chacun soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Bien évidemment, je termine en remerciant du fond du cœur ma formidable maman, mon frère Benoît auquel je tiens énormément, ma très sympathique future belle-sœur Émilie, ma nièce adorée Ilona, et mes très chers tonton Paul, tatie Annie et cousine Dominique pour leur présence réconfortante : ils sont une grande force pour avancer dans la vie et illuminer les moments passés ensemble. Merci à ma marraine Geneviève Bertrand, son mari Régis et leurs filles Florence et Frédérique pour l'exemple de droiture, d'intelligence et de simplicité qu'ils représentent.

Je remercie aussi chaleureusement ma chère amie Manue Lescure et son mari Jean-Philippe Reboul pour leur appui, leurs rires communicatifs, et tous ces beaux souvenirs que l'on a tissés ensemble ; Visou Ady, l'ami le plus attentionné que je connaisse : merci de m'avoir épaulée en tous temps et surtout quelle joie de partager tous ces fou-rires. Merci aussi à Chloé Thyron, David Gucik, Audrey Der Kasbarian, Anthony Laviale, Maroussia Valin, Sinda Safta, Dom Michel Pascal, Joëlle Carvin et sa bande des loups-garous de thiercelieux, ainsi que mes précieux amis Red Heads avec lesquels j'ai vécu certains des plus beaux moments de ma vie.

C'est une chance extraordinaire de connaître tant de personnes dignes d'être connues.

A tous, Merci d'avoir croisé mon chemin.



# Table des matières

## Remerciements

Introduction générale .....	3
-----------------------------	---

<b>CADRE THEORIQUE .....</b>	<b>7</b>
------------------------------	----------

<b>PREMIERE PARTIE DE L'INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
--	----------

*La plasticité du système nerveux central : cinquante années d'avancées stimulantes qui aboutissent à la découverte de la neurogenèse adulte*

<b>PARTIE 1 - Chapitre 1 : Des premiers pas vers la neurogenèse, jusqu'aux niches neurogènes .....</b>	<b>11</b>
--	-----------

<b>1.1 Historique .....</b>	<b>11</b>
-----------------------------	-----------

<b>1.2 La révolution des cellules souches .....</b>	<b>16</b>
---	-----------

2.1.1 Cellules souches neurales et lignées cellulaires .....	17
--	----

2.1.2 Hypothèses quant aux origines des cellules souches .....	20
--	----

2.1.3 Réveil des cellules souches .....	23
---	----

<b>PARTIE 1 - Chapitre 2 : La Neurogenèse adulte continue .....</b>	<b>27</b>
---	-----------

<b>2.1 La neurogenèse de la zone sous-ventriculaire .....</b>	<b>27</b>
---	-----------

2.1.1 Une longue route migratoire .....	27
---	----

2.1.2 Destination et différenciation finales des neurones néoformés .....	29
---	----

<b>2.2 La neurogenèse hippocampique de la zone sous-granulaire .....</b>	<b>30</b>
--	-----------

2.2.1 Des nouvelles cellules neurales facilement excitables .....	31
---	----

2.2.2 Prolifération et mort cellulaires .....	32
---	----

<b>2.3 Autres zones de neurogenèse pressenties chez le mammifère adulte en conditions physiologiques .....</b>	<b>33</b>
--	-----------

2.3.1 Le néocortex .....	33
--------------------------	----

2.3.2 Les structures limbiques .....	35
--------------------------------------	----

2.3.3 L'hypothalamus .....	35
----------------------------	----

2.3.4 Le tubercule olfactif et le cortex piriforme .....	30
--	----

2.3.5 La rétine .....	36
-----------------------	----

2.3.6 La substance noire, le striatum, le noyau caudé et la substance blanche subcorticale .....	36
--	----

2.3.7 Le complexe vagal dorsal .....	37
--------------------------------------	----

<b>2.4 La neurogenèse adulte dans le règne animal .....</b>	<b>38</b>
---	-----------

<b>PARTIE 1 - Chapitre 3 : Facteurs régulateurs et implications fonctionnelles de la neurogenèse adulte ..</b>	<b>43</b>
--	-----------

<b>3.1 Régulation de la neurogenèse adulte continue par des facteurs intrinsèques .....</b>	<b>43</b>
---	-----------

3.1.1 Bagage génétique .....	44
------------------------------	----

3.1.2 Influences hormonales .....	45
-----------------------------------	----

3.1.3 Déclinaisons de neuromédiateurs .....	47
---	----

3.1.4 Facteurs neurotrophiques .....	52
--------------------------------------	----

3.1.5 Les bienfaits de la niche vasculaire .....	53
--	----

3.1.6 Communication astrocytaire .....	54
--	----

3.1.7 Cellules microgliales en conditions physiologiques .....	55
--	----

<b>3.2 Facteurs environnementaux</b> .....	55
3.2.1 Vieillessement .....	55
3.2.2 Environnement enrichi et activité physique .....	57
3.2.3 Interactions sociales et rapports hiérarchiques .....	59
3.2.4 Diète et nutrition .....	60
3.2.5 Effets de la nicotine .....	60
3.2.6 Apprentissages hippocampo-dépendants .....	61
3.2.7 Déprivation d'odeurs ou enrichissement olfactif .....	62
<b>3.3 Conditions pathologiques et neurogenèse réactionnelle</b> .....	65
3.3.1 Les conséquences du stress sur la plasticité cérébrale .....	65
3.3.2 Privation de sommeil et désordres cognitifs .....	67
3.3.3 Dépression et espoir thérapeutique soulevé par la neurogenèse hippocampique .....	67
3.3.4 Consommation abusive d'alcool .....	70
3.3.5 Accident vasculaire cérébral .....	71
3.3.6 Epilepsie et plasticité aberrante .....	72
3.3.7 Maladies neurodégénératives et espoirs thérapeutiques grâce aux cellules souches .....	73
3.3.8 Facteurs de l'inflammation .....	76
3.3.9 Relations entre astrocytes réactifs et cellules microgliales .....	77
3.3.10 Apoptose induite expérimentalement et neurogenèse réactionnelle .....	79
3.3.11 Lésions mécaniques, axotomies et prolifération cellulaire réactionnelle .....	79
<b>DEUXIEME PARTIE DE L'INTRODUCTION :</b> .....	83
<i>La compensation vestibulaire : un excellent modèle de plasticité post-lésionnelle qui implique la Neurogenèse</i>	
<b>PARTIE 2 - Chapitre 1 : Rappels sur l'organisation anatomo-fonctionnelle du système vestibulaire</b> .....	84
<b>1.1 Système vestibulaire périphérique</b> .....	84
<b>1.2 Système vestibulaire central</b> .....	87
1.2.1 Afférences vestibulaires et complexe des noyaux vestibulaires .....	87
1.2.2 Efférences et fonctionnalité du système vestibulaire .....	89
1.2.3 Traitement central des informations vestibulaires .....	89
<b>PARTIE 2 - Chapitre 2 : Désafférentation vestibulaire et mécanismes de plasticité impliqués dans la compensation vestibulaire</b> .....	94
<b>2.1 Le syndrome vestibulaire</b> .....	94
<b>2.2 Mécanismes sous-tendant la compensation vestibulaire</b> .....	97
2.2.1 Contributions centrales .....	98
2.2.2 Contributions neurochimiques et structurales .....	100
<b>PARTIE 2 - Chapitre 3 :</b>	
<i>Neurogenèse réactionnelle et compensation vestibulaire</i> .....	109
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b> .....	111
<b>Matériel et méthodes</b> .....	114
<b>1. Population étudiée</b> .....	116
<b>2. Techniques de désafférentation vestibulaire</b> .....	116
2.1 Neurectomie vestibulaire unilatérale .....	116

2.2	Labyrinthectomie unilatérale .....	117
2.3	Injection de tétrodotoxine (TTX) .....	117
2.4	Infusion de drogues pharmacologiques dans le VI <sup>e</sup> ventricule cérébral .....	117
<b>3.</b>	<b>Analyses immunohistochimiques de la prolifération cellulaire</b> .....	<b>119</b>
3.1	Mise en évidence de la prolifération cellulaire .....	121
3.2	Prélèvement et fixation des tissus .....	121
3.3	Congélation et coupe des cerveaux .....	122
3.4	Traitements immunohistochimiques et marquages enzymatiques à la peroxydase .....	122
3.5	Observation des coupes histologiques et analyse statistique des données .....	123
<b>4.</b>	<b>Méthodes d'analyse comportementale</b> .....	<b>124</b>
4.1	Mesure du nystagmus post-lésionnel horizontal spontané .....	125
4.2	Mesure du polygone de sustentation .....	125
4.3	Fonction d'équilibration dynamique .....	126
<b>5.</b>	<b>Traitements statistiques</b> .....	<b>127</b>
	<b>Résultats</b> .....	<b>128</b>
	<b>Résultats - Chapitre 1</b> .....	<b>130</b>
	<i>Neurogenesis and astrogenesis contribution to recovery of vestibular functions in the adult cat following unilateral vestibular neurectomy: cellular and behavioral evidence</i>	
	<b>Résultats - Chapitre 2</b> .....	<b>132</b>
	<i>Neurogenic potential of the vestibular nuclei and behavioural recovery time course in the adult cat are governed by the nature of the vestibular damage</i>	
	<b>Résultats - Chapitre 3</b> .....	<b>134</b>
	<i>Effects of a GABA<sub>A</sub> Receptors agonist or antagonist on vestibular compensation and reactive neurogenesis</i>	
	<b>Résultats - Chapitre 4</b> .....	<b>160</b>
	<i>Modifications of neural cell proliferation in the vestibular nuclei and in the subgranular zone after vestibular damages in the adult cat</i>	
	<b>Discussion</b> .....	<b>172</b>
	<b>PREMIERE PARTIE DE LA DISCUSSION :</b> .....	<b>174</b>
	<i>Potentiel neurogène dans les noyaux vestibulaires</i>	
<b>1.</b>	<b>Les noyaux vestibulaires : une nouvelle zone de neurogenèse ?</b> .....	<b>176</b>
1.1	Estimation du nombre de cellules en prolifération .....	177
1.2	Réparation cellulaire, dégénérescence et incorporation de BrdU .....	178
<b>2.</b>	<b>Origines potentielles des nouvelles cellules neurales observées dans les noyaux vestibulaires désafférentés</b> .....	<b>179</b>

<b>3. Quels acteurs interviennent dans le déverrouillage du potentiel neurogène des noyaux vestibulaires ?</b>	180
3.1 Contributions gliales et vasculaires dans les noyaux vestibulaires	181
3.2 Lésions et libération de facteurs de l'inflammation	184
3.3 Facteurs de croissance nerveuse, neurotrophines et dialogues intercellulaires	187
3.4 Régulation de l'acétylcholine dans les noyaux vestibulaires	188
3.5 Un autre neuromédiateur intéressant : l'histamine	188
<b>DEUXIEME PARTIE DE LA DISCUSSION :</b>	192
<i>Implications fonctionnelles de la prolifération cellulaire induite dans les noyaux vestibulaires après lésion vestibulaire</i>	
1. Contrôles de l'innocuité de l'agent antimitotique	192
2. La neurogenèse et l'astrogenèse : deux mécanismes de plasticité contribuant à la compensation de la fonction posturo-locomotrice	193
3. Compensation de la fonction oculomotrice	195
4. La nature de la désafférentation détermine le potentiel neurogène des NV et le décours de la compensation vestibulaire	195
<b>TROISIEME PARTIE DE LA DISCUSSION :</b>	198
<i>Rôle du GABA dans les différentes étapes de la neurogenèse vestibulaire et dans la restauration des fonctions vestibulaires</i>	
1. La nature de la désafférentation vestibulaire induit un pattern d'expression spécifique de la glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67)	198
2. Hypothèses sur la contribution fonctionnelle des nouveaux neurones GABAergiques des noyaux vestibulaires lors de la compensation vestibulaire	200
3. L'environnement GABAergique influence non seulement la prolifération cellulaire vestibulaire, mais aussi la destinée des nouvelles cellules produites dans les noyaux vestibulaires	203
3.1 L'infusion de muscimol accentue la prolifération cellulaire réactionnelle	203
3.2 L'activation des récepteurs GABA <sub>A</sub> par le muscimol entrave la survie des nouvelles cellules dans les noyaux vestibulaires	204
3.3 Le blocage des récepteurs GABA <sub>A</sub> par la gabazine stimule la prolifération cellulaire vestibulaire	205
3.4 L'infusion continue de gabazine après neurectomie vestibulaire favorise la survie des nouvelles cellules dans les noyaux vestibulaires	206
4. Le décours de la compensation vestibulaire est influencé par l'infusion d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs GABA <sub>A</sub>	207
4.1 Compensation du nystagmus horizontal spontané	208
4.2 Compensation des paramètres posturo-locomoteurs	208
<b>QUATRIEME PARTIE DE LA DISCUSSION :</b>	212
<i>Impact du stress sur la plasticité post-lésionnelle après une neurectomie vestibulaire</i>	

1. La neurogenèse hippocampique est affectée par la suppression partielle ou totale des afférences vestibulaires .....	212
2. Stress, prolifération cellulaire et compensation vestibulaire .....	214
<b>Conclusions et perspectives</b> .....	218
<b>Annexes</b> .....	221
- Article scientifique : Tell me your vestibular deficit, and I'll tell you how you'll compensate, <i>Ann. N.Y. Acad. Sci</i> 2009	
- Article de revue (français) : Une nouvelle zone de neurogenèse fonctionnelle - les noyaux vestibulaires du tronc cérébral, <i>Med Sci</i> 2011	
<b>Références</b> .....	222

# Introduction



## Introduction générale

Les principes de l'impermanence et de l'interdépendance s'appliquent aussi bien à l'univers qu'à la vie terrestre. Il est intéressant de constater qu'on les retrouve également au sein même du corps humain. En effet, chaque cellule est connectée à ses voisines, toutes communiquent les unes avec les autres pour rester autant que possible en homéostasie et conférer à l'organisme l'équilibre nécessaire au maintien de la vie. A des niveaux bien inférieurs, de l'ordre des molécules, rien ne semble non plus laissé au hasard. Tout est finement paramétré. Néanmoins, certains réglages peuvent déraiper ; mais l'organisme dispose d'une palette de ressources et de stratégies pour recouvrer l'harmonie et/ou compenser certaines fonctions endommagées.

Longtemps le tissu nerveux a été considéré comme post-mitotique une fois le stade adulte atteint. Selon les opinions qui prévalaient au début du XX<sup>e</sup> siècle, seules les synapses pouvaient se réorganiser au fil de l'existence. Depuis, les techniques d'investigation ont permis de démontrer qu'à l'âge adulte, le système nerveux central reste un organe d'une extrême malléabilité qui s'adapte sans cesse à son environnement et qui se modifie par bien des aspects. Il peut effectivement produire de nouveaux neurones et les intégrer fonctionnellement dans de complexes réseaux neuronaux, phénomène plus connu à ce jour sous le terme de « Neurogenèse » adulte. Tout d'abord considérée comme relevant de l'impossible, puis comme processus peu crédible chez l'homme, la neurogenèse s'est finalement révélée en l'espace de 50 ans comme un champ de recherche extrêmement prometteur qui est loin d'avoir encore livré tous ses secrets.

A ce jour, seulement deux structures bien précises, la zone sous-granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire qui borde les ventricules latéraux, sont connues pour renouveler continuellement leur stock de neurones chez le mammifère adulte. En dehors de ces zones bien délimitées, l'ensemble du tissu nerveux est dépourvu de telles propriétés régénératrices. Cependant, certaines conditions pathologiques peuvent ponctuellement stimuler la neurogenèse. Sectionner l'un des nerfs vestibulaire d'un chat adulte a dévoilé dans la première semaine qui suit la neurectomie, une prolifération de nouvelles cellules dans les noyaux vestibulaires désafférentés du tronc cérébral, zone qui ne produit normalement aucun nouveau neurone chez l'animal adulte non-lésé. Les cellules néo-formées dans les noyaux vestibulaires survivent au-delà de 30 jours et une partie d'entre elles se différencie en neurones de phénotype GABAergique. Ces résultats sont d'autant

intéressants que cette même chirurgie est utilisée en clinique humaine pour soulager les patients atteints de crises vertigineuses réfractaires à tout traitement médicamenteux.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la lignée de ces découvertes novatrices. Il se situe à l'interface de la plasticité post-lésionnelle et réadaptative du système nerveux central, et de la neurogenèse adulte. Quatre études distinctes ont apporté de nouveaux éclairages dans ces deux champs de recherche. L'originalité de ce travail de thèse est 1) d'avoir examiné l'aspect fonctionnel de cette prolifération cellulaire post-lésionnelle. 2) Un intérêt supplémentaire a été apporté par la comparaison de différentes désafférentations vestibulaires et par l'évaluation de leurs conséquences respectives aux niveaux cellulaire et comportemental, offrant de nouvelles perspectives de réhabilitation après lésion vestibulaire. Cette étude a également fourni des éléments inédits sur le potentiel neurogène des noyaux vestibulaires. 3) En outre, au vu de l'importance du système GABAergique dans la compensation vestibulaire, et dans la régulation des différentes étapes de la neurogenèse continue, les effets d'une infusion d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs GABA de type A ( $GABA_A$ ) en bordure des noyaux vestibulaires ont été examinés, révélant des résultats inattendus tant sur le plan comportemental que cellulaire. 4) Enfin, il s'est avéré que la suppression partielle ou totale des afférences vestibulaires activait l'axe du stress et régula différemment le potentiel neurogène des noyaux vestibulaires d'une part, et de la zone sous-granulaire d'autre part.

Ce mémoire se divise en quatre parties :

*La première partie* est consacrée à l'exposé du cadre théorique de ce travail de recherche. Une revue bibliographique retrace les découvertes stimulantes sur la neurogenèse adulte qui ont jalonné ces soixante dernières années. Nous établirons ensuite une vue d'ensemble sur l'état actuel des connaissances concernant les cellules souches et la neurogenèse spontanée chez l'adulte. Pour un souci de clarté et de précision, nous n'aborderons pas le vaste champ de la neurogenèse développementale et nous nous focaliserons préférentiellement sur les travaux menés essentiellement chez le mammifère adulte. Nous présenterons également les facteurs régulateurs - intrinsèques, extrinsèques, et pathologiques - connus pour influencer les différentes étapes de la neurogenèse, tout en abordant les aspects fonctionnels soulevés par ces cellules néo-formées. Cette revue n'est pas exhaustive et a pour objectif de retracer une vue d'ensemble de cette thématique de recherche. Finalement, nous décrirons dans cette partie les caractéristiques principales du système vestibulaire. Nous aborderons la compensation vestibulaire, ainsi que les différents mécanismes neurobiologiques la sous-tendant.

*La deuxième partie* concerne les méthodes immunohistochimiques et les méthodes comportementales utilisées dans le cadre de cette thèse.

*La troisième partie* regroupe les études réalisées sur le chat adulte après neurectomie vestibulaire unilatérale. Elle est présentée sous forme d'articles originaux publiés ou en préparation.

Enfin, *la quatrième partie* est consacrée au rappel de l'ensemble des résultats obtenus ainsi qu'à une discussion générale articulée en quatre points :

- 1) Le potentiel neurogène des noyaux vestibulaires
- 2) L'implication fonctionnelle des cellules néo-formées dans les noyaux vestibulaires au cours de la compensation vestibulaire
- 3) L'influence du système GABAergique sur la neurogenèse vestibulaire et sur le déroulement de la compensation vestibulaire
- 4) L'influence des afférences vestibulaires sur l'expression de corticolibérine (CRF) dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et sur la prolifération cellulaire de la zone sous-granulaire du gyrus dentelé.

Pour conclure, nous présenterons une vue d'ensemble des perspectives qui se dessinent pour l'avenir, au carrefour de la sphère de la réhabilitation vestibulaire et de la sphère des cellules souches.



# ***CADRE THEORIQUE***



## *Première partie de l'introduction*

La plasticité du système nerveux central : cinquante années  
d'avancées stimulantes qui aboutirent à la découverte de la  
Neurogenèse adulte



## PARTIE 1 - Chapitre 1

### Des premiers pas vers la neurogenèse, jusqu'aux niches neurogènes

---

#### 1.1 Historique

Au début du XX<sup>e</sup> siècle, la communauté scientifique fut fortement influencée par le célèbre neuroanatomiste espagnol Santiago Ramon y Cajal, qui reçut en 1906 le prix Nobel de Médecine et de Physiologie pour ses travaux sur l'organisation du système nerveux. Déclarant que les neurones étaient exclusivement générés au cours d'une fenêtre temporelle bien délimitée, il ancrâ la croyance qu'une fois le développement achevé, le destin neuronal était scellé. Selon lui, plus aucune cellule neurale ne pouvait être produite à l'âge adulte, condamnant ainsi le tissu nerveux à un lent et inéluctable déclin. « *Une fois le développement terminé, les sources de la croissance et de la régénération des axones et des dendrites sont taries de manière irrévocable. Dans le cerveau adulte, les voies nerveuses sont fixées et immuables : tout peut mourir, rien ne peut régénérer...* » Santiago Ramon y Cajal, 1913. Bien que quelques neurobiologistes aient suggéré en parallèle que des cellules puissent se diviser dans le cerveau après la naissance - notamment au niveau du plancher des ventricules latéraux chez des rats albinos âgés d'au moins 4 mois, leurs publications restèrent lettres mortes (Hamilton, 1901; Allen, 1912).

La **neurogenèse adulte**, appelée également postnatale ou secondaire recouvre plusieurs étapes distinctes, lesquelles se déroulent comme dans l'embryogenèse selon une cinétique finement paramétrée (voir *Figure 1*). Lors de la première étape, dite de prolifération, la cellule-mère entre en mitose et donne naissance à deux cellules-filles. Celles-ci vont peu à peu migrer vers l'emplacement auquel elles sont destinées. De manière concomitante, elles passent par différents stades cellulaires (précurseurs, progéniteurs, neuroblastes voir *Chapitre 1, Partie 1.2*) tandis que se restreignent leurs possibilités phénotypiques ; cette phase est nommée maturation. Une fois sorties du cycle cellulaire, les cellules néo-formées entament leur différenciation finale en neurones adaptés à leur tissu hôte. S'ils survivent, les nouveaux neurones développent une arborisation dendritique et une arborisation axonale en concordance avec le microenvironnement cellulaire et les réseaux neuronaux pré-existants. Ils établissent des connexions fonctionnelles, incorporant des courants sodiques à l'origine de potentiels d'action (Kempermann, 2011a ).



Adapté de Gerd Kempermann, Oxford University Press Copyright©

**Figure 1. Illustration des différentes étapes aboutissant à la production d'un neurone différencié et fonctionnel.** La neurogenèse est un processus qui comprend de nombreuses étapes. Elle ne se limite pas à la simple prolifération cellulaire : elle débute par la division de précurseurs neuraux, et au terme d'une quinzaine d'étapes, se termine par l'obtention d'un neurone différencié, fonctionnel et intégré dans un réseau neuronal.

Il fallut attendre la fin des années 1950 pour que l'histoire de la neurogenèse débute véritablement, avec l'apparition de la **[<sup>3</sup>H]-thymidine** radioactive. Grâce à cette technique de visualisation, les chercheurs de l'époque purent enfin envisager la détection exhaustive de la prolifération cellulaire. En effet, la thymidine est un nucléotide indispensable à la synthèse réplivative. Injectée par voie intrapéritonéale, la [<sup>3</sup>H]-thymidine radioactive se fixe alors dans les brins d'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules néoformées qui peuvent ainsi être révélées par autoradiographie (Sidman et al., 1959). Au début des années 60, **Joseph Altman**, qui travaillait au Massachusetts Institute of Technology, injecta de la [<sup>3</sup>H]-thymidine radioactive directement dans le cerveau de rats adultes et observa des coupes fines de tissu nerveux (7 micromètres). Il rapporta dans un article paru en 1962 dans la prestigieuse revue *Science* que des cellules gliales situées autour du site de la lésion pratiquée avaient incorporé le marqueur radioactif et avaient survécu au-delà de 2 mois. En outre, les données les plus intéressantes indiquaient que les noyaux de plusieurs neurones, révélés par la coloration de Nissl, avaient également incorporé ce marqueur dans des régions cérébrales qui n'avoisinaient pourtant pas la lésion (Altman, 1962). Ceci suggérait le maintien de neuroblastes dans le cerveau adulte. Sur la base

de ces observations, J. Altman suggéra que le système nerveux central du mammifère adulte possédait la capacité de générer des nouveaux neurones. En 1963, il repéra une zone proliférative de cellules granulaires dans le gyrus dentelé de l'hippocampe et publia les premières microphotographies de neurogenèse de l'histoire (Altman, 1963). Deux ans plus tard, il montra que de nouvelles cellules neurales étaient produites par division cellulaire à l'âge adulte non seulement dans le gyrus dentelé de l'hippocampe (Altman and Das, 1965), mais aussi dans le néocortex (Altman and Das, 1966) et dans le bulbe olfactif (Altman, 1969) du rat adulte, érigeant ainsi les premières pierres du concept de neurogenèse adulte. Il fut également le premier à décrire en détail le flux migratoire rostral qui relie la zone sous-ventriculaire et le bulbe olfactif (Altman, 1969). Pourtant, malgré le caractère révolutionnaire de ses travaux, la communauté scientifique ne lui accorda guère de crédit, jugeant d'une part que ces résultats n'étaient pas assez spécifiques faute de marqueurs plus élaborés identifiant les neurones, et d'autre part que les nouvelles cellules neurales étaient localisées de manière éparse dans quelques rares structures cérébrales, pouvant relever de réparations de l'ADN. En outre, de vives contestations s'élevèrent quant à l'existence d'une neurogenèse chez l'humain ; si de nouveaux neurones pouvaient être produits chez l'adulte, comment expliquer alors les maladies neurodégénératives, les lésions irréversibles, et autres désordres cérébraux qui ne se réparaient pas automatiquement ? De surcroît, l'addition de nouvelles cellules serait susceptible d'entraver le fonctionnement optimal des réseaux neuronaux, notamment dans le cadre de l'apprentissage et de la mémoire. Ainsi, la neurogenèse ne pouvait encore s'intégrer au domaine des neurosciences.

Quelques années passèrent, n'apportant aucun résultat probant jusqu'à ce que **Michael Kaplan** rapporte que chez le rat adulte, de nouveaux neurones étaient générés dans l'hippocampe et qu'ils survivaient au-delà de 30 jours après l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine (Kaplan and Hinds, 1977). Reproduisant les travaux de J. Altman, il eut recours à un microscope électronique, qui lui permit de différencier les neurones des cellules gliales, éliminant au passage les possibles marquages dits faux-positifs. Il distingua même les caractéristiques morphologiques des nouvelles cellules qui jusque là n'avaient jamais été détaillées si précisément - axones, dendrites, synapses dans plusieurs structures (hippocampe, bulbe olfactif, cortex visuel). *In fine* les interprétations de M. Kaplan étaient similaires à ceux de J. Altman. A nouveau, les scientifiques furent peu convaincus par ces données et émirent de nombreuses critiques à leur égard. En 1982, M. Kaplan, certainement précurseur, soumit au comité d'éthique de son université un projet d'étude sur la neurogenèse chez l'être humain, qui lui fut refusé.

Parallèlement à ces travaux, d'autres équipes de recherche s'intéressèrent de près à la neurogenèse. **Fernando Nottebohm**, un chercheur américain, travaillait sur le système du chant des

canaris. Découvrant avec ses collaborateurs que chaque année, le volume de certaines structures cérébrales augmentait à la saison des amours durant laquelle les mâles apprenaient de nouveaux chants, ils eurent l'idée d'utiliser la [<sup>3</sup>H]-thymidine pour révéler l'éventuelle présence de nouvelles cellules neurales. Ils découvrirent ainsi un nombre important de neurones issus de divisions à l'âge adulte dans le centre vocal supérieur du chant des canaris mâles (Nottebohm, 1981). En outre, utilisant toute une palette d'outils techniques allant de traceurs rétrogrades à des enregistrements électrophysiologiques, ils observèrent que les cellules marquées à la [<sup>3</sup>H]-thymidine migraient et se différenciaient en neurones dotés de contacts synaptiques (Goldman and Nottebohm, 1983; Burd and Nottebohm, 1985; Alvarez-Buylla and Nottebohm, 1988; Alvarez-Buylla et al., 1988). Poursuivant ses investigations, F. Nottebohm et ses collaborateurs observèrent que les nouvelles cellules activées par des stimuli auditifs possédaient des propriétés électrophysiologiques et s'intégraient dans des circuits neuronaux préétablis (Paton and Nottebohm, 1984). Ces données très précises furent des avancées cruciales dans le domaine de la neurogenèse. Elles suggérèrent pour la première fois que des neurones nouvellement générés possédaient un rôle fonctionnel puisque leur genèse et leur intégration étaient corrélées à l'apprentissage de nouvelles syllabes de chant durant la saison des amours. En outre, elles démontrèrent que les conditions environnementales pouvaient influencer directement la composition du tissu nerveux, et plus précisément réguler le taux de neurogenèse dans une structure cérébrale particulière. En entrevoyant ainsi une utilité à la neurogenèse post-natale, l'intérêt de la communauté scientifique commença à s'éveiller.

En 1982, lorsque le **5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)** fit son entrée dans le monde de la recherche (Gatzner, 1982), de nouvelles possibilités s'offrirent aux laboratoires dont la thématique s'axait sur la production de neurones chez l'adulte. Cet agent était à l'origine utilisé pour déterminer l'index prolifératif des tumeurs (Hoshino et al., 1989) et pour étudier la prolifération cellulaire du système nerveux central au cours du développement (Nowakowski et al., 1989). Semblable par son impact biologique au [<sup>3</sup>H]-thymidine radioactif, le BrdU permit d'une part de visualiser les nouvelles cellules issues de prolifération - puisqu'il s'insère également dans l'ADN des cellules juste avant leur division - mais surtout d'être associé avec d'autres marqueurs cellulaires dans l'optique de préciser le phénotype des nouvelles cellules ; cet examen indispensable était jusqu'alors impossible avec la [<sup>3</sup>H]-thymidine. Malgré cette avancée technique prometteuse, en 1985, un doute s'insinua dans l'esprit de certains chercheurs quand Pasko Rakic rapporta qu'il n'avait quant à lui observé aucune neurogenèse dans le cerveau de singes adultes. Ayant eu recours à la même méthode que J. Altman, il déclara dans sa publication l'absence de cellules marquées dans le néocortex, l'hippocampe et le bulbe olfactif de ces animaux (Rakic, 1985).

Jusque dans les années 1990, les connaissances sur la neurogenèse demeurèrent en quelque sorte dans une période de latence. Puis, progressivement, plusieurs équipes rapportèrent des résultats stimulants, conférant plus de crédit à ce phénomène de plasticité postnatale. Jusqu'alors, l'idée que des neurones, cellules post-mitotiques et extrêmement ramifiées, puissent se diviser et engendrer de nouvelles cellules filles, apparaissait peu plausible. Les deux zones de neurogenèse dont la littérature scientifique faisait état étaient les seules où l'on soupçonnait la présence de cellules souches neurales résidentes. Lorsqu'en 1992, **Brent Reynolds et Sam Weiss** isolèrent pour la première fois des cellules souches neurales en culture primaire à partir du système nerveux central du rongeur (Reynolds and Weiss, 1992), leur découverte fit sensation. Non seulement, cela confirmait que la neurogenèse était désormais un phénomène crédible, mais surtout la présence de cellules souches disséminées dans l'ensemble du tissu nerveux s'inscrivait comme la voie royale de la médecine régénératrice pour restaurer des zones cérébrales endommagées. Dans la lignée de ces révélations, plusieurs études confirmèrent grâce à des comarquages avec le BrdU que le bulbe olfactif des rongeurs était une zone produisant continuellement de nouveaux neurones. Néanmoins, d'après ces mêmes auteurs, il était très incertain que ce même phénomène s'applique au bulbe olfactif de l'être humain (Corotto et al., 1994; Lois and Alvarez-Buylla, 1994).

La neurogenèse acquit réellement ses lettres de noblesse lorsque **Peter Eriksson et coll.** divulguèrent pour la première fois, en 1998, que le cerveau adulte humain produisait aussi de nouveaux neurones chez des individus âgés de 57 à 72 ans (Eriksson et al., 1998). Pour démontrer ces affirmations, P. Eriksson autopsia avec son équipe les cerveaux de patients décédés suite à un cancer de la gorge et ayant préalablement accepté de donner leur corps à la science. Ils avaient reçu de leur vivant une injection de BrdU intraveineuse pour marquer les cellules tumorales avant leur retrait chirurgical et évaluer leur rapidité de prolifération. Cette injection avait été effectuée entre 2 semaines et 2 ans avant leur décès. L'examen post-mortem de leur tissu cérébral fut effectué grâce à des techniques immunohistochimiques combinant BrdU et marqueurs de l'identité neuronale. Si les bulbes olfactifs ne furent pas analysables, les données recueillies permirent en tous cas de démontrer que l'hippocampe humain était une zone de neurogenèse. Dans la mesure où les doses de BrdU délivrées étaient relativement faibles, et compte-tenu de l'âge des patients, Eriksson et ses collaborateurs suggèrent que leurs données étaient largement en-deçà du nombre réel de nouveaux neurones générés chaque jour dans l'hippocampe de l'être humain adulte. Cette découverte fut classée par le New York Times comme la plus importante de la décennie (Blakeslee, 2000). D'autres médias reprirent massivement cette information, ce qui encouragea de nombreux chercheurs à examiner plus finement le cerveau du mammifère adulte.

Le nombre de publications relatives à la neurogenèse adulte prit un essor considérable ; les termes de « **neurogène** » et « **non-neurogène** » commencèrent à être utilisés dans la littérature scientifique. Le terme « neurogène » fut choisi pour décrire une région cérébrale ayant le pouvoir de générer de nouveaux neurones, tandis que le terme « non-neurogène » fut employé pour désigner toute région ne produisant pas de nouveaux neurones. De nos jours, seules deux zones bien délimitées du cerveau de mammifères adultes sont reconnues pour renouveler continuellement leur stock de neurones : le gyrus dentelé de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire qui borde les ventricules latéraux. Le reste du tissu nerveux est considéré comme non-neurogène bien que certains auteurs aient rapporté qu'une neurogenèse spontanée puisse également survenir dans d'autres régions cérébrales (voir *Chapitre 2, Partie 2.3*).

## 1.2 La révolution des cellules souches

Parmi les découvertes passionnantes qui enrichissent les neurosciences ces soixante dernières années, il apparut que le système nerveux du mammifère adulte était doté tout au long de sa vie de cellules indifférenciées capables de créer de nouveaux neurones. Au XIX<sup>e</sup> siècle, bien que n'ayant pas de définition claire et précise, le terme de **cellules souches** était déjà utilisé. Depuis, deux critères essentiels ont été établis pour les identifier : premièrement, elles sont capables de s'auto-renouveler de manière illimitée grâce à des divisions symétriques ou asymétriques ; ainsi au moins une des deux cellule-filles doit être identique à la cellule-mère. Deuxièmement les cellules souches peuvent générer différents types de cellules selon leur tissu d'appartenance. Ce phénomène est connu sous le terme de multipotence. Lorsque n'importe quel type cellulaire peut être engendré, on parle de pluripotence (McKay, 1997; Moysé et al., 2008).

**Theo Palmer** fut le premier à mettre en culture des cellules souches neurales provenant de diverses régions du système nerveux central chez le rongeur adulte - corps calleux, nerf optique, septum, hippocampe, striatum et néocortex - en présence de fibroblast growth factor-2 (FGF-2), un facteur de croissance aux propriétés mitogènes (Palmer et al., 1995). Les résultats qu'il obtint révélèrent que ces cellules souches étaient capables non seulement de proliférer, mais aussi de s'auto-renouveler et de générer différents lignages cellulaires - astrocytes, oligodendrocytes, et neurones. Cette découverte fort importante consacra les premiers pas de la culture cellulaire de cellules souches en présence de facteurs de croissance, et permit d'envisager les potentialités réparatrices du tissu nerveux. Par la suite, d'autres études démontrèrent que l'ensemble du tissu nerveux était doté de telles cellules capables de proliférer. Toutefois, il fut établi que les cellules souches localisées dans des zones

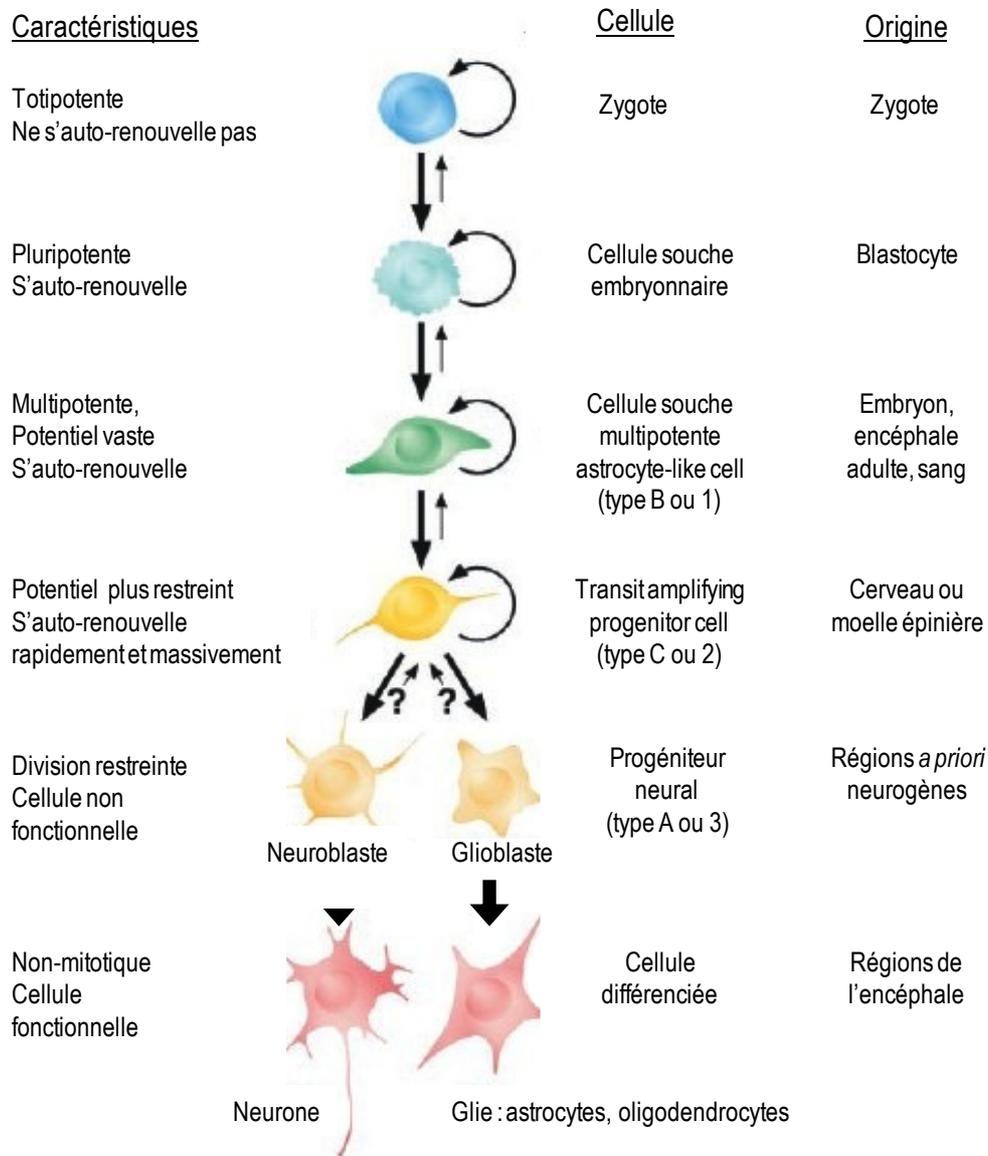
non-neurogènes demeuraient dans un état latent *in vivo* et présentaient en revanche un potentiel neurogène lorsqu'elles étaient cultivées *in vitro* en présence de FGF-2 et/ou d'epidermal growth factor (EGF), autre facteur de croissance bien connu. D'intéressantes questions se posèrent grâce à ces découvertes : contrairement aux cellules souches de la peau ou encore du foie, les cellules souches neurales ne proliféraient pas régulièrement, excepté dans les deux zones neurogènes répertoriées à ce jour. Puisque le cerveau adulte était parsemé de cellules souches quiescentes, pourquoi n'exploitait-il pas davantage ce potentiel ? Cette faculté de prolifération spontanée du tissu nerveux aurait-elle été brimée au cours de l'évolution ? Pourquoi seulement deux zones restreintes produisaient-elles de nouveaux neurones chez le mammifère adulte ? Quel rôle fonctionnel joueraient les neurones néoformés ? Quels facteurs réguleraient les mécanismes de prolifération et de différenciation des cellules souches ? Jusqu'à quel point les études *in vitro* pouvaient-elles refléter ce qu'il advenait *in vivo* ? Quelle serait la nature et l'origine des cellules souches neurales ? Comment enfin assurer la survie de leur descendance ainsi que leur intégration fonctionnelle à long terme ?

### 1.2.1 Cellules souches neurales et lignages cellulaires

L'identification précise des cellules souches reste un défi majeur pour la compréhension de leur mode de fonctionnement et de régulation. En effet, nombre de marqueurs moléculaires peuvent être aujourd'hui employés, mais tous ne sont pas exprimés spécifiquement par les cellules souches *in vivo* et *in vitro*. Les avancées techniques ont toutefois permis de distinguer progressivement plusieurs sous-types de cellules souches neurales.

L'appellation générale « **cellule souche neurale** » peut recouper différentes sortes de cellules, à des stades plus ou moins avancés. Les cellules issues du zygote au stade morula sont définies comme étant **totipotentes** car elles peuvent générer un organisme entier ainsi que son placenta. Les cellules dites **pluripotentes** sont, quant à elles, capables de générer les tissus de tous les feuilletts embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme), tandis que les cellules **multipotentes** sont plus restreintes dans la genèse de lignages cellulaires (voir *Figure 2*). Les cellules souches multipotentes, appelées aussi précurseurs neuraux, vont donner naissance à des *cellules progénitrices intermédiaires* ou *progéniteurs neuraux* (« intermediate progenitor cells » ou « transient amplifying progenitor cells »). Ces cellules ont pour caractéristiques de se diviser plus rapidement que les précurseurs, mais premièrement, leurs capacités d'auto-renouvellement sont plus limitées, et deuxièmement, elles ne sont pas multipotentes : puisqu'elles se limitent à une seule destinée cellulaire, on les qualifie d'**unipotentes**.

## Du zygote à la cellule neurale différenciée



*Modifié d'après Gage et al. (2000) Science 287:1433*

**Figure 2. Evolution du potentiel neurogène des cellules souches en fonction de leur origine.** Les cellules souches des mammifères passent par différentes étapes hiérarchiquement organisées, récapitulées dans ce schéma. Le zygote est la cellule originelle dotée du plus grand éventail de possibilités. Totipotente, elle peut donner naissance à n'importe quel type cellulaire. Au fur et à mesure des divisions, les possibilités d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules filles se réduisent toutefois, permettant d'éviter les risques de malformations et de tumeurs. Au final, les cellules différenciées (neurones et glie) sont fonctionnelles mais (a priori) non-mitotiques.

Les progéniteurs ne sont généralement pas considérés comme des cellules souches à proprement parler, mais plutôt comme des cellules-filles déjà engagées dans le lignage neuronal (van der Kooy and Weiss, 2000). En se divisant, les cellules progénitrices engendrent des neuroblastes. Les *neuroblastes* sont également unipotents et ont pour particularité de migrer en direction de leur futur emplacement. Ils peuvent uniquement générer des cellules qui deviendront post-mitotiques et s'intégreront, si elles survivent, dans un réseau neuronal préexistant. Dans de nombreuses études *in vivo*, le terme *précurseur neural* est souvent employé pour désigner des cellules indifférenciées pour lesquelles on ne peut vérifier les possibilités d'auto-renouvellement, mais qui sont dotées toutefois d'un pouvoir prolifératif et d'une multipotence caractéristiques. Nous utiliserons ainsi préférentiellement le terme de *précurseur* dans le reste du mémoire pour décrire des cellules souches aux stades précédant les neuroblastes.

Selon leur stade de maturation, les cellules souches neurales expriment plusieurs sortes de marqueurs moléculaires et présentent parfois des caractéristiques structurales proches de celles des cellules gliales matures (Barres, 1999; Doetsch et al., 1999b; Laywell et al., 2000). Plusieurs populations de cellules souches neurales ont été décrites dans la ZSV et dans la ZSG sur la base de leur morphologie, des marqueurs qu'elles exprimaient, de leur cinétique de prolifération et de leur potentiel de différenciation (Doetsch et al., 1997, 1999a; Doetsch et al., 2002).

Les **cellules de type 1, 2, et 3** ont été répertoriées dans la ZSG, tandis que les **cellules de type A,B,C,D et E** ont été désignées comme caractéristiques de la ZSV.

Bien que n'appartenant pas aux mêmes structures cérébrales, les cellules de type 1 et les cellules de type B présentent des homologues (voir *Figure 2*). Elles expriment le marqueur glial GFAP et possèdent une arborisation ramifiée qui se rapproche de la glie radiaire, type cellulaire prévalent lors du développement. La glie radiaire sert soit d'échafaudage pour la migration cellulaire, soit de source de progéniteurs neuraux. Elle se transforme ensuite en astrocytes chez le mammifère adulte, excepté dans les zones de neurogenèse où elle persiste (Alvarez-Buylla et al., 2001).

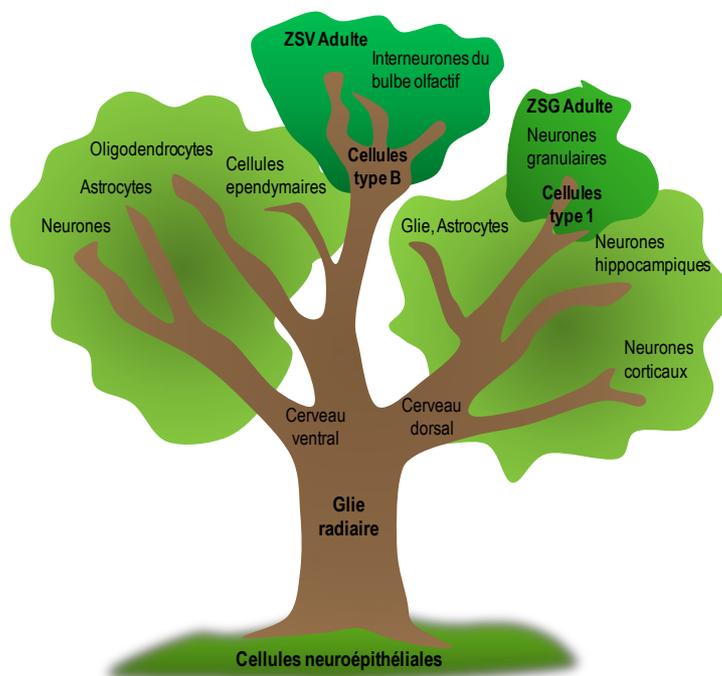
Les autres populations de cellules de type 2 et de type C, résidant respectivement dans la ZSG et dans la ZSV, possèdent quant à elles de très petites ramifications, voire aucune, et sont considérées comme des cellules progénitrices - « transient amplifying cells » - capables de proliférer rapidement mais ayant une multipotence plus restreinte en lignages cellulaires. Ces cellules expriment la nestine et

SOX2 (sex determining region Y)-box 2) ; certaines d'entre elles expriment la doublecortine (DCX ; marqueur des neurones immatures).

En revanche, les cellules de type C dans la ZSV et de type 3 dans la ZSG n'expriment pas le marqueur GFAP mais expriment les gènes *Dlx2* (distal-less homeobox 2), *Mash1* (Mammalian achaete scute homolog 1) et *Egfr* (epidermal growth factor receptor). Elles sont considérées comme des neuroblastes migrants qui donneront lieu à des neurones post-mitotiques à l'étape suivante.

### 1.2.2 Hypothèses quant aux origines des cellules souches

Les neurones et les cellules gliales furent longtemps considérés comme issus de deux populations distinctes de précurseurs ayant divergé au cours du développement embryonnaire. Cette croyance s'appuyait notamment sur le fait que les cellules gliales peuvent proliférer quel que soit le stade de la vie de l'individu, contrairement aux neurones, lesquels une fois différenciés ne disposent plus de cette faculté. En outre, la glie radiaire, issue des **cellules neuroépithéliales** du stade embryonnaire, a pendant longtemps été considérée comme un précurseur des astrocytes et non des neurones car elle disparaît ensuite massivement du système nerveux central une fois le stade adulte franchi (voir *Figure 3*). Ainsi, a-t-on pu considérer que la conversion en astrocytes de la glie radiaire et la diminution de son expression après la phase développementale sonnaient le glas de la neurogenèse (Walton, 2011).



**Figure 3. La régionalisation spatiale gouverne le devenir des cellules neuroépithéliales.** Les cellules des régions neurogènes du système nerveux central adulte possèdent une origine commune (les cellules neuroépithéliales). En fonction de leur régionalisation (ventrale ou dorsale), la glie radiaire va produire des cellules aux caractéristiques spécifiques requises par le tissu hôte.

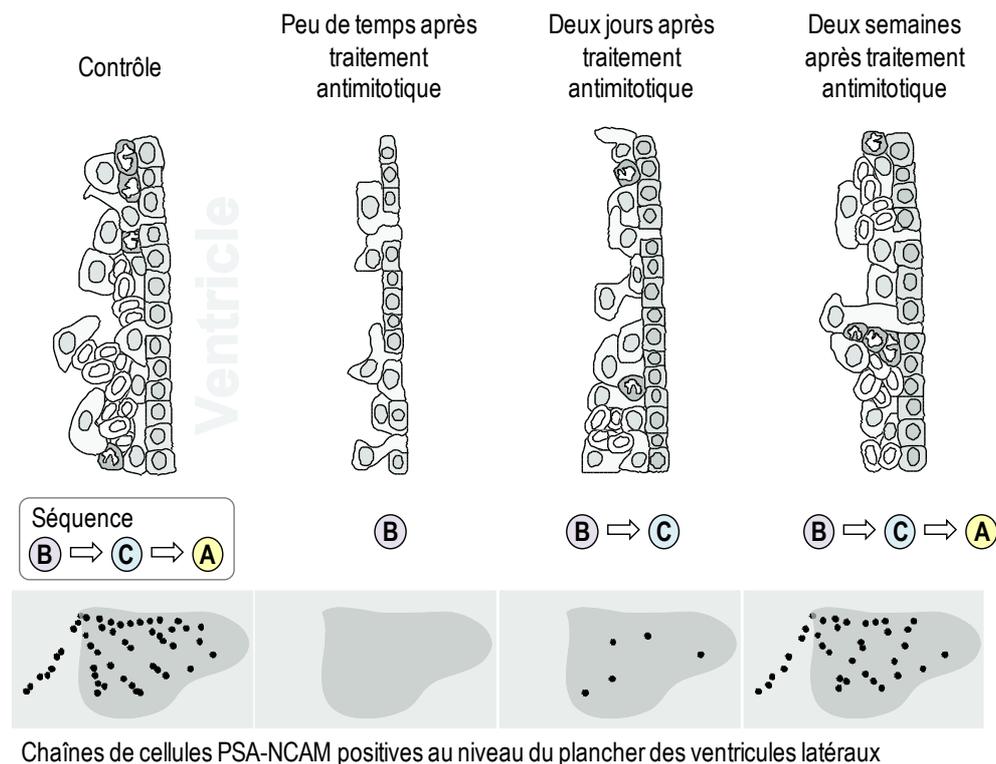
D'après Gerd Kempermann 2010, Copyright © Gerd Kempermann, Oxford University Press

Plusieurs hypothèses sur l'**origine** des cellules souches se sont depuis affrontées au cours de la dernière décennie. Actuellement, la caractérisation exacte de l'identité des précurseurs neuraux comporte toujours des zones d'ombre. D'après certaines équipes de chercheurs, les nouvelles cellules neurales issues de la zone sous-ventriculaire pourraient provenir de **cellules épendymaires** exprimant le filament intermédiaire nestine, mais étant GFAP-négatives (Johansson et al., 1999). En effet, certaines données ont laissé supposer que ces cellules pourraient avoir la faculté de générer des progéniteurs neuraux et des astrocytes, même si pour l'heure, de tels résultats n'ont été obtenus qu'*in vitro* ou *in vivo* exclusivement après lésion (Meletis et al., 2008; Carlen et al., 2009). Par ailleurs, il semblerait que les cellules épendymaires, quelquefois aussi désignées comme cellules de type E, ne seraient pas en mesure de s'auto-renouveler (Chiasson et al., 1999; Capela and Temple, 2002). La formation de nouveaux neurones *in vivo* pourrait aussi être imputable à la présence d'astrocytes dans la couche épendymaire qui borde les ventricules cérébraux (Basak and Taylor, 2009). Les cellules épendymaires serviraient alors plutôt à sécréter des facteurs proneurogènes tel que du noggin, des « bone morphogenetic proteins » (BMPs) et des éphrines, favorisant la quiescence et l'activité mitotique des précurseurs (Chiasson et al., 1999; Lim et al., 2000; Holmberg et al., 2005; Gajera et al., 2010).

Une deuxième théorie préconise que des **progéniteurs oligodendrocytaires** répondant positivement au « neuron-gial antigen 2 » (NG2) pourraient aussi appartenir à un lignage cellulaire à part entière, capable de générer de nouveaux neurones. Tout au moins les cellules NG2-positives<sup>(+)</sup> seraient multipotentes *ex vivo* (Belachew et al., 2002; Aguirre and Gallo, 2004; Aguirre et al., 2004; Alonso, 2005). Ces cellules se retrouvent dans les niches neurogènes, possèdent des contacts synaptiques avec les neurones et présentent des caractéristiques électrophysiologiques complexes et particulières, à cheval entre celles des cellules gliales et des neurones (Morrens et al., 2012). Leur contribution aux diverses étapes de la neurogenèse reste encore sujet à débats.

De nombreuses données suggèrent enfin que les nouvelles cellules neurales proviendraient de cellules « **astrocyte-like** », c'est-à-dire possédant une identité astrogliale et descendant de la glie radiaire. De telles cellules repérées dans la zone sous-ventriculaire expriment le marqueur glial GFAP et le marqueur de la nestine. Elles possèdent de surcroît des caractéristiques fonctionnelles à part entière, à mi-chemin entre celles des astrocytes et de la glie radiaire (Liu et al., 2006). Plus précisément, ce fut l'étude fort intéressante de Fiona Doetsch *et coll.* qui permit de dévoiler leur existence et de préciser la nature de leurs relations avec les diverses cellules dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) (Doetsch et al., 1999b). Dans cette étude, l'infusion d'un agent antimitotique, la Cytosine- $\beta$ -D-arabinofuranoside (AraC), a été pratiquée localement durant 6 jours afin d'éliminer les

progéniteurs en prolifération. Très peu de temps après l'arrêt du traitement à l'AraC, quelques cellules de type B exprimant les marqueurs astrocytaires ont été observées (Figure 4). En quelques jours, ces dernières ont généré des cellules progénitrices de type C (« transient amplifying progenitor cells ») qui ont à leur tour produit des cellules de type A (neuroblastes migrants). Au bout de deux semaines, le nombre total de cellules de type B, C et A avait significativement augmenté dans la séquence B ⇒ C ⇒ A, reconstituant le tissu à constitution similaire à celui des souris contrôles.



Reproduit avec l'autorisation de l'auteur du schéma – Copyright© Gerd Kempermann and Oxford University Press

**Figure 4. Les cellules de type B ("astrocyte-like"), précurseurs de la neurogenèse dans la zone sous-ventriculaire.** L'infusion d'un agent antimitotique perturbe l'homéostasie de la zone sous-ventriculaire et abolit les populations de progéniteurs en prolifération. Les cellules de type C et de type A ont ainsi été éliminées peu de temps après l'infusion de Cytosine-β-D-arabino-furanoside (AraC). Quelques cellules de type B ont persisté dans le tissu et ont donné naissance à des cellules de type C, qui à leur tour ont généré, quelques jours plus tard, des cellules de type A. Le tissu s'est finalement reconstitué en deux semaines. Cette représentation schématique, élaborée par Gerd Kempermann, est inspirée de l'expérience de Doetsch et al. 1999.

Ainsi ces auteurs ont-ils étayé la thèse selon laquelle des cellules s'apparentant à des astrocytes seraient à l'origine de la neurogenèse de la zone sous-ventriculaire (Doetsch et al., 1999b; Doetsch et al., 1999a). Dans la ZSG également, des cellules immatures exprimant la GFAP, la doublecortine et la PSA-NCAM repeuplèrent le tissu préalablement dépourvu de cellules progénitrices (Seri et al., 2004).

En outre, l'étude *in vitro* des propriétés des précurseurs astrocytaires et d'astrocytes matures de plusieurs régions cérébrales montra que ces populations présentaient des propriétés de multipotence et d'auto-renouvellement, tandis que les cellules épendymaires semblaient seulement unipotentes (Laywell et al., 2000).

Plus largement, les cellules GFAP<sup>+</sup> sont donc pressenties comme étant des **cellules souches quiescentes** *in vivo* (Morshead et al., 1994; Seri et al., 2004). Curieusement, certaines équipes ont suggéré que des astrocytes matures pourraient régresser dans leur stade développemental, se différencier et redevenir des cellules multipotentes à l'origine de nouveaux neurones (Lang et al., 2004) notamment dans des conditions lésionnelles (Buffo et al., 2008). Toutefois, puisque l'expression du marqueur GFAP peut s'exprimer dans d'autres populations cellulaires que celle des astrocytes, la nature exacte des précurseurs neuraux reste encore à préciser.

De plus, il semblerait que différentes populations d'astrocytes et de précurseurs neuraux délimitent finement la cytoarchitecture du système nerveux central adulte (Emsley et al., 2005; Kohwi et al., 2005). Les neuroblastes issus de la ZSV seraient hétérogènes bien avant leur intégration dans le bulbe olfactif : ils n'exprimeraient pas tous les mêmes facteurs moléculaires (Kohwi et al., 2005). Chez l'adulte, comme au cours du développement embryonnaire, une régionalisation cérébrale conférerait ainsi un code spatial déterminant le phénotype neuronal (Hack et al., 2005; Merkle et al., 2007).

### 1.2.3 Réveil des cellules souches

Au regard des études menées ces dernières décennies, la survie et la maturation des cellules souches neurales sont fortement influencées par des facteurs extrinsèques. En 1996, Jaana Suhonen, de l'équipe de Fred Gage, a transplanté des précurseurs issus de la zone sous-granulaire de l'hippocampe à l'intérieur du flux migratoire rostral reliant la ZSV au bulbe olfactif (Suhonen et al., 1996). D'ordinaire ces précurseurs se différencient en neurones granulaires, mais quelques jours plus tard, alors qu'ils étaient parvenus à destination dans le bulbe olfactif, ils se sont différenciés en interneurons granulaires et périglomérulaires olfactifs, phénotypes neuronaux spécifiques du tissu hôte. Ainsi, sous l'influence de l'environnement, les précurseurs du gyrus dentelé ont mûri en interneurons du bulbe olfactif. Dans une perspective similaire, une autre étude notoire a révélé que des précurseurs prélevés dans la moelle épinière de rats adultes - zone non-neurogène - se sont différenciés en neurones granulaires après avoir été transplantés dans la ZSG (Shihabuddin et al., 2000). En revanche, lorsque des cellules souches neurales issues d'une des deux zones neurogènes sont transplantées dans une

zone non-neurogène du système nerveux central, que ce soit au niveau du striatum, du cortex, ou du cervelet, elles ne se différencient pas en neurones dans leur tissu d'accueil, soulignant l'importance du **microenvironnement cellulaire** sur le devenir des précurseurs neuraux (Suhonen et al., 1996; Herrera et al., 1999). Bien d'autres données ont depuis étayé ces publications et ont permis d'énoncer que chez le mammifère adulte, le devenir des précurseurs neuraux semble dépendre davantage de la composition du microenvironnement cellulaire dans lequel ils évoluent, que de leur programme génétique intrinsèque.

On utilise l'expression **niche neurogène** lorsque le microenvironnement cellulaire autorise le bon déroulement des diverses étapes de la neurogenèse. Une niche neurogène est ainsi un microenvironnement restreint composé d'une population cellulaire dont les caractéristiques, la disposition particulière et les molécules qu'elles peuvent libérer favorisent la quiescence, la prolifération, la survie et la différenciation des cellules souches (Morrison and Spradling, 2008). *In vivo*, une niche neurogène se constitue principalement de précurseurs neuraux, d'astrocytes, de cellules épendymaires, de vaisseaux sanguins, de cellules endothéliales et de liquide cébrospinal (Knobloch and Jessberger, 2011). Par ailleurs, pour qu'une niche soit considérée comme neurogène, elle doit favoriser la survie et la différenciation fonctionnelle de précurseurs neuraux qui y seraient transplantés, quel que soit leur tissu d'origine.

Au niveau des acteurs principaux conférant à une niche son pouvoir neurogène, il a été envisagé que les cellules épendymaires jouent un rôle important grâce à leur disposition à l'interface du liquide céphalo-rachidien et du tissu nerveux. Néanmoins, il convient de mentionner que le gyrus dentelé, zone neurogène par excellence, n'est pas adossé directement à la surface ventriculaire, ce qui laisse supposer que bien d'autres facteurs sont à considérer. Outre la constitution cellulaire de la niche et son agencement spatial, les facteurs moléculaires libérés semblent particulièrement déterminants pour le devenir des précurseurs neuraux. Nous avons vu précédemment que les facteurs de croissance tels que l'EGF et le FGF-2 étaient utilisés dans les protocoles de culture cellulaire en tant qu'agents mitogènes. Il semblerait que de nombreux autres intermédiaires soient responsables de l'induction de la prolifération cellulaire et des passages de relais entre les étapes de la neurogenèse.

Au-delà des facteurs extracellulaires, les **facteurs génétiques** possèdent également une responsabilité pertinente dans la genèse de cellules souches. En 2006, Kazutoshi Takahashi et Shinya Yamanaka ont indiqué une piste tout à fait originale voire révolutionnaire : la manipulation de quatre gènes seulement gouvernant des facteurs de transcription (*C-Myc* ; Kruppel-like factor 4, *Klf4* ; Octamer

3/4, *oct-3/4* ; et SRY box-containing gene 2, *Sox2*) a permis à des cellules post-mitotiques de souris - des fibroblastes de la peau et des lymphocytes B - de retourner à un état pluripotent (Takahashi and Yamanaka, 2006). La surexpression de ces quatre gènes a donc autorisé la modification du pouvoir neurogène de ces cellules différenciées, les ramenant au stade de précurseurs neuraux capables d'engendrer des cellules-filles et d'induire leur redifférenciation en un autre type cellulaire. Ces cellules, ayant l'incroyable faculté de retourner à des stades antérieurs de développement ont été nommées *Induced Pluripotent Stem (iPS) cells* - cellules souches pluripotentes induites. De tels résultats ont été étendus chez l'humain en manipulant néanmoins des gènes différents (Hanley et al., 2010). De manière remarquable, n'importe quelle cellule pourrait donc être reprogrammée pour réacquérir un potentiel neurogène afin de répondre « à la carte » aux besoins médicaux. Cette technique permettrait ainsi d'éviter tout risque de rejet immunologique pour les patients greffés. Toutefois il convient de nuancer cette découverte étonnante car il est apparu que les iPS, cellules artificielles dérivées de cellules non-pluripotentes, pouvaient causer notamment des tumeurs (Miura et al., 2009).

### Conclusions et éléments-clés

- L'identité exacte des cellules souches neurales demeure encore à ce jour méconnue.
- Elles partageraient de nombreux points communs avec les astrocytes et la glie radiaire.
- L'environnement cellulaire influence fortement le potentiel neurogène d'une niche.
- Les facteurs intrinsèques notamment génétiques s'inscrivent comme porteurs d'espoirs pour la médecine réparatrice et régénératrice.



## **PARTIE 1 - Chapitre 2**

### *La Neurogenèse adulte continue*

---

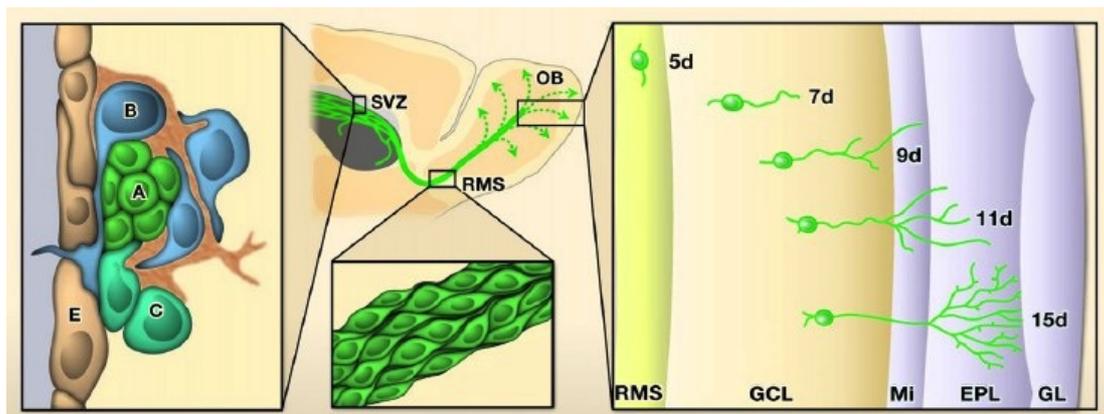
Les études sur la neurogenèse portent majoritairement sur les rongeurs, les érigeant ainsi comme le modèle-type de ce phénomène chez le mammifère. Pourtant, de nombreuses différences existent non seulement entre les espèces vivantes, mais aussi à l'intérieur d'une même population. Bien que la majorité des résultats concordent, il est important de considérer plusieurs paramètres tels que la durée de vie de l'espèce, l'influence des facteurs génétiques entre les lignées, l'âge des animaux sélectionnés pour les expérimentations, leur sexe, les conditions environnementales ou d'élevage. Dans ce chapitre, nous aborderons la neurogenèse telle qu'elle survient dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) et dans la zone sous-granulaire (ZSG) des mammifères adultes. Le plus souvent, nous mentionnerons les données obtenues chez les rongeurs. Nous aborderons ensuite les autres structures cérébrales pressenties pour être le site d'une neurogenèse secondaire. Enfin, nous évoquerons brièvement les connaissances relatives à la neurogenèse chez d'autres espèces animales telles que les amphibiens, les poissons, les insectes, et les oiseaux.

#### **2.1 La neurogenèse de la zone sous-ventriculaire**

La zone sous-ventriculaire et le bulbe olfactif sont originaires du télencéphale ventral. Les précurseurs neuraux à l'origine des nouveaux neurones se situent dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) ; il s'agit d'une fine bande de tissu nerveux située en bordure des ventricules latéraux, au niveau du striatum. L'originalité de la neurogenèse de cette zone est d'une part, qu'elle est la plus abondante du système nerveux central, et d'autre part, que les précurseurs migrent sur une longue distance en empruntant une route nommée **flux migratoire rostral**. Leur destination finale est le bulbe olfactif où les neurones immatures se différencient en cinq sortes d'interneurones (granulaires ou périglomérulaires). Chez les rongeurs, la quantité de cellules neurales produites dans la ZSV est particulièrement importante : chez la souris, il a été estimé que 30 000 à 60 000 neuroblastes étaient acheminés chaque jour jusqu'au bulbe olfactif (Lois and Alvarez-Buylla, 1994).

##### **2.1.1 Une longue route migratoire**

Pour migrer, les cellules peuvent puiser dans un répertoire de stratégies. Les neuroblastes de la ZSV, appelés cellules de type A, s'agencent en chaînes et migrent tangentiellement à travers un tunnel homophilique constitué de cellules de type B similaires aux astrocytes, qui compartimentalisent la ZSV en tubes gliaux. Des cellules de type C (« transit amplifying progenitors ») résident également au voisinage de ces chaînes de neuroblastes (voir *Figure 5*). Il semblerait que les tubes gliaux ne soient pas indispensables à la migration elle-même ; *in vitro* en effet, en l'absence de tubes astrocytaires, les précurseurs de la ZSV s'organisent en chaînes et se déplacent également en étroites relations (Wichterle et al., 1997). Toutefois un tel mode de déplacement semble propre aux précurseurs de la ZSV puisque d'autres populations neuronales cultivées dans les mêmes conditions ne s'associent pas en chaînes pour migrer (Wichterle et al., 1997). Le trajet des cellules neurales de la ZSV au bulbe olfactif dure entre 6 et 15 jours chez le rongeur et s'étend sur 3-5 mm, culminant à une vitesse allant de 20 à 100  $\mu\text{m/h}$  (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; De Marchis et al., 2001; Bolteus and Bordey, 2004; Davenne et al., 2005). Chez le macaque, cette étape s'étend sur plus de 85 jours pour un trajet d'environ 20 mm (Kornack and Rakic, 2001).



Originellement publié par Elsevier  
 Copyright © Zhao et al. 2008 Cell 132:645



**Figure 5. Migration, différenciation et intégration des précurseurs neurales de la zone sous-ventriculaire.** Les progéniteurs neurales (A-C) de la zone sous-ventriculaire (SVZ sur le schéma) se situent à proximité des cellules épendymaires (E) en bordure des ventricules latéraux. Les nouvelles cellules migrent en chaîne grâce au flux migratoire rostral et subissent des changements morphologiques et physiologiques en parallèle, jusqu'à ce qu'elles atteignent le bulbe olfactif (OB - olfactive bulb sur le schéma). Elles intégreront alors la couche granulaire (GCL - granule cell layer) ou glomérulaire (GL - glomerular layer). Abréviations sur le schéma : Mi, mitral cell layer - cellules mitrales ; EPL, external plexiform layer - couche plexiforme externe ; RMS, rostral migratory stream - flux migratoire rostral.

Ce long cheminement est sous-tendu par la présence de molécules de la matrice extracellulaire, de molécules d'adhésion cellulaire comme la PolySialylated Neural Cell Adhesion Molecule (PSA-NCAM) ainsi que par de nombreuses molécules chémo-attractives ou -répulsives, des facteurs de transcription, des récepteurs transmembranaires ou encore des neurotransmetteurs (Whitman and Greer, 2009). Chez le rongeur, la concentration de GABA à l'intérieur du tube glial régule la vitesse de migration des neuroblastes (Bolteus and Bordey, 2004). Les astrocytes libèrent également une protéine appelée « migration-inducing activity » (MIA) capable d'influer sur la migration des progéniteurs (Mason et al., 2001). Il a été envisagé que l'écoulement caudorostral du liquide cébrospinal provoqué par le battement des cils des cellules épendymaires en bordure des ventricules latéraux puisse participer également au processus migratoire, inférant un gradient de molécules nécessaire à l'orientation de la migration neuronale (Sawamoto et al., 2006). Les neuroblastes peuvent aussi utiliser un mode de déplacement vasculaire en migrant le long des vaisseaux sanguins parallèles au flux migratoire rostral (Bovetti et al., 2007; Saghatelian, 2009; Whitman and Greer, 2009). Après avoir atteint le milieu du bulbe olfactif, les neuroblastes se détachent des chaînes et poursuivent leur route radialement vers les couches granulaires et périglomérulaires du bulbe olfactif dans lesquelles finalement ils se différencient.

### 2.1.2 Destination et différenciation finales des neurones néoformés

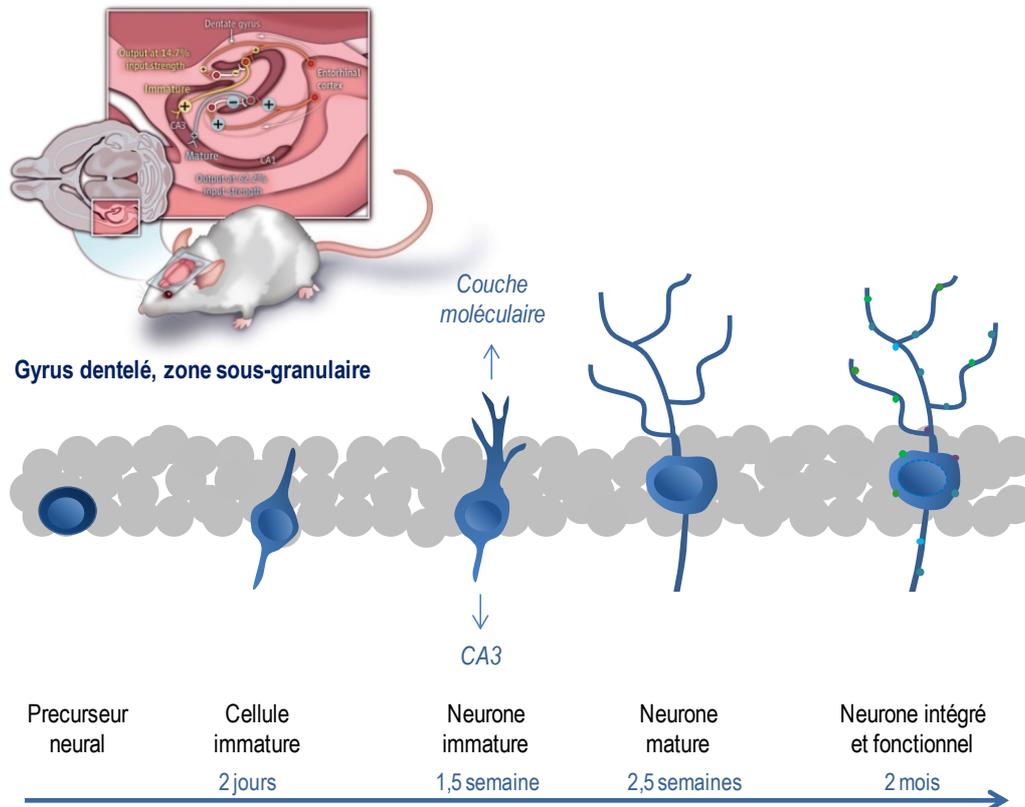
L'équipe d'Arturo Alvarez-Buylla a distingué cinq étapes dans la différenciation morphologique des nouvelles cellules de la ZSV, du départ de la migration des neuroblastes à travers le flux migratoire rostral jusqu'à l'intégration des nouveaux neurones, 15 à 30 jours plus tard. Il a été montré que quatorze jours après leur naissance, les nouveaux neurones ont déjà développé une **arborisation et des épines dendritiques** ; ils sont dotés de **récepteurs GABA<sub>A</sub>** à la surface de leur membrane plasmique (Bolteus and Bordey, 2004). Ces récepteurs GABA<sub>A</sub>, actifs précocement, sont ensuite rejoints par des récepteurs AMPA et NMDA. Le GABA est un important régulateur de l'arborisation dendritique des neurones et stabilise les lamellipodes des cônes de croissance dendritique (Gascon et al., 2006). Les neuroblastes migrants sont capables de répondre à des molécules particulières de chémoattraction et reçoivent des « inputs » durant les deux premières semaines suivant leur genèse. Ils perçoivent séquentiellement des informations les renseignant sur le réseau neuronal avant d'y contribuer (Whitman and Greer, 2009) et achèvent leur maturation complète lorsqu'ils atteignent le bulbe olfactif (Carleton et al., 2003). En réalité, une grande quantité de nouvelles cellules est créée chaque jour dans la ZSV mais seulement un pourcentage, estimé à 40%, survit à long-terme et atteint le bulbe olfactif (Winner et al., 2002). Parmi les cinq types d'interneurones qui peuvent être générés, 95% sont de phénotype GABAergique et composent la couche granulaire ; une mince proportion appartient à la couche périglomérulaire et

colocalise de la tyrosine hydroxylase et/ou de la dopamine (Winner et al., 2002). Les 5% restant se différencient quant à eux en interneurones glutamatergiques (Brill et al., 2009). Le phénotype des nouveaux neurones semble dépendre de l'origine et plus précisément de la disposition spatiale des précurseurs dans la ZSV (Merkle et al., 2007). Les facteurs conduisant à la survie ou à la dégénérescence des nouveaux neurones demeurent à ce jour méconnus mais il semblerait que l'activité neuronale liée à l'apprentissage olfactif soit particulièrement importante (Winner et al., 2002; Alonso et al., 2006).

## 2.2 La neurogenèse hippocampique de la zone sous-grulaire

L'hippocampe tient son nom de la racine latine *hippocampus* qui désigne l'animal marin du nom éponyme. En effet, les premiers chercheurs qui découvrirent cette structure cérébrale chez l'être humain trouvèrent qu'elle lui ressemblait morphologiquement. Pourtant chez le rongeur, cette comparaison ne s'applique pas puisque l'hippocampe possède une tout autre forme anatomique. Cette structure, que l'on appelle également la formation hippocampique, provient de l'archicortex (ou cortex limbique). Elle comporte 3 couches cellulaires et se divise en quatre régions distinctes : le gyrus dentelé, le subiculum, le presubiculum et la corne d'Amon. Cette dernière se subdivise en quatre sous-régions nommées CA1, CA2, CA3 et CA4. La **zone sous-grulaire** se situe dans le gyrus dentelé, à l'interface de la couche granulaire et du hilus.

La neurogenèse hippocampique chez le mammifère adulte se limite à la zone sous-grulaire (ZSG) du gyrus dentelé. Les précurseurs qui y résident se divisent et génèrent des progéniteurs neuronaux qui migrent tangentiellement sur une courte distance, vers la base de la couche granulaire adjacente. Durant les quelques jours nécessaires à cette migration, les cellules-filles se divisent à nouveau et donnent des neuroblastes. Ces derniers étendent par la suite leurs dendrites vers la couche moléculaire, tandis que leur axone se déploie en direction de la corne d'amon 3 (CA3) et constitue les fibres moussues. Bien que les nouveaux neurones soient déjà partiellement différenciés entre le 3<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> jour après leur naissance, l'étape de maturation s'échelonne en réalité sur 2 à 10 semaines (voir *Figure 6*) durant lesquelles les cellules néo-formées acquièrent en grande majorité le phénotype glutamatergique, ou GABAergique dans 14% des cas (Liu et al., 2003). Les neurones néo-formés développent progressivement les mêmes caractéristiques structurelles et électrophysiologiques que leurs homologues déjà matures, ils génèrent des potentiels d'action et répondent à la stimulation de la voie perforante (Stanfield and Trice, 1988; Cameron et al., 1993; van Praag et al., 2002).



Haut : Publié par l'AAAS dans *Kempermann 2012 Science 335(6073):1175-*   
 Edité avec la permission de l'AAAS Copyright © Gerd Kempermann  
 Bas : Inspiré de Bonfanti et al. 2011 *Eur J Neurosci 34:937*

**Figure 6. Evolution temporelle et fonctionnelle des précurseurs neuraux de la zone sous-granulaire du gyrus dentelé.** Dans la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus dentelé de l'hippocampe, les précurseurs neuraux se divisent, migrent sur une courte distance et deviennent finalement fonctionnels lorsque leur axone parvient dans l'aire CA3 de l'hippocampe. Les neurones granulaires matures du gyrus dentelé reçoivent aussi bien des afférences excitatrices (+) qu'inhibitrices (-) en provenance du cortex entorhinal. Les cellules granulaires immatures quant à elles, pour leur part, reçoivent relativement moins d'afférences inhibitrices, et répondent ainsi plus facilement à des stimulations plus faibles mais moins spécifiques que ne le font les neurones matures. Leur seuil d'induction de la potentialisation à long terme est d'ailleurs plus bas que celui des neurones plus âgés.

### 2.2.1 Des nouvelles cellules neurales facilement excitables

Au cours de la première semaine qui suit leur genèse, les nouveaux neurones reçoivent des afférences uniquement GABAergiques, ensuite secondées par des afférences glutamatergiques (Ge et al., 2006). Les premières semaines, il est particulièrement intéressant de constater que le récepteur GABA<sub>A</sub>, qui possède un canal chlorure (Cl<sup>-</sup>), engendre une **dépolarisation des progéniteurs** et des neurones immatures lorsqu'il est activé (Li et al., 2002). Cette dépolarisation particulière est due à la

présence majoritaire de cotransporteurs cation-chlorures de type  $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$  de type 1 (NKCC1) sur la membrane des neurones immatures (Blaesse et al., 2009). Ces cotransporteurs NKCC1 sont responsables de l'import massif d'ions  $\text{Cl}^-$  à l'intérieur des cellules immatures, et donc d'une concentration intracellulaire en  $\text{Cl}^-$  élevée. En de telles circonstances, l'activation d'un récepteur  $\text{GABA}_A$  exerce une sortie d'ions  $\text{Cl}^-$ , à l'origine d'une excitation (Wang et al., 2002). Deux semaines plus tard, tandis que les cotransporteurs NKCC1 sont internalisés et dégradés dans le cytoplasme, leurs homologues de type  $\text{K}^+ 2\text{Cl}^-$  de type 2 (KCC2) les remplacent progressivement à la surface des neurones et modifient le gradient de concentration des ions  $\text{Cl}^-$  intracellulaires en les exportant hors de la cellule. Par conséquent, l'action du GABA engendre une entrée d'ions  $\text{Cl}^-$  dans le cytoplasme, à l'origine d'une hyperpolarisation. Ainsi, lors des deux semaines qui suivent leur formation, les nouveaux neurones sont dépolarisés par le GABA en raison de la présence de cotransporteurs NKCC1 sur leur membrane neuronale. En outre, ils possèdent un seuil d'excitabilité plus bas que les neurones matures pour le déclenchement de la potentialisation à long terme, phénomène connu comme étant le substrat neuronal de l'apprentissage et de la mémoire (Schmidt-Hieber et al., 2004).

Alors que les neurones néo-formés s'équipent en récepteurs et autres transporteurs membranaires, leur arborisation dendritique s'ajuste en parallèle de façon « **activité-dépendante** » surtout entre les 19<sup>e</sup> et 28<sup>e</sup> jours, tandis que leur capacité à produire des potentiels d'action se modifie (Aimone et al., 2010). Ces processus d'adaptation et de mise en place se poursuivent de manière intensive jusqu'à la 8<sup>e</sup> semaine (Laplagne et al., 2007) où les nouveaux neurones se fondent ensuite dans le paysage neuronal.

### 2.2.2 Prolifération et mort cellulaires

Il a été estimé que chaque jour, près de 9000 nouveaux neurones étaient générés dans le gyrus dentelé du rat adulte, ce qui représente 0,03% de la population neuronale totale de cette zone (Kempermann et al., 1997a; Cameron and McKay, 2001). En revanche, chez le macaque adulte, ce ratio n'atteindrait que 0,004% (Kornack and Rakic, 1999). L'idée que la neurogenèse hippocampique soit le corollaire de la mort neuronale a prévalu quelques années, avant d'être contestée par plusieurs études qui avancèrent que le volume de la zone sous-granulaire augmentait au cours de la vie de l'individu (Butz et al., 2006; Ben Abdallah et al., 2010). Pourtant, dans les structures neurogènes, le taux d'apoptose est de loin le plus élevé comparativement au reste du système nerveux central. En réalité, cette mort neuronale concerne davantage l'excédent de cellules néo-formées qui ne s'intégreront pas dans des circuits neuronaux, plutôt que les neurones matures qui disparaîtraient au rythme de

l'incorporation de nouveaux-venus (Biebl et al., 2000). En ce sens, bloquer les cellules en mitose dans la ZSG n'engendre pas une diminution du nombre total de cellules granulaires (Imayoshi et al., 2008). La sélection des neurones néo-formés qui s'intègrent aux réseaux neuronaux semble dépendre principalement de l'environnement et de stimulations appropriées.

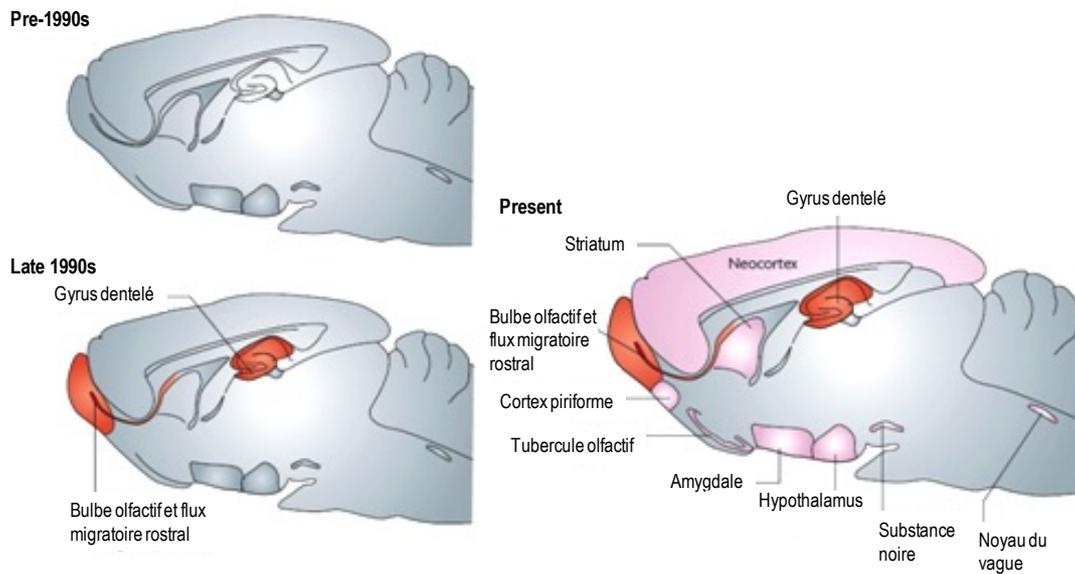
*Bien que la neurogenèse de la ZSG soit comparativement moins intense que celle de la ZSV et du bulbe olfactif, elle suscite néanmoins un vif intérêt par son caractère fonctionnel. La formation hippocampique fait partie du système limbique : elle supervise la genèse d'émotions et participe aux processus motivationnels. Elle est également impliquée dans les mécanismes attentionnels, l'apprentissage spatial et la consolidation de la mémoire déclarative. En outre, la neurogenèse hippocampique est facilement modulée par de nombreux facteurs physiologiques, environnementaux et pathologiques ; ainsi l'amélioration des symptômes de maladies telle que la dépression pourrait être liée à la plasticité cellulaire de cette structure (voir Chapitre 3, Partie 3.3).*

## **2.3 Autres zones de neurogenèse pressenties chez le mammifère adulte en conditions physiologiques**

Ces trois dernières décennies, d'autres zones cérébrales que la zone sous-granulaire et la zone sous-ventriculaire ont été examinées afin de détecter l'éventuelle présence de nouvelles cellules neurales se renouvelant spontanément chez l'animal adulte en bonne santé (voir *Figure 7*). De nombreux articles sont parus, relatant que des zones considérées jusque là comme non-neurogènes étaient capables de générer de nouveaux neurones (*Tableau I*). Ces données restent toutefois sujettes à discussions. Rappelons que pour être considérée comme une niche neurogène, une zone cérébrale doit valider un nombre précis de critères (*cf Chapitre 1, Partie 1.2.3*).

### **2.3.1 Le néocortex**

Les premières recherches attestant d'une neurogenèse dans le néocortex remontent à celles d'Altman (1963) et de Kaplan (1981). Depuis, cette structure cérébrale et son potentiel neurogène ont fait l'objet d'une attention particulière. Les données de Liyue Huang en 1998 ont notamment révélé qu'une neurogenèse saisonnière survenait dans le cortex cingulaire des hamsters, mais ces résultats furent reçus avec scepticisme (Huang et al., 1998). Un an plus tard, Elizabeth Gould *et coll.* firent état d'une neurogenèse ayant pour origine des précurseurs de la ZSV migrant jusqu'au néocortex du singe macaque (Gould et al., 1999a). Ils précisèrent ensuite que ces nouveaux neurones dégénéraient (Gould et al., 2001).



Originellement publié par ©2007 Nature Publishing Group  
 Reproduit avec l'autorisation de l'auteur Copyright © Elizabeth Gould 2007  
 Nat Rev Neurosci 8(6):481

**Figure 7. Représentation schématique de l'évolution des points de vue concernant les zones de neurogenèse dans le cerveau du mammifère adulte ces 15 dernières années.** Avant la période des années 1990 (pre-1990s), toutes les régions de l'encéphale étaient qualifiées de "non-neurogènes" (gris). A la fin des années 1990 (late 1990s), seuls le gyrus dentelé de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire associée au bulbe olfactif par le flux migratoire rostral étaient catégorisés de neurogènes (en rouge sur le schéma). De nos jours, d'autres structures sont pressenties pour être également le siège d'une neurogenèse, mais ces données restent encore controversées (rose pâle). Il convient de noter que les localisations de ces régions sont représentées de manière approximative car elles ne se situent pas toutes dans le même plan sagittal.

Pasko Rakic et ses collaborateurs, qui avaient mené de pareilles investigations, n'observèrent, en revanche pas de neurogenèse chez la même espèce, malgré la vaste étude entreprise (Rakic, 2002). Cette absence de prolifération cellulaire corticale fut étayée par d'autres équipes de recherche, y compris chez l'homme (Kornack and Rakic, 2001; Koketsu et al., 2003; Bhardwaj et al., 2006) mais contredite par Alexandre Dayer *et al.* qui rapportèrent l'existence d'une neurogenèse corticale chez le rat adulte (Dayer et al., 2005). Malgré l'utilisation d'outils méthodologiques similaires, les résultats demeurent encore à ce jour contradictoires. Certains auteurs ont suggéré que les cellules BrdU<sup>+</sup> colocalisant un marqueur des neurones matures dans le néocortex proviendraient de précurseurs quiescents déjà présents dans le tissu et se différencieraient préférentiellement en interneurones GABAergiques de petit diamètre plutôt qu'en neurones pyramidaux plus conséquents (Dayer et al., 2005; Cameron and Dayer, 2008). Ceci expliquerait la difficulté de leur détection parmi la vaste population de neurones pyramidaux de gros diamètre, occupant 70 à 80% des neurones corticaux (Cameron and Dayer, 2008). Il a en outre été observé qu'une neurogenèse corticale pouvait survenir

chez le rat dans des modèles de maladies psychiatriques ou suite à des traitements thérapeutiques (Alonso, 2000; Czeh et al., 2007). Ainsi, approfondir la fonctionnalité d'éventuels nouveaux neurones corticaux chez le mammifère adulte, et assurer leur survie pourraient permettre la mise en place de moyens thérapeutiques prometteurs.

### 2.3.2 Les structures limbiques

Les structures limbiques ont également fait l'objet d'examen minutieux. L'amygdale est une structure impliquée notamment dans les comportements sociaux et de reproduction en partie régulés par la détection d'odorants et de phéromones. Elle intervient aussi dans les comportements d'agression et participe à la mémoire émotionnelle (Fowler et al., 2008). La présence d'une neurogenèse dans l'amygdale a été rapportée chez le campagnol des prairies (Fowler et al., 2002) et chez le primate non-humain (Bernier et al., 2002). Cette neurogenèse locale pourrait être influencée par l'environnement social et générer près de 2,6 fois moins de nouveaux neurones que ceux quantifiés dans le gyrus dentelé (Fowler et al., 2002; Fowler et al., 2005). Il est important de signaler que l'amygdale reçoit des afférences directes provenant du bulbe olfactif, ce qui pourrait expliquer en partie cette prolifération cellulaire. En effet, une augmentation du nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> a été observée chez des femelles campagnols mises en présence de l'odeur spécifique de mâles pendant 48h (Liu et al., 2007). De plus, ce phénomène de plasticité pourrait s'expliquer du fait que l'amygdale, tout comme l'hypothalamus, est une structure contenant une grande quantité de récepteurs aux œstrogènes, neurohormones connues pour être proneurogènes (Fowler et al., 2008). En 2000, l'équipe de Samuel Weiss a estimé que la plupart des protocoles de marquage des nouvelles cellules dans le système nerveux central ne ciblaient qu'une portion des cellules en division. Ces chercheurs ont alors utilisé un protocole d'exposition prolongée au BrdU chez la souris. Leurs résultats ont révélé l'existence d'une prolifération cellulaire répartie dans de multiples régions de l'hippocampe et plus précisément dans la corne d'Amon (Rietze et al., 2000). Un grand nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> a toutefois dégénéré dans une fenêtre temporelle de 24 semaines tandis qu'une majorité de cellules survivantes s'est différenciée en cellules gliales. Il pourrait donc exister une prolifération cellulaire continue disséminée dans l'hippocampe, mais elle n'aboutirait peut-être pas à une neurogenèse fonctionnelle.

### 2.3.3 L'hypothalamus

L'hypothalamus intervient dans de nombreuses fonctions cérébrales dont certaines sont communes avec l'amygdale (détection de phéromones, affiliation sociale) (Fowler et al., 2008). Tout comme la majorité des régions non-neurogènes, l'hypothalamus contient des précurseurs neuronaux qui

peuvent proliférer et se différencier *in vitro* en neurones matures dont les propriétés reproduisent celles des populations neurales contrôles de l'hypothalamus (Markakis et al., 2004). Mais de telles données n'ont pas été répliquées *in vivo* en condition physiologique. Par ailleurs, certains résultats suggèrent que des progéniteurs neuraux provenant de la couche épendymaire du III<sup>e</sup> ventricule pourraient migrer pour s'intégrer dans des réseaux neuronaux de l'hypothalamus latéral. Ils répondraient ensuite à l'orexine, comme les neurones matures locaux (Xu et al., 2005). En 2005, Maia Kokoeva a publié un article indiquant que sous l'infusion d'un facteur de croissance, le ciliary neurotrophic factor (CNTF), qui induit une perte pondérale chez les rongeurs obèses, une neurogenèse survenait au niveau du parenchyme du III<sup>e</sup> ventricule basal et dans l'hypothalamus - noyaux arqué, ventromédian et dorsomédian (Kokoeva et al., 2005). Les nouveaux neurones survivants exprimaient les marqueurs caractéristiques des populations locales de neurones (Neuropeptide Y (NPY) et pro-opiomelanocortine (POMC) qui jouent respectivement des rôles orexigènes et anorexigènes). En outre, l'infusion d'une drogue antimototique, l'AraC, combinée avec l'infusion de CNTF a bloqué la perte pondérale constatée chez les animaux uniquement infusés avec du CNTF. Ainsi, d'après ces auteurs, la neurogenèse hypothalamique induite par le CNTF jouerait un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme. Certains noyaux de l'hypothalamus pourraient donc être le site d'une neurogenèse fonctionnelle.

### 2.3.4 Le tubercule olfactif et le cortex piriforme

Le tubercule olfactif et le cortex piriforme sont tous deux en relation avec le bulbe olfactif et participent au traitement des informations olfactives. Ils seraient susceptibles d'accueillir de nouveaux neurones pour les intégrer dans des circuits pré-existants (Bernier et al., 2002; Pekcec et al., 2006; Cayre et al., 2009). Certains travaux ont fait mention d'une migration et d'une intégration possibles de neuroblastes issus de la ZSV vers les tubercules olfactifs et le cortex piriforme (Bedard et al., 2002; Shapiro et al., 2009). De telles données restent encore à préciser.

### 2.3.5 La rétine

Une fois lésée, la rétine des mammifères ne peut se reconstituer d'elle-même ; cette propriété a été perdue au cours de l'évolution phylogénétique. Pourtant, elle contient des précurseurs semblables à ceux que l'on trouve dans les zones de neurogenèse continue chez l'adulte et génèrent des neurosphères *ex vivo* (Engelhardt et al., 2004). Des études de transplantation de précurseurs issus notamment de l'hippocampe ont révélé qu'ils pouvaient s'y développer mais n'y maturaient pas totalement (Takahashi et al., 1998; Warfvinge et al., 2001; Akita et al., 2002; Mellough et al., 2004).

### 2.3.6 La substance noire, le striatum, le noyau caudé et la substance blanche subcorticale

Ming Zhao rapporta en 2003 avoir observé une neurogenèse dans la substance noire (Zhao et al., 2003), mais ses résultats ne furent pas corroborés par d'autres équipes de chercheurs (Lie et al., 2002; Frielingsdorf et al., 2004). En induisant une surexpression de BDNF par les cellules épendymaires en bordure des ventricules cérébraux, une neurogenèse a été décrite dans le striatum (Benraiss et al., 2001). Les nouveaux neurones ont survécu au-delà de cinq semaines, suggérant que cette structure pouvait devenir permissive pour la neurogenèse si elle surexprimait des facteurs proneurogènes. En outre, il semblerait que chez le lapin, des précurseurs prolifèreraient et se différencieraient avec un assez faible taux de survie dans le noyau caudé ; mais ces données restent à approfondir (Luzzati et al., 2006). Au niveau de la substance blanche subcorticale, la présence de nouvelles cellules neurales a été mise en évidence en 2005 par Noriko Takemura *et al.* ; toutefois les neurones nouvellement générés n'ont pas survécu au-delà d'une semaine (Takemura, 2005). Lorsque des précurseurs de la ZSV sont transférés le long de faisceaux de substance blanche, ils migrent sur de longues distances et sont capables de se différencier en oligodendrocytes en une vingtaine de jours (Cayre et al., 2006).

### 2.3.7 Le complexe vagal dorsal

Le complexe vagal dorsal (CVD) se situe dans le tronc cérébral, au niveau du plancher du IV<sup>e</sup> ventricule. Il englobe trois structures : le noyau du tractus solitaire, l'area postrema et le noyau dorsal moteur du vague qui tous trois sont des centres réflexes du système nerveux autonome. Le CVD est le siège d'une importante plasticité structurale où les expressions de PSA-NCAM, de growth-associated protein-43 (GAP-43, exprimée par les cônes axonaux en croissance) et de BDNF sont élevées, signes de réorganisations synaptiques permanentes (Moyses et al., 2006). L'équipe d'Emmanuel Moyses a démontré en 2005 qu'une neurogenèse survenait *in vivo* dans le CVD chez le rat adulte (Bauer et al., 2005). Une égale proportion de nouveaux neurones et de nouvelles cellules gliales a été observée (Moyses et al., 2006), sans qu'aucune activité apoptotique n'ait été notée (Charrier et al., 2006). Une étude ultérieure menée *in vitro* a permis de confirmer que le CVD contenait une population de précurseurs capables de s'auto-renouveler et de donner naissance aux trois lignages neuronaux distincts : neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Charrier et al., 2006). En relation avec les travaux de M. Kokoeva sur la neurogenèse hypothalamique impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme, cet ensemble de noyaux du CVD pourrait être impliqué dans la régulation à long-terme de la prise alimentaire et des ajustements du seuil de satiété.

Tableau I ZONES de neurogenèse répertoriées dans le système nerveux central du mammifère adulte				
Régions cérébrales	Types cellulaires	Méthodes	Cellules filles	Références
Zone sous-ventriculaire	Type B	<i>in vivo</i>	Type C, astrocytes	Doetsch et al. 1997, 1999, 2002
	Type C	<i>in vivo</i>	Type A	Doetsch et al. 1997, 1999, 2002
	Type A	<i>in vivo</i>	Interneurones, oligodendrocytes	Doetsch et al. 1997, 1999, 2002
	NG2	<i>in vitro</i>	Neurones obtenus dans une étude, non confirmé	Belachew et al. 2003, Aiguirre et Gallo 2004
	Type E (épendymaires)	<i>in vivo</i>	Neurones en conditions lésionnelles uniquement	Carlen et al. 2009
Ventricules latéraux	Précurseurs neuraux	<i>in vivo</i>	Neurones, astrocytes dans le cortex	Gould et al. 1999
	E (épendymaires)	<i>in vivo</i>	Neurones dans l'hypothalamus	Xu et al. 2005
	Précurseurs neuraux	<i>in vivo</i>	Neurones dans la substance noire	Zhao et al. 2003
Ive ventricule	Progéniteurs neuraux	<i>in vivo et in vitro</i>	Neurones dans le striatum	Benraiss et al. 2001
	Précurseurs neuraux	<i>in vivo</i>	Astrocytes, oligodendrocytes	Martens et al. 2002
Canal central (me)	Type E (épendymaires)	<i>in vivo</i>	Astrocytes, oligodendrocytes après lésion	Meletis et al. 2008
	NG2	<i>in vivo</i>	NG2	Horner et al. 2000
	Astrocytes Nestin+	<i>in vitro</i>	Dedifférenciation, multipotence après lésion	Lang et al. 2004
Bulbe olfactif	Type A	<i>in vitro</i>	Neurones, astrocytes, oligodendrocytes	Liu et Martin 2003, Vicario-Abejon et al. 2003
Zone sous-granulaire	Type 1	<i>in vivo</i>	Type 2, astrocytes	Seri et al. 2001, Filippov et al. 2003, Steiner et al. 2006, Suh et al. 2007
	Type 2	<i>in vivo</i>	Type 3, oligodendrocytes, neurones granulaires	Seri et al. 2001, van Praag et al. 2002, Filippov et al. 2003, Steiner et al. 2006, Suh et al. 2007, Jessberger et al. 2008
	Type 3	<i>in vivo</i>	Neurones granulaires	Filippov et al. 2003, Jessberger et al. 2005, Steiner et al. 2006
Structures limbiques	Précurseurs neuraux	<i>in vivo</i>	Neurones, astrocytes	Fowler et al. 2002, Bernier et al. 2002, Liu et al. 2007, Rietze et al. 2010
Cortex	Astrocytes GFAP+	<i>in vitro</i>	Dedifférenciation, multipotence après lésion	Buffo et al. 2008
	NG2	<i>in vivo</i>	Astrocytes, interneurones GABAergiques	Alonso et al. 2005, Dayer et al. 2005
Hypothalamus	Précurseurs neuraux	<i>in vitro</i>	Neurones, astrocytes	Markakis et al. 2004, Kokoieva et al. 2005
Rétine	Précurseurs neuraux	<i>in vitro</i>	Neurones, astrocytes	Engelhardt 2004
Complexe vagal dorsal	Progéniteurs neuraux	<i>in vivo</i>	Neurones, astrocytes	Bauer et al. 2005

Tableau I. Tableau résumant les zones de neurogenèse et de prolifération cellulaire décrites à ce jour dans le système nerveux central du mammifère adulte.

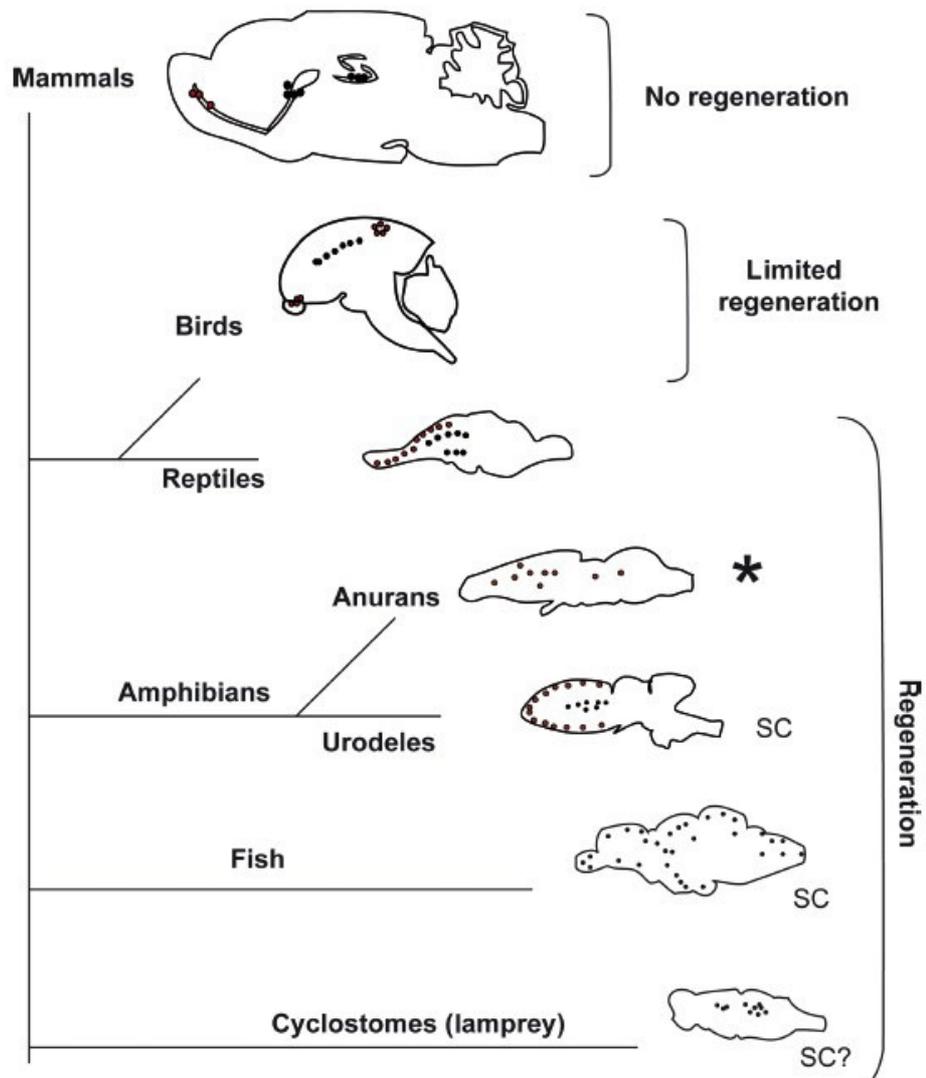
## 2.4 La neurogenèse adulte dans le règne animal

La neurogenèse adulte touche une grande variété d'espèces et n'est pas l'apanage exclusif des mammifères. Elle semble liée à des fonctions sensorielles bénéfiques voire essentielles pour la survie des espèces, ce qui expliquerait qu'elle ait été préservée tout au long de la phylogénèse (voir Figure 8).

En 1985, Pasko Rakic a émis l'hypothèse que la complexité cérébrale n'a pu être acquise qu'aux dépens d'une réduction de la potentialité neurogène. Ainsi, les espèces moins évoluées bénéficieraient d'un système nerveux plus plastique que celles phylogénétiquement supérieures, qui présenteraient davantage de stabilité structurale (Rakic, 1985).

Les cas les plus remarquables de neurogenèse et de plasticité cérébrale se retrouvent chez les amphibiens, dont le système nerveux est capable de se régénérer parfaitement après lésion. Plusieurs zones de neurogenèse secondaire souvent reliées à des structures présentant des homologies avec

l'hippocampe et le bulbe olfactif s'ajoutent à d'autres régions du système nerveux central qui arborent une plasticité remarquable.



Reproduit avec l'autorisation de l'auteur de l'article -  
 Ferretti 2011 Eur J Neurosci 34 :951

**Figure 8.** Dessin schématique résumant les régions neurogènes et où survient une prolifération cellulaire principales décrites chez les vertébrés adultes. Les points noirs sur la figure indiquent les régions où ont été observées une prolifération cellulaire chez l'adulte et les points marron recensent les régions neurogènes du système nerveux central et de la moelle épinière (SC: spinal cord sur le schéma d'origine). L'absence de la mention 'SC' indique l'absence de neurogenèse dans la moelle épinière. L'astérisque indique qu'il n'est à ce jour pas connu de capacités régénératives spontanées. Dans leur ensemble, ces données mettent en avant qu'au cours de l'évolution, le potentiel neurogène et les capacités de régénération du tissu nerveux ont diminué. Il convient de noter que les dessins des encéphales ne sont pas à la même échelle.

Ainsi, l'axolotl est un amphibien capable de restituer entièrement sa queue et sa moelle épinière (Schnapp et al., 2005). Il en est de même du triton, apte à régénérer sa queue, sa mâchoire, ses pattes ou son tissu oculaire (Brockes, 1997). Chez un autre amphibien, la grenouille taureau, plusieurs zones cérébrales semblent renouveler continuellement leur stock de neurones : quatre semaines après l'injection de BrdU, des cellules incorporant ce marqueur de la prolifération cellulaire ont été retrouvées dans les noyaux thalamiques, l'hypothalamus, le tectum optique et le torus semicircularis, structure du mésencéphale propre aux poissons et aux amphibiens (Simmons et al., 2008). Il apparaîtrait que le support cellulaire des nouveaux neurones soit de nature gliale, tout au moins pour la neurogenèse corticale des lézards (Romero-Aleman et al., 2004). Cependant, la régénération tissulaire ne fait pas systématiquement appel au phénomène de neurogenèse : elle se cantonne parfois à une repousse axonale des neurones rostraux au plan d'amputation (Ferretti, 2011). En effet, bien qu'après sa section, la queue du lézard repousse, les capacités neurogènes de la moelle épinière sont en réalité restreintes : la queue nouvellement formée ne se reconstitue pas grâce à la production de nouveaux neurones, mais par l'accroissement des contacts synaptiques et par la repousse axonale des neurones locaux pré-existants (Duffy et al., 1992). En dernier lieu, les régions neurogènes décrites chez les reptiles adultes diffèrent légèrement selon les espèces considérées.

Chez les poissons adultes, certaines zones du système nerveux central sont connues pour produire des neurones (Cayre et al., 2002; Ferretti, 2011). Le poisson dard-perche (zebrafish en anglais), facilement modifiable génétiquement, est l'objet de nombreuses études sur la neurogenèse (Chapouton et al., 2011). Pourvu de cellules gliales de type épendymoglie assimilables à la glie radiaire, son système nerveux central autoriserait la prolifération cellulaire après une lésion au niveau du télencéphale. Outre la survie à long terme des nouveaux neurones générés (2 mois et demi), il ne se formerait pas de cicatrice gliale contrairement à ce qui s'observe dans le même cadre lésionnel chez le mammifère adulte (Baumgart et al., 2012). Ainsi ce modèle représente-t-il un point de comparaison fort intéressant pour la compréhension des mécanismes qui procurent un environnement bénéfique ou non après lésion.

La neurogenèse secondaire du grillon domestique, de la mite, du cafard ou de la punaise asclépiade se situe dans le protocerebrum, et plus spécifiquement dans les corps pédonculés, seule zone neurogène répertoriée chez l'insecte adulte (Cayre et al., 2002). Les corps pédonculés s'inscrivent comme une structure nerveuse extrêmement plastique qui reçoit les entrées sensorielles en provenance des antennes, des palpes labiaux et des yeux. Cette structure est un centre intégratif et multimodal souvent comparé à l'hippocampe des mammifères car il intervient dans l'apprentissage et la

mémoire (Cayre et al., 1996; Mashaly et al., 2008). Plus précisément, les corps pédonculés sont constitués d'un cortex où sont continuellement produits des neuroblastes générant des cellules dites de Kenyon. Une fois matures, celles-ci reçoivent des informations de types visuel et olfactif (Cayre et al., 2007). Il est étonnant de constater que la quantité de nouvelles cellules de Kenyon formées au cours de la vie d'un grillon n'est pas contrebalancée par un phénomène de mort cellulaire, et représente près de 25% du volume total du cortex chez un grillon âgé de 40 jours (Cayre et al., 1996). Le système nerveux du grillon étant plus simple que celui des mammifères, il représente un modèle d'étude de la neurogenèse adulte particulièrement intéressant. De plus, cette dernière serait également modifiée par des facteurs communs à ceux étudiés chez les mammifères (Cayre et al., 2002; Malaterre et al., 2003). Pour conclure, la neurogenèse adulte n'est pas un mécanisme commun à tous les insectes ; ainsi est-elle absente des corps pédonculés de la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*) et de l'abeille (Ito and Hotta, 1992; Fahrbach et al., 1995). Ces particularités remarquables soulignent bien que la neurogenèse n'est pas le mécanisme de plasticité essentiel sous-tendant l'apprentissage et la mémoire chez les insectes, d'autant plus que les abeilles possèdent des comportements sociaux et de navigation hautement élaborés (Cayre et al., 2007). Une niche neurogène existe également chez les crustacés où des cellules néo-formées se différencient en deux types d'interneurones et se projettent vers le lobe olfactif et le lobe accessoire (Schmidt, 2007).

Quant aux oiseaux, ils possèdent un encéphale presque aussi complexe que celui des mammifères. Outre les célèbres travaux de Fernando Nottebohm *et coll.* sur le centre vocal supérieur du chant (Nottebohm, 1981), il a été démontré que le striatum, le lobe parolfactif et la formation hippocampique étaient le siège d'une neurogenèse secondaire chez les canaris (Alvarez-Buylla et al., 1990). D'après certains auteurs, les oiseaux mâles possèderaient une neurogenèse plus importante que les femelles (Margotta and Caronti, 2005). En outre, les espèces stockant de la nourriture auraient une expression de neurogenèse supérieure aux autres, probablement en raison de l'hippocampe qui interviendrait dans la récupération en mémoire du lieu de stockage des denrées alimentaires (Sherry and Hoshoooley, 2010). De surcroît, les oiseaux vivant en liberté possèderaient une neurogenèse hippocampique plus importante que celles des oiseaux élevés en captivité, suggérant fortement l'existence d'un lien entre la neurogenèse et la mémoire spatiale, plus fortement sollicitée en milieu naturel (LaDage et al., 2011).

Il est intéressant de noter que le traitement des informations olfactives et mémorielles semble être un point commun entre les zones de neurogenèse secondaire répertoriées dans le règne animal (Schmidt, 1997; Ferretti, 2011). Par ailleurs, de nombreux autres facteurs tels que la température, la

durée de la photopériode, les conditions environnementales (richesse des stimuli olfactifs, visuels et tactiles) ou l'activité neuronale, seraient d'importants modulateurs de la neurogenèse adulte (Cayre et al., 2002). La neurogenèse secondaire est par conséquent un phénomène de plasticité que l'on retrouve chez de nombreuses espèces en tous points de l'échelle phylogénétique. Elle survient majoritairement dans des structures cérébrales hautement plastiques qui relaient des informations sensorielles ayant trait à la mémoire et/ou à l'olfaction. Par ailleurs des facteurs communs semblent réguler l'expression de la neurogenèse chez des espèces pourtant éloignées.

### Conclusions et éléments-clés

- En conditions physiologiques, le cerveau du mammifère adulte est actuellement connu pour comporter seulement deux zones de neurogenèse continue : la zone sous-ventriculaire en bordure des ventricules latéraux, et la zone sous-granulaire située dans le gyrus dentelé de l'hippocampe.
- Certaines zones cérébrales pourraient accueillir une plus faible neurogenèse continue mais de tels résultats restent à approfondir.
- La neurogenèse survient également dans les structures nerveuses des autres organismes du règne vivant (insectes, amphibiens, poissons, crustacés, oiseaux) sur lesquels les avancées pourraient révolutionner les recherches fondamentales et cliniques.

## **PARTIE 1 - Chapitre 3**

### **Facteurs régulateurs et implications fonctionnelles de la neurogenèse adulte**

---

Il est désormais établi que les performances des individus, leurs comportements, tout comme l'organisation de leurs réseaux neuronaux sont aussi bien gouvernés par l'environnement et l'expérience, que par des signaux physiologiques (Lund, 1978). Chez l'adulte, chaque aspect de la neurogenèse, de la prolifération jusqu'à la survie, en passant par la différenciation et l'intégration fonctionnelle, peut être régulé et modulé. Une constellation de facteurs, intrinsèques et extrinsèques ont ainsi été étudiés dans ce cadre-là. En outre, l'importance fonctionnelle de la neurogenèse et ses implications aux niveaux physiologique, pathologique et comportemental, passionne des équipes de chercheurs depuis les années 1960. Bien que certaines réponses commencent à se dégager avec plus de précision, de nombreuses zones d'ombre demeurent. En effet, plusieurs niveaux sont à distinguer, ainsi que les questions qu'ils génèrent : a) le niveau cellulaire : quels signaux permettent à un précurseur d'entrer en mitose et d'enchaîner avec une rythmique finement paramétrée, toutes les étapes de la neurogenèse jusqu'à l'intégration fonctionnelle des nouvelles cellules dans un réseau préétabli ? b) le niveau intercellulaire : comment dialoguent les différentes cellules d'une niche neurogène ? Quels signaux sont indispensables pour ôter les restrictions anti-neurogènes d'un tissu ? Comment l'emplacement des nouvelles cellules est-il défini au sein d'un réseau ? Quels critères doivent être requis pour qu'un neurone immature survive durablement ? c) le niveau comportemental : quelles sont les possibles répercussions fonctionnelles et/ou comportementales en lien avec cette neurogenèse ? Présente-t-elle de réels bénéfices pour la structure et ses fonctions ? Si oui, sont-ils durables ?

#### **3.1 Régulation de la neurogenèse adulte continue par des facteurs intrinsèques**

L'incorporation continue de nouveaux neurones infère un mouvement perpétuel au sein des réseaux neuronaux du gyrus dentelé et du bulbe olfactif. La différenciation et l'intégration des nouveaux neurones se déroule néanmoins en préservant un équilibre physiologique entre stabilité et plasticité. Parmi les régulateurs intrinsèques répertoriés ci-après, il convient de préciser que les mécanismes d'action pourraient agir de manière plus indirecte que prévu. Par souci de synthèse, nous passerons en revue un certain nombre de ces facteurs, tout en privilégiant ceux qui s'articulent autour de la

problématique des travaux de ce mémoire de thèse (voir *Tableaux II et III*). Nous aborderons par la même occasion certains des aspects fonctionnels de la neurogenèse.

### 3.1.1 Bagage génétique

Gerd Kempermann a été le premier à s'intéresser aux lignées de souris. Il a ainsi mis en évidence les liens existant entre le « bagage génétique » et le taux de la neurogenèse secondaire (Kempermann et al., 1997b). Ainsi certains gènes modulent-ils plus ou moins la prolifération, la survie, ou encore la gliogenèse (Kempermann et al., 2006). D'ailleurs, certaines conditions environnementales, telles que la pratique d'une activité motrice par des rongeurs, ou des tâches d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendantes, augmentent l'expression de *Zif268*, de *C-fos* et d'*Arc*, trois gènes d'expression précoce utilisés comme marqueurs biologiques de l'activité neuronale (Clark et al., 2011). De même, les facteurs de transcription jouent un rôle important dans l'orchestration de la neurogenèse. Régulant l'activation ou l'inhibition des gènes, ils interviennent dans toutes les étapes de la neurogenèse, aussi bien au cours du développement que chez l'adulte en condition physiologiques ou pathologiques. Tel est le cas du CREB pour lequel Katharina Merz a rédigé un article de synthèse détaillé (Merz et al., 2011). Certains messagers chimiques, particulièrement importants au cours du développement embryonnaire et post-natal, sont aussi exprimés au cours de la neurogenèse secondaire ; ils modulent notamment les précurseurs et les progéniteurs neuraux. Parmi eux, *Dlx2* est un facteur de transcription impliqué dans la formation de neurones GABAergiques, aussi bien chez le jeune mammifère que chez l'adulte au niveau des zones de neurogenèse secondaire (Petryniak et al., 2007; Brill et al., 2008). D'autres acteurs, par exemple les ligands Notch autorisent la prolifération, l'auto-renouvellement et la multipotence des précurseurs neuraux ; les peptides Sonic Hedgehog (SHH) stimulent la prolifération cellulaire : ils agissent sur les astrocytes issus de niches neurogènes et peuvent inciter des cellules souches quiescentes à réentrer dans le cycle cellulaire. Une vaste étendue de rôles clés leur a été attribuée au cours des différentes phases de la neurogenèse (Jiao and Chen, 2008). Les glycoprotéines appelées Bone Morphogenetic proteins (BMPs) sont issues des facteurs de transcription du même nom et interviennent essentiellement dans la différenciation des progéniteurs (Palma et al., 2005), alors que les signaux peptidiques de la voie Wnt maintiennent les cellules souches dans un état indifférencié leur permettant de s'auto-renouveler. Ils orchestrent en outre la formation synaptique et la survie neuronale (Michaelidis and Lie, 2008; Moyse et al., 2008; Inestrosa and Arenas, 2010). Pour finir, les composants de la matrice extracellulaire et les molécules d'adhésion cellulaire [*i.e* collagène, laminine, cadhérine, télastatine-C, PSA-NCAM et éphrines] ont été abondamment étudiés

dans le contexte de la neurogenèse adulte et jouent respectivement un rôle sur les étapes de prolifération ou de migration des précurseurs neuraux (Whitman and Greer, 2009).

### 3.1.2 Influences hormonales

L'influence des hormones sur l'expression de la neurogenèse chez les mammifères adultes fait l'objet de nombreuses recherches. Nous citerons quelques-unes des hormones les plus pertinentes dans le contexte de la neurogenèse.

#### a) Œstrogènes

Les œstrogènes, outre leur intervention dans la reproduction sexuelle, favorisent la prolifération cellulaire et la survie des nouveaux neurones. De tels résultats furent en premier lieu obtenus au niveau du centre vocal supérieur de canaris femelles par Fernando Nottebohm et ses collaborateurs (Nordeen and Nordeen, 1989). Chez la rate, le taux de prolifération dans la ZSG augmente lors du proœstrus, quand le pic d'œstrogène est élevé. Ensuite, le nombre de cellules produites diminue proportionnellement à la baisse de la concentration en œstrogènes (Tanapat et al., 1999). Alors que chez des rates ovariectomisées la neurogenèse hippocampique diminue significativement, l'administration d'un traitement à base d'œstradiol restaure ponctuellement la prolifération cellulaire mais ne joue pas sur la survie des cellules néo-formées (Tanapat et al., 1999). Il a aussi été démontré que l'activation des récepteurs aux œstrogènes ER  $\alpha$  ou  $\beta$  améliore la prolifération cellulaire de la ZSG des femelles (Mazzucco et al., 2006). En outre, la prolifération cellulaire croît dans la zone sous-ventriculaire de femelles campagnols mises en présence d'un mâle (Smith et al., 2001). Réciproquement, une ovariectomie empêche cette augmentation malgré la présence d'un mâle, mais elle peut être rétablie grâce à l'administration d'œstradiol. Ces données indiquent que les œstrogènes seraient nécessaires pour que l'odeur d'un mâle génère une augmentation de la genèse des nouvelles cellules dans la ZSV. En outre, il est intéressant de souligner que ces hormones sexuelles facilitent la synaptogenèse, favorisent la production de facteurs de croissance et influencent aussi la libération de neuromédiateurs. Pour finir, les variations de sécrétion de cette hormone agirait sur l'humeur et la cognition (Sundermann et al., 2010).

#### b) Hormone de croissance et insulin-like growth factor I

L'hormone de croissance et l'insulin-like growth factor I (IGF-I) jouent des rôles prépondérants au cours de la vie, régulant notamment le développement du système nerveux central et la myélinisation (Aberg et al., 2006). Chez l'adulte, leur importance est indéniable, intervenant aussi bien à des niveaux

biochimiques que cognitifs. Dans l'ensemble du système nerveux central, les récepteurs de l'hormone de croissance se retrouvent aussi bien à la surface d'oligodendrocytes, d'astrocytes, que de neurones (Lobie et al., 1993). Chez les rongeurs et chez l'homme, ils sont même davantage concentrés dans certaines structures tels que l'hippocampe et l'hypothalamus (Lobie et al., 1993). L'expression d'IGF-I se dissémine également dans l'ensemble de l'encéphale, avec toutefois des pics d'expression transitoires quand certaines régions cérébrales sont le site de croissance dendritique ou axonale (Aberg et al., 2006). Il est fort intéressant de noter qu'outre leurs fonctions neuroprotectrices et antiapoptotique après lésion du système nerveux central (Russell et al., 1998; Takadera et al., 1999), l'hormone de croissance et plus particulièrement l'IGF-I favorisent la prolifération cellulaire non seulement *in vitro*, mais aussi *in vivo* dans le gyrus dentelé et la zone sous-ventriculaire de rongeurs sains (Aberg et al., 2006; McLenachan et al., 2009).

### c) Prolactine

La prolactine est une hormone lactogène libérée durant la grossesse. Elle est ensuite impliquée dans les comportements maternels et de reproduction. Proche de l'hormone de croissance, ces deux hormones possèdent un effet positif sur la prolifération cellulaire des progéniteurs prélevés au niveau cortical sur des fœtus humains (Pathipati et al., 2011). Chez l'adulte, des récepteurs de la prolactine sont d'ailleurs localisés sur les progéniteurs appartenant à des zones neurogènes (Pathipati et al., 2011). Ainsi n'est-il pas étonnant que la prolactine augmente la neurogenèse de la ZSV de souris gestantes (Shingo et al., 2003), favorisant la reconnaissance olfactive de la descendance. En bloquant les pics de prolactine chez des souris gestantes, Larsen et Grattan (2010) ont mis en évidence que la neurogenèse de la ZSV diminue alors que les souris présentent une anxiété maternelle et des difficultés à établir des liens avec leurs souriceaux. Il est particulièrement intéressant de constater que le fait de diminuer uniquement la neurogenèse de la ZSV sans toucher à la sécrétion de prolactine engendre les mêmes conséquences (Manassis et al., 1994; Larsen and Grattan, 2010). En effet, le système olfactif est particulièrement important durant la période d'allaitement des rongeurs nouveau-nés. Des résultats similaires ont été obtenus en mettant des souris femelles en présence de litière souillée de mâles : la neurogenèse de la ZSV a augmenté chez les femelles parallèlement à une augmentation de prolactine (Mak et al., 2007), suggérant que des phéromones odorantes mâles puissent agir sur l'expression de la prolactine dans la ZSV, et subséquemment sur la neurogenèse locale. De plus, une augmentation de la neurogenèse a aussi été observée dans la ZSV et la ZSG de souris mâles mises en présence de leur progéniture (Mak and Weiss, 2010). D'après les auteurs de cette étude, l'accroissement du nombre de nouveaux neurones serait sous-tendu par la prolactine et participerait à la reconnaissance olfactive des souriceaux.

d) Ocytocine

L'ocytocine est une neurohormone entre autre impliquée dans le réflexe d'éjection du lait, l'attachement, l'exploration sociale, les comportements maternels et le choix du partenaire. Il a été démontré qu'elle régulait positivement la neurogenèse de la ZSG et limitait également les effets délétères du stress (Leuner et al., 2012).

e) Testostérone

L'injection de cette hormone masculine par excellence ré-augmente la neurogenèse hippocampique chez des rats castrés dont la neurogenèse était significativement plus basse que celle de rats non castrés (Spritzer and Galea, 2007). Dans la lignée des travaux sur les canaris, Fernando Nottebohm et Arturo Alvarez-Buylla ont mené une étude sur les effets de l'injection de testostérone à court et à long terme sur la neurogenèse du centre vocal supérieur du chant de canaris femelles. Ils ont observé que cette hormone favorisait la survie des nouveaux neurones du centre vocal supérieur, augmentant le volume de la structure et le nombre de neurones marqués à la [<sup>3</sup>H]-thymidine, mais n'influçait pas la prolifération des précurseurs (Rasika et al., 1994). Les quelques études portant sur les liens entre cette hormone sexuelle et la neurogenèse intègrent cependant des facteurs environnementaux tels que le stress ou l'isolation sociale. Relativement peu de données se sont concentrées sur les liens directs entre testostérone et neurogène secondaire chez le mammifère adulte.

f) Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes influencent la physiologie cellulaire et le comportement des individus. Assimilés à l'hormone du stress, ils interviennent dans la modulation de la neurogenèse. Nous reviendrons sur ce point dans la *Partie 3.3.1* de ce même chapitre.

### 3.1.3 Déclinaisons de neuromédiateurs

Les neuromédiateurs sont de petites molécules diffusibles dont les actions sur la genèse, la migration, la différenciation, la survie et l'intégration des nouveaux neurones peuvent être variables, aussi bien au cours du développement que chez l'individu adulte.

a) Acétylcholine

Ce neuromédiateur favoriserait la survie des précurseurs neuraux (Cooper-Kuhn et al., 2004; Ho et al., 2009). Il a été prouvé que la destruction de neurones cholinergiques en bordure des ventricules latéraux diminue d'une part la neurogenèse des zones sous-ventriculaire (ZSV) et sous-granulaire dans

lesquelles ils se projettent, et augmente d'autre part le nombre de cellules apoptotiques (Cooper-Kuhn et al., 2004). Ce phénomène serait médié par les récepteurs nicotiniques qui auraient une action anti-neurogène (Mechawar et al., 2004). De plus, les nouveaux neurones générés dans la ZSG et la ZSV expriment une large variété de récepteurs cholinergiques (Kaneko et al., 2006) ce qui confirmerait le rôle significatif de ce neuromédiateur dans certaines des étapes de la neurogenèse adulte, et plus particulièrement dans la survie cellulaire.

#### *b) Dopamine*

Bien que la contribution de la dopamine au cours de la neurogenèse développementale ait été largement étudiée, son action sur les différentes étapes de la neurogenèse adulte demeure assez imprécise. La dopamine est connue pour réguler la prolifération cellulaire au cours de l'ontogenèse du cerveau du mammifère (Borta and Hoglinger, 2007) : les cinq classes de récepteurs dopaminergiques ; D1-like (D1 et D5) et D2-like (D2, D3, et D4), et plus particulièrement le récepteur D3, sont fortement exprimées au cours du développement, notamment dans les zones germinatives neuroépithéliales du proencéphale basal (Diaz et al., 1997). Chez l'adulte, les données sont encore diffuses et se contredisent souvent selon les récepteurs dopaminergiques considérés. Il semble que l'expression du récepteur D3 persiste fortement dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) (Diaz et al., 1997). Certaines études *in vitro* indiquent que la prolifération des cellules de type C de la ZSV est potentialisée par l'activation de certains types de récepteurs dopaminergiques (D2 ou D3) (Coronas et al., 2004; Hoglinger et al., 2004) tandis que l'activation du récepteur D1 n'a aucun effet sur la prolifération des précurseurs mis en culture cellulaire (Hoglinger et al., 2004).

La plupart des études *in vivo* s'accordent sur l'action positive d'agonistes des récepteurs D2 quant à la prolifération cellulaire au niveau des ventricules latéraux. Il a aussi été démontré avec des protocoles de destruction des afférences dopaminergiques par l'injection de drogues neurotoxiques (6-hydroxytryptamine -6-OHDA), qu'une telle lésion contribuait à diminuer la prolifération cellulaire dans la ZSV (Baker et al., 2004; Winner et al., 2006). Pourtant, il a aussi été décrit que l'activation des récepteurs D2 par la dopamine ou par un agoniste des récepteurs D2, la quinpirole, diminue le nombre de neurosphères issues de cellules de type B. Subséquemment, le blocage chronique des récepteurs D2 par un traitement à l'halopéridol, un antagoniste des récepteurs D1 et D2, augmente le nombre de neurosphères formées (Kippin et al., 2005). Ainsi d'après cette étude, la dopamine serait défavorable à la prolifération des précurseurs neuraux de la ZSV. A ce jour, la littérature scientifique est donc quelque peu en contradiction sur les effets de l'activation ou du blocage des différentes catégories de récepteurs dopaminergiques sur les étapes de la neurogenèse. Elle semble toutefois aller dans le sens d'une

action proneurogène de la dopamine *in vivo* en agissant de concert avec une production locale d'épidermal growth factor (EGF) (O'Keeffe et al., 2009b; Young et al., 2011). En outre, la dopamine intervient majoritairement dans la régulation de l'humeur, des processus motivationnels et de la motricité ; elle représente donc une piste d'exploration fort intéressante pour palier certaines pathologies telles que la dépression, les addictions ou la maladie de Parkinson (voir *Partie 3.3* de ce même Chapitre).

c) *Gamma-aminobutyric acid - GABA*

Le GABA, généralement connu comme neurotransmetteur inhibiteur par excellence, possède au cours du développement une action excitatrice sur les progéniteurs et sur les neurones immatures. Cette propension à dépolariser les cellules se déroule par l'intermédiaire des récepteurs GABA<sub>A</sub> et s'étend chez le rongeur sur deux semaines, période suffisante pour que les récepteurs glutamatergiques entrent en scène. Grâce à un jeu de cotransporteurs cations-chlorures différents de ceux jusqu'alors massivement exprimés sur la membrane plasmique, le GABA exerce ensuite une action inhibitrice (Wang et al., 2002). Au cours du développement, la glie radiaire, qui représente en quelque sorte les cellules souches corticales, est elle-même équipée de récepteurs GABA<sub>A</sub> fonctionnels (LoTurco et al., 1995). Ceci suggère une action importante de ce système neurochimique au cours de la neurogenèse développementale. Etant à l'œuvre bien avant que les synapses deviennent fonctionnelles, le GABA doit remplir un nombre très important de fonctions essentielles, allant de la prolifération jusqu'à l'intégration des nouvelles cellules. Il pourrait même jouer un rôle trophique pour les cellules (Ge et al., 2006; Wang and Kriegstein, 2009). Ce neurotransmetteur possède un rôle majeur dans les zones de neurogenèse. En effet, des récepteurs GABA<sub>A</sub> se retrouvent non seulement à la surface des neurones matures de la ZSV chez le rat adulte, mais aussi sur la membrane plasmique des précurseurs neuraux et des cellules astrocyte-like (Stewart et al., 2002). Dans l'hippocampe, le GABA occupe une position très importante au sein de la connectivité neuronale adulte, favorisant la prolifération et la différenciation des précurseurs en neurones (Tozuka et al., 2005; Jagasia et al., 2006). Il exerce en outre une forte influence sur la vitesse de migration des neuroblastes aussi bien lors du développement (Heck et al., 2007) que chez l'adulte (Bolteus and Bordey, 2004; Ge et al., 2006).

d) *Glutamate*

La littérature scientifique relative aux effets du glutamate sur la neurogenèse adulte est contradictoire. Certaines études ont montré que l'activation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) favorise la neurogenèse hippocampique, alors qu'elle possède un effet opposé sur la prolifération cellulaire de la zone sous-ventriculaire, diminuant drastiquement le nombre de cellules

BrdU<sup>+</sup> (Joo et al., 2007 ; Mochizuki et al., 2007). Cependant, il a aussi été décrit que le blocage des récepteurs NMDA par des antagonistes glutamatergiques - MK-801 ou CGP 37849 - accroît le nombre de cellules nouvellement générées dans l'hippocampe (Cameron et al., 1995). De plus, la prolifération cellulaire de la ZSG augmente après la lésion de la voie perforante, voie de nature glutamatergique afférente au gyrus dentelé (Gould et al., 1994; Cameron et al., 1995). Ceci suggère que le glutamate pourrait avoir un effet anti-neurogène. Néanmoins chez la souris, la même lésion induit non pas une hausse de la prolifération cellulaire, mais une augmentation ponctuelle de la survie neuronale (Gama Sosa et al., 2004). Les relations exactes entre les récepteurs NMDA et la modulation de la neurogenèse ne sont donc pas encore clairement élucidées ; il serait possible que l'entrée de calcium consécutive à l'ouverture des canaux ioniques de ces récepteurs active des voies de signalisation aux répercussions complexes et indirectes sur la neurogenèse (Whitney et al., 2009). L'activation des autres types de récepteurs glutamatergiques induirait également des effets contrastés sur la modulation de la neurogenèse (Bengzon et al., 1997; Bernabeu and Sharp, 2000; Baskys et al., 2005). Ces données, souvent opposées, suggèrent que les sous-unités des récepteurs glutamatergiques joueraient un rôle non négligeable dans le potentiel neurogène des neurones qui en seraient porteurs. Ainsi, lorsque des entrées excitatrices seraient sollicitées ou que des processus inflammatoires conduiraient à une importante libération de glutamate, les différentes assemblées de récepteurs glutamatergiques permettraient de réguler assez finement les étapes de la neurogenèse secondaire.

#### e) *Histamine*

Peu de données existent à ce jour sur les liens entre l'histamine et la neurogenèse. Chez l'embryon, les précurseurs neuraux et les neurones différenciés localisés dans le cortex cérébral seraient porteurs des trois types de récepteurs histaminergiques H1, H2 (post-synaptiques) et H3 (pré-synaptique) (Molina-Hernandez and Velasco, 2008). Ils seraient donc sensibles à l'action de l'histamine au niveau central. Anayansi Molina-Hernandez et ses collaborateurs ont étudié *in vitro* les effets de diverses concentrations d'histamine sur des précurseurs neuraux prélevés chez des rats au 14<sup>e</sup> jour de l'embryogenèse (E14). Leurs résultats révélèrent que l'histamine facilitait la prolifération cellulaire et augmentait de trois fois le nombre de nouveaux neurones. Un autre résultat intéressant est à signaler : l'histamine a diminué la différenciation gliale et a favorisé la différenciation neuronale (Molina-Hernandez and Velasco, 2008). Reste à savoir si de telles propriétés restent effectives chez l'animal adulte. Andrew Foley a mis en évidence des effets promnésiants d'un antagoniste histaminergique de l'autorécepteur H3, le GSK189254, lors de tâches de discrimination olfactive et dans des épreuves de water-maze chez le rat. Bien qu'il n'ait pas été démontré d'incidence sur la prolifération des cellules BrdU<sup>+</sup> dans le gyrus dentelé des rats adultes, deux résultats dignes d'intérêt se sont dégagés : la survie

des progéniteurs neuraux a été augmentée, et une hausse de PSA-NCAM a été décelée dans le gyrus dentelé des animaux. Il a été envisagé que cette molécule d'adhésion cellulaire puisse faciliter la migration et l'intégration des nouveaux neurones (Foley et al., 2009). Une récente étude a de surcroît mis en avant l'action facilitatrice de l'histamine sur la différenciation neuronale de progéniteurs contenus dans la ZSV de la souris adulte (Bernardino et al., 2012).

*f) Noradrénaline*

La noradrénaline fait partie des neuromédiateurs dont les niveaux de concentrations fluctuent sous l'effet du stress ou encore de traitements antidépresseurs. En effet, la plupart des traitements antidépresseurs agissent sur le système sérotoninergique et noradrénergique. En cultivant des précurseurs neuraux de type 2 issus de la ZSG, des chercheurs ont récemment montré que la noradrénaline augmentait le nombre de précurseurs en agissant via les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques. Ces effets ont été confirmés par l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes sélectifs des récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénergiques (Masuda et al., 2012). Dans une autre étude, l'injection intrahippocampique d'un agoniste des récepteurs  $\beta$ 3-adrénergiques a accru également le nombre de précurseurs dans la ZSG. De plus, la prolifération cellulaire des précurseurs de la ZSG a significativement augmenté grâce à l'administration d'un traitement antidépresseur bloquant la recapture de la noradrénaline mais non celle de la sérotonine (Jhaveri et al., 2010). Ainsi la noradrénaline ferait partie des facteurs qui amplifient la prolifération cellulaire des précurseurs situés dans la ZSG, via les récepteurs  $\beta$ 2- et  $\beta$ 3-adrénergiques. La noradrénaline aurait aussi un effet stimulateur sur la neurogenèse du bulbe olfactif en protégeant les nouveaux neurones contre l'apoptose (Bauer et al., 2003). A ce jour toutefois, les liens directs entre ce système neurochimique et la neurogenèse adulte demeurent relativement incomplets.

*g) Sérotonine*

La sérotonine (5HT) possède une grande variété de récepteurs sur lesquels agir, et par conséquent, un vaste répertoire d'actions. Le système sérotoninergique, dont les neurones sont localisés dans le noyau du raphé, diffuse à travers tout l'encéphale, si bien que tout dysfonctionnement de ce système neurochimique peut favoriser l'émergence de certaines pathologies ou les aggraver, les plus connues étant la dépression et l'anxiété. Dans la ZSV et dans la ZSG, la sérotonine favoriserait la neurogenèse (Brezun and Daszuta, 1999). En outre, au niveau hippocampique les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS), qui augmentent la concentration synaptique locale en sérotonine, sont connus pour améliorer les symptômes dépressifs tout en amplifiant la prolifération cellulaire de la ZSG (Malberg et al., 2000). De nombreuses expériences utilisant des drogues sérotoninergiques combinées à d'autres facteurs (souris knockout 5HT1AR<sup>-/-</sup>; facteurs

environnementaux ; modèles de souris dépressives ou stressées) ont permis de peaufiner les données allant dans le sens d'une action proneurogène de la sérotonine. Il convient cependant de mentionner qu'au vu de la diversité des sous-types de récepteurs existant, des effets différentiels ont pu être constatés (Czeh et al., 2001).

*Ainsi, les systèmes neurochimiques les plus connus concourent de manière collective aux multiples étapes de la neurogenèse adulte. Il semble tout à fait plausible qu'un dysfonctionnement survenant à l'échelle d'un de ces systèmes puisse engendrer des pathologies, ou que l'émergence d'une pathologie ou d'une maladie neurodégénérative puisse affecter directement ces systèmes de neurotransmetteurs.*

### **3.1.4 Facteurs neurotrophiques**

Les facteurs neurotrophiques sont des peptides dont le pouvoir d'action est particulièrement important pour la neurogenèse développementale et adulte. S'ils facilitent la croissance dendritique, ils promeuvent aussi la survie des neurones post-mitotiques (Kirschenbaum and Goldman, 1995) et possèdent des effets proneurogènes ainsi qu'anti-apoptotiques (Altar et al., 1997 ; Pencea et al., 2001). On recense plus d'une vingtaine de facteurs neurotrophiques, dont quelques uns intéressent plus particulièrement les recherches sur la régulation de la neurogenèse. L'Epidermal Growth Factor (EGF) et le Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) sont les plus connus et sont très fréquemment employés dans les protocoles de culture cellulaire. Tous deux possèdent un pouvoir mitogène *in vitro*, favorisant la prolifération cellulaire massive des précurseurs mis en culture (Reynolds and Weiss, 1992). L'EGF a même été désigné comme capable de convertir des progéniteurs en cellules multipotentes (Doetsch et al., 2002). De plus, l'expression des récepteurs de l'EGF diminue au cours de l'existence (Enwere et al., 2004) et le retrait de l'EGF du milieu de culture induit la différenciation des précurseurs. Sa surexpression, en revanche, stimule la production d'oligodendrocytes dans la ZSV de souris saines et aussi de souris démyélinisées (Aguirre et al., 2007). Parmi les autres facteurs neurotrophiques connus pour leur action neurogène, le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est aussi régulièrement cité dans la littérature scientifique. Sécrété notamment lors de l'angiogenèse, il possède une incidence sur la prolifération cellulaire des précurseurs neuraux (voir *Partie 3.1.5* ci-après). Le Transforming Growth Factor (TGF) et le Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) favorisent la prolifération des cellules de la ZSV, de la ZSG et d'autres structures telle que l'hypothalamus (Craig et al., 1996; Emsley and Hagg, 2003; Kokoeva et al., 2005). Les neurotrophines agissent pour leur part via des récepteurs à tyrosine kinase Trk, et des récepteurs p75. Lorsque l'on infuse ou que l'on injecte directement du Brain Derived

Neurotrophic Factor (BDNF) dans les ventricules latéraux de rats, non seulement la neurogenèse de la ZSV et de la ZSG augmente, mais de nouveaux neurones sont aussi produits dans des zones non-neurogènes telles que le striatum et l'hypothalamus (Benraiss et al., 2001; Pencea et al., 2001; Chmielnicki et al., 2004). Le BDNF joue de surcroît un rôle important dans la plasticité synaptique durant l'apprentissage (Minichiello et al., 2002). En outre, il a été prouvé que les traitements antidépresseurs augmentent la quantité de BDNF dans le cerveau (Duman and Monteggia, 2006) et réciproquement, que le BDNF accroît l'activité sérotoninergique (Siuciak et al., 1996). Certains facteurs extrinsèques que nous détaillerons dans la partie suivante (3.2) semblent jouer un rôle sur la concentration en BDNF, et avoir par cet intermédiaire une répercussion sur la neurogenèse adulte (Suh et al., 2009). Quant aux autres neurotrophines (Nerve Growth Factor, NGF ; Neurotrophin-3, NT3 ; Glial Derived Nerve Factor, GDNF) leur impact exact sur la neurogenèse reste encore à affiner mais les données actuelles indiquent qu'elles agissent positivement sur la prolifération cellulaire, notamment dans la ZSV (Fiore et al., 2002; Bath and Lee, 2010).

### 3.1.5 Les bienfaits de la niche vasculaire

Dans les niches neurogènes, les astrocytes, les cellules endothéliales et les précurseurs sont très souvent associés en grappes au voisinage des vaisseaux sanguins. Le concept de niche neurovasculaire a émergé voilà plus de 10 ans avec les travaux de Caroline Leventhal (Leventhal et al., 1999) suivis de près par ceux de Theo Palmer (Palmer et al., 2000). Ce dernier a émis l'hypothèse que des cellules endothéliales puissent être en réalité des précurseurs neuraux dans la ZSG. Il a rapporté dans sa célèbre étude parue en 2000 que près de 37% des cellules en prolifération étaient des précurseurs endothéliaux qui s'amassaient près des vaisseaux sanguins. Neurogenèse et angiogenèse collaboreraient par l'intermédiaire de signaux tels que le VEGF, le BDNF ou encore le GABA (Palmer et al., 2000; Saghatelian, 2009). Caroline Leventhal et ses collaborateurs ont montré que les cellules endothéliales sécrétaient du BDNF dans la niche neurogène de la ZSV, ce qui fut ultérieurement confirmé par les travaux de Marina Snapyan (Leventhal et al., 1999; Snapyan et al., 2009). La présence de ce facteur neurotrophique pourrait donc promouvoir un effet proneurogène sur les précurseurs résidant dans la niche et les guider dans leur migration (Snapyan et al., 2009). Certaines études ont aussi démontré qu'une concentration élevée de VEGF augmentait les taux de neurogenèse et d'angiogenèse hippocampiques, ce qui pourrait être relié à l'amélioration des performances des rongeurs soumis à des tests d'évitement passif ou au water maze (Jin et al., 2002; Cao et al., 2004). Lorsqu'en revanche le VEGF est bloqué, les effets positifs normalement engendrés par un environnement enrichi et une activité physique sont annihilés (Fabel et al., 2003; Cao et al., 2004). De

plus, dans les zones neurogènes du rongeur, les récepteurs 2 (Flk1) du VEGF sont exprimés sur des précurseurs neuraux (Jin et al., 2002) et l'infusion de VEGF dans les ventricules latéraux accroît la survie cellulaire dans la ZSG et la ZSV du rat adulte (Schanzer et al., 2004). Enfin, un phénomène remarquable est à signaler : il semblerait que les neuroblastes soient capables de migrer le long de vaisseaux sanguins en conditions physiologiques et pathologiques (Bovetti et al., 2007; Saghatelian, 2009; Snayyan et al., 2009). Cette migration vasophile leur conférerait alors une vitesse de déplacement fort avantageuse qui, notamment dans le cas d'une ischémie du striatum, permettrait aux neuroblastes de la ZSV d'atteindre le site lésionnel -estimé à environ 450  $\mu\text{m}$  (Yamashita et al., 2006).

### 3.1.6 Communication astrocytaire

Initialement considérées comme de la simple glue pour le tissu nerveux, les cellules gliales se sont révélées à la fin du XX<sup>e</sup> siècle comme essentielles à l'homéostasie cérébrale. Les astrocytes particulièrement, sont d'importants acteurs polyvalents qui veillent au bon équilibre homéostatique du tissu et contribuent au potentiel neurogène d'une niche (Mori et al., 2005). Outre leurs multiples fonctions (réguler le pH, apporter les nutriments essentiels aux neurones, faire tampon avec la concentration extracellulaire d'ions potassium ou de glutamate, ou encore participer à l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique), ils régulent l'activité neuronale, la synaptogenèse et la prolifération des précurseurs du gyrus dentelé (Ullian et al., 2001; Song et al., 2002; Nedergaard et al., 2003). Ils prennent en charge les neurones nouveau-nés et leur procurent un environnement favorable grâce à la sécrétion de facteurs bénéfiques tel que Sonic Hedgehog (SHH) qui possède notamment un rôle mitogène (Song et al., 2002). Les astrocytes peuvent aussi moduler l'action des neurotransmetteurs, notamment en agissant sur le GABA et son récepteur ionotrope GABA<sub>A</sub> dont ils sont porteurs. Des études conduites *in vitro* indiquent que si des précurseurs sont mis en culture avec des astrocytes issus de la ZSV, ils mûrissent en neurones fonctionnels (Lim and Alvarez-Buylla, 1999), même en présence d'astrocytes morts provenant de la ZSG, soulignant par conséquent leur rôle proneurogène (Song et al., 2002). Depuis les travaux de Fiona Doetsch (Doetsch et al., 1999a), il semblerait que certains types d'astrocytes soient des précurseurs capables de générer de nouveaux neurones. Certaines études ont mis en évidence que les populations d'astrocytes diffèrent selon le tissu nerveux dans lequel ils résident, et qu'ils disposent alors d'un pouvoir neurogène ou pas (Horner and Palmer, 2003; Wallraff et al., 2004). A l'intérieur même de la ZSV, la répartition des cellules de type B est finement organisée (Beech et al., 2004; Merkle et al., 2007), suggérant qu'il existe une régionalisation astrocytaire en étroite relation avec les compétences du tissu (Song et al., 2002).

### 3.1.7 Cellules microgliales en conditions physiologiques

Les cellules microgliales possèdent une origine hématopoïétique. Elles constituent en quelque sorte une barrière auto-immune pour le système nerveux central où elles jouent un rôle de vigile. En effet, dotées d'une mobilité remarquable, elles se déplacent dans l'ensemble du tissu et évaluent constamment l'état du microenvironnement local (Nimmerjahn et al., 2005). Dans la zone sous-granulaire du rongeur adulte, leur mobilisation permet de réguler le nombre de nouvelles cellules produites (Sierra et al., 2010). En effet, grâce au phénomène de phagocytose, les cellules microgliales éliminent en quelques heures les progéniteurs intermédiaires apoptotiques. En outre, il a été montré grâce à des souris immuno-déficientes que la présence de cellules microgliales et de lymphocytes T dans la zone sous-granulaire est importante pour le bon déroulement de la neurogenèse continue (Ziv et al., 2006). Ces cellules particulières créeraient de surcroît un environnement cellulaire favorable à l'apprentissage spatial et à la mémorisation, dialoguant notamment avec le BDNF. Jusqu'à présent peu de données ont été collectées quant à leur rôle en conditions physiologiques car ces cellules entrent véritablement en scène dans des conditions pathologiques. Nous développerons ce point dans la *Partie 3.3.9*.

*Ainsi la composition de l'environnement moléculaire et cellulaire proche est-elle prépondérante pour que la neurogenèse secondaire puisse exister et se dérouler de manière optimale. Les divers acteurs se relaient et se conjuguent les uns avec les autres dans une harmonie où le moindre dérèglement peut entraver tout le processus. Pourtant, cette complexité extraordinaire dépasse encore le niveau cellulaire. En effet, des facteurs extrinsèques à l'organisme modulent également la neurogenèse adulte.*

## 3.2 Facteurs environnementaux

### 3.2.1 Vieillesse

Le vieillissement est un processus physiologique associé à un déclin général de l'organisme et à une altération progressive des fonctions cognitives et motrices. Ses effets touchent asynchroniquement les différentes aires cérébrales et dépendent fortement du mode de vie de l'individu. Le vieillissement se situe ainsi à l'interface des facteurs extrinsèques et physiologiques. Si le point de départ de l'âge adulte peut correspondre à la maturation sexuelle, celui du vieillissement dépend des espèces considérées. En fonction des différentes périodes de la vie, la neurogenèse chez les mammifères peut fluctuer (Amrein et al., 2004). Lorsque l'on compare des souris âgées à des souris jeunes adultes, les nouvelles cellules de la ZSG prolifèrent moins et se différencient davantage en cellules gliales qu'en neurones (Lee et al., 2012). Ce phénomène pourrait être en partie lié à l'augmentation du niveau basal de

glucocorticoïdes au cours du vieillissement (Lupien et al., 1994), d'autant plus que la réduction de ce paramètre a pour effet de rehausser le nombre de nouveaux neurones granulaires produits dans le gyrus dentelé (Cameron and McKay, 1999). Parmi les autres facteurs susceptibles d'affecter la prolifération cellulaire chez l'individu vieillissant, il a récemment été établi que la circulation sanguine pourrait contenir des cytokines capables de moduler la neurogenèse hippocampique. En effet, outre une diminution du nombre de cellules répondant positivement à la doublecortine (DCX<sup>+</sup>) ainsi que des troubles de l'apprentissage et de la mémoire, les souris âgées présentent de fortes concentrations sanguines de chémokines C-C motif ligand 11 (CCL11, appelée aussi eotaxin-1). L'administration intrapéritonéale de CCL11 à des souris jeunes adultes diminue alors le nombre de cellules DCX<sup>+</sup> dans le gyrus dentelé et entrave certaines fonctions cognitives (Villeda et al., 2011). Par ailleurs, des progéniteurs exposés *in vitro* au sérum sanguin de souris âgées prolifèrent deux fois moins qu'en présence du sérum de jeunes souris. Enfin, l'injection de CCL11 (par voie intrapéritonéale) chez les jeunes souris entrave les performances dans les tests comportementaux hippocampo-dépendants (Villeda et al., 2011). Ces données suggèrent que la diminution du nombre de nouveaux neurones dans la ZSG, ainsi que la baisse de certaines capacités cognitives chez les souris âgées pourraient en partie être imputables à la présence de chémokines CCL11 dans la circulation sanguine. Il serait possible également que la réduction du nombre de neurones nouvellement formés dans une région cérébrale donnée soit attribuable à un ralentissement du cycle cellulaire des précurseurs en division accentuant leur quiescence, plutôt qu'à une nette diminution de la population de précurseurs (Goldman et al., 1997; Hattiangady and Shetty, 2008; Ahlenius et al., 2009). En effet, même chez des individus âgés, le taux de neurogenèse reste détectable (Kempermann et al., 2002) et *in vitro* les précurseurs de souris âgées continuent à donner naissance à des neurones fonctionnels (Ahlenius et al., 2009). Certaines études ont même rapporté que chez des rongeurs et des primates jeunes adultes, l'expression de la neurogenèse reste quasiment constante tout au long de leur vie (Kempermann, 2011c). Néanmoins, au cours du vieillissement, le métabolisme se modifie ; l'organisme produit davantage de corticostérone chez les rats vieillissant que chez les rats plus jeunes (Sapolsky, 1992). Les capacités régénératrices du tissu pourraient donc diminuer parallèlement à des modifications survenant à l'intérieur des niches neurogènes. Il a effectivement été mis en évidence que dans les niches germinales de la drosophile - ovaires et testicules - le nombre de cellules souches germinales et leur capacité de prolifération diminue avec l'âge. De manière concomitante se produisent des déclin de l'expression de certains marqueurs moléculaires tels que le bone morphogenetic protein (BMP) ou encore la DE-cadherin, tous deux importants pour la maintenance des cellules souches (Merkle et al., 2007). Il est peut-être envisageable que de tels phénomènes se produisent au niveau des niches cérébrales chez le mammifère vieillissant. Sous l'effet de l'âge, de nombreux changements neurochimiques et structuraux surviennent, comme la

diminution de la concentration de dopamine et du nombre de projections cholinergiques actives, la baisse de la densité synaptique, ou encore de la concentration en BDNF dans l'hippocampe (Lapchak et al., 1993; Hayashi et al., 2001; Segovia et al., 2009). Ainsi, en l'absence de quantité suffisamment élevées de BDNF, certaines zones cérébrales pourraient manquer de facteurs trophiques alimentant la survie neuronale, ce qui favoriserait la dégénérescence cellulaire (Hock et al., 2000). Il a été aussi observé qu'un amoindrissement de l'angiogenèse et de l'efficacité des cellules gliales survenait dans les niches des souris âgées (Bernal and Peterson, 2011; Lee et al., 2011). Des souris âgées (18 mois) déficientes pour la GFAP et la vimentine (GFAP<sup>-/-</sup> Vim<sup>-/-</sup>) possèdent une prolifération et une survie cellulaires supérieures de 30% à celles des souris non modifiées génétiquement (Larsson et al., 2004). Ces données, recueillies dans le gyrus dentelé, supposent que l'astrogenèse des souris vieillissantes serait l'un des facteurs restreignant la neurogenèse secondaire. En outre, la diminution des concentrations de VEGF et de FGF-2 pourraient participer au déclin de la neurogenèse. Il est intéressant de souligner qu'au-delà des fluctuations de l'expression de la neurogenèse, la densité d'épines dendritiques des nouveaux neurones produits dans la zone sous-granulaire reste identique au cours du vieillissement des souris (Morgenstern et al., 2008) ; la fonctionnalité de la neurogenèse semble donc demeurer somme toute optimale. Chez l'humain, au niveau du bulbe olfactif, la quantité de neuroblastes résidant varierait extrêmement d'un individu à l'autre. Certains auteurs ont envisagé que ce paramètre pourrait être un prédicteur de longévité chez la personne âgée, voire un outil diagnostique supplémentaire pour détecter la démence d'Alzheimer (Elsner, 2001).

### 3.2.2 Environnement enrichi et activité physique

En 1962, Mark Rosenzweig et ses collaborateurs découvrirent l'influence bénéfique d'un environnement enrichi sur la plasticité cérébrale de rats adultes (Rosenzweig et al., 1962). Ainsi apparurent les premières données concernant l'influence d'un type d'environnement (sauvage *versus* en captivité) sur le fonctionnement du cerveau, son anatomie, les capacités d'apprentissage ou encore les capacités mnésiques. L'équipe de Fernando Nottebohm a aussi montré que chez les mésanges à tête noire (*Parus atricapillus*), le nombre de nouveaux neurones de l'hippocampe diminue lorsque qu'elles demeurent en captivité durant 6 semaines après l'injection de [<sup>3</sup>H]thymidine, comparativement aux mésanges ayant évolué librement dans la nature au cours de la même durée (Barnea and Nottebohm, 1994). En 1997, des résultats similaires furent obtenus chez le rongeur. En plaçant des souris dans un environnement enrichi constitué d'une cage plus spacieuse, de plusieurs congénères et de nombreux objets, tunnels, plateformes et jouets, Gerd Kempermann démontra que le nombre de précurseurs neuraux, ainsi que leur durée de vie augmentent par rapport aux souris contrôles placées

dans des cages standards (Kempermann et al., 1997a). En outre, les animaux élevés dans cet environnement enrichi obtiennent de meilleures performances aux tests d'apprentissage spatial, suggérant un rôle fonctionnel pour ces nouveaux neurones. Il a également été observé qu'un environnement enrichi augmente le nombre d'épines dendritiques, de synapses et la longueur de l'arborisation dendritique (van Praag et al., 2000) et module les systèmes neurochimiques dopaminergique, cholinergique, sérotoninergique et glutaminergique (Segovia et al., 2009). Par ailleurs, des souris élevées à partir de leur 21<sup>e</sup> jour post-natal dans un environnement enrichi durant 10 semaines (Post-natal day, P21 - P89) ont ensuite été placées dans une cage standard durant les 3 mois suivants. A P158, les résultats ont révélé qu'elles possédaient une neurogenèse plus importante dans la ZSG que les souris du groupe contrôle qui n'avaient connu qu'une cage standard (Kempermann and Gage, 1999; Brown et al., 2003). Ces données ont ainsi établi qu'un environnement enrichi connu relativement tôt dans la vie engendre des effets structuraux à long terme. De surcroît, de telles conditions environnementales tendraient à diminuer la mort apoptotique des neurones néo-formés dans la ZSG (Young et al., 1999). Il convient de noter que l'augmentation de l'expression de la neurogenèse se situe seulement dans l'hippocampe et ne concerne ni la ZSV ni le bulbe olfactif (Brown et al., 2003). Quel serait donc le substrat neurochimique de ces changements structuraux ? Il semblerait que la complexité de l'environnement et des stimulations diverses et répétées rehausseraient la quantité de neurotransmetteurs et de facteurs trophiques libérés dans le tissu nerveux (Falkenberg et al., 1992; Young et al., 1999; van Praag et al., 2000; Cayre et al., 2009).

En outre, il a été mis en évidence que la pratique d'une activité physique régulière contribue à diminuer les risques de contracter des maladies cardio-vasculaires, du diabète et de l'hypertension, qui peuvent d'ailleurs favoriser l'émergence de désordres cognitifs. Chez les rongeurs, la pratique régulière d'une activité physique (grâce à une roue placée dans la cage) augmente l'expression de la neurogenèse dans la ZSG. Cet effet proneurogène se prolonge tout au long de la vie de l'animal (Kronenberg et al., 2006) et pourrait notamment s'expliquer par un accroissement local de la libération de BDNF (Lee et al., 2000; Russo-Neustadt et al., 2004; Rossi et al., 2006), d'insulin-like growth factor-1 (IGF1) et de FGF-2 (Gomez-Pinilla et al., 1997; Carro et al., 2000) parallèlement à une baisse de l'expression de facteurs proinflammatoires (Cotman et al., 2007). L'exercice physique modifie également le métabolisme énergétique et stimule la production de certaines hormones telle l'hormone de croissance (Blackmore et al., 2009), ce qui contribuerait à l'augmentation du nombre de précurseurs neuronaux dans la ZSG. Combiner alors un environnement enrichi avec de l'exercice physique potentialiserait les effets proneurogènes de ces deux facteurs (Fabel et al., 2009) et pourrait compenser les effets délétères de certaines conditions pathologiques comme la consommation abusive d'alcool,

une ovariectomie, des lésions de l'hippocampe ou un accident vasculaire cérébral (Chen et al., 2006; Hicks et al., 2007; Jin et al., 2008; Helfer et al., 2009). Enfin, un environnement enrichi combiné ou non à une activité physique permettrait de stimuler la neurogenèse hippocampique des rongeurs âgés (Kempermann et al., 2002; van Praag et al., 2005).

### 3.2.3 Interactions sociales et rapports hiérarchiques

Les interactions sociales au sein d'une cage de rongeurs modifieraient l'expression de la neurogenèse dans la zone sous-granulaire (ZSG). En effet, des femelles campagnols mises en présence d'un mâle pour l'accouplement présenteraient une augmentation de nouvelles cellules générées dans l'hippocampe, l'hypothalamus et la zone sous-ventriculaire (ZSV) (Smith et al., 2001; Fowler et al., 2002). Cependant ces résultats sont à relier avec la cascade de réactions hormonales liées à l'œstrus des femelles et aux interactions connexionnelles entre le système olfactif et l'amygdale. En effet, il a été montré que la neurogenèse de la ZSG et de la ZSV augmentait chez les femelles souris mises en présence de congénères mâles. De plus, les femelles manifestaient une préférence pour l'odeur du mâle dominant comparativement à celle du mâle subalterne (Mak et al., 2007). Cette préférence a été abolie par l'infusion d'AraC, qui supprima les proliférations cellulaires respectives de la ZSG et de la ZSV. Ainsi, la neurogenèse pourrait, à un certain niveau, participer à la sélection du partenaire chez la souris. Néanmoins, la drogue antimétabolique ayant bloqué simultanément les deux zones de neurogenèse continue, il est difficile d'aller plus avant dans l'interprétation de ces résultats (Lau et al., 2011). En 2010, Rebecca Fox et ses collaborateurs testèrent sur la mésange de Gambel (*Poecile gambeli*) l'incidence des facteurs « groupe » et « sexe » sur le volume, le nombre de cellules néo-formées et le nombre total de neurones de la formation hippocampique. Pour cela, différents groupes expérimentaux furent constitués (mâles et femelles mélangés ou non, tailles variable dans les différents groupes) et comparés avec des animaux isolés. Les données recueillies ont révélé qu'aucune différence significative n'avait émergé entre les animaux, sous-entendant ainsi que la composition d'un groupe, ainsi que sa taille n'avaient pas d'incidence sur la neurogenèse de la ZSG ni sur le volume de la structure (Fox et al., 2010). Ces données sont peut-être spécifiques aux mésanges, qui ne sont pas des animaux vivant dans des communautés semblables à celles des rongeurs. Elizabeth Gould et Yevgenia Kozorovitskiy ont quant à elles examiné l'impact des rapports de dominance et de soumission dans des groupes de rats. L'examen minutieux de leur formation hippocampique, des niveaux de corticostérone, et du poids général de l'ensemble des rats a révélé qu'ils étaient tous trois comparables quels que soient les groupes d'animaux. Pourtant, les mâles dominants possédaient davantage de nouvelles cellules dans leur ZSG que leurs congénères au bas de l'échelle hiérarchique. Ces résultats indiquent

alors chez les animaux vivant en collectivité, ce n'était pas tant la concentration en corticostérone (et donc le niveau de stress) qui pouvait être responsable de modifications de la neurogenèse hippocampique, mais plutôt une combinaison de différents facteurs (Kozorovitskiy and Gould, 2004).

### 3.2.4 Diète et nutrition

La restriction calorique consiste à diminuer d'un tiers l'apport calorique journalier tout en évitant les carences alimentaires. Depuis les années 1990, de nombreuses publications ont vanté les bénéfices d'un tel régime sur la santé, le diabète, le stress, l'apprentissage ou encore la mémoire. Il accentuerait la résistance aux dommages causés par l'oxydation des cellules et augmenterait significativement la longévité des individus (rats, souris, drosophile, nématode, singe rhésus) (Colman et al., 2009; Qiu et al., 2010). Il a en outre été démontré que chez des souris soumises à une diète restrictive, la prolifération cellulaire de la ZSG augmentait proportionnellement à la concentration en facteurs neurotrophiques comme le BDNF et le NT3 (Lee et al., 2002; Bondolfi et al., 2004; Kumar et al., 2009). De la sorte, les effets neuroprotecteurs, ainsi que les meilleures performances à des tests d'apprentissage et de mémorisation attribués à une diète calorique pourraient s'expliquer en partie par l'augmentation des concentrations en facteurs neurotrophiques dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Stewart et al., 1989; Duan et al., 2001). Même si une restriction calorique limitée semble améliorer les fonctions cognitives, les conditions du vieillissement ainsi que les symptômes de certaines maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson chez différentes espèces animales (Duan and Mattson, 1999; Zhu et al., 1999; Martin et al., 2006; Witte et al., 2009), l'ensemble des données recueillies à ce jour est insuffisant, notamment chez l'être humain, et nécessite de plus amples investigations.

### 3.2.5 Effets de la nicotine

Bien qu'il soit notoire que la nicotine possède des effets stimulants sur l'apprentissage et la mémoire (Heishman, 1999) et que cette drogue confère un effet neuroprotecteur sur les neurones matures, Nora Abrous et ses collaborateurs ont constaté pour la première fois des effets négatifs se répercutant sur les nouvelles cellules de la zone sous-granulaire (ZSG). En effet, chez des rats ayant l'opportunité de s'auto injecter quotidiennement de la nicotine, la neurogenèse diminue parallèlement à une augmentation locale de la mort cellulaire (Abrous et al., 2002). Des résultats similaires ont été ultérieurement rapportés par d'autres équipes de recherche (Shingo and Kito, 2005 ; Scerri et al., 2006; Bruijnzeel et al., 2011). L'une d'elles a notamment découvert que non seulement la fumée de cigarette diminue la prolifération et la survie cellulaires, mais qu'en plus elle favorise la gliogenèse dans la ZSG

de rats adolescents (Bruijnzeel et al., 2011). En outre, des rats testés dans le dispositif expérimental du water maze obtiennent des résultats d'autant plus médiocres qu'ils ont reçu une dose élevée de nicotine. Par ailleurs, la prolifération cellulaire est affectée dans la ZSG de ces animaux (Scerri et al., 2006).

### 3.2.6 Apprentissages hippocampo-dépendants

L'hippocampe est essentiellement impliqué dans des tâches de mémorisation spatiale et de « séparation de patterns ». Il entre en jeu dans l'acquisition et la consolidation des mémoires déclaratives et épisodiques. La piscine de Morris (ou water maze) fait partie des tests comportementaux utilisés pour évaluer l'apprentissage et la mémorisation hippocampiques. Immérgés dans une piscine d'eau opaque cernée de balises externes, les rongeurs doivent apprendre à retrouver le plus rapidement possible une plateforme dissimulée sous la surface de l'eau. Certaines données indiquent que l'entraînement des rongeurs à effectuer cette tâche est liée à l'augmentation de la neurogenèse hippocampique (Gould et al., 1999b; Shors et al., 2002) et que les performances des rats âgés à ce test semblent constituer un facteur prédictif de leur taux de neurogenèse adulte dans la ZSG (Drapeau et al., 2003; Driscoll et al., 2006). D'autres auteurs ont toutefois montré que l'élimination de la neurogenèse hippocampique n'affecte pas la phase d'apprentissage de la piscine de Morris (Shors et al., 2002; Jaholkowski et al., 2009) bien que d'autres données mentionnent l'inverse (Dupret et al., 2007; Dupret et al., 2008; Wolf et al., 2009). Récemment, il a été décrit que les neurones néoformés des rats soumis à ce type d'apprentissage spatial possèdent une arborisation dendritique plus complexe que celle observée dans la ZSG de rats contrôles (Lemaire et al., 2012). En outre, stopper la prolifération cellulaire hippocampique durant une semaine à l'aide d'un agent antiméiotique retarde la rétention de nouvelles informations spatiales lorsque, quatre mois plus tard, les animaux sont déposés dans le dispositif de la piscine de Morris. Ceci suggère que les neurones élaborés à l'âge adulte puis intégrés dans des réseaux pré-existants sont requis pour la préservation d'informations et la réutilisation de cartes spatiales (Lemaire et al., 2012). Cette forme de plasticité synaptique serait bénéfique à la stabilisation du réseau en dépit des modifications environnementales survenant en parallèle. En outre, des études computationnelles ont envisagé que la production continue de nouvelles cellules pourrait constituer une réserve potentielle pour les informations à venir (Becker, 2005; Chambers and Conroy, 2007). Parmi les autres fonctions qui lui sont attribuées, la neurogenèse hippocampique favoriserait chez l'adulte la formation de représentations spatiales allocentrées, la consolidation d'informations hippocampo-dépendantes à long-terme ainsi que la modulation de leur rapidité d'acquisition (Koehl and Abrous, 2011). Les nouveaux neurones participeraient aussi à l'association entre un contexte et une

émotion anxiogène (Bergami et al., 2008; Revest et al., 2009). Le test de peur conditionnée fait à ce titre partie des tâches sollicitant l'hippocampe et pouvant modifier l'expression de la neurogenèse dans la ZSG. A nouveau, des résultats contradictoires ont cependant été publiés à ce sujet (Feng et al., 2001; Shors et al., 2002; Zhang et al., 2007; Hernandez-Rabaza et al., 2009). Ainsi, tous les tests comportementaux mettant à contribution l'hippocampe n'influeraient pas systématiquement sur la quantité de précurseurs générés et sur les différentes phases de la neurogenèse dans le gyrus dentelé ; une standardisation des matériels et des méthodes employés permettrait certainement l'obtention de données plus homogènes.

### 3.2.7 Déprivation d'odeurs ou enrichissement olfactif

L'olfaction permet d'identifier les sources de nourriture comestible, mais aussi de détecter les individus, les partenaires sexuels, ainsi que de potentiels dangers. Ce sens joue un rôle prépondérant chez les rongeurs ; aussi l'étude de la neurogenèse de la zone sous-ventriculaire et du bulbe olfactif est-elle particulièrement intéressante chez ces derniers. Alors que la mémoire olfactive figure parmi les plus tenaces qu'il existe, les interneurons se renouvellent continuellement dans son substrat anatomique, le bulbe olfactif. Frank Corotto et ses collaborateurs ont décrit l'importance de l'activité sensorielle sur ces deux systèmes de neurogenèse chez la souris : en effet, après l'obstruction temporaire d'une narine, on observe du côté ipsilatéral une diminution de la neurogenèse de l'épithélium olfactif et du bulbe olfactif, tandis que la survie des neurones néo-formés est également réduite (Corotto et al., 1994). Dans une expérience similaire conduite chez des marsupiaux, dès la libération de la narine de l'animal, la neurogenèse du bulbe olfactif a de nouveau atteint un niveau contrôle (Cummings et al., 1997). Ce phénomène souligne l'impact d'une activité sensorielle olfactive sur la neurogenèse. Ce concept fut confirmé avec un paradigme d'enrichissement olfactif orchestré par Christelle Rochefort, Pierre-Marie Lledo et leurs collaborateurs. En exposant des souris à un large spectre d'odeurs, ils observèrent dans le bulbe olfactif une augmentation du nombre de cellules nouvellement générées qui avaient incorporé du BrdU trois semaines auparavant (Rochefort et al., 2002). De plus, les performances de ces souris à une tâche de mémorisation olfactive furent améliorées. En revanche aucun changement ne fut constaté pour les tâches d'apprentissage spatial requérant l'hippocampe. Finalement, des souris mutantes déficientes pour la NCAM et dont la neurogenèse du bulbe olfactif était par conséquent diminuée, s'avèrent moins performantes dans des tâches de discrimination olfactive que leurs congénères contrôles (Gheusi et al., 2000). Ces résultats sont indicatifs d'une intégration synaptique fonctionnelle, confirmée par le fait que les neurones nouvellement générés et répondant à des stimuli olfactifs, sur-expriment le gène précoce *c-fos* (Carlen

et al., 2002). Il est intéressant de noter qu'à la différence de la ZSG, la neurogenèse survenant dans la ZSV et le bulbe olfactif semble relever de ce qu'on appelle en anglais un « turnover » entre mort neuronale et addition de nouveaux neurones. Il apparaît même qu'un certain degré d'apoptose soit requis pour favoriser le bon fonctionnement de la structure. D'une part, bloquer la neurogenèse engendre une diminution du volume du bulbe olfactif, combinée à des déficits de discrimination olfactive (Imayoshi et al., 2009), et d'autre part, bloquer la mort cellulaire dans le bulbe olfactif provoque une baisse des performances à des tâches de discrimination olfactive ainsi qu'une baisse de la neurogenèse (Mouret et al., 2009), ce qui laisse supposer que le phénomène de mort neuronale dans cette structure serait un pré-requis à son bon fonctionnement.

*Les conditions environnementales modèlent donc aussi bien la plasticité structurale du tissu nerveux que les diverses étapes de la neurogenèse de la ZSG et de la ZSV chez le mammifère adulte sain (voir Tableau II). Mais la neurogenèse peut-elle être affectée lorsque des conditions environnementales deviennent délétères pour l'organisme ? Quelles répercussions fonctionnelles pourraient alors avoir des déficits de la neurogenèse notamment lorsqu'une pathologie se déclare ?*

**Tableau II Facteurs intrinsèques modulant certaines des étapes de la neurogenèse adulte**

<b>Facteurs régulateurs</b>	<b>Prolifération</b>	<b>Survie</b>	<b>Différenciation</b>	<b>Migration</b>	<b>Références</b>
<b>Hormones</b>					
<i>CE strogènes</i>	+				Tanapat et al. 1999, Mazzucco et al. 2006, Smith 2001
<i>Hormone de croissance et IGF-I</i>	+	+			Russell et al. 1998, Takadera et al. 1999, Åberg et al. 2006, Mclenachan et al. 2009
<i>Prolactine</i>	+				Pathipati et al. 2011, Shingo et al. 2003, Mak and Weiss 2011
<i>Ocytocine</i>	+				Leuner et al. 2012
<i>Testostérone</i>		+			Spritzer et Galea 2007, Rasika et al. 1994
<i>Glucocorticoïde, corticostérone</i>	+/-	+/-			Gould et al. 1997, Cameron et al. 1998, Tanapat et al. 2001, Joëls et al. 2007, Lau et al. 2007, Leuner et al. 2010, Lyons et al. 2010, Parihar et al. 2011
<b>Neuromédiateurs</b>					
<i>Acétylcholine</i>	+	+			Cooper-Kuhn et al. 2004, Mechawar et al. 2004, Ho et al. 2009
<i>Dopamine</i>	+/-	+/-			Höglinger et al. 2004, Coronas et al. 2004, Baker et al. 2004, Höglinger et al. 2004, Kippin et al. 2005, Wimmer et al. 2006, Khaindrava 2011
<i>GABA</i>	+	-	+	+	Bolleus et Bordey 2004, Jagasia et al. 2006, Tozuka et al. 2005, Ge et al. 2006, Duthell et al. 2012
<i>Glutamate</i>	+/-	+/-			Joo et al. 2007, Mochizuki et al. 2007, Cameron et al. 1995, Gould et al. 1994, Gama Sosa et al. 2004, Bernabeu et al. 2000, Bengzon et al. 1997, Bai et al. 2003, Baskys et al. 2005
<i>Histamine</i>		+	+		Foley et al. 2009, Bernardino 2012
<i>Noradrénaline</i>	+	+			Bauer et al. 2003, Jhaveri et al. 2010, Masuda et al. 2011
<i>Sérotinine</i>	+				Brezun et Daszuta 1999, Malberg et al. 2000
<b>Facteurs neurotrophiques</b>					
<i>EGF et FGF-2</i>	+	+	-		Doesch et al. 2002, Reynolds and Weiss 1992
<i>VEGF</i>	+	+		+	Palmer et al. 2000, Schänzer et al. 2004, Bove et al. 2007, Saghatelian et al. 2009, Snayyan et al. 2009,
<i>CNTF et TGF</i>	+				Craig et al. 1996, Emsley and Hagg 2003, Kokoeva et al. 2005
<i>BDNF</i>	+	+			Benraiss et al. 2001, Pencea et al. 2001, Chmielnicki et al. 2004, Leventhal et al. 1999
<i>NGF, NT3, GDNF</i>		+			Fiore et al. 2002, Bath et al. 2010

**Tableau II. Tableau résumant l'action de facteurs intrinsèques sur les différentes étapes de la neurogenèse adulte.** Les effets rapportés peuvent être positifs (+), contrasté selon les études (+/-) ou négatifs (-). BDNF : brain derived neurotrophic factor ; CNTF : ciliary neurotrophic factor ; EGF : epidermal growth factor ; FGF-2 : fibroblast growth factor 2 ; GABA : gamma-aminobutyric acid ; GDNF : glial-derived neurotrophic factor ; NGF : nerve growth factor ; NT3 ; neurotrofin-3 ; TGF : Transforming growth factor ; VEGF : vascular endothelial growth factor.

### 3.3 Conditions pathologiques et neurogenèse réactionnelle

De nombreuses pathologies sont liées à des dysfonctionnements du tissu nerveux et à une dégénérescence neuronale brusque ou progressive. Les cellules souches représentent un espoir thérapeutique considérable pour la médecine régénérative et réparatrice ; comprendre le fonctionnement de ces cellules permettrait de les manipuler expérimentalement pour restaurer des zones et des fonctions cérébrales endommagées. D'une manière surprenante, dans des conditions lésionnelles ou pathologiques, le tissu nerveux est capable de lever momentanément les restrictions neurogènes qui étaient en vigueur dans l'état basal, et d'autoriser une prolifération cellulaire locale et temporaire (voir résumé dans le *Tableau III* page 81).

#### 3.3.1 Les conséquences du stress sur la plasticité cérébrale

Le signal d'alarme transitoire provoqué par le stress a pour effet de mobiliser toutes les ressources de l'organisme et d'adapter la réponse comportementale la plus appropriée à la survie de l'individu. L'organisme revient ensuite à l'homéostasie ; cependant, dans certains cas, le stress peut devenir chronique et incontrôlable, engendrant alors une cascade de réactions biochimiques délétères pour de nombreux organes (de Kloet et al., 2005). Les effets du stress sont considérables. Il active l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, augmente la libération de cortisol et affecte tout aussi bien la libération de neuromédiateurs (GABA, sérotonine, noradrénaline, dopamine, neurohormones) que de facteurs neurotrophiques et de cytokines (Lucassen et al., 2010; Wager-Smith and Markou, 2011). Dotée de nombreux récepteurs aux glucocorticoïdes, la formation hippocampique est particulièrement vulnérable au stress. Sous l'emprise d'un stress chronique, des neurones peuvent rétracter certaines de leurs dendrites et réduire leur surface de contact afin de se protéger des effets excitotoxiques du glutamate (Hajszan et al., 2009; Lucassen et al., 2010). L'atrophie dendritique modifie alors la connectivité synaptique ainsi que le nombre d'épines dendritiques. Ce phénomène expliquerait en partie les désordres cognitifs décrits dans le cadre d'une exposition à un stress chronique (Conrad, 2006). En outre, des conditions de stress aigu ou chronique favoriseraient l'activation microgliale (Wager-Smith and Markou, 2011).

Dans les années 1990, Elizabeth Gould et Bruce McEwen se sont demandés pourquoi le stress, qui engendrait une mort cellulaire observable dans l'hippocampe, ne provoquait pas une diminution de volume de cette structure (Gould et al., 1997; Joels et al., 2007). Cette interrogation fut le point de départ de plusieurs études grâce auxquelles progressèrent les connaissances sur l'impact des glucocorticoïdes ainsi que du stress physique et psychosocial sur la neurogenèse adulte hippocampique (Gould et al., 1997; Cameron et al., 1998). Les glucocorticoïdes font partie des acteurs sollicités par un stress et sous-tendent la diminution de la prolifération cellulaire dans la ZSG de nombreuses espèces animales, à différents âges de leur vie (Leuner and Gould, 2010). De même, dans la ZSV, Wui-Man Lau rapporta que la corticostérone diminuait la prolifération cellulaire, mais que celle-ci pouvait toutefois recouvrer des valeurs contrôles grâce à l'injection d'un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (ISRS) : la paroxétine (Lau et al., 2007). Si des études ont montré les répercussions à long-terme d'un stress provoqué chez le rongeur adulte sur la production de nouveaux neurones, ou encore sur leur survie dans la ZSG, d'autres au contraire ont rapporté que les effets délétères étaient temporaires (Tanapat et al., 2001) : ces données restent par conséquent à approfondir.

Par ailleurs, les glucocorticoïdes pourraient agir de manière plus indirecte que prévu ; par exemple, le blocage des récepteurs NMDA couplé à un traitement à base de glucocorticoïdes n'engendre pas la baisse de la neurogenèse hippocampique rapportée dans d'autres études (Cameron et al., 1998). Ces données suggèrent l'implication d'autres systèmes de régulation qui pourraient tempérer l'effet négatif des glucocorticoïdes. Les relations entre le stress et les neurotrophines ont été particulièrement examinées et ont révélé que la plupart des paradigmes de stress chez les rongeurs diminuaient également l'expression de BDNF, de NGF, de NT-3 et de VEGF dans l'hippocampe (Duman and Monteggia, 2006; Balu and Lucki, 2009). Il est de surcroît intéressant de constater que des traitements antidépresseurs contribuent à ramener les quantités de BDNF à des valeurs contrôles (Soumier et al., 2009), et à inverser l'effet délétère du stress sur le volume hippocampique (Warner-Schmidt and Duman, 2006). Dans l'ensemble, les données actuelles sur les effets du stress ne sont cependant pas toutes cohérentes ; jusqu'à un certain seuil, le stress et la concentration en glucocorticoïdes pourraient être bénéfiques, y compris sur la prolifération cellulaire et la neurogenèse (Lyons et al., 2010; Parihar et al., 2011). Passée cette limite toutefois, il s'avèrerait fortement préjudiciable pour l'organisme et engendrerait des cascades de réactions biochimiques délétères. Il a même été envisagé qu'il fasse partie de la liste des facteurs potentiels prédisposant à l'autisme, à la dépression ou encore à la schizophrénie.

Enfin, il est intéressant de noter que l'exposition prénatale et/ou post-natale à un stress aigu imprime durablement des séquelles structurales et fonctionnelles au niveau cérébral, et plus particulièrement au niveau du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien. D'après certaines études, une déprivation ou une réduction des soins maternels serait responsable d'une baisse de la neurogenèse hippocampique (Bredy et al., 2003; Mirescu et al., 2004). Des singes rhésus soumis à un stress prénatal aigu conservent des séquelles dans l'hippocampe, ainsi qu'aux niveaux comportemental et endocrinien (Coe et al., 2003). De nombreuses revues scientifiques vont dans ce sens et insistent sur le rôle délétère du stress et/ou d'une carence en soins maternels chez les nouveau-nés.

### **3.3.2 Privation de sommeil et désordres cognitifs**

Outre les perturbations cognitives liées à une privation de sommeil à long terme, le niveau de glucocorticoïdes augmente tandis que la neurogenèse hippocampique diminue de 30 à 80% chez des rats adultes (Guzman-Marin et al., 2005; Roman et al., 2005; Mirescu et al., 2006). De tels effets surviennent également lorsque le sommeil des animaux est fragmenté (Guzman-Marin et al., 2007). Il semblerait alors que la privation de sommeil agisse comme un agent stressant, entraînant non seulement, une élévation du niveau de corticostérone mais aussi, de cytokines proinflammatoires (McEwen, 2006; Mirescu et al., 2006; Meerlo et al., 2008). Par ailleurs, une privation de sommeil paradoxal d'au moins 48h induit une diminution de la synthèse et de la libération de BDNF dans l'hippocampe (Guzman-Marin et al., 2006). Il est intéressant de remarquer que des rats privés de sommeil présentent des perturbations des systèmes endocrines et neurochimiques similaires à ceux que l'on trouve dans le cadre de la dépression (Roman et al., 2005). Des patients atteints de dépression majeure présentent fréquemment des altérations nocturnes de la sécrétion de l'hormone de croissance durant les trois premières heures suivant l'endormissement (Sakkas et al., 1998). L'ensemble de ces résultats impliquerait l'existence d'un lien de causalité entre le sommeil, le stress et la dépression où des neurohormones communes moduleraient la neurogenèse hippocampique (Meerlo et al., 2008; Meerlo et al., 2009).

### **3.3.3 Dépression et espoir thérapeutique soulevé par la neurogenèse hippocampique**

La dépression, connue sous le terme de « mélancolie » dans l'antiquité, est l'un des maux les plus courants de nos sociétés occidentales. Elle touche actuellement un américain sur cinq (Kessler et al., 1994) et deviendra la seconde plus grande cause de décès et d'invalidité en 2020, tous âges et sexes confondus (World Health Organisation, 2009). Un épisode dépressif se caractérise par une pléiade de

symptômes classés en trois grandes catégories : 1) des changements d'humeur (tendance au pessimisme, mauvaise estime de soi, sentiment d'impuissance, irritabilité, anhédonie, perte d'intérêt pour l'environnement et pour les activités qui d'ordinaire étaient stimulantes) ; 2) des troubles physiques (répercussions sur l'appétit, le sommeil, ralentissement des fonctions psychomotrices) et 3) des perturbations cognitives (ruminations, sentiments de culpabilité, pensées suicidaires persistantes) (Warner-Schmidt and Duman, 2006; David et al., 2010). Une liste de critères précis a été consignée dans le *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV) de l'Association Américaine de Psychiatrie. Cette pathologie peut revêtir de multiples formes selon la durée des épisodes dépressifs, l'intensité des symptômes, la récurrence de leur survenue et l'éventuelle comorbidité entre plusieurs troubles ou maladies (maladie de Parkinson, troubles obsessionnels compulsifs, stress post-traumatique).

Bien que diverses régions cérébrales soient impliquées dans la survenue des différents symptômes, l'hippocampe fait partie de celles qui focalisent le plus d'intérêt. L'imagerie par résonance magnétique a permis de compléter les données post-mortem, et a indiqué que chez des patients ayant connu des épisodes de dépression majeure et n'ayant pas été traités pharmacologiquement, le volume de l'hippocampe est d'autant plus réduit qu'ils ont traversé de nombreux épisodes dépressifs (MacQueen et al., 2003; Sheline et al., 2003; Wager-Smith and Markou, 2011). De tels résultats ont été étayés dans des modèles animaux visant à reproduire les symptômes dépressifs, confortant l'hypothèse que la dépression puisse être reliée à une altération structurale et durable de l'hippocampe (Fuchs et al., 2004; Warner-Schmidt and Duman, 2006). Ainsi certains chercheurs se sont interrogés sur les causes de cette diminution de volume. Il a été envisagé que ce léger rétrécissement structural (de l'ordre de 10 à 15%) soit lié à une diminution de la production locale de BDNF (Catena-Dell'Osso et al., 2011) ou qu'il soit davantage imputable à une modification de la gliogenèse et du nombre de cellules gliales, qu'à une nette diminution de la neurogenèse. En effet, un faisceau d'arguments plaiderait en faveur de cette hypothèse, d'autant plus que des changements structuraux de la population gliale pourraient altérer la communication neuronale de la structure (Bremner et al., 2000; Rajkowska, 2000; Czeh and Lucassen, 2007). Plus récemment, d'autres hypothèses ont émergé, suggérant que cette réduction de volume s'explique entre autre par une production trop élevée de cytokines proinflammatoires. Les patients dépressifs présenteraient des concentrations sanguines excessives de chémokines et autres facteurs d'inflammation (Catena-Dell'Osso et al., 2011) qui tendraient à diminuer la quantité de BDNF dans l'hippocampe, favorisant par conséquent la dégénérescence cellulaire locale. En effet, chez les patients dépressifs, le niveau de BDNF présent dans la formation hippocampique est réduit, et peut être restauré grâce à des antidépresseurs (Chen et al., 2001). De plus, il a été remarqué

que des traitements anti-inflammatoires améliorent l'efficacité des antidépresseurs tandis que l'administration de médiateurs de l'inflammation, y compris chez l'homme, peut provoquer un syndrome dépressif (Catena-Dell'Osso et al., 2011; Wager-Smith and Markou, 2011). L'anxiété fait également partie des facteurs aggravants susceptibles de déclencher un épisode de dépression majeure (Kendler et al., 1999). Les individus dépressifs présentent souvent un dérèglement du cycle circadien du cortisol dont le point de départ serait fréquemment attribuable à un stress chronique. En outre, l'hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien favorise la libération de cortisol et d'interleukin-1 beta chez l'homme (Maes et al., 1993). Ces facteurs pourraient ainsi affaiblir la neurogenèse hippocampique, et sous-tendre la diminution du nombre de précurseurs en division observé post-mortem chez les personnes touchées par la dépression tel que cela a été illustré par Maura Boldrini et ses collaborateurs (Boldrini et al., 2009). De telles perturbations de la plasticité cérébrale pourraient participer aux désordres de flexibilité cognitive relevés chez les patients. Par ailleurs, l'activité physique, qui est connue pour favoriser la neurogenèse hippocampique et pour diminuer l'expression des symptômes dits dépressifs chez les rongeurs, stimule la production de BDNF (Bjornebekk et al., 2005). Un programme d'exercice physique pourrait être l'une des alternatives aux traitements antidépresseurs notamment chez les personnes âgées souffrant de cette pathologie (Blumenthal et al., 1999). Le VEGF favoriserait également l'effet bénéfique des antidépresseurs (Greene et al., 2009), s'ajoutant à la palette de facteurs qui pourraient intervenir pour la guérison des patients.

Les résultats de Jean-Michel Brezun montrant qu'une déplétion en sérotonine diminue la neurogenèse des zones sous-granulaire et sous-ventriculaires chez des rats adultes (Brezun and Daszuta, 1999) ont apporté de nouveaux éléments dans le cadre des recherches sur les antidépresseurs sérotoninergiques. Il est notoire que les individus touchés par la dépression possèdent des neurones monoaminergiques, plus précisément sérotoninergiques, dont l'hypoactivité peut être compensée par certains traitements thérapeutiques. Dans les modèles animaux reproduisant un état dépressif, l'administration d'antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) rehausse les quantités de ce neuromodulateur dans l'espace synaptique et améliore non seulement l'état général, mais aussi la plasticité cérébrale (synaptogenèse, neurogenèse et maturation neuronale) dans l'hippocampe (Malberg et al., 2000; Malberg and Duman, 2003; Castren et al., 2007; Balu and Lucki, 2009). Il est donc désormais reconnu que l'administration chronique d'un traitement antidépresseur augmente la prolifération cellulaire et la survie des progéniteurs de la ZSG (Dranovsky et al, 2006; Malberg, et al 2000), y compris chez l'homme (Boldrini et al., 2009). Cependant, au-delà de six semaines, il a été montré que la neurogenèse de la zone sous-ventriculaire chez la souris diminue (Ohira and Miyakawa, 2011), constituant un effet secondaire à long terme. Un autre argument en faveur

de l'importance fonctionnelle de la neurogenèse hippocampique dans la pathologie de la dépression est que sa suppression bloque les effets thérapeutiques des antidépresseurs chez les rongeurs (Santarelli et al., 2003; Sahay and Hen, 2007) ainsi que chez les primates non-humains (Perera et al., 2011). De telles données suggèrent que la neurogenèse de la ZSG est requise pour le bon fonctionnement des traitements antidépresseurs. D'ailleurs, la plupart des molécules antidépresseurs exercent leur effet thérapeutique trois à quatre semaines après la première prise médicamenteuse ; or, ce délai correspond à l'augmentation progressive de la neurogenèse hippocampique et à la durée nécessaire à la maturation des cellules néo-formées. Cependant, il convient de demeurer prudent quant aux liens de cause à effet, puisque l'éradication expérimentale de la neurogenèse hippocampique ne suffit pas à générer un comportement « depressive-like » chez la souris (Vollmayr et al., 2007; Wager-Smith and Markou, 2011).

En conclusion, les hypothèses physiopathologiques expliquant la dépression rendent compte d'une multitude de facteurs réciproquement interconnectés (stress et hormones du stress, facteurs de l'inflammation, plasticité cellulaire, neurogenèse, facteurs neurotrophiques) qui ouvrent de remarquables possibilités cliniques.

#### 3.3.4 Consommation abusive d'alcool

L'alcoolisme chronique, qui touche près de 8% de la population adulte dans le monde, est à l'origine de désordres cognitifs et d'altérations structurales de l'encéphale. Lorsque l'alcool est consommé au cours de la gestation, il conduit au syndrome d'alcoolisation fœtale caractérisé par des anomalies faciales, un retard de croissance prénatal et postnatal, ainsi que des déficits cognitifs et comportementaux chez l'enfant. Chez les souriceaux devenus adultes, on constate les effets délétères à long terme sur la neurogenèse de la ZSV (Roitbak et al., 2011). L'éthanol ralentirait le cycle cellulaire des cellules en prolifération et augmenterait notamment la mort cellulaire par apoptose (Jacobs and Miller, 2001). Des études *in vitro* ont démontré qu'il affectait la différenciation neurale des précurseurs neurales et leur survie (Tateno et al., 2005). Il serait aussi à l'origine d'une diminution du nombre de cellules dans le gyrus dentelé, d'une baisse de la prolifération cellulaire et d'un raccourcissement de la survie des précurseurs neurales de la ZSG chez le rat adulte, tout comme chez l'être humain quel que soit son âge (Nixon and Crews, 2002; Klintsova et al., 2007; Morris et al., 2010). Ces effets pourraient cependant être tempérés grâce à une période d'abstinence qui engendrerait alors chez des rats dépendants à l'alcool une augmentation importante de la neurogenèse hippocampique (Nixon and Crews, 2002). Chez l'humain, une période d'abstinence améliorerait de surcroît les fonctions cognitives

et stopperait le phénomène d'atrophie cérébrale, entre autre imputable à la sécrétion de cytokines proinflammatoires (Crews and Nixon, 2009). Puisque l'abus d'alcool occasionne des problèmes d'olfaction et de mémoire, et que ces fonctions sont plus ou moins reliées aux structures neurogènes chez l'adulte, moduler la neurogenèse secondaire pourrait représenter un espoir pour les traitements pharmacologiques. Cette piste a été explorée par une équipe japonaise qui a transplanté des cellules souches neurales par voie intraveineuse à de jeunes rats atteints d'un syndrome d'alcoolisme fœtal. Leurs résultats ont indiqué que les précurseurs ayant incorporé un marqueur fluorescent s'étaient dispersés dans le système nerveux central et auraient contribué à améliorer les symptômes comportementaux des animaux (Yoshinaga et al., 2007).

### 3.3.5 Accident vasculaire cérébral

Ces dix dernières années, la neurogenèse réactionnelle est apparue comme un espoir thérapeutique dans la réparation des tissus abîmés à la suite d'un accident vasculaire cérébral (AVC). Il existe deux sortes d'AVC : 1) l'AVC ischémique : lorsqu'un vaisseau sanguin est oblitéré par un caillot de sang et entraîne une diminution de la circulation sanguine cérébrale ; 2) l'AVC hémorragique : lorsqu'un vaisseau sanguin se rompt : un hématome se forme et comprime alors la zone cérébrale. Dans la majeure partie des publications, provoquer une ischémie cérébrale engendre une prolifération cellulaire locale et/ou dans la ZSG. Cependant, les résultats ne concordent pas toujours selon les modèles de lésion et les zones cérébrales concernées. Dans sa célèbre étude, Andreas Arvidsson généra une ischémie focale dans le striatum de rats en pratiquant l'occlusion d'une artère cérébrale moyenne. Il observa que 0,2% des interneurons ayant dégénéré étaient remplacés par des neuroblastes en provenance de la zone sous-ventriculaire (Arvidsson et al., 2002). Ces résultats furent étayés par l'étude de Jack Parent publiés la même année (Parent et al., 2002) mais il s'avéra que cette neurogenèse n'apportait aucun bénéfice fonctionnel et que la majorité des nouveaux neurones dégénéraient dans un intervalle de deux à cinq semaines après l'ischémie. Plus embarrassant encore, les neuroblastes provenant du flux migratoire rostral ne pénétraient pas exactement au cœur de la lésion. L'attraction des neuroblastes jusqu'au site lésionnel a donc beaucoup préoccupé les chercheurs. Il semblerait que ce phénomène dépende notamment de chémokines telle que la chémokine C-X-C (CXCR4) et son ligand, le récepteur 4, ou bien du stromal cell-derived factor-1 alpha (SDF-1alpha) (Thored et al., 2006) mais ces données restent encore à éclaircir. Hirofumi Nakatomi et ses collègues ont pour leur part réalisé une ischémie focale au niveau de CA1 dans l'hippocampe tout en infusant du FGF-2 et de l'EGF. Leurs données ont révélé que le tissu semblait se régénérer grâce à la migration de précurseurs provenant de la ZSV postérieure. Plus remarquable encore : les nouveaux neurones

s'intégraient dans les réseaux neuronaux, se projetaient sur le subiculum et contribuaient à améliorer les performances des animaux ischémiés (Nakatomi et al., 2002). Cela étant, ces résultats restent encore discutés ; certains écueils méthodologiques concernant le nombre de neurones avant la lésion et le nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> observées réduiraient un peu la portée de cette étude. Il a aussi été montré qu'en cas d'ischémie du cortex, une neurogenèse réactionnelle locale survenait ; les nouveaux neurones étaient de phénotype GABAergique et étaient incorporés aux circuits neuronaux pré-existants (Ohira et al., 2010). Un tel phénomène de plasticité serait imputable à la néovascularisation et à l'angiogenèse consécutives à l'ischémie (Ohab and Carmichael, 2008). Effectivement, l'ischémie induirait une angiogenèse dont les néo-micro vaisseaux sanguins produits serviraient éventuellement à acheminer les neuroblastes jusqu'à leur destination finale (Yamashita et al., 2006; Thored et al., 2007). En outre, lorsqu'un AVC est généré expérimentalement, de nombreux facteurs mitogènes tels que le glutamate, le BDNF, le VEGF et l'EGF sont produits et libérés aux abords de la lésion (Wiltrot et al., 2007). Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que l'environnement local serait capable d'autoriser un début de neurogenèse ; cependant, au-delà de la prolifération cellulaire, les étapes successives de la neurogenèse n'apporteraient pas un bénéfice fonctionnel. Néanmoins, si l'augmentation de la neurogenèse réactionnelle après ischémie était mieux contrôlée, elle pourrait permettre de restaurer des fonctions abîmées chez les patients.

### 3.3.6 Epilepsie et plasticité aberrante

Les crises cérébrales épileptiques résultent de l'hyperactivation locale et synchronisée d'un ensemble de neurones. Il existe de multiples formes de crises cérébrales et d'épilepsie qui touchent plus de 50 millions de personnes à travers le monde (Kuruba et al., 2009). Un certain nombre d'entre elles survient dans les structures limbiques, par ailleurs très sensibles aux effets du stress. Il a été démontré qu'une crise d'épilepsie pouvait provoquer une totale désorganisation de la couche sous-granulaire du gyrus dentelé (Houser, 1990). Il est connu que dans cette pathologie, les fibres mossues de CA3 se réorganisent de manière aberrante, phénomène parfois imputable aux nouveaux neurones de la ZSG (Parent et al., 1997; Jung et al., 2004). Les facteurs neurotrophiques pourraient aussi participer à cette migration ectopique chaotique (Scharfman, 2005). En conditions expérimentales, le nombre de cellules nouvellement générées peut être multiplié par 8 à 10 en quelques jours. De plus, les nouveaux neurones s'avèrent affectés sur les plans structural et connexionnel - polarité, arborisation dendritique, synapses, épines dendritiques, activité amoindrie (Kraev et al., 2009). Il a été envisagé que cette neurogenèse atypique et caractéristique puisse être à la fois la cause et la conséquence des crises d'épilepsie (Parent et al., 2007; Zhao and Overstreet-Wadiche, 2008), et qu'elle puisse être

responsable des dysfonctionnements mnésiques rapportés par les patients (Sayin et al., 2003). Il n'est pas exclu que les processus inflammatoires observés lors de crises d'épilepsie chez l'animal puissent également favoriser la formation de dendrites excitatrices aberrantes (Whitney et al., 2009). Fang Yang et ses collaborateurs ont d'ailleurs observé qu'à la suite de crises d'épilepsie induites expérimentalement, l'activation astrocytaire et microgliale augmentait dans l'hippocampe (Yang et al., 2010). Bloquant sélectivement le métabolisme astrocytaire ou l'activité microgliale, ils ont découvert que ces populations cellulaires semblaient impliquées dans la migration aberrante des neuroblastes et même dans leur survie. En effet, il arrive qu'en conditions expérimentales, un accroissement massif de la prolifération cellulaire se concentre dans les zones neurogènes, ce qui expliquerait qu'un certain pourcentage de neuroblastes migrent vers d'autres zones corticales (Parent et al., 2002; Jessberger et al., 2007). La neurogenèse hippocampique réactionnelle aux crises d'épilepsie dépendrait de la sévérité des crises (Whitney et al., 2009) et pourrait s'intégrer dans de nombreuses pathologies reliées aux effets néfastes du stress et de l'augmentation de la concentration en corticostérone (Kumar et al., 2011). Aussi une séparation maternelle précoce effectuée chez des rats nouveau-nés (entre P2 et P14) potentialiserait-elle les effets du stress et induirait une prédisposition à l'épilepsie limbique chez les rats devenus adultes (Salzberg et al., 2007; Jones et al., 2009). Les données relatives à la neurogenèse réactionnelle après exposition précoce au stress divergent toutefois selon les études (Kumar et al., 2011). Dans cette pathologie, la niche neurogène et de nombreux acteurs y résidant seraient fortement perturbés. Réguler plus finement les conséquences délétères occasionnées par cette pathologie pourrait ainsi prévenir, voire idéalement faire cesser la récurrence des crises.

### 3.3.7 Maladies neurodégénératives et espoirs thérapeutiques grâce aux cellules souches

Les maladies neurodégénératives occasionnent une mort neuronale irréversible. Selon la localisation des neurones dégénérescents, elle engendre une pléiade de symptômes caractéristiques. Il se pourrait qu'en réalité, le tissu nerveux des patients soit davantage sujet à une mauvaise plasticité régénératrice et compensatoire plutôt qu'une simple mort cellulaire.

#### a) *Maladie de Huntington*

Cette maladie neurodégénérative, appelée également chorée de Huntington ou danse de Saint-Guy, touche moins de 1 personne sur 5 000. Héritaire, cette maladie se déclare vers l'âge de 40 ans chez les individus porteurs du gène de Huntington où le triplet GAG se répète anormalement et mène à l'accumulation de la protéine huntingtine. Cette dernière s'agrège dans les neurones des noyaux gris centraux et cause la mort neuronale préférentiellement dans le striatum ; cela a pour conséquence de

provoquer des désordres moteurs de plus en plus sévères. Les personnes touchées par la maladie souffrent alors de mouvements anormaux dits choréiques (mouvements brusques et imprévisibles, souvent de rotation) et athétosiques (mouvements de torsion et d'ondulation des membres). Une démence progressive se développe aussi chez les patients. Il a été rapporté que dans des modèles murins de cette pathologie, la prolifération cellulaire augmente dans la ZSV et qu'une partie des progéniteurs se mettent à migrer vers le site de la dégénérescence neuronale (Tattersfield et al., 2004). Reste à savoir si ces neurones seraient en mesure de devenir fonctionnels. Dans la ZSG de souris transgéniques reproduisant la maladie, la prolifération et la maturation des nouvelles cellules est réduite, mais la survie neuronale n'est pas affectée (Phillips et al., 2005). En surexprimant du BDNF et la protéine noggin, les déficits moteurs des souris atteintes de cette pathologie semblent se réduire, tandis que le nombre de neuroblastes ayant contacté la zone de la lésion augmente (Cho et al., 2007). Il est à remarquer qu'infuser en parallèle un agent antimitotique supprime ces effets bénéfiques, soulignant alors l'importance de ces nouvelles cellules pour le striatum. A ce jour, aucun traitement ne permet de soulager les patients ; c'est pourquoi, la greffe de cellules souches pourrait représenter un espoir thérapeutique afin de palier la dégénérescence neuronale (Lodi et al., 2011).

#### *b) Maladie d'Alzheimer*

Les patients touchés par la maladie d'Alzheimer éprouvent souvent pour premiers symptômes une désorganisation spatiale et des pertes de mémoires relatives aux lieux. Ces désordres cognitifs semblent impliquer l'hippocampe, qui figure d'ailleurs parmi les premières cibles de dépôts de protéines  $\beta$ -amyloïde ( $\beta$ A) s'assemblant en plaques au niveau du parenchyme et au pourtour des vaisseaux sanguins. À ces symptômes s'ajoute un mauvais fonctionnement d'une autre protéine : la protéine du cytosquelette Tau, laquelle, suite à un excès de phosphorylation, s'accumule dans le neurone et entrave le passage de l'information. La maladie d'Alzheimer est spécifique à l'espèce humaine, aussi est-il ardu d'établir des modèles animaux fidèles à ce que l'on observe chez l'homme. Certaines études portant sur des souris génétiquement modifiées surexprimant la protéine  $\beta$ -amyloïde ont montré que chez ces souris mutantes, la neurogenèse de la ZSG augmentait, ce qui semble aussi être le cas chez l'humain (Jin et al., 2004; Lopez-Toledano and Shelanski, 2007; Rohe et al., 2008). Cependant, l'étape de maturation des nouveaux neurones laisserait à désirer ; c'est pourquoi promouvoir la survie neuronale pourrait améliorer le traitement de la maladie (Li et al., 2008). Il se pourrait d'ailleurs que la diminution de la concentration en BDNF dans certaines régions cérébrales sous-tende le mécanisme de dégénérescence neuronale (Hock et al., 2000; Nagahara et al., 2009). Il convient de mentionner néanmoins qu'une série d'autres études a rapporté des données opposées, à savoir qu'une diminution de la neurogenèse hippocampique et même de la ZSV se produisaient lorsque la protéine  $\beta$ A était

surexprimée (Feng et al., 2001; Haughey et al., 2002; Donovan et al., 2006). Cette protéine induirait *in vitro* la différenciation et accélérerait la mort des cellules souches en culture (Uchida et al., 2007). Ainsi, si des changements s'effectuent au niveau de la neurogenèse de la ZSG et ZSV, une meilleure clarification est-elle souhaitable, notamment en examinant des tissus cérébraux post-mortem chez l'humain. De telles investigations se heurtent cependant à des difficultés : les patients décédés sont généralement en dernière phase de la maladie, de plus ils n'ont pas tous reçu les mêmes traitements pharmacologiques, et enfin, la méthode de détection des nouvelles cellules peut également interférer sur l'interprétation des résultats (Rodriguez and Verkhratsky, 2011). Pour finir, les facteurs hormonaux tels que les taux d'œstrogène circulant accélèreraient les effets de la maladie, qui d'ailleurs touche davantage les femmes que les hommes (Baum, 2005). La qualité du cadre de vie ainsi que l'activité physique, auraient des effets préventifs sur le déclenchement et sur l'aggravation des symptômes de la maladie, aussi bien chez l'humain que chez des modèles animaux (Costa et al., 2007; Mohajeri and Leuba, 2009). Il est important de rappeler que la maladie d'Alzheimer se caractérise par une perturbation du système cholinergique, qui module la neurogenèse adulte (Cooper-Kuhn et al., 2004). De plus, les cellules microgliales et les astrocytes pourraient également jouer un rôle neuroprotecteur pour lutter contre l'accumulation de plaques  $\beta$ A grâce à la sécrétion d'enzymes protéolitiques (Napoli and Neumann, 2009). Les astrocytes, en temps normal, peuvent reconnaître et internaliser les plaques  $\beta$ A grâce à certaines protéines qu'il synthétisent comme la glycoprotéine alipoprotéine E. Dans la maladie d'Alzheimer, les plaques  $\beta$ A sont souvent entourées de cellules gliales ; il semblerait que dans des modèles murins de la maladie, le dysfonctionnement de l'alipoprotéine E dispense alors les astrocytes de dégrader les plaques  $\beta$ A pour en empêcher l'accumulation (Hartlage-Rubsamen et al., 2003; Koistinaho et al., 2004). La fonctionnalité optimale des cellules gliales pourrait diminuer avec l'âge et le raccourcissement parallèle de leurs télomères (Flanary et al., 2007). Dans le cadre de cette pathologie, la modulation de la neurogenèse et des réactions gliales représentent à ce jour un espoir thérapeutique pour retarder voire stopper les désordres cognitifs invalidants liés aux pertes neuronales.

### c) *Maladie de Parkinson*

La maladie de Parkinson frappe plus de 2% de la population âgée de plus de 65 ans. Chaque année, plus de 10 000 nouveaux cas sont recensés en France. Cette maladie neurodégénérative se caractérise par une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire se projetant sur le striatum. Le tableau clinique se caractérise par une rigidité musculaire (hypertonie), des tremblements de repos, une bradykinésie (difficultés à exécuter des mouvements fins, ralentissement moteur) accompagnés de troubles de la marche et de la posture. Hélas, lorsque les premiers signes de la maladie se déclarent, 50 à 60% des neurones dopaminergiques de la substance noire sont déjà

détruits (O'Keeffe et al., 2009a). Parmi les modèles animaux utilisés pour étudier cette pathologie, aucun n'aurait induit de neurogenèse réactionnelle dans cette structure cérébrale. Pourtant, l'un des espoirs thérapeutiques envisageables serait de palier la mort neuronale locale en y stimulant expérimentalement une neurogenèse. En effet, si l'administration de traitements pharmacologiques permet une atténuation temporaire des symptômes de la maladie, ils ne permettent toutefois pas de compenser la perte cellulaire. Il est intéressant de noter qu'en 2002 il a été rapporté qu'une lésion de la substance noire par de la 6-hydroxytryptamine induisait une migration de précurseurs originaires de la ZSV vers le striatum. Néanmoins, dans cette étude, les précurseurs migrants se différenciaient finalement en cellules gliales (Lie et al., 2002). Certaines équipes de recherche ont alors réussi à induire une différenciation 'neuroblast-like' en infusant localement des facteurs de croissance ou la protéine noggin (de Chevigny et al., 2008; Gonzalo-Gobernado et al., 2009). En transplantant dans le striatum des neurones dopaminergiques immatures provenant de fœtus avortés, une amélioration comportementale a été notée chez des primates et chez des patients humains (Olanow et al., 2003; Takagi and Takahashi, 2005). Il semble que la prolifération cellulaire soit diminuée de près de 40% dans les zones de neurogenèse secondaire chez la souris et chez l'homme en post-mortem (Baker et al., 2004; Hoglinger et al., 2004). Ces phénomènes pourraient en partie être reliés avec l'altération de l'olfaction (Berendse et al., 2001), la déplétion dopaminergique de la substance noire (Hoglinger et al., 2004), et éventuellement la démence qui frappe les malades. Récemment, dans un modèle de la maladie de Parkinson chez le rat, la stimulation prolongée (durant 8 jours) des noyaux subthalamiques à haute fréquence - cette procédure permet de soulager les patients souffrant des effets secondaires du traitement à base de L-DOPA - n'a certes pas modifié la prolifération cellulaire dans les deux zones de neurogenèse (ZSG et ZSV), mais y a augmenté la survie des précurseurs neuraux (Khaindrava et al., 2011). Ces résultats suggèrent qu'un tel traitement s'avérerait bénéfique pour le maintien des populations de précurseurs des niches neurogènes, et pourrait donc *in fine* atténuer certains symptômes associés à la maladie, telles que la dépression et l'hyposmie - *i.e.* la perte partielle de l'odorat.

### 3.3.8 Facteurs de l'inflammation

Dans le système nerveux central, l'inflammation est une réponse complexe sollicitant diverses catégories cellulaires - cellules microgliales, astrocytes, macrophages, lymphocytes - en mesure de libérer localement de nombreuses molécules tels que des cytokines anti- et proinflammatoires [*i.e.* interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukine-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukine-6 (IL-6)], des chémokines [*i.e.* stromal cell-derived factor-1 alpha (SDF-1 $\alpha$ )], et des neurotransmetteurs

[i.e. glutamate]. Il a été démontré que des cytokines anti-inflammatoires pouvaient favoriser le passage d'un environnement gliogène à un environnement neurogène suite à certaines lésions du système nerveux central (Horner and Palmer, 2003; Whitney et al., 2009). L'IFN- $\gamma$  aurait d'ailleurs une action proneurogène et favoriserait la différenciation neuronale des précurseurs neuraux (Wong et al., 2004). Mais si l'inflammation peut favoriser certaines étapes de la neurogenèse, elle peut également lui nuire, notamment si des cytokines proinflammatoires sont sécrétées en grande quantité par les cellules microgliales (Ekdahl et al., 2003; Monje et al., 2003). L'IL-1 $\beta$  posséderait un effet anti-neurogène mais ces données restent à préciser (Whitney et al., 2009). Le rôle des chémokines semblerait également important dans la mesure où elles attireraient des précurseurs neuraux sur le site de l'inflammation. Cela a été observé *in vitro* et *in vivo* avec la libération de SDF-1 $\alpha$  par des astrocytes locaux (Imitola et al., 2004; Peng et al., 2004). Cependant, elles pourraient aussi être nocives pour le tissu, et conduire à la mort neuronale en stimulant à outrance l'inflammation locale (Whitney et al., 2009). Une autre piste intéressante concerne les mitochondries, qui figurent parmi les premières cibles de l'inflammation. Au cours de la neurogenèse, la différenciation neuronale des neuroblastes, les modifications du cytosquelette et toutes les étapes qu'ils subissent requièrent de l'énergie chimique sous forme d'ATP fournie par les mitochondries. Des dysfonctionnements de ces organites causeraient des dommages cellulaires, entraînant la mort neuronale voire des diminutions de la neurogenèse de la ZSG. Les précurseurs positifs à la doublecortine (DCX<sup>+</sup>) seraient particulièrement vulnérables à des altérations du métabolisme mitochondrial (Voloboueva and Giffard, 2011).

### 3.3.9 Relations entre astrocytes réactifs et cellules microgliales

Dans des conditions lésionnelles, inflammatoires ou dans le cadre de maladies neurodégénératives, les astrocytes peuvent devenir réactifs - ou protoplasmiques. Ils s'hypertrophient et surexpriment notamment la GFAP et la vimentine, deux filaments intermédiaires caractéristiques ; ce phénomène est connu sous le nom d'astroglie. Parallèlement, ils libèrent localement de nombreux facteurs de l'inflammation et de croissance (Song et al., 2002). Ces changements morphologiques et fonctionnels peuvent être bénéfiques pour le tissu, permettant de limiter l'inflammation, la dégénérescence neuronale et l'accumulation de débris cellulaires (Robel et al., 2011). Il arrive cependant que les astrocytes réactifs constituent une cicatrice gliale pour limiter les dégâts tissulaires et entravent toute repousse axonale (Sofroniew, 2009). En sécrétant certains facteurs de l'inflammation, ils peuvent aussi engendrer des lésions secondaires, comme cela a été montré après lésion spinale (Whitney et al., 2009). Une astroglie excessive peut de surcroît comprimer des capillaires sanguins et obstruer la circulation microvasculaire, occasionnant des atteintes aux neurones voisins (Wang et al.,

2008). Les astrocytes réactifs possèdent par conséquent de multiples aspects, tantôt favorables tantôt délétères à l'égard du tissu nerveux et de la neurogenèse. Il est particulièrement intéressant de mentionner que des astrocytes provenant de régions lésionnelles possèderaient la capacité d'entrer à nouveau dans le cycle cellulaire, de s'autorenouveler et de générer des astrocytes, des oligodendrocytes, et même quelques neurones *in vitro*, contrairement à des astrocytes issus de régions non lésionnelles (Buffo et al., 2008). Ainsi, le rôle des astrocytes dépendrait de l'environnement cellulaire qui leur intimerait de libérer certains facteurs plutôt que d'autres, participant au potentiel neurogène d'une niche.

Les cellules microgliales, résidentes silencieuses dérivant du lignage des monocytes de la moelle osseuse sont présentes en quantité élevée dans le tissu nerveux : elles représentent entre 10 et 15% de la totalité cellulaire des différentes régions cérébrales (Perry et al., 1993). Recrutées sur les sites d'inflammation grâce à la libération de nucléotides telles que l'adénosine triphosphate (ATP) par les neurones lésés, leur activation peut tout aussi bien s'avérer préjudiciable que favorable pour la neurogenèse (Butovsky et al., 2006; Napoli and Neumann, 2009). Certaines données suggèrent qu'elles pourraient maintenir les propriétés neurogènes de certains tissus, voire promouvoir la prolifération de précurseurs neuronaux en sécrétant des facteurs de survie neuronale comme le BDNF (Batchelor et al., 1999; Walton et al., 2006; Bessis et al., 2007; Nakajima et al., 2007; Jakubs et al., 2008) ou le TNF- $\alpha$  qui possède un rôle pro- ou anti-neurogène selon les modèles animaux, les lésions et les zones cérébrales (Whitney et al., 2009). Les cellules microgliales, tout comme les astrocytes, sécrètent parfois des cytokines proinflammatoires (Ekdahl et al., 2003; Monje et al., 2003) et du monoxyde d'azote (NO), facteur connu pour défavoriser la neurogenèse (Torroglosa et al., 2007). Leur pouvoir d'action dépendrait de leur stade d'activation et de leurs changements morphologiques. Il a été montré que certaines pathologies telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, pour lesquelles la neurogenèse secondaire est d'ailleurs affectée, s'accompagnaient de changements inflammatoires et d'une augmentation du nombre de cellules microgliales (Voloboueva and Giffard, 2011). En outre, suite à un AVC induit expérimentalement, Andreas Arvidsson a montré qu'en moyenne seulement 0,2% des neurones qui avaient dégénéré étaient remplacés par des neuroblastes migrant depuis le flux migratoire rostral (Arvidsson et al., 2002). La mort cellulaire massive consécutive à l'AVC pourrait notamment s'expliquer par la présence de phénomènes inflammatoires (Kokaia et al., 2006) qui joueraient à l'encontre de la neurogenèse post-lésionnelle.

### 3.3.10 Apoptose induite expérimentalement et neurogenèse réactionnelle

L'une des premières études ayant révélé le phénomène de neurogenèse réactionnelle fut celle qu'entreprirent Constance Schaff et ses collègues. Dans la lignée des célèbres travaux obtenus par Fernando Nottebohm (1981), ils induisirent une ischémie cérébrale focale dans le centre vocal supérieur de diamants mandarins en appliquant une drogue phototoxique (Scharff et al., 2000) permettant de tuer par apoptose, donc sans réaction inflammatoire, les neurones ayant incorporé la drogue. Cette lésion engendra une augmentation du nombre de cellules prolifératives dans cette zone déjà reconnue pour être neurogène (Nottebohm, 1981). Elle eut également des répercussions fonctionnelles sur l'apprentissage du chant saisonnier chez les oiseaux lésés. La même année fut publiée une étude mettant en évidence que l'apoptose neuronale induite par la même méthode (phototoxicité) induisait une neurogenèse réactionnelle dans le cortex antérieur, zone pourtant non-neurogène chez le rongeur (Magavi et al., 2000). Dans la rétine du rongeur, l'injection de NMDA intraoculaire causa la dégénérescence de neurones appartenant à des couches internes de la rétine et stimula la prolifération de la glie de Müller, un type spécifique de cellules gliales de la rétine, générant de nouveaux neurones (Karl et al., 2008). Ces études suggèrent d'une part que la mort neuronale par apoptose pourrait être suffisante pour induire un remplacement cellulaire focal et temporaire dans certaines zones cérébrales, et d'autre part que les phénomènes d'inflammation pourraient être plus délétères que prévu.

### 3.3.11 Lésions mécaniques, axotomies et prolifération cellulaire réactionnelle

La plupart des lésions du tissu nerveux engendrent une prolifération cellulaire massive qui généralement se mue en cicatrice gliale au niveau du site lésionnel. Ainsi lors de lésions de la moelle épinière par exemple, une cicatrice gliale se forme et entrave toute repousse axonale et prolifération cellulaire à visée réparatrice (Horky et al., 2006; Sofroniew, 2009). Pour que le site de la lésion puisse accueillir une neurogenèse fonctionnelle, l'environnement cellulaire doit être proneurogène, ce qui en temps normal n'est pas le cas de la moelle épinière, ni de la majeure partie des zones de l'encéphale. Aussi de nombreuses recherches visent-elles depuis des décennies à comprendre et à manipuler les restrictions anti-neurogènes du système nerveux central. Toutefois, il a été consigné que certaines lésions mécaniques avaient occasionné une neurogenèse ; après aspiration corticale par exemple, il é été observé que la neurogenèse de la ZSV avait augmenté, tout comme l'expression locale de PSA-NCAM (Szele and Chesselet, 1996). En 2000, Sanjay Magavi injecta une drogue chromato-neurotoxique chez la souris qui détruisit environ 20% des neurones cortico-thalamiques, sans engendrer de nécrose ou d'inflammation. De manière inattendue, des neuroblastes en provenance de la

ZSV migrèrent jusqu'au site lésionnel et s'y différencièrent en neurones cortico-thalamiques (Magavi et al., 2000). Lorsque ce même protocole fut appliqué à des neurones cortico-spinaux, la même équipe de chercheurs découvrit des résultats similaires (Chen et al., 2004). Joo-Hee Walzlein montra également que lors d'un glioblastome induit dans le cortex de souris, des précurseurs de la ZSV étaient déviés du flux migratoire rostral pour contacter le site de la tumeur et y accomplir une action antitumorigène. Parallèlement, une diminution du taux de neurogenèse dans le bulbe olfactif a été observée (Walzlein et al., 2008). Ainsi, les précurseurs de la ZSV pourraient servir de réservoir pour alimenter des zones cérébrales adjacentes : leur déviation du flux migratoire rostral serait une voie thérapeutique fort intéressante. De nombreux paramètres restent cependant encore à maîtriser, notamment en ce qui concerne leur intégration fonctionnelle et durable.

**Tableau III Facteurs extrinsèques et pathologiques modulant certaines des étapes de la neurogenèse adulte**

<b>Facteurs régulateurs</b>	<b>Prolifération</b>	<b>Survie</b>	<b>Différenciation</b>	<b>Références</b>
<b>Facteurs extrinsèques</b>				
<i>Vieillessement</i>	-		-	Goldman et al. 1997, Cameron and McKay 1999, Hatfalgandy and Shetty 2008, Ahlenius et al. 2009, Lee et al. 2011
<i>Environnement enrichi</i>	+	+	+	Rosenzweig 1962, Bernea et Nofzbohm 1994, Kempermann et al. 1997, Young et al. 1999, Van Praag et al. 2000
<i>Activité physique</i>	+	+		Kempermann et al. 2002, Van Praag et al. 2005, Kronenberg et al. 2006, Fabel et al. 2009
<i>Interactions sociales</i>	+ ?			Smith et al. 2001, Fowler 2002, Kozorovitskiy and Gould 2004, Fox et al. 2010, Lau 2011,
<i>Diète</i>	+	+		Stewart et al. 1989, Duan et al. 2001, Lee et al. 2002, Bondolfi et al. 2004, Kumar et al. 2009
<i>Nicotine</i>	-	-	-	Abrous et al. 2002, Shingo et al. 2005, Scerri et al. 2006, Buijzeel et al. 2011
<i>Apprentissage hippocampo-dépendant</i>	+ ?	+	+	Gould et al. 1999, Shors et al. 2002, Dupret et al. 2007, Jaholkowski et al. 2009, Wolf et al. 2009, Lemaire et al. 2012
<i>Enrichissement olfactif</i>		+		Rochefort et al. 2002
<i>Déprivation d'odeurs</i>		-		Corotio et al. 1994, Cummings et al. 1997, Gheusi et al. 2000
<b>Conditions pathologiques</b>				
<i>Stress</i>	+/-	+/-		Gould et al. 1997, Cameron et al. 1998, Tanapat et al. 2001, Joëls et al. 2007, Lau et al. 2007, Leuner et al. 2010, Lyons et al. 2010, Parihar et al. 2011
<i>Privation de sommeil</i>	-	-		Guzman-Marin et al. 2005, Roman et al. 2005, Mirescu et al. 2006, Meerlo 2008
<i>Dépression</i>	- ?	- ?	- ?	Rajkowska et al. 2000, Bremner et al. 2000, Czéh et al. 2007
<i>Consommation d'alcool</i>	-	-	-	Jacobs et al. 2001, Tabeno et al. 2005, Nixon et al. 2002, Klimsova et al. 2007, Morris et al. 2010
<i>Accident vasculaire cérébral</i>	+	-		Arvidsson et al. 2002, Parent et al. 2002, Nakabni 2002, Ohira 2010
<i>Epilepsie</i>	+		+	Parent et al. 1997, Jung et al. 2004, Parent et al. 2007, Zhao et Overstreet-Wadiche 2008, Kraev et al. 2009
<i>Maladie de Huntington</i>	+/-			Tattersfield et al. 2004, Phillips et al. 2005
<i>Maladie d'Alzheimer</i>	+/-	-	-	Feng et al. 2001, Haughey et al. 2002, Wang et al. 2004, Jin et al. 2004, Donovan et al. 2006, Rohe et al. 2008, Lopez-Toledano et al. 2007, Li et al. 2008
<i>Facteurs de l'inflammation</i>	+/-	+/-	+	Horner et al. 2003, Ekdahl et al. 2003, Wong et al. 2004, Monje et al. 2005, Whitney et al. 2009
<i>Apoptose</i>	+			Scharff et al. 2000, Magavi et al. 2000, Karl et al. 2008
<i>Axotomies</i>	+	+	+	Bauer et al. 2005, Tighilet et al. 2007

**Tableau III. Tableau synthétisant l'effet de facteurs environnementaux et de conditions pathologiques sur la modulation des différentes étapes de la neurogenèse adulte chez le mammifère.** Les effets rapportés peuvent être positifs (+), négatifs (-), contrastés selon les études (+/-), ou donnant un effet positif d'après certaines études, et n'ayant pas d'effet d'après d'autres études (+ ? ou - ?).

Dans le domaine des lésions cérébrales également, il a été découvert qu'une section du nerf vague - appelée aussi vagotomie - engendrait une neurogenèse réactionnelle importante dans le complexe vagal dorsal (Bauer et al., 2005). Cet ensemble de noyaux, qui est déjà le site d'une légère neurogenèse secondaire chez l'animal sain, augmente son potentiel neurogène durant la première semaine après vagotomie (jusqu'à 18 fois au-dessus du niveau contrôle dans le noyau dorsal moteur du vague ipsilatéral). Dans un cadre lésionnel, des noyaux du tronc cérébral semblent donc capables d'acquérir une permissivité ponctuelle pour la neurogenèse. De surcroît, d'autres noyaux situés à proximité, les noyaux vestibulaires, se sont révélés porteurs de cette étonnante propriété. A l'origine non-neurogènes chez l'animal adulte en bonne santé, ils sont pourtant le siège d'une neurogenèse réactionnelle importante après section du nerf vestibulaire (Tighilet et al., 2007).

### **Conclusion et éléments-clés**

- La neurogenèse est un mécanisme de plasticité extrêmement influençable car une étonnante quantité de facteurs, aussi bien intrinsèques qu'extrinsèques, modulent son expression et par-là même, sa fonctionnalité.
- Ces facteurs se recoupent et semblent interdépendants les uns des autres.
- Si la production de nouveaux neurones survient majoritairement dans la ZSV et la ZSG, des conditions pathologiques sont capables de suspendre ponctuellement les mécanismes anti-neurogènes en vigueur dans d'autres zones du tissu nerveux.

## Deuxième partie de l'introduction

La compensation vestibulaire : un excellent modèle de plasticité post-lésionnelle qui implique la Neurogenèse



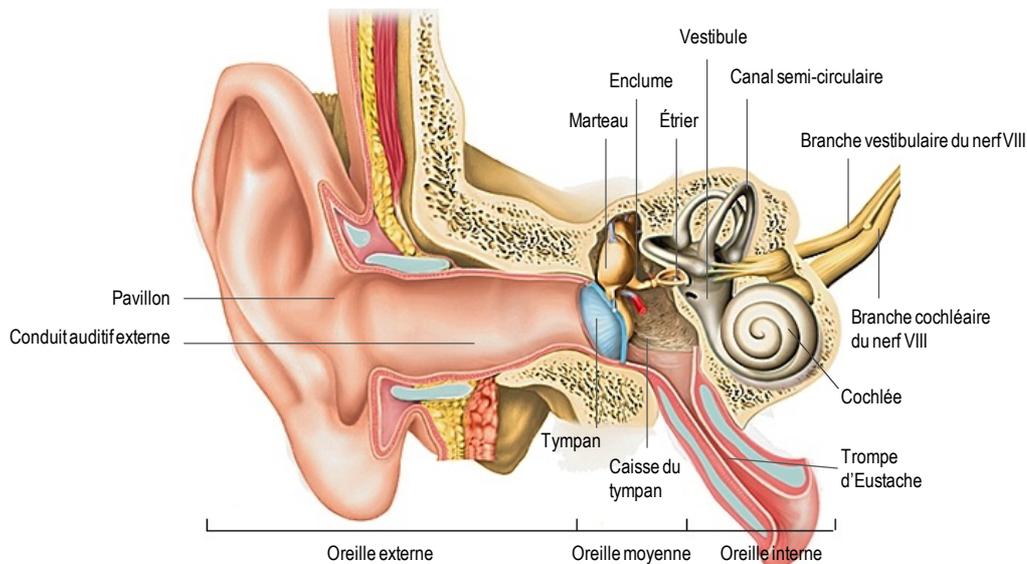
## PARTIE 2 - Chapitre 1

### Rappels sur l'organisation anatomo-fonctionnelle du système vestibulaire

L'élaboration d'un référentiel géocentré et le maintien de l'équilibre postural font partie des nombreux attributs qu'offre le système vestibulaire. Présent chez une majorité d'espèces jusqu'au bas de l'échelle phylogénétique, il permet notamment l'orientation de l'individu et la stabilisation du regard. Dans le cadre de la description de ce système, nous évoquerons son organisation anatomo-fonctionnelle périphérique et centrale, en ciblant particulièrement les données en rapport avec les travaux présentés dans ce mémoire de thèse.

#### 1.1 Système vestibulaire périphérique

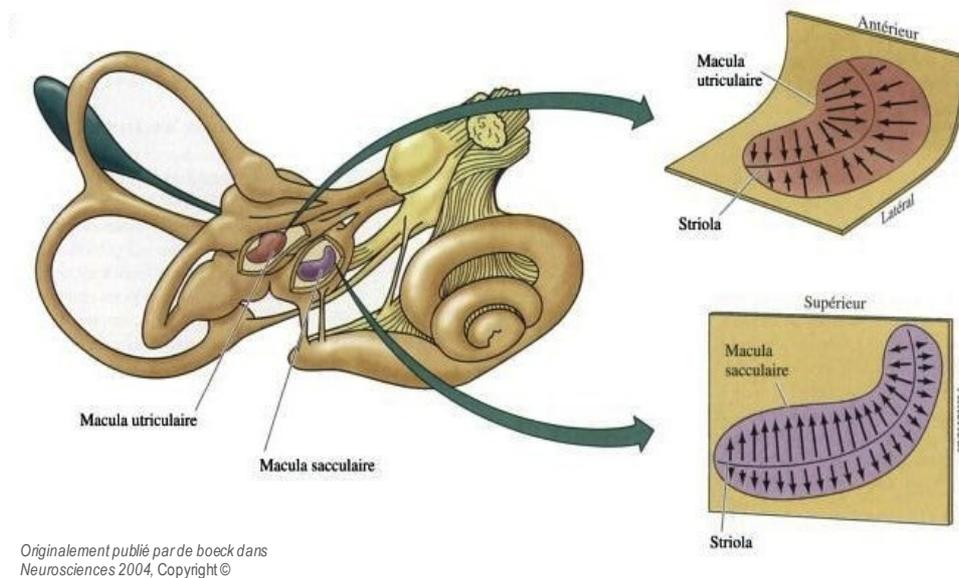
Le système vestibulaire périphérique des mammifères se compose de récepteurs spécialisés localisés dans l'os temporal, plus précisément dans l'oreille interne (voir *Figure 9*). Trois paires de canaux semi-circulaires et deux paires de récepteurs otolithiques (utricule et saccule) sont protégées par une structure osseuse appelée le labyrinthe osseux. Ce dernier comprend une série de cavités où se trouve un liquide similaire au liquide céphalo-rachidien : la périlymphe. De plus, il est tapissé par le labyrinthe membraneux, réceptacle d'un autre liquide : l'endolymphe, riche en ions potassium  $K^+$ .



Originellement publié par Larousse Copyright ©

**Figure 9. Description anatomique de l'oreille.**

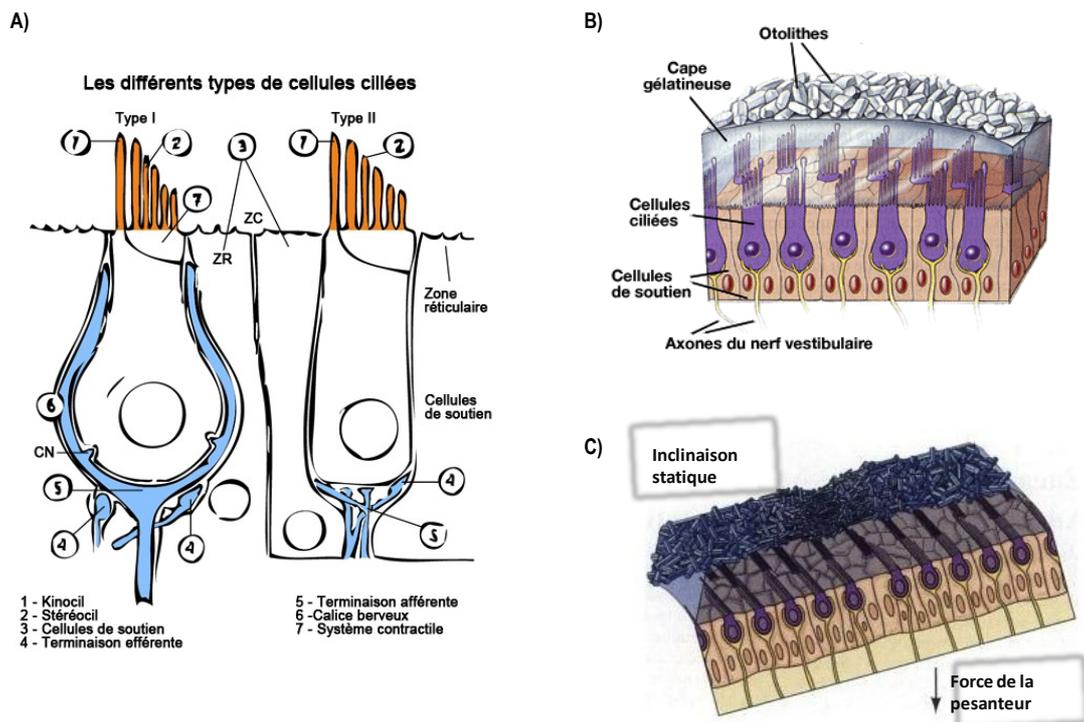
Les trois paires de canaux semi-circulaires sont orientés approximativement de façon orthogonale dans l'espace. On distingue les canaux semi-circulaires antérieurs, postérieurs et latéraux (ou horizontaux). Tous trois permettent de détecter les accélérations angulaires. Le labyrinthe membraneux de ces canaux semi-circulaires débouche sur l'utricule et le saccule, deux cavités composées chacune d'une macule (*i.e.* surface plane sur laquelle reposent des cellules ciliées), qui permettent la détection d'accélérations linéaires respectivement horizontales et verticales. La macule utriculaire est disposée sur un plan horizontal sensiblement parallèle au plan des canaux semi-circulaires horizontaux, tandis que la macule sacculaire est disposée sur un plan vertical proche de celui des canaux antérieurs, voir *Figure 10*.



**Figure 10. Polarisation morphologique des macules sacculaires et utriculaires.**

Un épithélium constitué de cellules de soutien et de deux types de cellules sensorielles recouvre l'intérieur des canaux semi-circulaires et des macules utriculaires et sacculaires. Les cellules de type I, piriformes, possèdent la forme d'une bouteille évasée et sont réparties de manière hétérogène dans les différents récepteurs vestibulaires. Les cellules de type II, quant à elles, sont de forme cylindrique (voir *Figure 11*). Chacune de ces cellules est coiffée d'un assortiment de 50 à 110 stéréocils répartis sur trois rangées parallèles, ainsi que d'un stéréocil plus long polarisé dans un axe spécifique. Les cils de ces différentes cellules sont emboîtés dans une structure gélatineuse recouverte de cristaux de carbonate de calcium en suspension, les otoconies ou otolithes. Lors d'un déplacement, par suite des forces

d'inertie, les otolithes et les stéréocils sont animés d'un mouvement. L'inclinaison des stéréocils dans la direction du kinocil induit l'ouverture plus ou moins longue de canaux ioniques (Chabbert et al., 1996). Ces derniers laissant passer des ions potassium, la transduction mécano-électrique du message nerveux se caractérise ainsi par une augmentation de la fréquence de décharge du nerf vestibulaire. En revanche, lorsque les stéréocils se déplacent dans la direction opposée à celle du kinocil, la fréquence de décharge des afférences primaires diminue. Ainsi de très petites accélérations, de l'ordre de quelques dixièmes de g, et de très faibles inclinaisons de la tête, sont détectées par les capteurs qui



Originellement édité sur vestib.org, Copyright ©

Originellement publié par de boeck dans Neurosciences 2004, Copyright ©

jouent un rôle d'accéléromètre et d'inclinomètre.

**Figure 11. Organisation anatomique des cellules ciliées labyrinthiques.** A) Schéma de l'épithélium sensoriel et des deux types morphologiques de cellules ciliées. B) Les cils de ces cellules sont emboîtés dans une structure gélatineuse recouverte de cristaux de carbonate de calcium en suspension : les otoconies ou otolithes. Lorsque le vecteur gravitaire est perpendiculaire au plan de la macule, les cellules ciliées ne sont pas excitées. C) En revanche, lorsque le vecteur gravitaire est incliné par rapport au plan de la macule, es otolithes et les stéréocils sont animés d'un mouvement qui engendre une dépolarisation.

Les corps cellulaires des afférences vestibulaires sont situés dans le ganglion de Scarpa et projettent sur les noyaux vestibulaires ipsilatéraux situés dans le tronc cérébral. Les fibres de ces

neurones bipolaires, dont le nombre a été estimé à 12 000 (Gacek, 1969), constituent le nerf VIII ou nerf vestibulo-cochléaire qui relie les récepteurs vestibulaires aux structures centrales. 10% de ces fibres sont d'un diamètre important, 70% sont des fibres de diamètre moyen, et 20% sont de petit diamètre, répondant à l'excitation de plusieurs cellules sensorielles regroupées. Les fibres afférentes possèdent une activité spontanée de l'ordre de 35 potentiels d'action par seconde chez le chat (Estes et al., 1975). Le nerf vestibulo-cochléaire et le nerf facial constituent le paquet acoustico-facial qui traverse le tronc cérébral, entre le pont de varole et le bulbe rachidien.

Les informations captées de manière symétrique par l'ensemble de ces récepteurs permettent de rendre compte des déplacements de la tête de l'individu dans l'espace en se basant sur un référentiel invariant et absolu.

## 1.2 Système vestibulaire central

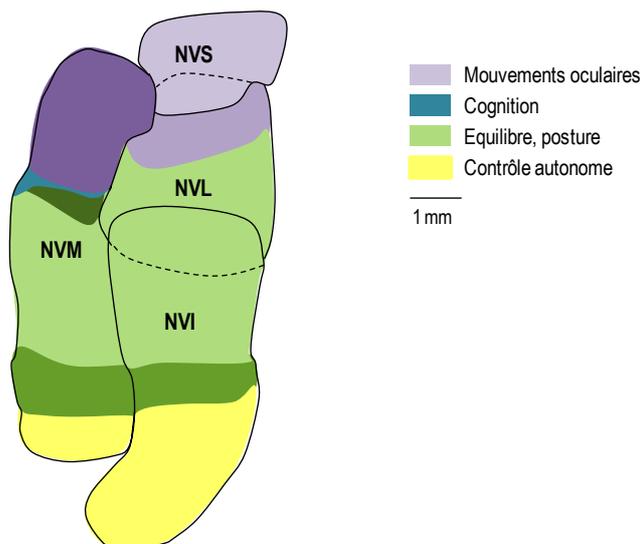
### 1.2.1 Afférences vestibulaires et complexe des noyaux vestibulaires

Une fois captées par les récepteurs vestibulaires périphériques, les informations sont acheminées par les axones des neurones afférents constituant la branche vestibulaire du nerf vestibulo-cochléaire. Ce nerf se projette ipsilatéralement sur les noyaux vestibulaires (NV) situés dans le tronc cérébral, au niveau de la jonction ponto-bulbaire et du plancher du IV<sup>e</sup> ventricule. Grâce à la voie des commissures vestibulaires, système inhibiteur reliant les NV homologues, les signaux provenant de chaque côté de la tête sont optimisés et amplifiés lorsqu'ils convergent vers les NV.

Le complexe des NV se caractérise par quatre noyaux distinguables sur la base de leur morphologie et des connexions entre la périphérie et les centres supérieurs (voir *Figure 12*) :

1. Le **noyau vestibulaire médian (NVM)**, appelé aussi noyau de Schwalbe ou triangulaire, est l'un des NV les plus volumineux. Il se projette aussi bien au niveau spinal via le faisceau vestibulo-spinal médian (FVSM), que sur le cervelet ou encore sur les noyaux oculomoteurs.
2. Le **noyau vestibulaire inférieur (NVI)**, appelé également descendant, spinal ou encore noyau de Roller est principalement dévolu au contrôle de la posture. Il se projette essentiellement sur le cervelet, le noyau fastigial et la moelle épinière à travers le FVSM.
3. Le **noyau vestibulaire latéral (NVL)** ou encore noyau de Deiters, impliqué notamment dans le contrôle postural et duquel se projette la majeure partie des neurones constituant les voies vestibulo-spinales. Les neurones du NVL se projettent ipsilatéralement sur les motoneurones de la moelle épinière via le faisceau vestibulo-spinal latéral (FSL) et sur le cervelet.

4. Le **noyau vestibulaire supérieur (NVS)** désigné parfois noyau de Bechterew est un noyau essentiellement oculomoteur. Il est le seul à n'envoyer aucune projection directe vers la moelle épinière et à contacter principalement les noyaux oculomoteurs grâce au faisceau longitudinal médian ascendant (FLM).



*D'après McCall et Yates 2011 front neurol 2(88):7*

**Figure 12 . Représentation schématique d'une section horizontale des noyaux vestibulaires chez le chat adulte.** Les noyaux vestibulaires modulent notamment les mouvements oculaires (violet), l'orientation spatiale (bleu), l'équilibre et la posture (en vert), ainsi que des réponses du système nerveux autonome (jaune). NVI : noyau vestibulaire inférieur ; NVL : noyau vestibulaire latéral ; NVM : noyau vestibulaire médian ; NVS : noyau vestibulaire supérieur.

Le nerf vestibulaire se projette en deux branches dans le complexe des NV : la branche ascendante contacte le NVM, le NVS, ainsi que le cervelet via le pédoncule cérébelleux inférieur ; la branche descendante se termine dans le NVM, le NVI et le NVL. La transmission des informations vestibulaires s'effectue essentiellement grâce au glutamate et à l'aspartate. Les NV sont le centre d'une grande variété d'afférences sensorielles en provenance du cervelet et des systèmes visuel et somesthésique.

Il est intéressant de noter que le cervelet envoie des afférences vers les NV. En effet, les cellules de Purkinje projettent leurs axones vers les neurones des NV. D'autres types d'afférences atteignent les NV : les afférences visuelles qui empruntent la voie optocinétique, les afférences spinales en provenance de la moelle épinière, enfin les afférences corticales ou commissurales. L'hypothalamus, le

locus coeruleus, la formation réticulée, les noyaux du raphé et le cortex pariétal se projettent également sur le complexe des NV (Straka et al., 2005).

### 1.2.2 Efférences et fonctionnalité du système vestibulaire

Les efférences des NV propagent les messages vestibulaires vers un ensemble de structures très diversifiées :

1. Les structures oculomotrices du tronc cérébral via le faisceau longitudinal médian et le faisceau ascendant de Deiters. Les NV sont ainsi en relation avec les muscles oculomoteurs percevant également des projections des nerfs oculomoteur (nerf III), trochléaire (nerf IV) et abducens (nerf VI). Cet ensemble constitue le système vestibulo-oculaire.
2. La moelle épinière dont les étages médullaires reçoivent les axones des neurones vestibulaires de second ordre qui participent au système vestibulo-spinal.
3. Les noyaux thalamiques constituent les premiers relais de la voie vestibulo-corticale.
4. Le cervelet, qui fait partie du système vestibulo-cérébelleux.
5. Des aires corticales (cortex vestibulaire pariéto-insulaire, aire 3a et 2v). Ces aires cérébrales sont multisensorielles et intègrent donc, en plus des informations vestibulaires, des signaux divers issus de modalités sensorielles telles que la proprioception et la vision.

### 1.2.3 Traitement central des informations vestibulaires

Aucune sensation consciente distincte n'émerge directement des récepteurs vestibulaires car au niveau central, des informations issues de plusieurs systèmes sensoriels (muscles, tendons, peau, yeux) s'ajoutent continuellement aux informations vestibulaires. L'ensemble de ces signaux participe à l'élaboration de fonctions allant de réflexes basiques jusqu'à de hauts niveaux de conscience et de perception.

#### *a) Messages d'origine canalaire ou ampullaire*

Les neurones vestibulaires en contact avec les canaux semi-circulaires ont été décrits et répertoriés en quatre types cellulaires par Gernandt (1949) et Duensing et Schaefer (1958) (Gernandt, 1949; Duensing and Schaefer, 1958):

- Les cellules de type I qui sont activées lors d'une rotation ipsilatérale, inhibées par une rotation en sens inverse
- Les cellules de type II qui réagissent de façon inverse aux cellules de type I
- Les cellules de type III qui sont excitées quel que soit le sens de rotation

- Les cellules de type IV qui sont inhibées quel que soit le sens de rotation

Ces populations se subdivisent en neurones toniques et en neurones phasiques. Les neurones toniques sont activés polysynaptiquement et déchargent pendant toute la durée de la stimulation. Ils possèdent un gain faible, c'est-à-dire que le rapport entre l'amplitude de la décharge neuronale et la vitesse de rotation n'est guère élevé. Ces neurones répondent aux faibles accélérations et participent au maintien de l'activité électrique de base des NV (de l'ordre de 35 PA/sec chez le chat (Estes et al., 1975), notamment en charge du contrôle des musculatures oculaires et segmentaires. Les neurones phasiques sont activés monosynaptiquement et possèdent un seuil de réponse plus élevé. Sensibles aux fortes accélérations, ils ne déchargent qu'au début d'une stimulation et participent au contrôle des activités musculaires lors de brusques accélérations.

#### *b) Messages d'origine otolithique*

Des études anatomiques et physiologiques ont révélé l'existence de quatre types de neurones vestibulaires centraux connectés à l'utricule et au saccule. Leur localisation se situe préférentiellement dans le NVL et le NVI et leur pattern de réponse varie en fonction de l'inclinaison statique sur le plan frontal (Duensing and Schaefer, 1959; Peterson, 1970) :

- Les cellules de type  $\alpha$  sont activées par une inclinaison de la tête du côté ipsilatéral et inhibées par une inclinaison controlatérale
- Les cellules de type  $\beta$  qui possèdent un pattern de réponse opposé
- Les cellules de type  $\gamma$  qui augmentent leur fréquence de décharge quel que soit le sens de l'inclinaison
- Enfin les cellules de type  $\delta$  qui diminuent leur fréquence de décharge quel que soit le sens de l'inclinaison

Ainsi le système vestibulaire est-il lié au contrôle de la posture et de la locomotion, de la stabilisation du regard et de l'orientation spatiale. Le complexe des NV est un véritable centre d'intégration sensorimotrice qui autorise l'élaboration d'informations tridimensionnelles d'un grand intérêt pour le déplacement des individus et pour leurs représentations sensorielles de l'environnement. En outre, de par ses nombreuses connexions afférentes et efférentes, le système vestibulaire régit un ensemble de réflexes visant à stabiliser la posture (réflexe vestibulo-spinal), la tête (réflexe vestibulo-nucal) ainsi que le regard (réflexe vestibulo-oculaire).

#### *c) Réflexes en lien avec la voie vestibulo-spinale*

De nombreux neurones de second ordre localisés dans les NV se projettent sur les étages médullaires de la moelle épinière et contactent les neurones de la corne antérieure grâce aux faisceaux vestibulo-spinaux (latéral, médian et caudal) et au faisceau réticulo-spinal issu de la formation réticulée. Ces voies participent ainsi au contrôle postural de la tête, du cou et des muscles squelettiques antigravitaires des membres.

#### *Réflexes de redressement*

L'existence de ce réflexe a été pour la première fois révélée en 1926 chez l'animal et chez l'homme par Rudolph Magnus dans la revue *The Lancet*. En effet les organes labyrinthiques autorisent les réflexes de redressement en impliquant la musculature du cou afin de ramener les canaux semi-circulaires horizontaux et les utricules sur le plan horizontal. En cas de désafférentation labyrinthique, ces réflexes disparaissent.

#### *Réflexes d'équilibration dynamique*

Ces réflexes permettent aux individus de conserver leur équilibre alors que se déplaçant dans l'espace, ils changent soudain de trajectoire (Lacour and Borel, 1993). Sous-tendus par les informations canales, ils permettent de ramener la tête dans la direction opposée à celle de la rotation grâce à des contractions musculaires. Cette réaction annihile alors l'entrée labyrinthique originelle.

#### *Ajustements posturaux statiques*

Ces ajustements automatiques servent à maintenir un tonus musculaire adéquat des muscles du cou et des membres. Ils permettent d'adapter la position de l'individu en cas de chute. Les entrées maculaires sont responsables de ces ajustements qui gouvernent le polygone de sustentation, ainsi que la projection du centre de gravité en son centre.

#### *d) Réflexes en lien avec le système oculomoteur*

Lors de déplacements dans l'espace, les images défilent sur la rétine mais apparaissent pourtant stabilisées tandis que l'acuité visuelle est préservée. Ces mécanismes sont directement liés au réflexe vestibulo-oculaire et aux voies oculomotrices qui se projettent dans le noyau oculomoteur commun (III), le noyau trochléaire ou pathétique (IV) et le noyau abducens ou moteur oculaire externe (VI) qui gouvernent la musculature extra-oculaire. Ainsi le système vestibulaire assure-t-il la stabilisation du regard grâce aux entrées canales et otolithiques et la stabilisation des images sur la rétine lors de déplacement de l'environnement visuel par ce que l'on nomme le réflexe optocinétique.

e) *Système vestibulaire et cognition spatiale*

Le système vestibulaire participe à la construction du référentiel gravitaire qui gouverne l'orientation de la posture. Il contribue en outre à l'orientation spatiale, à la mémorisation des trajectoires dans un environnement, et chez l'humain, à la perception de la verticale visuelle subjective. Les neurones vestibulaires de second ordre font relais dans le thalamus avant de contacter le cortex cérébral. Plus précisément, les projections vestibulo-thalamiques qui ont été décrites aboutissent dans neuf noyaux thalamiques : le noyau ventral postérieur latéral (VPL) qui est également un relais pour les voies somesthésiques ; le noyau ventral postérieur médian (VPM) ; le noyau ventral postérieur inférieur (VPI) ; les complexes nucléaires ventral antérieur et ventral latéral (VA-VL) qui contactent pour leur part les noyaux cérébelleux, les noyaux gris centraux et le cortex prémoteur ; le groupe postérieur du thalamus (Po) ; les noyaux intralaminaires (IL) ; les corps genouillés médians (CGM) qui font aussi figure de relais des voies auditives ; les corps genouillés latéraux (CGL) qui pour leur part sont impliqués dans les voies visuelles ; et enfin le noyau latéral postérieur (LP).

Chez l'animal, les neurones du noyau ventro-postérieur du **thalamus** répondent à des rotations de la tête de manière similaire aux neurones situés dans le complexe des NV : ils possèdent une direction préférentielle et leur fréquence de décharge est fonction de la celle de la rotation angulaire de la tête (Buttner et al., 1977).

Par la suite, les informations vestibulaires se projettent sur plusieurs **aires corticales** situées aux niveaux temporo-pariétal, insulaire et frontal. Les plus importantes sont les aires 2v, 3av et le cortex pariétal postérieur. Contrairement aux autres modalités sensorielles telles que l'audition ou la vision, qui se projettent sur des aires corticales spécifiques (cortex visuel primaire), il n'existe pas de cortex vestibulaire primaire unique, mais plusieurs aires de réception étroitement interconnectées. De plus, les aires corticales recevant les informations vestibulaires présenteraient plutôt la particularité d'être multisensorielles. Pour de plus amples informations, voir Lopez et Blanke (2011) (Lopez and Blanke, 2011).

Il est opportun de noter que la **formation hippocampique** et le système vestibulaire collaborent assez étroitement. Cet axe sera davantage développé dans la *Partie 2.2.1* ainsi que dans la dernière *Partie de la Discussion* de ce mémoire.

*f) Système végétatif et système vestibulaire*

Les NV sont également reliés à l'area postrema, au noyau du tractus solitaire et au noyau dorsal du vague qui sont en charge des réactions végétatives telles que la pression artérielle, le rythme cardiaque, la motilité viscérale et les sécrétions salivaires (Yates, 1992). Des voies coeruleo-vestibulaires provenant de la partie caudale du locus coeruleus contactent les NV et sont aussi impliquées dans les fonctions de vigilance (Balaban and Porter, 1998).

**Conclusion et éléments-clés**

- Le système vestibulaire périphérique est un véritable centre inertiel qui capte toutes les accélérations de la tête.
- Il permet le contrôle de la posture, le contrôle oculomoteur, l'orientation et la navigation spatiale.
- Enfin le complexe des noyaux vestibulaires, situé dans le tronc cérébral au niveau du plancher du IV<sup>e</sup> ventricule, est en relation avec de nombreuses structures bulbaires, sub-corticales et corticales.

## Partie 2 - Chapitre 2

### *Désafférentation vestibulaire et mécanismes de plasticité impliqués dans la compensation vestibulaire*

---

L'une de nos préoccupations majeures consiste à tenter de relier des réorganisations cellulaires et moléculaires à des changements comportementaux. Cette tâche ardue est néanmoins envisageable dans l'étude des phénomènes de plasticité postlésionnelle qui surviennent à la suite d'une désafférentation vestibulaire.

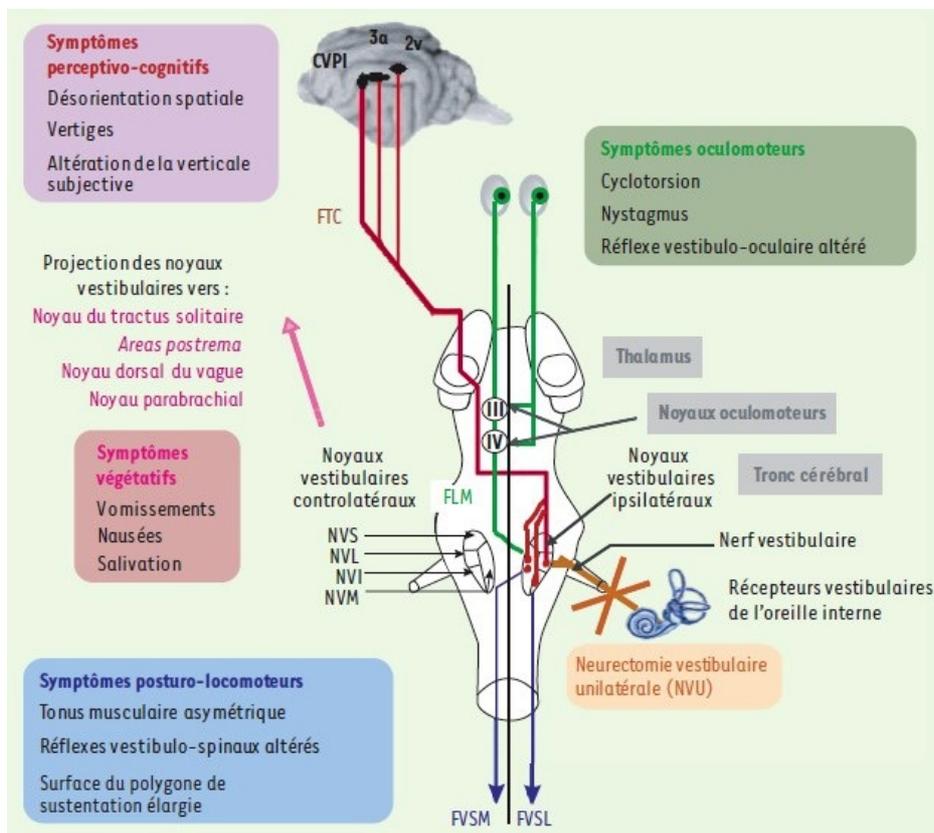
#### 2.1 Le syndrome vestibulaire

Les fonctions vestibulaires sont assurées par un pattern symétrique d'afférences convergeant vers les noyaux vestibulaires (NV) homologues situés dans le tronc cérébral. Du fait de son organisation anatomo-fonctionnelle, une perte partielle ou complète des informations vestibulaires engendre systématiquement, chez une grande variété d'espèces y compris l'homme, un **syndrome vestibulaire** caractéristique. En raison des interactions existant entre les différentes modalités sensorielles et les noyaux vestibulaires centraux, une atteinte se répercute à différents niveaux de préjudice. Quatre grandes classes de désordres peuvent être répertoriées : 1) les désordres posturo-locomoteurs, 2) oculomoteurs, 3) végétatifs, et 4) spatio-cognitifs (*Figure 13*).

On oppose classiquement les symptômes statiques aux symptômes dynamiques. **Les symptômes dits statiques** sont observables aux stades critique et aigu d'une lésion vestibulaire, en l'absence de mouvement de la tête ou de déplacement du corps dans l'espace.

- 1) Ainsi un syndrome oculomoteur statique se manifeste par un nystagmus vestibulaire horizontal spontané d'origine canalaire. Le nystagmus est un mouvement involontaire et saccadé du globe oculaire qui comprend deux composantes, une dérive lente du côté désafférenté et une secousse de rappel rapide dirigé vers le côté sain. Les globes oculaires sont également déviés vers le bas pour l'œil du côté ipsilatéral et vers le haut pour l'œil opposé ; il existe également une cyclotorsion du globe oculaire côté de la lésion. Ces signes témoignent de l'atteinte otolithique.

- 2) Un syndrome postural statique, caractérisé par une rotation de la tête dans les plans frontal et horizontal du côté ipsilatéral à la lésion, est quelquefois accompagné d'un nystagmus de la tête et d'une courbure du tronc. La tonicité musculaire des membres se répartit asymétriquement, avec une flexion du côté désafférenté et une extension des muscles du côté controlatéral. Par



Issu de Dutheil et al. 2011 med sci 27(6-7):605

conséquent, l'animal a tendance à chuter fréquemment et à élargir la surface de son polygone de sustentation afin d'abaisser son centre de gravité.

**Figure 13. Organisation anatomo-fonctionnelle du complexe des noyaux vestibulaires (NV).** Le nerf vestibulaire contacte les cellules sensorielles des récepteurs labyrinthiques périphériques (canaux semi-circulaires, utricule et saccule) et se projette ipsilatéralement sur les 4 différents noyaux vestibulaires (NV) : médian (NVM), inférieur (NVI), latéral (NVL) et supérieur (NVS). Les NV sont localisés dans la partie dorso-latérale de la jonction bulbo-protubérantielle du tronc cérébral, sous le plancher du IVème ventricule. Ils forment le premier relais des réflexes vestibulo-oculaires, vestibulo-spinaux, vestibulo-végétatifs et des voies ascendantes vestibulo-corticales impliquées dans l'orientation spatiale. Les NV sont à l'origine de messages prémoteurs (commande de la musculature oculaire et somatique) au service de la régulation de la posture et de la stabilisation du regard. Ils projettent, par le faisceau longitudinal médian (FLM) sur les noyaux oculomoteurs (noyau oculomoteur III, noyau trochléaire ou abducens IV) dont les motoneurones commandent la musculature oculaire afin de produire des réactions compensatoires de l'œil stabilisant les images sur la rétine lors de mouvements de la tête. Les projections vestibulo-spinales, originaires du NVL ipsilatéral, atteignent tous les étages médullaires via le faisceau vestibulo-spinal latéral (FVSL). Les projections controlatérales des NV médian, inférieur et latéral constituent le faisceau vestibulo-spinal médian (FVSM) et commandent les motoneurones du cou et de la partie supérieure de l'axe du corps. Les NV reçoivent des afférences cérébelleuses, médullaires (proprioceptives), visuelles (optocinétiques), des noyaux vestibulaires controlatéraux et des aires corticales. Chez

les mammifères supérieurs, il existe plusieurs aires corticales plurisensorielles impliquées dans la réception des messages vestibulaires (aire 3a, aire 2v, cortex vestibulaire pariéto-insulaire) cheminant par le FTC (faisceau thalamo-cortical).

- 3) Des symptômes végétatifs se traduisent notamment chez l'homme par des épisodes nauséux, une sudation, une accélération du rythme cardiaque, ainsi qu'une modification de la pression artérielle.
- 4) Enfin, un syndrome statique se manifeste aussi par des désordres cognitifs, une perception erronée de la verticale visuelle subjective chez l'humain, ainsi que par des sensations illusoire de déplacement angulaire du corps et des vertiges rotatoires.

Les **symptômes dits dynamiques** sont observables lorsque l'individu ou l'animal initie un mouvement de la tête et/ou de l'ensemble du corps (Lacour, 2006). Ils comprennent des troubles survenant en réponse à des accélérations linéaires ou bien angulaires, liées à des déplacements. Après lésion vestibulaire, le gain du réflexe vestibulo-oculaire est altéré lors d'un mouvement de la tête du côté lésé (vitesse de la phase lente de l'œil / vitesse angulaire de la tête). D'ordinaire, ce réflexe sert à stabiliser le regard, et donc les images sur la rétine, lors de rotation de la tête en opérant une rotation compensatoire de l'œil. Il permet de voir clairement l'environnement dans lequel la tête tourne. Il imprime à l'œil une rotation d'amplitude et de vitesse égales, mais de sens opposé à celle de la tête, de sorte que l'axe visuel est maintenu stable dans l'espace. Après une lésion vestibulaire unilatérale, les gains des réflexes vestibulo-oculaire et optocinétique diminuent. A cela s'ajoute un syndrome postural dynamique caractérisé par une dégradation des propriétés des réflexes vestibulo-spinaux et vestibulo-nucal. Les modifications de l'amplitude de réponse des muscles fléchisseurs et extenseurs participent également à l'inadéquation des réflexes posturaux. Les réflexes de redressement d'origine vestibulaire sont fortement altérés et associés à des mouvements giratoires.

L'expression de la majorité de ces symptômes diminue peu à peu, voire disparaît totalement grâce au phénomène de « **compensation vestibulaire** » qui correspond à la récupération comportementale. Celle-ci s'opère relativement rapidement selon les espèces (Borel et al., 2001; Lacour, 2006). Dans la majeure partie des cas, les symptômes statiques se dissipent complètement alors que les symptômes dynamiques rétrocedent partiellement avec une cinétique temporelle bien plus longue (Borel et al., 2008). Ainsi la compensation vestibulaire n'est-elle pas un phénomène homogène et existe-t-il une dissociation entre la restauration des troubles statiques et dynamiques. Ceci met d'une part en exergue la diversité des ressources adaptatives du système nerveux central après lésion vestibulaire, et suppose d'autre part que des mécanismes de plasticité différents interviennent dans les processus de récupération.

Après atteinte vestibulaire unilatérale, trois phases peuvent être distinguées :

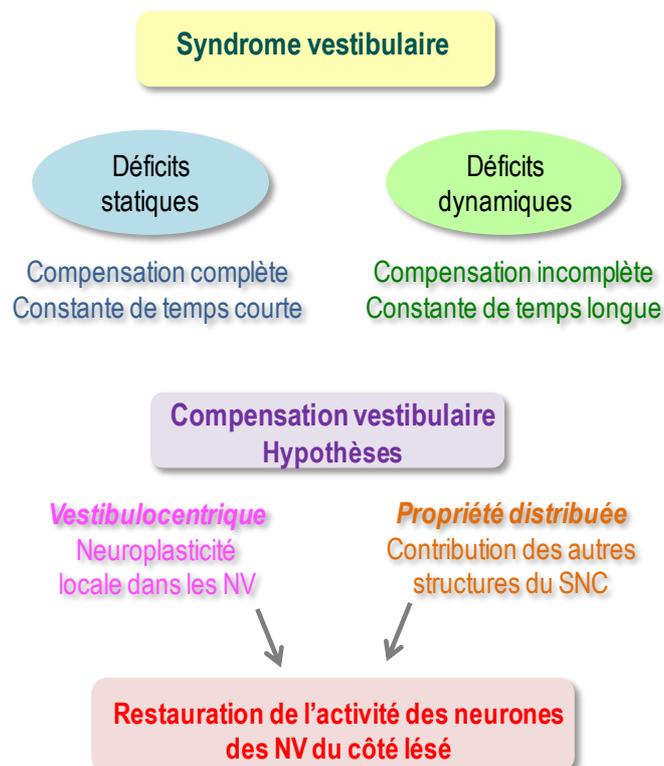
- 1) La phase critique. Elle dure environ une semaine chez le chat et les symptômes sont extrêmement invalidants.
- 2) La phase aiguë. Les asymétries régressent et le chat peut à nouveau se déplacer sur quelques courtes distances sans chuter.
- 3) La phase de compensation. Progressivement les déficits oculomoteurs et posturo-locomoteurs diminuent jusqu'à disparaître pour certains. Cette phase s'étend de un à deux mois chez le chat. Selon l'atteinte vestibulaire (périphérique ou touchant le nerf vestibulaire) la cinétique de ces désordres comportementaux peut varier. Cette récupération comportementale est un outil d'investigation singulier pour l'étude des mécanismes post-lésionnels du système nerveux central et de leurs corrélats comportementaux.

## 2.2 Mécanismes sous-tendant la compensation vestibulaire

Wolfgang Precht a été le premier à postuler en 1966 que l'expression des symptômes faisant suite à une atteinte vestibulaire s'explique notamment par **l'asymétrie de l'activité électrique spontanée** entre les noyaux vestibulaires (NV) sains et lésés. Une atteinte vestibulaire unilatérale rompt en effet toute communication entre les récepteurs vestibulaires et les NV ipsilatéraux à la lésion. Les neurones primaires dont le corps cellulaire se situe dans le ganglion de Scarpa sont la principale source excitatrice dirigée vers les NV. La perte de ces afférences laisse ainsi les neurones des NV ipsilatéraux privés de stimulations vestibulaires : ils deviennent quasiment silencieux. Par ailleurs, les neurones inhibiteurs ipsilatéraux décussant et se projetant sur les NV controlatéraux sont également réduits au silence, ce qui accroît d'autant plus l'activité électrique spontanée des NV controlatéraux (Markham and Yagi, 1984). Ces phénomènes ont été étayés par de nombreuses études (Precht et al., 1966; Pompeiano et al., 1984; Zennou-Azogui et al., 1993; Ris et al., 1995). Habituellement, ce déséquilibre électrophysiologique se réajuste selon une cinétique variable en fonction des espèces parallèlement aux désordres vestibulaires qui s'atténuent. Chez le chat par exemple, environ trois semaines après une neurectomie vestibulaire unilatérale, l'activité électrique spontanée du NVL recouvre des valeurs similaires aux enregistrements pré-opératoires (Zennou-Azogui et al., 1993). Des résultats identiques ont été rapportés chez le cobaye et la grenouille pour des délais légèrement inférieurs (Smith and Curthoys, 1988b, a; Ris et al., 1995), établissant qu'un équilibre électrique est restauré entre les noyaux vestibulaires homologues. Ainsi l'équilibre électrique entre NV ipsi et contra-latéraux est-il considéré comme le substrat neurophysiologique de la compensation vestibulaire.

### 2.2.1 Contributions centrales

Plusieurs courants de pensée rendent compte du phénomène de compensation vestibulaire (voir Figure 13). L'estompement progressif plus ou moins efficace des déficits dynamiques est généralement attribué à la théorie de la propriété distribuée qui prône l'intervention de mécanismes de substitution sensorielle (voir Figure 14). Cette théorie, initialement formulée par Rodolfo Llinas et Kerry Walton en 1979, considère l'implication de réseaux neuronaux extra-vestibulaires (Lacour, 2006). L'expérience visuo-motrice post-lésionnelle revêt par exemple une importance particulière puisqu'il a été démontré que l'absence d'informations visuelles précoces après désafférentation vestibulaire gèle la récupération de la fonction posturo-locomotrice chez le chat, tandis que les propriétés dynamiques de codage des informations visuelles de mouvement se modifient au niveau des NV (Zennou-Azogui et al., 1994;



Zennou-Azogui et al., 1996).

**Figure 14. Compensation vestibulaire : théories et mécanismes.** Une atteinte vestibulaire unilatérale engendre systématiquement un syndrome vestibulaire caractéristique chez une grande variété d'espèces. Ce syndrome comprend des déficits statiques, dont l'expression diminue progressivement avec le temps grâce au phénomène de « compensation vestibulaire ». La compensation des déficits dynamiques en revanche

requiert une constante de temps plus longue et demeure incomplète. La théorie vestibulo-centrique et la théorie de la propriété distribuée font partie des hypothèses permettant d'expliquer ce phénomène de compensation vestibulaire. NV : noyaux vestibulaires. SNC : système nerveux central.

Chez l'homme, lorsque des patients vestibulo-lésés ferment les yeux, les oscillations du centre de pression augmentent (Borel et al., 2002), soulignant l'importance du système visuel pour la stabilité posturale. Ces entrées sensorielles véhiculent en effet des informations redondantes avec celles issues du système proprioceptif musculo-articulaire et podal. En s'additionnant aux entrées vestibulaires du côté intact, elles favorisent la compensation partielle des déficits dynamiques. Il est intéressant de remarquer qu'il existe une gamme d'adaptations comportementales variant d'un patient vestibulo-lésé à l'autre (Lacour, 2006). Pour contrebalancer le réflexe vestibulo-oculaire endommagé après une lésion, les individus acquièrent certaines manœuvres compensatoires telle que la rotation de la tête de manière solidaire avec le tronc, ou l'exécution de saccades oculaires. Ces stratégies permettent de remédier indirectement à la compensation des déficits dynamiques.

Un grand nombre de structures nerveuses centrales sont sollicitées dans les processus de compensation vestibulaire ; ainsi les aires pariéto-insulaires corticales, le cortex enthorinal, l'hypothalamus postérieur, le cervelet ou encore l'hippocampe participent à l'amélioration des fonctions vestibulaires après lésion (Dutia, 2010). Les noyaux vestibulaires communiquent constamment avec les structures cérébelleuses. Aussi de nombreuses études se sont-elles concentrées sur la nature de leurs relations réciproques, ceci plus particulièrement après désafférentation vestibulaire. Il ressort de la littérature scientifique que des lésions cérébelleuses ne causent pas systématiquement les mêmes symptômes (Darlington and Smith, 2000). Si certaines études ont montré que des lésions de l'uvula et du nodulus affectaient la compensation des symptômes oculomoteurs chez le macaque (Igarashi and Ishikawa, 1985) et que le flocculus était requis pour initier les mécanismes de compensation oculaire chez le chat (Gulley et al., 1978), d'autres données en revanche ont souligné que de telles lésions n'avaient pas d'effets sur le déploiement des symptômes statiques chez le chat et le cochon d'inde (Haddad et al., 1977; Schaefer et al., 1979). Il a été montré que le flocculus contribuait à l'augmentation de l'activité intrinsèque du noyau vestibulaire médian (NVM) ipsilatéral après lésion vestibulaire : en effet, Alex Johnston a mis en évidence qu'une floccullectomie abolissait cette hausse de l'activité de décharge spontanée consécutive à une labyrinthectomie (Johnston et al., 2002). Il est de surcroît particulièrement intéressant de noter que l'administration d'antagonistes des récepteurs aux glucocorticoïdes - RU38486- au niveau du flocculus a également bloqué cette augmentation de l'activité électrique dans le NVM. Ceci suggère que cette structure cérébelleuse riche en récepteurs aux glucocorticoïdes contribuerait de manière importante à l'excitabilité locale du NVM (Johnston et al., 2002). Enfin, une équipe de chercheurs a montré dans un modèle de souris transgéniques cerebellar-

deficient Lurcher (Lc/+) perdant progressivement leurs cellules de Purkinje au cours des trois semaines post-natales, que la compensation du réflexe vestibulo-oculaire s'opère aussi bien par des mécanismes cérébello-dépendants que par d'autres mécanismes indépendants de cette structure cérébrale (Beraneck et al., 2008). Ainsi, bien que le cervelet intervienne dans la compensation vestibulaire et dans la restauration des fonctions posturo-locomotrice et oculomotrice, son rôle fonctionnel après lésion vestibulaire reste à préciser plus finement.

En outre, il est particulièrement intéressant de remarquer que les animaux et les humains naviguent dans l'espace en se basant notamment sur des informations vestibulaires, mémorisant les chemins parcourus dans des cartes cognitives (Berthoz et al., 1995; Smith et al., 2010b). Les fonctions hippocampiques peuvent d'ailleurs être modulées par les afférences vestibulaires. Une lésion ou une stimulation vestibulaire périphérique perturbent en effet les performances des rongeurs au test de la piscine de Morris (Matthews et al., 1989; Semenov and Bures, 1989), ou dans d'autres tâches sollicitant la mémoire spatiale (Ossenkopp and Hargreaves, 1993; Smith, 1997). Plus précisément, il a été observé qu'au niveau électrophysiologique, une désafférentation vestibulaire modifie le taux de décharge des cellules de lieu de l'hippocampe (Russell et al., 2003) ainsi que des cellules de direction de la tête situées dans le thalamus (Stackman and Taube, 1997). Le thalamus est un centre important qui sert d'intermédiaire notamment entre les NV et l'hippocampe (Smith, 1997). Ainsi, une lésion vestibulaire se répercute-t-elle non seulement sur de multiples échelles moléculaires, cellulaires, comportementales mais aussi sur une diversité de structures nerveuses.

### **2.2.2 Contributions neurochimiques et structurales**

La disparition des déficits statiques est pour sa part davantage imputée à la théorie vestibulo-centrique. Elle stipule que la plupart des processus impliqués dans le retour à l'équilibre électrophysiologique entre les NV sains et lésés est régie par des mécanismes de neuroplasticité survenant dans les NV, voire dans le tronc cérébral (Lacour, 2006). En effet, le système nerveux dispose d'un degré de flexibilité inédite lui permettant de compenser certaines fonctions détériorées grâce à une restructuration fonctionnelle et structurale. Dans cette partie, nous ciblerons ainsi les mécanismes de neuroplasticité survenant dans les NV.

#### *a) Réorganisations structurales*

Après lésion vestibulaire, des modifications neurochimiques surviennent. De tels processus impliquent certainement l'augmentation des vésicules pré-synaptiques ainsi que des changements

quant au nombre et à la morphologie des synapses. Les travaux de Richard Gacek dans les années 1980 et 1990 ont mis en évidence qu'après NVU chez le chat, même un an après lésion, les contacts synaptiques du NVS sont réduits bilatéralement. L'équipe de Michel Lacour a en outre démontré que suite à une neurectomie vestibulaire unilatérale, la densité synaptique diminue de 35% dans le NVM ipsilatéral une semaine après la lésion. Cinq mois plus tard, la densité synaptique recouvre un niveau similaire à celui du NVM controlatéral. Ces données indiquent qu'au cours de la compensation vestibulaire, des mécanismes de plasticité synaptique se mettent en place à long terme et contribuent manifestement au retour à l'équilibre électrophysiologique des noyaux vestibulaires homologues (Raymond et al., 1991). Des bourgeonnements de collatérales d'axones ont aussi été observés dans le même modèle animal grâce à des techniques immunohistochimiques ciblant la synaptophysine, une protéine membranaire spécifique des vésicules synaptiques de petit diamètre (Gacek et al., 1988; Gacek et al., 1989). Ces derniers pourraient être à l'origine de nouvelles connexions sur les neurones vestibulaires de second ordre désafférentés par la lésion. Pour autant, ce mécanisme de plasticité séduisant n'expliquerait pas à lui seul la récupération fonctionnelle des animaux au stade critique car pour que la formation de bourgeonnements soit efficiente, une durée de 72h est nécessaire (Cotman et al., 1981). Il a également été suggéré que suite à une désafférentation vestibulaire, les neurones désafférentés puissent devenir plus sensibles aux stimulations : ce phénomène a été désigné dans la littérature scientifique d'hypersensibilité de dénervation. Celle-ci se traduirait par un accroissement du nombre de récepteurs membranaires post-synaptiques, ce qui favoriserait l'augmentation de l'efficacité synaptique locale (Darlington and Smith, 1996).

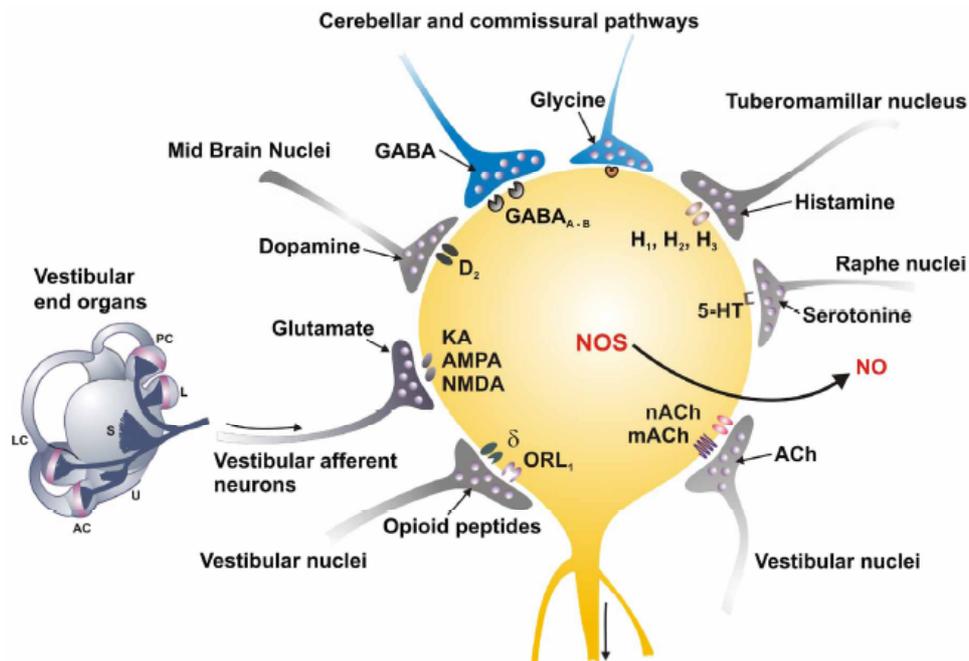
#### *b) Facteurs de transcription et gènes d'expression précoce*

Les gènes d'expression précoce régissent notamment la synthèse de facteurs de transcription qui sont exprimés dans l'ensemble du système nerveux central. Certains peuvent être utilisés comme indice de l'activité neuronale. Le facteur de transcription Fos et la protéine c-fos, présentent un pattern d'expression relativement faible dans la majorité des neurones du système nerveux central. Après désafférentation vestibulaire, il a été montré que l'expression de Fos augmentait significativement notamment dans les NV désafférentés, suggérant la présence importante de mécanismes de plasticité cellulaire chez les rongeurs (Kaufman et al., 1992; Cirelli et al., 1996) et chez le chat (Gustave Dit Duflo et al., 1999). Cette régulation positive s'échelonne sur une courte fenêtre temporelle, variable selon les espèces (entre 12h chez le rat et une semaine chez le chat). Il est particulièrement remarquable de constater que la protéine c-fos régule aussi la transcription de neurotrophines telles que le BDNF et le NGF (Robertson, 1992). Chez la grenouille, une désafférentation vestibulaire conduit à la

phosphorylation de protéines cérébrales mettant en évidence des changements adaptatifs d'ordre moléculaire (Janssen et al., 1992). En outre, une semaine après labyrinthectomie, l'expression de 26 protéines, dont certaines sont impliquées dans la guidance axonale et dans le métabolisme énergétique, est modifiée chez le rat (Paterson et al., 2006). Ainsi la régulation de facteurs de transcription et de leurs protéines s'intègre aux multiples réactions biochimiques survenant lors de la compensation vestibulaire.

### c) Mosaïque de neuromédiateurs

L'étonnante diversité des systèmes de neuromédiateurs dont les actions se conjuguent à l'intérieur des NV (acétylcholine, GABA, glycine, glutamate, histamine et catécholamines) et les nombreuses modifications neurochimiques engendrées par une désafférentation vestibulaire constituent un aspect supplémentaire pour la compréhension des phénomènes de compensation vestibulaire (voir Figure 15). En outre, la présence de ces différents systèmes de neurotransmetteurs a permis le développement de la pharmacologie vestibulaire nécessaire au traitement des pathologies vestibulaires.



**Figure 15. Neurochimie des noyaux vestibulaires centraux.** De nombreuses entrées synaptiques convergent vers les noyaux vestibulaires centraux. Les populations de neurones de ces noyaux sont hétérogènes et ne reçoivent pas nécessairement tous les types d'influences synaptiques. L'entrée synaptique principale provient des récepteurs vestibulaires périphériques. Cette voie est de nature glutamatergique et interagit avec les récepteurs NMDA, AMPA/Kainate, ainsi qu'avec les récepteurs métabotropiques. Les noyaux vestibulaires reçoivent également des synapses glutamatergiques en provenance de neurones de la moelle épinière. Les fibres GABAergiques provenant essentiellement du cervelet et des noyaux vestibulaires controlatéraux convergent aussi sur les neurones des noyaux

vestibulaires et activent des récepteurs GABAA et GABAB. Les noyaux tubéro-mamillaires de l'hypothalamus postérieur projettent des fibres histaminergiques activant les récepteurs histaminergiques H1, H2 et H3. Les fibres sérotoninergiques émanant des noyaux du raphé sollicitent les récepteurs 5-HT1 et 5-HT2. Les connexions intrinsèques et commissurales sont de nature glycinergiques et activent les récepteurs inhibiteurs glycinergiques. Les fibres noradrénergiques en provenance du locus cœruleus agissent principalement sur les récepteurs  $\alpha_2$ , mais aussi sur les récepteurs  $\alpha_1$  et  $\beta$  adrénergiques. Les fibres enképhalinergiques internucléaires libèrent quant à elles des peptides opioïdes telle que l'orphanine-nociceptine F/Q qui se fixe sur les récepteurs ORL1 (récepteur orphelin opioïde) et sur les récepteurs opioïdes  $\delta$ . En outre, des récepteurs endocannabinoïdes de type CB1 ont également été détectés dans les noyaux vestibulaires. La sortie des neurones des noyaux vestibulaires s'effectue essentiellement grâce à des projections glutamatergiques et cholinergiques, mais des projections GABAergiques et glycinergiques ont également été décrites. Enfin, les neurones des noyaux vestibulaires expriment l'oxyde nitrique synthétase (NOS) et peuvent produire de l'oxyde nitrique (NO) en tant que messager cellulaire.

### *Acétylcholine*

Les afférences cholinergiques qui contactent les noyaux vestibulaires (NV) participent aux fonctions vestibulaires (de Waele et al., 1995). Ainsi retrouve-t-on des neurones cholinergiques ainsi que des récepteurs nicotiques et muscariniques répartis massivement dans l'ensemble des NV, et plus particulièrement dans les NV médian (NVM) et inférieur (NVI). Il est intéressant de noter que des agents antimuscariniques sont efficaces dans le traitement du mal des transports chez l'homme (de Waele et al., 1995). En revanche, l'activation locale des récepteurs cholinergiques chez des animaux non-lésés dépolarise les neurones des NV et engendre des désordres posturaux similaires à ceux observés après lésion vestibulaire (Bienhold and Flohr, 1980; Phelan and Gallagher, 1992; Lacour and Tighilet, 2010). Cependant, lorsqu'un prétraitement à base d'antagonistes des récepteurs nicotiques et muscariniques est administré, cet effet dépolarisant est aboli. Suite à une neurectomie vestibulaire, des augmentations de l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine, la choline acetyltransférase (ChAT), surviennent dans les NV (Tighilet and Lacour, 1998). Certains neurones vestibulaires de second ordre changent probablement de phénotype ; ce phénomène a été décrit par Brahim Tighilet et ses collaborateurs qui ont observé une augmentation du nombre de neurones cholinergiques aux stades aigus et chroniques de la compensation vestibulaire (Tighilet and Lacour, 1998). Effectivement, une lésion du système nerveux central désorganise aussi bien le tissu nerveux que l'expression génétique des cellules qui y résident. Ainsi les neurones peuvent-ils modifier de manière adaptative l'expression de leur combinaison phénotypique parmi le vaste répertoire de neuromédiateurs existant. De surcroît, la surexpression locale d'Ach à la suite d'une neurectomie vestibulaire participe certainement au rééquilibrage de l'activité électrique entre les NV homologues (Tighilet and Lacour, 1998; Lacour and Tighilet, 2010).

### *GABA et glycine*

Les noyaux vestibulaires sont richement innervés en fibres GABAergiques et glycinergiques, notamment en bordure du IV<sup>e</sup> ventricule (de Waele et al., 1995). Un grand nombre de synapses GABAergiques relaient les voies vestibulo-cérébelleuses, vestibulo-oculomotrices et vestibulo-spinales. Les neurones des différents NV sont en outre richement équipés de récepteurs GABA<sub>A</sub> et synthétisent l'enzyme de synthèse du GABA, la glutamic acid decarboxylase (GAD) (Gliddon et al., 2005a). Des études électrophysiologiques, pharmacologiques et immunohistochimiques suggèrent que le GABA intervient au niveau des commissures vestibulaires reliant les NVM homologues (Precht et al., 1973; Furuya et al., 1991). En outre, des études menées *in vitro* indiquent que les neurones du NVM seraient inhibés continuellement par une action GABAergique et que l'administration de tétrotoxine dépolarise les neurones du NVM (Dutia et al., 1992; Vibert et al., 1995). Des animaux non-lésés chez lesquels des agonistes ou des antagonistes GABAergiques sont injectés directement dans les NV présentent des troubles posturaux - asymétrie posturale chez le chat - ou oculomoteurs - nystagmus spontané, modification du gain du réflexe vestibulo-oculaire chez le singe - selon les sites d'injection (Straube et al., 1991; Luccarini et al., 1992; Pompeiano et al., 1993). Le système GABAergique est également connu pour être un acteur majeur de la compensation vestibulaire. Chez le singe, trois à six jours après une lésion vestibulaire, une augmentation du marquage GABAergique survient de manière transitoire dans le NVL ipsilatéral, tandis que le marquage diminue parallèlement dans le NVL controlatéral (Thompson et al., 1986). Par ailleurs, dans les NV médian, inférieur et latéral, des augmentations de l'immunomarquage GABAergique (nombre de neurones et varicosités) ont été constatées une et trois semaines après avoir soumis des chats à une NVU (Tighilet and Lacour, 2001). Ces modifications persistent de manière bilatérale une année plus tard. D'ailleurs des chats ayant recouvré leurs fonctions vestibulaires après lésion et chez lesquels on administre des agonistes GABAergiques sont de nouveaux affectés de troubles vestibulaires semblables à ceux observés au stade critique (Peppard, 1986). Ainsi, le GABA pourrait contribuer à l'apparition de désordres vestibulaires ou à leur aggravation. Il est très intéressant de noter que l'administration d'antagonistes GABAergiques accélère à l'inverse le décours de la compensation vestibulaire (Flohr et al., 1985), suggérant que le blocage de ce système neurochimique peut favoriser le retour à l'équilibre des NV. Le système glycinergique intervient aussi dans les fonctions vestibulaires, inhibant les neurones des NV de manière dose-dépendante (Serafin et al., 1993). Ces deux neuromédiateurs interviennent donc après atteinte vestibulaire et font partie des mécanismes de plasticité post-lésionnelle à étudier plus précisément pour améliorer la thérapeutique humaine.

### *Glutamate*

Ce neuromédiateur est impliqué dans de nombreux mécanismes de plasticité du système nerveux central ; ses récepteurs interviennent notamment dans la potentialisation à long terme de l'hippocampe sous-tendant les processus de mémorisation (Bliss and Lomo, 1973). Dans les NV, des phénomènes de potentialisation à long terme ont également été décrits. La stimulation à haute fréquence des afférences vestibulaires pratiquée *in vitro* conduit à des modifications de l'efficacité synaptique à long-terme dans le NVM : plus précisément une potentialisation à long-terme survient dans la partie ventrale du NVM, tandis qu'une dépression à long-terme se manifeste dans la partie dorsale de ce même noyau (Capocchi et al., 1992). De même, après labyrinthectomie unilatérale, la potentialisation à long-terme augmente et la dépression à long-terme diminue dans la partie dorsale ipsilatérale du NVM, tandis que l'inverse se produit dans la partie dorsale controlatérale. De tels changements pourraient alors jouer en faveur du rééquilibrage de l'activité spontanée entre NV homologues (Pettorossi et al., 2003). L'activation des récepteurs NMDA contribue aussi à l'initiation du nystagmus oculaire après labyrinthectomie (Smith et Darlington 1988) tandis que leur blocage par l'administration d'antagonistes peut ralentir le décours de la compensation vestibulaire, ou bien induire le retour des symptômes posturaux et oculomoteurs chez l'animal ayant compensé (Smith and Darlington, 1988; Pettorossi et al., 1992). Ainsi les récepteurs NMDA pourraient non seulement être impliqués dans l'expression du syndrome vestibulaire, mais aussi dans sa maintenance. Les autres types de récepteurs glutamatergiques seraient aussi activés durant la compensation vestibulaire et moduleraient parallèlement l'excitabilité électrique ipsilatérale (Pettorossi et al., 2003).

### *Histamine*

Les récepteurs de ce neuromodulateur sont répartis dans l'ensemble du système nerveux central, y compris dans les noyaux vestibulaires (NV) du rat et du chat, dotés de neurones répondant positivement à l'histamine (Tighilet and Lacour, 1996). En effet, de nombreux récepteurs histaminergiques H1 et H2 ont été observés dans les NV et l'injection par ionophorèse d'antagonistes de ces récepteurs modifie l'excitabilité des neurones *in vivo* (de Waele et al., 1995). En outre, *in vitro*, l'histamine dépolarise les neurones du NVM via les récepteurs H1 et H2 (Phelan et al., 1990; Wang and Dutia, 1995). Le récepteur histaminergique H3 est un récepteur pré-synaptique contrôlant la synthèse et la libération d'histamine dans l'espace synaptique. Après désafférentation vestibulaire chez les animaux, l'administration d'antagonistes ou d'agonistes inverses des récepteurs H3 accélère considérablement la récupération des fonctions posturo-locomotrices et oculomotrices (Yabe et al.,

1993; Tighilet and Lacour, 1995; Tighilet et al., 2005; Tighilet et al., 2006), suggérant que l'histamine favoriserait la compensation de désordres moteurs. Puisque la section bilatérale des nerfs vestibulaires n'engendre pas de modifications de l'immunomarquage histaminergique contrairement à la section unilatérale, il a été envisagé que l'asymétrie électrique entre les NV homologues soit à l'origine de la libération ipsilatérale d'histamine dont l'effet excitateur permettrait le retour progressif à l'équilibre (Tighilet et al., 2006). De surcroît, des traitements histaminergiques avec des antagonistes des autorécepteurs H3 (les bêtahistines) sont aujourd'hui fréquemment prescrits aux patients vestibulaires (Menière) sujets au mal des transports pour réduire leurs crises de vertiges (Fischer, 1991; Lacour and Sterkers, 2001; Tighilet et al., 2006). Après lésion vestibulaire chez le chat, en augmentant la synthèse d'histamine et en désensibilisant les récepteurs H3 dans les NV, ces produits actifs facilitent la récupération comportementale (Tighilet et al., 2006). Puisqu'il a été démontré que le réflexe vestibulo-oculaire dépendait du niveau de vigilance (McKinley and Peterson, 1985) et que l'histamine intervient notamment dans l'éveil et l'attention, ce neuromédiateur pourrait être un contributeur majeur de la compensation vestibulaire.

#### *d) Facteurs neurotrophiques*

Les facteurs neurotrophiques jouent un rôle essentiel tout au long de la vie. Ils interviennent entre autres au niveau du système vestibulaire dont les noyaux centraux chez le rat et chez le chat sont richement pourvus en récepteurs TrkA et TrkB (Zhang et al., 2003; Benitez-Temino et al., 2004). De plus, des souris knockout BDNF<sup>-/-</sup> et NT3<sup>-/-</sup> arborent des désordres vestibulaires (Ernfors et al., 1995), soulignant l'importance des neurotrophines dans le fonctionnement optimal du système vestibulaire. Après labyrinthectomie unilatérale, il a été montré qu'une augmentation de l'expression de BDNF survenait symétriquement dans le noyau vestibulaire latéral (NVL) du cochon d'inde (Smith et al., 1998). En outre, le blocage de cette neurotrophine grâce à l'infusion d'oligonucléotides antisens retarde la compensation vestibulaire de rongeurs ayant subi une désafférentation vestibulaire (Bolger et al., 1999). Suite à une neurectomie vestibulaire unilatérale, Brahim Tighilet et ses collaborateurs ont mis en évidence une régulation positive de BDNF, de NGF, de NT3 et de leurs récepteurs respectifs dans les NV : les niveaux d'expression culminaient notamment 3 jours après la lésion (résultats non publiés à ce jour).

#### *e) Neurohormones du stress*

Le syndrome vestibulaire consécutif à une atteinte du système est responsable d'une gamme d'altérations aussi bien physiologiques que comportementales. Ainsi n'est-il pas étonnant que l'axe

hypothalamo-hypophyso-surrénalien, connu comme étant l'axe du stress, s'active parallèlement à une hausse de neurones c-fos<sup>+</sup> observée dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Cameron and Dutia, 1999; Gustave Dit Duflo et al., 1999). Ce dernier est responsable de la synthèse et de la libération de corticolibérine (CRF) et d'arginine vasopressine qui mènent *in fine* à la régulation positive de glucocorticoïdes dans l'organisme. Il a été décrit que l'expression de vasopressine et de CRF était amplifiée à long terme chez le chat après neurectomie vestibulaire unilatérale, leur régulation se normalisant seulement au bout de trois mois (Tighilet et al., 2009). Par ailleurs, parmi les nombreux acteurs intervenant dans la plasticité synaptique des NV, les glucocorticoïdes participeraient à la compensation vestibulaire et seraient capables de la moduler (Yamanaka et al., 1995; Cameron and Dutia, 1999; Gliddon et al., 2003a). Il serait possible que ces neurohormones puissent revêtir une action neuroprotectrice voire neurogène, comme cela a été rapporté par quelques études au niveau de l'hippocampe chez le rat et chez le singe (Lyons et al., 2010; Parihar et al., 2011).

#### *f) Réactions astrocytaires et microgliales*

Suite à une désafférentation vestibulaire unilatérale, une augmentation du nombre d'astrocytes et de cellules microgliales a été observée principalement du côté ipsilatéral chez le cochon d'inde et chez le chat. En effet, les cellules microgliales se multiplient, engendrant de manière presque synchrone l'hypertrophie des astrocytes qui deviennent réactifs (Cass and Goshgarian, 1990; Campos-Torres et al., 2005; Tighilet et al., 2007). De tels mécanismes, observables dès le lendemain de la lésion, persistent quelques semaines chez le cochon d'inde, et plus longuement chez le chat adulte, avant de recouvrer des valeurs contrôles (Campos-Torres et al., 2005; Tighilet et al., 2007). Ces types cellulaires pourraient être d'une importance particulière aussi bien pour la compensation vestibulaire que pour le retour à l'homéostasie du tissu nerveux après lésion.

*Ainsi l'activation de gènes à expression précoce, les réorganisations de systèmes de neurotransmetteurs et de neurohormones, ainsi que l'expression accrue de neurotrophines participent assurément à la compensation vestibulaire (Lacour, 2006; Lacour and Tighilet, 2010). Cette grande variété d'acteurs génétiques, moléculaires et cellulaires est sollicitée à différentes étapes cruciales. Étonnamment, ces mêmes facteurs qui orchestrent la compensation vestibulaire, modulent aussi les différentes étapes de la neurogenèse adulte.*

## **Conclusion et éléments-clés**

- Une atteinte vestibulaire génère un assortiment de symptômes posturaux, oculomoteurs, perceptivo-cognitifs et végétatifs communs chez une grande variété d'espèces.
- Ces symptômes régressent pour la plupart au cours du temps dans un processus appelé la compensation vestibulaire.
- La compensation vestibulaire dispose d'un éventail conséquent de mécanismes de plasticité cellulaire au sein du système nerveux central, ainsi que des possibilités de substitution sensorielle palliant les fonctions endommagées.
- De nombreux facteurs du microenvironnement cellulaire contribuent à la compensation vestibulaire et sont également des modulateurs de la neurogenèse adulte.



## Partie 2 - Chapitre 3

### Neurogenèse réactionnelle et compensation vestibulaire

---

Lorsque les désordres des patients vestibulaires ne peuvent être améliorés ni par des traitements pharmacologiques, ni par la rééducation vestibulaire, une neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) peut être proposée - notamment dans la pathologie de Ménière - pour abolir définitivement les crises vertigineuses et les symptômes invalidants associés. Notre modèle expérimental de neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) chez le chat adulte, constitue un remarquable modèle de plasticité adaptative post-lésionnelle car il permet d'examiner finement les conséquences, tant comportementales que structurales d'une désafférentation vestibulaire. De plus, l'anatomie du système vestibulaire, ses afférences et ses efférences sont désormais bien caractérisées, ce qui facilite d'autant plus son étude. En 2001, Brahim Tighilet et ses collaborateurs ont constaté à la suite d'une neurectomie vestibulaire unilatérale, une forte augmentation du nombre de neurones exprimant les phénotypes GABAergique (Tighilet and Lacour, 2001) et cholinergique (Tighilet and Lacour, 1998) dans les NV désafférentés. Il a été envisagé que ces mécanismes de plasticité résultaient de changement de phénotype neuronal. Cependant, deux publications essentielles ont modifié l'interprétation de ces résultats :

- 1) la découverte de précurseurs neuronaux situés au niveau du plancher du IV<sup>e</sup> ventricule (Martens et al., 2002)
- 2) l'existence d'une neurogenèse dans le complexe vagal dorsal, à proximité des NV, dont l'expression est amplifiée après vagotomie (Bauer et al., 2005)

Ainsi une nouvelle hypothèse a-t-elle été émise, à savoir que l'accroissement du nombre de neurones GABAergiques et cholinergiques observés après la lésion pourrait être imputable à une prolifération cellulaire réactionnelle.

Afin de confirmer cette théorie, des méthodes immunohistochimiques ont été utilisées pour révéler l'existence de cellules BrdU immunopositives (BrdU<sup>+</sup>). Brahim Tighilet *et coll.* ont ainsi été les premiers à établir que de nouvelles cellules étaient produites uniquement dans les NV désafférentés du chat adulte neurectomisé. Il s'est avéré que les nouvelles cellules étaient générées au cours de la première semaine post-lésionnelle, avec un pic de prolifération culminant au délai de survie de 3 jours (Tighilet et al., 2007). L'étude de la cinétique de survie des cellules néo-formées a indiqué qu'une majorité d'entre elles survivait au-delà d'un mois - avec des proportions variables selon les différents NV (60 à 70 % en moyenne). Certaines de ces cellules se différenciaient en astrocytes, d'autres en cellules microgliales, confirmant la réaction gliale déjà décrite par d'autres auteurs chez le rat (Campos Torres et al., 1999).

D'autres cellules enfin, colocalisaient le marqueur NeuN, spécifique des neurones matures, avec le BrdU, indiquant que certaines de ces cellules BrdU<sup>+</sup> s'étaient différenciées en neurones. L'étude phénotypique a confirmé que ces neurones étaient en quasi totalité de phénotype GABAergique, démontrant de manière originale que de nouveaux neurones GABAergiques pouvaient être produits dans les NV désafférentés après lésion vestibulaire chez le mammifère adulte. En revanche, aucun neurone cholinergique ne s'est avéré colocaliser du BrdU et l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine. Cette observation a amené les auteurs de l'étude à postuler que l'augmentation du nombre de neurones cholinergiques dans les NV désafférentés résulterait davantage d'une régulation positive de l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine, voire d'un changement de phénotype neuronal, plutôt que d'une neurogenèse (Tighilet and Lacour, 1998).

### Conclusion et éléments-clés

- Un nouveau mécanisme de plasticité consécutif à une lésion vestibulaire a été découvert dans les noyaux vestibulaires désafférentés : il y survient une prolifération cellulaire réactionnelle.
- Les nouvelles cellules survivent au-delà de 30 jours et se différencient en astrocytes, en cellules microgliales et en neurones de phénotype GABAergique.

## Objectifs de l'étude

Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse concernent la découverte d'une neurogenèse réactionnelle survenant dans les noyaux vestibulaires désafférentés lors de la compensation vestibulaire post-lésionnelle. Les expérimentations ont été réalisées sur des populations de chats adultes domestiques.

### **I) Le premier volet expérimental de ce mémoire est consacré à l'étude du rôle fonctionnel de la neurogenèse réactionnelle des noyaux vestibulaires après neurectomie vestibulaire unilatérale.**

La compensation vestibulaire est un remarquable modèle d'étude de plasticité du système nerveux central après lésion. Les améliorations comportementales qui s'effectuent progressivement sont soutenues par de nombreux mécanismes de plasticité cellulaire. La présence inattendue d'une neurogenèse réactionnelle de type GABAergique dans ces noyaux du tronc cérébral nous a conduits à nous interroger sur le rôle fonctionnel de ce mécanisme de plasticité dans la restauration des fonctions vestibulaires.

Le premier objectif de l'étude a consisté à étudier les mécanismes de plasticité cellulaire survenant dans les noyaux vestibulaires (NV) sous infusion d'une drogue antiméiotique bloquant la survenue de la neurogenèse réactionnelle. Nous avons orienté nos recherches sur le système GABAergique, qui est un important contributeur de la compensation vestibulaire, et sur les cellules astrocytaires, qui sont de proches alliées des neurones en condition lésionnelle. De plus, ces dernières semblent jouer un rôle primordial dans la neurogenèse adulte. Nous avons vérifié que la drogue administrée aux animaux possédait bien une action antiméiotique spécifique et locale. Nous nous sommes ensuite demandé si la population de neurones GABAergiques était modifiée sous infusion de l'antiméiotique trois jours après la lésion, puis trente jours après. Le nombre de cellules astrocytaires a été examiné à ces mêmes délais post-lésionnels. Pour trouver des réponses à ces problématiques, nous avons utilisé des outils immunohistochimiques sur des coupes de cerveaux de chats adultes.

Notre second objectif a été de relier nos observations cellulaires à des observations comportementales relatives au déroulement temporel de la compensation vestibulaire. Les adaptations posturo-locomotrices et oculomotrices des animaux ont été évaluées de manière régulière grâce à des

tests adaptés. Nous avons ainsi pu examiner si le blocage spécifique de la prolifération cellulaire réactionnelle des noyaux vestibulaires désafférentés influait sur le décours de la compensation vestibulaire des animaux. Nous nous sommes demandé plus précisément quels effets pouvaient être engendrés aux niveaux oculomoteur, postural et posturo-locomotor, et enfin si le décours de la compensation était similaire pour ces fonctions vestibulaires.

**II) Dans un second volet expérimental, nous avons analysé les répercussions aux plans cellulaire et comportemental de trois types de désafférentations du système vestibulaire mimant différentes pathologies vestibulaires.**

En clinique humaine, les désordres vestibulaires qui affectent les patients peuvent résulter de diverses étiologies susceptibles d'être reproduites par des modèles animaux. Puisque différentes lésions induisent des effets distincts sur l'environnement cellulaire, nous avons voulu distinguer d'une part, les mécanismes de plasticité, et d'autre part, les répercussions comportementales qui pouvaient survenir consécutivement à trois sortes de désafférentations vestibulaires.

Le premier objectif de l'étude s'est attelé à la comparaison du modèle de neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) - chez lequel survient une neurogenèse réactionnelle - avec deux autres sortes de désafférentation vestibulaire : d'une part, une labyrinthectomie unilatérale (LU) où les récepteurs vestibulaires sont détruits dans l'oreille interne, et d'autre part le blocage de l'activité du nerf vestibulaire par l'administration locale de tétrodoxtine (TTX). Nous nous sommes donc demandé si la prolifération cellulaire réactionnelle dépendait de la nature de la désafférentation vestibulaire et si les populations de neurones GABAergiques et d'astrocytes étaient modifiées dans ces trois conditions expérimentales (NVU, LU, TTX). Le protocole immunohistochimique a été calqué sur l'étude précédente en utilisant du 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) pour mettre en évidence la synthèse d'ADN relative à la division des précurseurs dans les noyaux vestibulaires. Nous avons combiné ces marquages avec l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'enzyme de synthèse du GABA (Anti-Glutamic Acid Decarboxylase 67 : GAD67) ou contre les protéines du cytosquelette (Glial Fibrillary Acidic Protein : GFAP).

Notre second objectif a été de relier les corrélats comportementaux avec les mécanismes de plasticité consécutifs aux trois sortes de désafférentations vestibulaires. La cinétique de la compensation vestibulaire a pu être ainsi étudiée et comparée entre les différents groupes à l'aide des mêmes tests comportementaux utilisés dans les travaux précédents.

**III) Le troisième volet expérimental présenté dans ce mémoire de thèse concerne l'étude du système GABAergique au cours de la compensation vestibulaire et de son impact sur la neurogenèse réactionnelle dans les noyaux vestibulaires désafférentés.**

La littérature concernant la compensation vestibulaire atteste depuis de nombreuses années que le système GABAergique joue un rôle important dans la restauration des fonctions vestibulaires. Il est notamment impliqué dans les interactions réciproques directes entre noyaux vestibulaires via les commissures. D'après les données précédemment obtenues dans notre modèle de neurectomie vestibulaire unilatérale chez le chat adulte, nos objectifs ont consisté à déterminer quels effets résulteraient de l'infusion d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs GABA de type A (GABA<sub>A</sub>) sur la prolifération cellulaire réactionnelle, la survie des nouvelles cellules, leur différenciation et enfin, sur le décours de la compensation vestibulaire des animaux.

**IV) Le quatrième volet et dernier volet expérimental de ce mémoire porte sur l'incidence des informations vestibulaires sur la neurogenèse non seulement dans les noyaux vestibulaires, mais aussi au niveau de la zone sous-granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe.**

Notre objectif a consisté à comparer l'expression de la neurogenèse continue de la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus dentelé de l'hippocampe chez des animaux ayant subi une neurectomie vestibulaire unilatérale ou bilatérale. Les afférences vestibulaires qui contactent l'hippocampe participent en effet à l'élaboration de cartes spatiales modulant le fonctionnement de cette structure nerveuse. A l'aide de techniques immunohistochimiques identiques à celles des précédentes études, nous avons examiné si la suppression partielle ou totale des informations vestibulaires affectait la prolifération et la survie cellulaires dans la ZSG, ainsi que dans les noyaux vestibulaires. Nous nous sommes également intéressés à l'expression de la corticolibérine dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, qui reflète le niveau de stress des animaux.



# Matériel et méthodes



## Matériel et méthodes

### 1. Population étudiée

Les analyses qui font l'objet de ce mémoire de thèse ont porté sur une population générale de chats domestiques provenant du centre d'élevage Isoquimen S.L. (centre d'élevage européen d'animaux de laboratoire localisé à Barcelone, Espagne). Leur poids moyen était compris entre 3 et 6 kg. Toutes les expériences ont été effectuées en stricte conformité avec l'Institut National de la Santé pour le guide de soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (NIH publication N°80-23) révisé en 1996 pour les animaux au Royaume-Unis (procédure scientifique) Act 1986 et les lignes directrices associées, ainsi que pour la politique sur l'éthique approuvée par la Société américaine des Neurosciences en 1989, et modifiée en novembre 1993. Tous les efforts et les tentatives ont été faits pour minimiser la souffrance et le nombre d'animaux utilisés dans ces études. Les chats ont été hébergés dans un grand espace confiné avec un libre accès à l'eau et la nourriture. Les méthodes d'approches utilisées dans les différentes expériences sont diversifiées, concernant les niveaux cellulaire (immunohistochimie) et comportemental (tests comportementaux pré- et post-opératoires). Ainsi les adaptations comportementales observées ont-elles pu être reliées aux réorganisations neurochimiques examinées dans les noyaux vestibulaires centraux. Le détail des différents protocoles expérimentaux est récapitulé dans la *Figure 16*.

### 2. Techniques de désafférentation vestibulaire

Les différentes approches expérimentales (chirurgie, histologie, comportement) sont illustrées dans la *Figure 16*. La réussite de la désafférentation vestibulaire est évaluée par un ensemble de symptômes se manifestant immédiatement après la chirurgie : nystagmus horizontal spontané, posture asymétrique lorsque l'animal éveillé tente de se relever, polygone de sustentation considérablement élargi, chutes, déviation de la démarche, inclinaison de la tête du côté ipsilatéral à la lésion.

#### 2.1 Neurectomie vestibulaire unilatérale

La chirurgie est réalisée sous microscope opératoire selon une approche rétro sigmoïde dans des conditions d'asepsie rigoureuse. Les animaux sont anesthésiés à l'aide d'une solution de kétamine dihydrochloride injectée en intra musculaire (20 mg/kg, Rhône Poulenc, Mérieux, France) et reçoivent une injection d'analgésique (Tolfédine, 0,5 ml, Vetoquinol, Lure, France). Une couverture chauffante permet de maintenir l'animal anesthésié à une température comprise entre 37 et 38°C. L'incision des

tissus situés en arrière du pavillon auditif gauche permet l'accès à la bulla tympanique. La perforation de celle-ci à l'aide d'une fraise diamantée débouche sur l'oreille interne. La cavité labyrinthique est abordée par une ouverture creusée au-dessus des fenêtres ronde et ovale, qui dévoile la VIII<sup>e</sup> paire de nerfs crâniens (nerf vestibulocochléaire). La section de celui-ci est pratiquée au niveau post-ganglionnaire où le nerf vestibulaire est séparé du nerf cochléaire, à mi-distance entre le ganglion de Scarpa et le tronc cérébral. Par la suite, le conduit auditif interne est obturé à l'aide de spongel cicatrisant et les tissus superficiels sont recousus. Les animaux sont placés sous antibiotiques pendant 6 jours et reçoivent des analgésiques pendant les 48h suivant la lésion. La NVU est contrôlée cliniquement, immédiatement après la chirurgie.

## 2.2 Labyrinthectomie unilatérale

La labyrinthectomie chirurgicale est pratiquée selon la même approche que pour la NVU. Une fois la chaîne des osselets et le muscle tenseur retirés, on accède à la cavité de l'oreille interne où se situent l'ensemble des récepteurs vestibulaires et cochléaires que l'on détruit à l'aide d'une fraise diamantée. La cavité est ensuite obturée avec du spongel puis la peau est recousue.

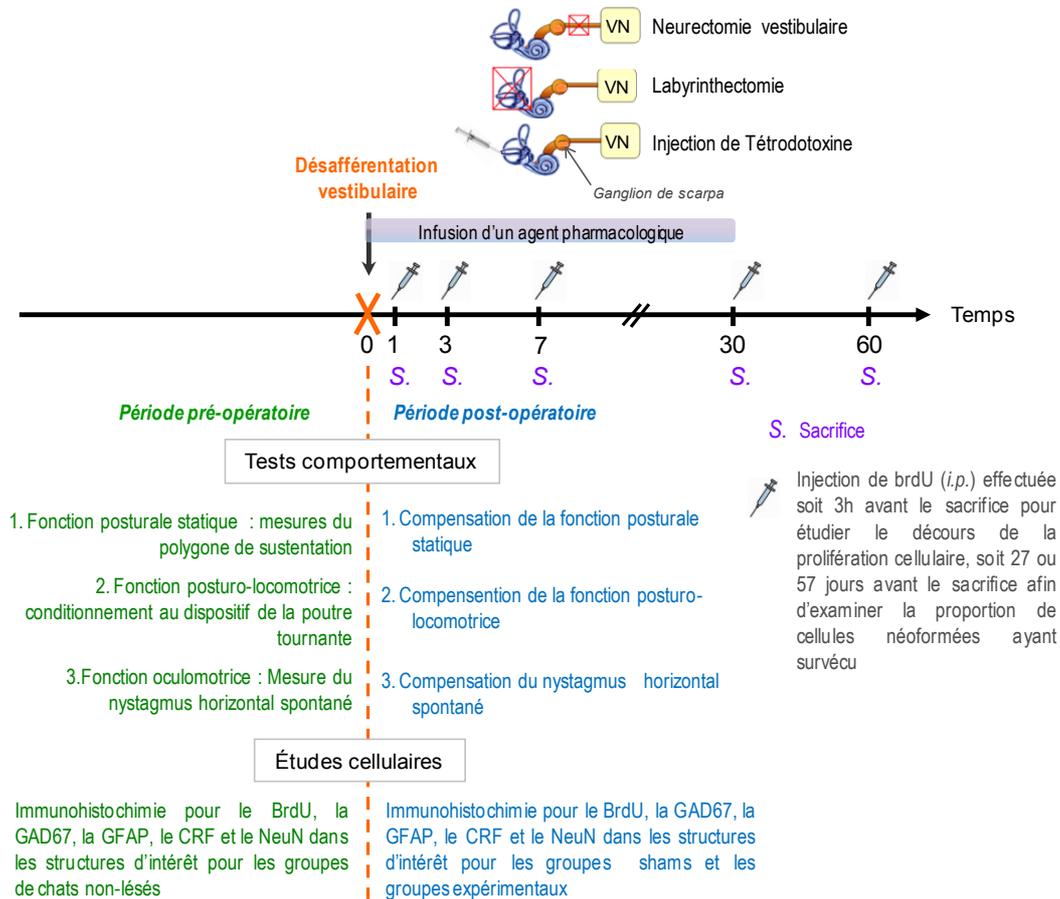
## 2.3 Injection de tétrodotoxine (TTX)

La TTX a déjà été utilisée comme un outil efficace pour bloquer les potentiels d'action du nerf vestibulaire (Saxon *et al.*, 2001). La chirurgie est réalisée sous microscope opératoire selon la même approche décrite précédemment. Lorsque la bulla tympanique du côté gauche des animaux dévoile les fenêtres ronde et ovale, le blocage des afférences vestibulaires est pratiqué par une injection à l'intérieur des fenêtres d'une solution de 150  $\mu$ l de 3 mM de TTX (Tocris, Cookson Ltd, Bristol, UK) diluée dans un tampon phosphate buffer (PB 0,1 M à un pH de 7,4). La dose de TTX utilisée induit un blocage de l'activité nerveuse pendant 3 jours.

## 2.4 Infusion de drogues pharmacologiques dans le VI<sup>e</sup> ventricule cérébral

Selon les protocoles expérimentaux, l'infusion d'agents pharmacologiques est réalisée à différents délais post-lésionnels. Une pompe osmotique ALZET (ALZA Corporation, Palo Alto, CA, USA) de 2,0 ml est logée sous la peau de l'animal. Elle est connectée à un cathéter qui délivre de manière continue la drogue (solution d'AraC, antimétabolite ; de muscimol, agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> ; ou de gabazine, antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>) ou le chlorure de sodium dans le liquide céphalo-rachidien du IV<sup>e</sup> ventricule, en bordure des NV, à raison de 2,5  $\mu$ l/h pendant 30 jours. La mise en place du cathéter nécessite son insertion entre l'atlas et l'os occipital puis de le glisser entre la paroi dorsale du tronc

cérébral et la face ventrale du cervelet. Son immobilisation est assurée par du ciment dentaire. L'os est fraisé au niveau du foramen magnum afin de permettre l'implantation du cathéter dans le IV<sup>e</sup> ventricule.



**Figure 16. Protocole expérimental général.** Schéma du protocole expérimental élaboré pour étudier les effets de différents types de désafférentations vestibulaires (neurectomie vestibulaire, labyrinthectomie ou injection de tétrotoxine dans l'oreille interne) et d'infusion de différents agents pharmacologiques dans le IV<sup>e</sup> ventricule (NaCl, muscimol, gabazine ou AraC) sur la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires dans les structures d'intérêt (noyaux vestibulaires, zone sous-granulaire, zone sous-ventriculaire ou noyau paraventriculaire de l'hypothalamus) à différents délais. Des tests comportementaux ont également été utilisés afin d'évaluer la cinétique de récupération des paramètres oculomoteurs, posturo-statiques et posturo-locomoteurs. BrdU : 5-bromo-2'deoxyuridine; CRF : corticolibérine ; GAD67 : glutamic acid decarboxylase, enzyme de synthèse du GABA ; GFAP : glial fibrillary acidic protein ; *i.p.* : voie intrapéritonéale ; NeuN : neuronal nuclei.

### 3. Analyses immunohistochimiques de la prolifération cellulaire

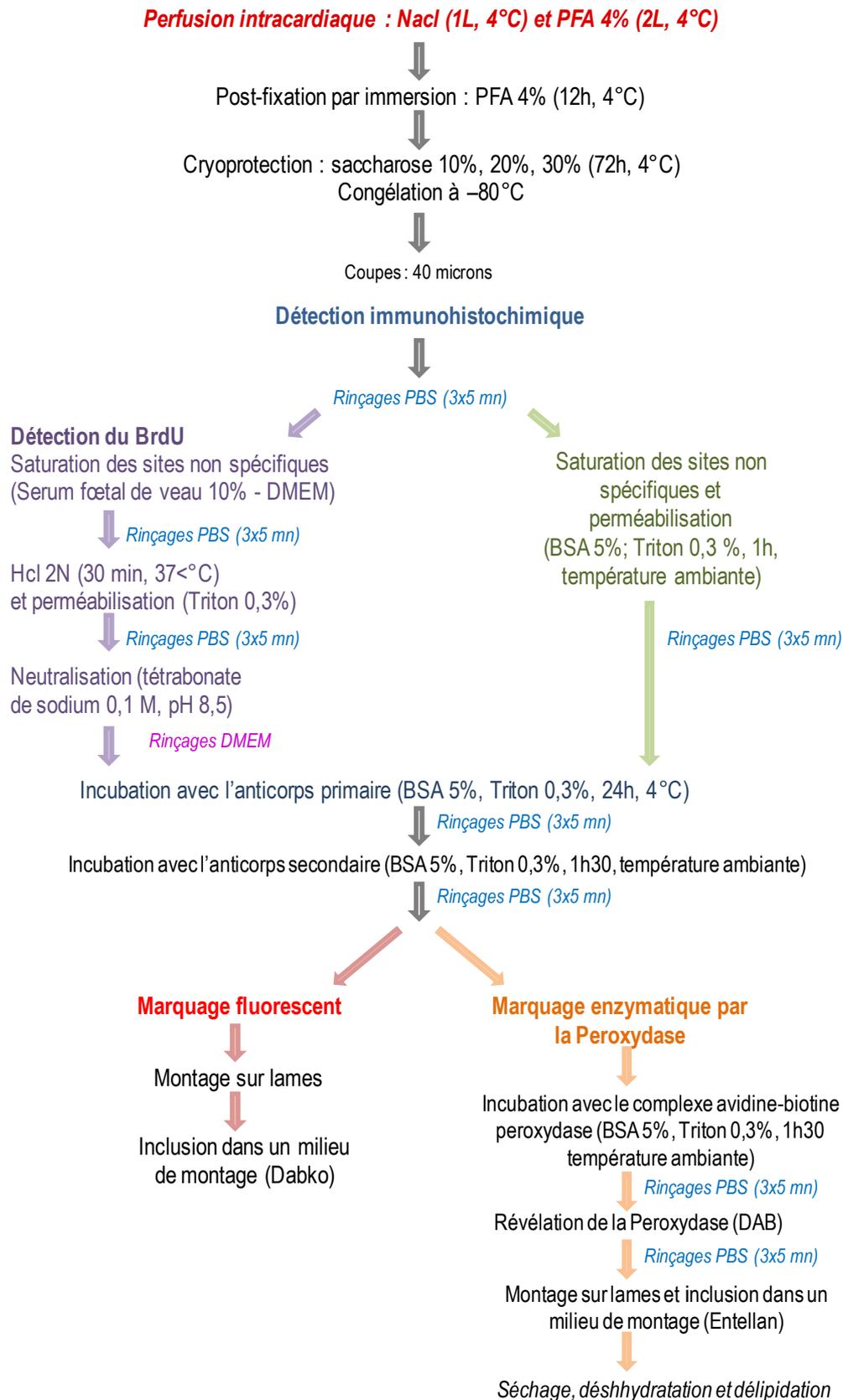
Les remaniements neurochimiques survenant dans les structures cérébrales des animaux étudiés ont été identifiés d'après l'atlas stéréotaxique de Berman pour le tronc cérébral (Berman, 1968) et l'atlas de Berman et Jones pour les structures telles que la zone sous-ventriculaire et le gyrus dentelé de l'hippocampe (Berman and Jones, 1982). Nous avons observé dans toutes les études des réorganisations neurochimiques post-lésionnelles dans les noyaux vestibulaires (médian, latéral, inférieur et supérieur) du côté ipsilatéral et controlatéral à la désafférentation. Les deux zones de neurogenèse continue, la zone sous-ventriculaire et la zone sous-granulaire ont également été examinées dans certaines des études que nous avons réalisées.

Les techniques immunohistochimiques ont permis de relever et de quantifier les variations de molécules contenues dans le tissu nerveux grâce à la présence d'anticorps spécifiques. La première étape consiste en la fixation de l'anticorps primaire sur l'antigène de la substance chimique d'intérêt. Le marqueur utilisé par la suite, et qui se fixe sur l'anticorps primaire afin de révéler sa présence peut être un fluorochrome ou une enzyme, voir *Figure 16* et *Tableau IV*.

Tableau IV			
Marqueurs	Anticorps primaire	Anticorps secondaire	Technique de coloration
<i>BrdU</i>	Mouse 1/100, Dako	Horse anti-mouse 1/200, Vector	DAB - marron
<i>GFAP</i>	Rabbit 1/200, Dako	Goat anti-rabbit 1/200, Vector	DAB - marron
<i>GAD67</i>	Mouse 1/10 000, Chemicon	Horse anti-mouse 1/200, Vector	DAB - marron
<i>BrdU</i>	Rat 1/100, Oxford Biot	Rabbit anti-rat 1/200, Interchim	Alexa Fluor 594 - rouge
<i>GFAP</i>	Rabbit 1/200, Dako	Goat anti-rabbit 1/200, Interchim	Alexa Fluor 488 - vert
<i>GAD67</i>	Mouse 1/100, Chemicon	Rabbit anti-mouse 1/200, Interchim	Alexa Fluor 488 - vert
<i>NeuN</i>	Mouse 1/100, Chemicon	Rabbit anti-mouse 1/200, Interchim	Alexa Fluor 488 - vert

**Tableau IV. Caractéristiques des anticorps primaires, des anticorps secondaires et du système révélateur.**

**Ci-après : Figure 17. Représentation schématique des différentes étapes immunohistochimiques.** Protocole de détection du 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) ; protocole de marquage enzymatique par la peroxydase et protocole de marquage par immunofluorescence.



### 3.1 Mise en évidence de la prolifération cellulaire

Le BrdU est un analogue structural de la déoxythymidine qui peut la remplacer durant la phase S du cycle cellulaire, lors de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Il peut être injecté par voie intrapéritonéale (i.p.), intracérébroventriculaire (i.c.v.), intraveineuse (i.v.) ou être même délivré oralement (per os) car il franchit la barrière hémato-encéphalique. Cette technique de marquage est très performante et fait de cette méthode l'une des plus utilisées pour visualiser la prolifération cellulaire. En effet, grâce à l'immunohistochimie il est possible de combiner plusieurs types de marqueurs afin d'identifier le phénotype des cellules BrdU<sup>+</sup>.

Pour éviter d'identifier de faux-positifs, il convient de couper de fines coupes de tissu cérébral (moins de 40 microns) et d'utiliser un microscope confocal qui permet de pivoter les champs de vision dans les trois dimensions. Des précautions doivent être prises en considération : il a en effet été démontré que certaines cellules pouvaient synthétiser de l'ADN en l'absence de mitose. C'est le cas lors de phénomènes de réparations de l'ADN ou lorsque des neurones sont en train de mourir (Kuan et al., 2004; Menu dit Huart et al., 2004). Afin de s'assurer qu'il s'agit bien d'une prolifération cellulaire, il est recommandé d'utiliser des marqueurs de l'apoptose et des neurones matures ; dans la mesure du possible, il convient également d'étudier les cellules BrdU<sup>+</sup> dans une large fenêtre temporelle afin d'examiner le ratio de cellules ayant survécu plus d'un mois après l'injection.

En outre, le BrdU peut s'avérer toxique et causer des effets secondaires selon les doses administrées (Taupin, 2007). Il a été évalué que des doses inférieures à 300 mg/kg étaient suffisantes pour marquer la majorité des cellules en phase S sans engendrer de pertes de poids, ou de changements comportementaux (Taupin, 2007). Dans nos différents protocoles, le BrdU (10 mg/ml, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) a été dissous dans une solution stérile de NaCl 0,9% chauffée à 56°C puis administré aux animaux par injection intrapéritonéale. Nous nous sommes basés sur les recommandations de Philippe Taupin et avons employé une seule injection intrapéritonéale à la dose de 200 mg/kg par animal. Aucun effet secondaire n'a été observé chez les chats, le BrdU qui n'est pas intégré dans l'ADN est rapidement dégradé et éliminé.

### 3.2 Prélèvement et fixation des tissus

La perfusion est réalisée par injection intra cardiaque. Les animaux sont préalablement anesthésiés avec une solution de kétamine dihydrochloride (20mg/kg). L'ouverture de la cage thoracique et du péricarde donne accès au muscle cardiaque. Une canule est introduite dans la pointe du ventricule

gauche et enfoncée jusqu'à l'aorte, où elle est maintenue par une pince de Mohr. L'oreillette droite est sectionnée afin d'empêcher le reflux du liquide et l'aorte abdominale est clampée de façon à limiter la fixation à la partie antérieure de l'animal. L'injection d'1 litre de solution saline isotonique (NaCl à 0,9% contenant un anticoagulant, 0,1% d'héparine) est suivie d'une perfusion de 2 litres de solution de Zamboni (4% de paraformaldéhyde et 0,2% d'acide picrique dans un tampon phosphate 0,1M, pH 7,4), à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex, Biobloc), pendant 30 minutes à 4°C. A la fin de la perfusion, les cerveaux sont extraits de la boîte crânienne, coupés en blocs et post-fixés pendant 8 heures à 4°C dans le même mélange de fixateur utilisé lors de la perfusion. Les tissus sont ensuite immergés successivement dans des solutions cryoprotectrices de concentration croissante en saccharose : à 10% pendant 24 heures, à 20% pendant 48 heures et à 30% pendant 72 heures, dans un tampon phosphate (PB 0,1M, pH 7,4), à 4°C.

### 3.3 Congélation et coupe des cerveaux

Une congélation rapide des tissus s'effectue avec de la neige carbonique (CO<sub>2</sub>) pendant 3 minutes. Les tissus sont ensuite conservés à -80°C. Chaque bloc de cerveau correspondant à la région pontobulbaire, où se situent les noyaux vestibulaires, ainsi que la région adjacente aux ventricules latéraux où se situe la ZSV, et la région contenant la zone sous-granaire du gyrus dentelé, est sectionné à l'aide d'un cryostat en coupes sériées de 40 µm d'épaisseur dans l'axe antéro-postérieur. Les coupes histologiques sont recueillies dans des puits contenant une solution de polyéthylène glycol mélangée à un tampon phosphate (PBS 0,1M ; pH 7,4) et conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

### 3.4 Traitements immunohistochimiques et marquages enzymatiques à la peroxydase

Tous les marquages immunohistochimiques sont réalisés sur des coupes de 40 µm. Le protocole de marquage enzymatique à la peroxydase est décrit dans la *Figure 17*. Les caractéristiques des anticorps primaires, secondaires et du système révélateur sont consignées dans le *Tableau IV*. L'incubation en présence des anticorps primaires s'effectue dans des boîtes de culture à 12 puits contenant un tampon phosphate Buffer 0,1 M, BSA 5%, Triton X100 0,3%. Les coupes sont soumises à une agitation permanente à 4°C d'une durée précise recommandée pour chaque anticorps. L'incubation avec les anticorps secondaires permet de révéler grâce à l'utilisation ultérieure de 3,3' diaminobenzidine (DAB, Sigma) tétrahydrochloride dans un tampon Tris, l'activité peroxydasique. La réaction est stoppée par immersion dans du PBS. Les coupes sont ensuite montées sur lames gélatinées, séchées et déshydratées dans des solutions d'alcool à concentration croissante (70°, 80°, 90°, 100°) et de xylène puis mises entre lame et lamelle avec de l'entellan.

Pour la détection immunohistochimique du BrdU et du phénotype cellulaire des nouvelles cellules, nous avons utilisé des méthodes fluorescentes dont le déroulé est détaillé dans la *Figure 17*. Il est important de préciser que les protocoles histologiques varient d'une équipe de chercheurs à une autre. Selon les approches et les structures cérébrales étudiées, le nombre d'injections de BrdU, leur espacement dans le temps, et la dose administrée peuvent considérablement varier. Dans notre protocole de détection du BrdU, lors de l'incubation avec l'anticorps spécifique, la saturation des sites antigéniques aspécifiques s'opère avec du sérum foetal de veau à 10%. Afin de révéler les cellules marquées au BrdU, des étapes de dénaturation sont requises dans le protocole immunohistochimique : les coupes subissent ainsi un traitement acide (HCl 2N à 37°C) pendant 30 minutes, afin d'hydrolyser partiellement l'ADN et rendre le BrdU accessible à l'anticorps primaire. Cette étape est suivie d'une neutralisation du pH (4 rinçages dans du tétraborate de sodium 0,1M, pH 8,5).

Les nouveaux neurones peuvent être identifiés grâce à la colocalisation de plusieurs marqueurs fluorescents exprimés par les cellules BrdU<sup>+</sup>. Pour les doubles marquages, il convient de passer par une étape de fixation du tissu grâce à l'incubation des coupes dans une préparation à base de paraformaldéhyde 4% durant 15 minutes, à 4°C. Par la suite, le protocole est conforme à celui de la GFAP et de la GAD67. Toutefois, des fluorochromes sont utilisés comme anticorps secondaires et les coupes sont montées sur lames gélatinées grâce à une préparation Dabko. L'analyse phénotypique des nouvelles cellules requiert l'utilisation de méthodes stéréologiques combinées à l'emploi d'un microscope confocal reconstruisant les coupes de cerveaux en trois dimensions.

### 3.5 Observation des coupes histologiques et analyse statistique des données

Le protocole de comptage des cellules immunomarquées a été validé dans de précédentes études (Tighilet et al., 2007; Dutheil et al., 2009; Dutheil et al., 2011b). Nous avons pris soin de ne pas compter les vaisseaux sanguins comme des cellules BrdU<sup>+</sup> et nous nous sommes basés sur des critères morphologiques pour distinguer les neurones des astrocytes GAD67<sup>+</sup>. Les neurones ont été définis grâce à la présence d'une arborisation dendritique, d'un nucléole centré au cœur du noyau, d'un cytoplasme visible et d'un corps cellulaire relativement important. En revanche, les astrocytes ont été classés comme tels lorsque des cellules immunomarquées possédaient un plus petit corps cellulaire ainsi qu'un cytoplasme diffus (Christensen et al., 2007). Le nombre total de cellules immunopositives a été estimé grâce à la méthode du fractionnator (West et al., 1991).

Nous avons choisi de distinguer chaque NV au lieu de les prendre en compte de façon globale, cela pour deux raisons : d'une part, la répartition des marqueurs étudiés différerait selon les NV considérés et d'autre part, il est connu que chaque NV est impliqué dans des fonctions distinctes. Le NVS est par exemple davantage engagé dans les fonctions oculomotrices et n'est pas le site d'une neurogenèse post-lésionnelle, contrairement aux NVM, NVI et NVL. Ces derniers sont davantage associés à des fonctions posturales statiques et dynamiques et expriment une quantité importante de nouvelles cellules consécutivement à une neurectomie vestibulaire unilatérale.

L'observation des coupes histologiques a été réalisée sur microscope photonique à fond clair de type Leitz Aristoplan (Leica) ou sur microscope Nikon (Eclipse 80 i) équipé d'un système d'analyse en stéréologie (Mercator, Explora Nova, La Rochelle, France) composé d'une caméra numérique Nikon DXM 1200 à haute résolution et équipé de lentilles à immersion en huile de 63x/1,32 NA. Les comptages ont été réalisés au niveau de coupes frontales collectées dans les parties dorsales (5.2) et caudales (12.1) du tronc cérébral. Les noyaux vestibulaires, la ZSV et la ZSG ont été examinés grâce à un nombre de coupes allant de 20 à 40 par chat, du côté droit et du côté gauche, ou du côté ipsilatéral et du côté controlatéral. Le nombre total de cellules immunopositives a été évalué grâce à la méthode du « dissector » optique. Les nombres de cellules BrdU<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup>, GAD67<sup>+</sup> et NeuN<sup>+</sup> ont été évalués grâce à des dissecteurs optiques du tissu (West et al., 1991). Une sonde en trois dimensions permet de comptabiliser le nombre d'éléments marqués (cellules immunopositives) par objet, quelle que soit leur orientation dans le volume dont on connaît les caractéristiques. Ainsi, est-il possible d'avoir une estimation fidèle du nombre total de cellules marquées par volume des structures d'intérêt. Les sections sont systématiquement sélectionnées avec un saut de 480 micromètres en suivant l'axe antéropostérieur. Nous avons compté uniquement les cellules immunopositives situées dans les limites de la fenêtre délimitée, sans toucher les lignes interdites (voir Dutheil et al., 2011 pour plus de détails).

#### 4. Méthodes d'analyse comportementale

Les études comportementales ont été réalisées sur une population de chats adultes répartis en différents groupes selon les études considérées. Les chats séjournèrent par petits groupes dans une pièce spacieuse et étaient soumis à une restriction alimentaire quotidienne en vue du conditionnement au dispositif de la poutre tournante (*cf* ci-après). Les animaux soumis à des désafférentations vestibulaires unilatérales et les animaux shams ont été opérés du côté gauche. A partir du premier jour post-lésionnel, trois paramètres comportementaux ont été quantifiés : le nystagmus horizontal spontané, la posture statique au repos et la fonction d'équilibration dynamique sur la poutre tournante.

#### 4.1 Mesure du nystagmus post-lésionnel horizontal spontané

La récupération de la fonction oculomotrice est quantifiée en mesurant le décours post-lésionnel du nystagmus vestibulaire spontané à la lumière. Ce nystagmus est enregistré dans le plan horizontal par enregistrement vidéo de l'œil grâce à une caméra vidéo numérique (Sony HDV) ou à l'appréciation des expérimentateurs présents. Une fois la tête de l'animal immobilisée, la fréquence du nystagmus est caractérisée par le nombre de battements rapides (dirigés du côté controlatéral à la lésion) par unité de temps (10 secondes). Les enregistrements sont réalisés quotidiennement jusqu'à disparition totale du nystagmus spontané. Les différentes sessions expérimentales n'excèdent pas 15 minutes chacune et se situent au même moment de la journée, afin de neutraliser les variations possibles imputables au niveau de vigilance de l'animal. La quantification du nystagmus a également été effectuée par des méthodes plus invasives tel que l'enregistrement des mouvements oculaires à l'aide d'électrodes Ag-AgCl oculo-optiques (Tighilet et al., 2006). Les mêmes résultats ont été obtenus avec les deux méthodes ; ainsi, pour des raisons de souci d'éthique et afin de limiter les souffrances des animaux, nous avons opté pour la moins invasive.

#### 4.2 Mesure du polygone de sustentation

La surface du polygone de sustentation est un bon indice du degré de stabilité posturale chez le chat. Elle est en général très réduite chez l'animal normal (de l'ordre de 50-100 cm<sup>2</sup>). Les mesures de la surface du polygone de sustentation sont réalisées chez le chat en position érigée sur ses quatre pattes, au repos. Un dispositif constitué d'un plateau transparent gradué permet de photographier les animaux par le dessous (*Figure 18*). Les images capturées sont ensuite transférées sur un ordinateur : les mesures du polygone de sustentation sont effectuées à partir des points correspondant aux coussinets plantaires, grâce à un logiciel de mesure de surface Canvas (9<sup>TM</sup>, Deneba software, Miami, FL). Les mesures de surface (en cm<sup>2</sup>) obtenues au cours du temps post-lésionnel sont normalisées par rapport aux valeurs enregistrées avant la lésion. Chaque animal constitue ainsi sa propre référence. Cette méthode permet de comparer directement les différents groupes d'animaux entre eux.

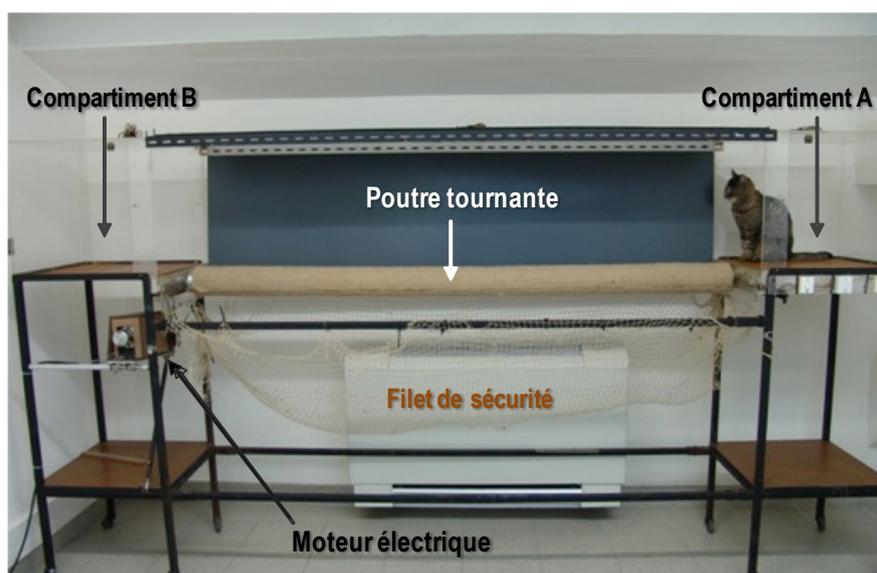


**Figure 18. Dispositif de mesure du polygone de sustentation chez le chat.** Photographie de dessous d'un animal en position érigée sur ses quatre pattes au repos sur un plateau transparent gradué. L'évaluation de la surface du polygone de sustentation est effectuée par ordinateur à partir des points correspondant aux coussinets plantaires.

L'évolution post-lésionnelle de cet indice constitue un bon élément d'appréciation de la restauration des capacités d'équilibration statique de l'animal et un index à valeur pronostique de ses performances d'équilibration dynamique.

#### 4.3 Fonction d'équilibration dynamique

L'épreuve de la poutre tournante quantifie les déficits de la fonction d'équilibration cinétique et sa récupération en fonction du temps post-lésionnel. Ce test comportemental a été spécialement conçu pour nos études chez le chat. Deux compartiments sont reliés par une poutre cylindrique horizontale de 3 m de long et de 12 cm de diamètre, placée à 1,2 m au-dessus du sol (*Figure 19*).



**Figure 19. Dispositif de la poutre tournante.** Deux compartiments sont reliés par une poutre cylindrique de 3 m de long et de 12 cm de diamètre, placée 1,2 m au-dessus du sol. Cette poutre peut tourner autour de son axe central avec des vitesses angulaires variables de 0 à 588,4 °/sec. Les animaux sont conditionnés à se déplacer sur la poutre (renforcement positif par distribution de nourriture au terme de chaque passage).

Cette poutre peut tourner autour de son axe central selon des vitesses angulaires variables de 0 à 588,4°/sec (soit plus de 1,5 tour par seconde). Avant que les animaux des groupes expérimentaux ne soient soumis à la désafférentation vestibulaire (injection de TTX, LU ou NVU), ils sont conditionnés à se déplacer sur cette poutre tournante (conditionnement pré-opératoire). La performance maximale (P. Max) correspond à la plus grande vitesse de rotation de la poutre qui n'entraîne pas de chute de l'animal au cours de quatre essais consécutifs. En règle générale, 8 à 12 sessions d'entraînement quotidien d'environ une heure suffisent pour que les animaux atteignent 100 % de la P. Max. Ils

apprennent en moyenne à traverser la poutre en une semaine. L'analyse statistique ne montre aucune différence significative d'apprentissage entre les différents groupes de chats établis. Après désafférentation vestibulaire, les animaux sont isolés durant deux jours dans une salle de quarantaine où des soins post-chirurgicaux leur sont prodigués. Le troisième jour post-lésionnel, les animaux sont replacés dans leur pièce commune et sont incités quotidiennement à se mouvoir dans la salle expérimentale comportant le dispositif de la poutre tournante. En moyenne, quelques jours d'activité locomotrice globale sont nécessaires pour qu'ils puissent franchir de part et d'autre une large planche de bois de 50 cm de diamètre déposée sur la poutre sans tomber. L'enregistrement des performances post-opératoires débute lorsque les chats vestibulo-lésés sont de nouveau capables de traverser la poutre cylindrique de 12 cm de diamètre maintenue immobile. Progressivement, la vitesse de rotation est augmentée. L'entraînement post-opératoire s'achève lorsqu'un animal atteint la P. Max durant trois jours consécutifs.

## 5. Traitements statistiques

Pour les études immunohistochimiques, l'analyse de variance (ANOVA) permet d'étudier l'effet des variables indépendantes « groupes », « côté » et « délais post-lésionnels » sur l'immunoréactivité des différents marqueurs de la plasticité utilisés (BrdU, GAD67, GFAP, NeuN) au sein des structures nerveuses concernées (NV, ZSG, ZSV). Les effets globaux mis en évidence par l'analyse de variance sont précisés par des tests a posteriori (Scheffé). Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne  $\pm$  l'erreur standard et le seuil de signification des résultats a été fixé à  $p < 0,01$ .

Dans le volet comportemental, l'analyse de variance (ANOVA à mesures répétées) permet d'étudier l'effet des variables indépendantes « groupes » et « délais post-lésionnels » sur la fréquence du nystagmus vestibulaire (nombre de battements rapides par 10 sec), la surface du polygone de sustentation (en  $\text{cm}^2$ ) et la performance maximale post-lésionnelle (exprimée en % de la P. Max pré-opératoire). Les effets globaux mis en évidence par l'analyse de variance sont précisés par des tests a posteriori (Scheffé). Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne  $\pm$  l'erreur standard et le seuil de signification des résultats a été fixé à  $p < 0,01$ .

# Résultats



## Résultats - Chapitre 1

*Neurogenesis and astrogenesis contribution to recovery of vestibular functions in the adult cat following unilateral vestibular neurectomy: cellular and behavioral evidence*

Sophie Dutheil, Jean Michel Brezun, Jacques Leonard, Michel Lacour, Brahim Tighilet

In: *Neuroscience* (2009), 164 (4) : 1444-56

### Résumé de l'article

Nous avons examiné si la prolifération cellulaire qui survient dans les noyaux vestibulaires désafférentés de chats adultes sujets à une neurectomie vestibulaire possédait un rôle fonctionnel dans la compensation des désordres vestibulaires.

Pour répondre à cette problématique, nous avons administré aux animaux une drogue antimétabolite : la cytosine- $\beta$ -C arabinofuranoside (AraC) afin de bloquer la production des nouvelles cellules dans les noyaux vestibulaires. Les groupes expérimentaux ont reçu une infusion continue d'AraC, délivrée dans le IV<sup>e</sup> ventricule cérébral qui borde les noyaux vestibulaires, tandis que les groupes contrôles ont été infusés avec une solution de chlorure de sodium (NaCl). Pour contrôler rigoureusement l'apparition possible d'effets secondaires liés aux infusions intracérébroventriculaires, nous avons utilisé des animaux non lésés infusés à l'AraC, et d'autre part, des animaux neurectomisés infusés à l'AraC ou au NaCl vingt jours plus tard. Ce dernier groupe a également permis d'envisager l'existence d'une fenêtre critique pour la neurogenèse adaptative.

Des tests comportementaux nous ont permis de quantifier le décours temporel de la compensation des déficits oculomoteurs, posturaux statiques et posturo-locomoteurs pour les différents groupes de chats. Nous avons également utilisé des techniques immunohistochimiques pour détecter la présence de cellules néo-formées marquées et pour caractériser leur phénotype.

Durant la première semaine post-lésionnelle, les animaux du groupe « neurectomie vestibulaire unilatérale et infusion d'AraC » (NVU-AraC) ont manifesté une aggravation des déficits posturaux statiques (augmentation du polygone de sustentation, chutes plus fréquentes, impossibilité de se

relever) comparativement aux animaux du groupe NVU-NaCl. Il est fort intéressant de noter que les animaux chez lesquels la prolifération cellulaire a été bloquée n'ont pu traverser le dispositif expérimental de la poutre tournante qu'un mois après ceux infusés avec du NaCl. Plus précisément, les chats NVU-AraC ont retrouvé leurs performances posturo-locomotrices pré-opératoires beaucoup plus tardivement que les chats NVU-NaCl (trois mois au lieu d'un mois), suggérant que la prolifération cellulaire réactionnelle dans les noyaux vestibulaires désafférentés contribuait voire favorisait la compensation des déficits posturo-locomoteurs. En revanche, la compensation du nystagmus horizontal spontané n'a pas été affectée par l'infusion de l'antimitotique, suggérant que d'autres mécanismes de plasticité que la prolifération cellulaire réactionnelle intervenaient dans la compensation de ce paramètre. Nous avons également montré que les trois premières semaines post-lésionnelles constituaient une période critique pour l'expression d'une neurogenèse adaptative.

Au niveau cellulaire, l'AraC induit un blocage total de la prolifération cellulaire dans le complexe des noyaux vestibulaires. Chez les chats NVU-AraC, comparativement aux animaux NVU-NaCl, une diminution de la population de neurones GABAergiques ainsi qu'une baisse de la réaction astrogliale ont été observées. Ces données présupposent que les astrocytes joueraient un rôle proneurogène après neurectomie vestibulaire, tandis que le système GABAergique contribuerait éventuellement au retour de l'équilibre électrophysiologique entre les NV homologues.

Cette étude a été la première à révéler le rôle fonctionnel de la neurogenèse et de l'astrogenèse post-lésionnelles survenant dans les noyaux vestibulaires chez le mammifère adulte. Nos résultats ont mis en évidence que la prolifération cellulaire des noyaux vestibulaires désafférentés qui survient durant la phase critique de la compensation vestibulaire contribuerait à la restauration des fonctions posturo-locomotrices chez le chat adulte. Ces données ouvrent des pistes extrêmement intéressantes, tant dans le domaine de la compensation vestibulaire en clinique humaine, que dans le domaine de la neurogenèse réactionnelle à visée thérapeutique.

## NEUROGENESIS AND ASTROGENESIS CONTRIBUTION TO RECOVERY OF VESTIBULAR FUNCTIONS IN THE ADULT CAT FOLLOWING UNILATERAL VESTIBULAR NEURECTOMY: CELLULAR AND BEHAVIORAL EVIDENCE

S. DUTHEIL, J. M. BREZUN, J. LEONARD, M. LACOUR AND B. TIGHILET\*

UMR 6149 "Neurosciences Intégratives et Adaptatives," Pôle 3C, Comportement, Cerveau, Cognition, Centre de St Charles—Case B—3 Place Victor Hugo, 13331 Marseille Cedex 3—France

**Abstract**—In physiological conditions, neurogenesis occurs in restricted regions of the adult mammalian brain, giving rise to integrated neurons into functional networks. In pathological or postlesional conditions neurogenesis and astrogenesis can also occur, as demonstrated in the deafferented vestibular nuclei after immediate unilateral vestibular neurectomy (UVN) in the adult cat. To determine whether the reactive cell proliferation and beyond neurogenesis and astrogenesis following UVN plays a functional role in the vestibular functions recovery, we examined the effects of an antimetabolic drug: the cytosine- $\beta$ -D arabinofuranoside (AraC), infused in the fourth ventricle after UVN. Plasticity mechanisms were evidenced at the immunohistochemical level with bromodeoxyuridine, GAD67 and glial fibrillary acidic protein (GFAP) stainings. Consequences of immediate or delayed AraC infusion on the behavioral recovery processes were evaluated with oculomotor and posturo-locomotor tests. We reported that after UVN, immediate AraC infusion blocked the cell proliferation and decreased the number of GFAP-immunoreactive cells and GABAergic neurons observed in the vestibular nuclei of neurectomized cats. At the behavioral level, after UVN and immediate AraC infusion the time course of posturo-locomotor function recovery was drastically delayed, and no alteration of the horizontal spontaneous nystagmus was observed. In contrast, an infusion of AraC beginning 3 weeks after UVN had no influence neither on the time course of the behavioral recovery, nor on the reactive cell proliferation and its differentiation. We conclude that the first 3 weeks after UVN represent a possible critical period in which important neuroplasticity mechanisms take place for promoting vestibular function recovery: reactive neurogenesis and astrogenesis might contribute highly to vestibular compensation in the adult cat. © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** adult neurogenesis, GABA, GFAP, vestibular compensation, vestibular nuclei complex, AraC.

\*Corresponding author. Tel: +33-0488576841; fax: +33-0488576818. E-mail address: brahim.tighilet@univ-provence.fr (B. Tighilet).

**Abbreviations:** ANOVA, variance analysis; AraC, cytosine- $\beta$ -D arabinofuranoside; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BrdU, bromodeoxyuridine; GAD, glutamate decarboxylase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HSN, spontaneous nystagmus; Ir, immunoreactivity; IVN, inferior vestibular nucleus; LVN, lateral vestibular nucleus; Max P, maximal locomotor balance performance; MVN, medial vestibular nucleus; NaCl, sodium chloride; SVN, superior vestibular nucleus; SVZ, subventricular zone; UVN, unilateral vestibular neurectomy; VN, vestibular nuclei.

0306-4522/09 \$ - see front matter © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.neuroscience.2009.09.048

Adult neural stem progenitors reside in many areas of the adult mammalian CNS, but continuous neurogenesis occurs only in two restricted regions: in the subgranular zone of the dentate gyrus (DG) and in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles (Gross, 2000; Ming and Song, 2005). Among the questions raised by this new form of adult plasticity is the function of these new neurons (Zhao et al., 2008). *In vitro* experiments in rodents have shown that new DG or SVZ neurons develop electrophysiological and synaptic properties very similar to or even indistinguishable from mature neurons (Carlen et al., 2002; van Praag et al., 2002; Laplagne et al., 2006; Ge et al., 2007b). Spontaneous neurogenesis leads to functional integration into pre-existing neural networks of the cells newly generated in the DG (Schmidt-Hieber et al., 2004; Ge et al., 2008) and in the olfactory bulb (Carlen et al., 2002; Carleton et al., 2003). These cells become active and contribute to the transmission of information in the brain. Outside these two discrete areas, proliferating cells give rise to glia but not neurons in the intact adult CNS. However, in pathological or injured states of the brain, neurogenesis and gliogenesis have been reported both in known neurogenic zones and in other areas (de Waele et al., 1996; Campos Torres et al., 1999; Arlotta et al., 2003; Kokoeva et al., 2005; Moysé et al., 2006). Together, these results suggest that the adult mammalian CNS is able to generate the main characteristic cell types of nervous tissue (neurons, astrocytes and microglial cells) and to integrate them into pre-established networks. But the functional benefit of this form of structural plasticity remains poorly documented.

We have previously demonstrated in the adult cat that unilateral vestibular neurectomy (UVN) (Tighilet et al., 2007) causes a marked reactive cell proliferation in the deafferented vestibular nuclei (VN). Most of these new cells survive 1 month after injury and give rise to astrocytes, microglial cells, and neurons. The newly generated neurons express a GABAergic phenotype. The question raised in the present study is whether reactive astrogenesis and GABAergic neurogenesis contribute functionally to vestibular compensation, that is, the postlesional restoration of the impaired vestibular functions (Lacour, 2006). To determine whether reactive cell proliferation plays a functional role in the vestibular compensation process, the mitotic activity of the dividing new cells was blocked by a continuous infusion of cytosine- $\beta$ -D arabinofuranoside (AraC, S-phase-specific antimetabolic drug) in the fourth ven-

tricle. In order to clarify whether delayed AraC infusion had an effect on vestibular compensation, the drug was administered to adult cats either immediately after being subjected to UVN, or 3 weeks after UVN when all the newly generated cells have been formed. Cell division blockade and its consequences were characterized at the cellular level with bromodeoxyuridine (BrdU), glial fibrillary acidic protein (GFAP), and glutamate decarboxylase (GAD)-67 immunostainings. Consequences of AraC infusion on the behavioral recovery processes were evaluated with oculomotor and posturo-locomotor tests.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals and surgeries

Experiments were performed on 40 adult domestic cats (3–5 kg) obtained from the “Centre d'élevage du Contigné” (Contigné, France). All experiments were carried out in line with the Animals (scientific procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications No. 8023, revised 1978). Every attempt was made to minimize both the number and the suffering of animals used in this experiment. Cats were housed in a large confined space with normal diurnal light variations and free access to water and food.

Animals were anesthetized with ketamine dihydrochloride (20 mg/kg, i.m., Rhône Poulenc, Mérieux, France), received analgesic (tofenamic acid, 4 mg/kg, i.m.; Vetoquinol, Lure, France) and were kept at physiological body temperature using a blanket. The vestibular nerve was sectioned at a postganglion level after mastoidectomy, partial destruction of the bony labyrinth, and surgical exposure of the internal auditory canal. The classical postural, locomotor, and oculomotor deficits displayed by the animals in the days following UVN were used as criteria indicating the effectiveness of the vestibular nerve lesion. Completeness of UVN had already been assessed by histological procedures in previous studies (Lacour et al., 1976).

For the implantation and use of osmotic minipumps containing AraC or sodium chloride (NaCl), a stainless steel cannula was implanted under anesthesia into the fourth ventricle of the brain and connected to a subcutaneous minipump (Alzet, Alza Corporation, Palo Alto, CA; flow rate 2.5  $\mu$ l/h for 30 days). A midline incision was made through the skin and musculature in the back of the neck, and a cannula connected to plastic tubing was inserted between the dorsal wall of the brainstem and the ventral face of the cerebellum and then cemented with dental cement to the skull. The air in the system was removed by filling up with saline or AraC (diluted into a NaCl solution, 0.13 mM), after which the tubing was connected to an osmotic minipump, and the skin was incised. Cats ( $n=34$ ) were infused continuously into the cerebrospinal fluid of the fourth ventricle with an antimetabolic agent,

AraC, known to block cell proliferation in brain structures, or with NaCl, using the osmotic minipump.

### Study design

To determine the functional role of the reactive cell proliferation occurring in the VN after UVN and its possible functional critical period, five groups of cats were used for both cellular and behavioral investigations: (i) control that did not undergo UVN ( $n=4$ ), (ii) UVN with early NaCl infusion (UVN/NaCl  $D_{0-30}$ ,  $n=8$ ), (iii) UVN with early AraC infusion (UVN/AraC  $D_{0-30}$ ,  $n=8$ ), (iv) UVN with delayed NaCl infusion (UVN/NaCl  $D_{20-50}$ ,  $n=8$ ), (v) UVN with late AraC infusion (UVN/AraC  $D_{20-50}$ ,  $n=8$ ). In addition, to determine if AraC provided behavioral changes (conditioning on rotating beam, postural function and global sensorimotor activity) and/or side effects (salivation, vomiting), a group of non-lesioned cats ( $n=2$ ) underwent an infusion of AraC during the conditioning period (Non lesioned AraC group). Another group of nonlesioned cats ( $n=2$ ) was used for determining if the conditioning on rotating beam affects cell proliferation in the VN (conditioning control group) (see Fig. 7). Immunostaining analyses of postlesional cell proliferation and cell differentiation were performed in the VN and the SVZ. The changes in behavioral recovery profile were analyzed with different behavioral tests (ocular horizontal nystagmus, support surface, and conditioning on rotating beam).

### BrdU labeling and immunohistochemistry

Animals were injected with BrdU (200 mg/kg) and killed 27 (UVN  $D_{0-30}$ ) or 47 (UVN  $D_{20-50}$ ) days later (Fig. 7). The low doses administered to animals are not liable to generate side effects but are sufficient to mark the cells in S-phase synthesizing DNA (Tighilet et al., 2007).

The cats were deeply anesthetized with ketamine dihydrochloride (20 mg/kg, i.m., Rhône Poulenc, Mérieux, France) and killed by paraformaldehyde perfusion. See Tighilet et al. (2007) for details. Immunohistochemical labeling of BrdU-, GFAP-, and GAD67-immunoreactive (Ir) cells was performed according to Tighilet et al. (2007). Double immunofluorescent stained sections were incubated with GAD67 or GFAP combined with BrdU-Ir. The optimal antibody dilutions and staining procedures are described in Table 1. Differentiation of the newly generated cells was analyzed with double labeling analysis performed using confocal imaging with a Leica TCS SP2 laser scanning microscope equipped with a 63 $\times$ /1.32 NA oil immersion lens. The fields of view were then examined by confocal microscopy, and 1  $\mu$ m-step Z series were obtained.

### Spontaneous nystagmus recovery

The cat was placed on an apparatus with its head fixed and bent forward 23 deg, thus maintaining the horizontal semicircular canals in the horizontal plane. The frequency of the horizontal spontaneous nystagmus (HSN) was recorded in the light using a video camera (Sony HDV) as the number of quick phase beats toward

**Table 1.** Combination and sequential processing of primary and secondary antibodies used for immunohistochemical and immunofluorescent stainings of BrdU, GFAP, or GAD67

Marker	Primary antibody	Secondary antibody	Technique/coloration
BrdU	Mouse 1/100, Dako	Horse anti-mouse 1/200, Vector	DAB–brown
GFAP	Rabbit 1/200, DaKo	Goat anti-rabbit 1/200, Vector	DAB–brown
GAD67	Mouse 1/10000, Chemicon	Horse anti-mouse 1/200, Vector	DAB–brown
BrdU	Rat 1/100, Oxford Biot	Rabbit anti-rat 1/200, Interchim	Alexa 594–red
GFAP	Rabbit 1/200, Dako	Goat anti-rabbit 1/200, Interchim	Alexa 488–green
GAD67	Mouse 1/10000, Chemicon	Rabbit anti-mouse 1/200, Interchim	Alexa 488–green

the contralateral side relative to UVN in 10 s (five repeated measures per animal per sampling time).

### Posture recovery

Posture deficits and recovery were evaluated by measuring the support surface delimited by the four legs of the cat standing erect at rest, without walking. The support surface can be regarded as a good estimate of postural control because it reflects the cat's behavioral adaptation compensating the static vestibulospinal deficits induced by the vestibular lesion. As a rule, the support surface was small in the normal cat (about 50–100 cm<sup>2</sup>) and greatly increased in the days following unilateral vestibular lesion. To quantify the support surface, cats were placed in a device with a graduated transparent floor that allowed them to be photographed from underneath. Five repeated measurements were done for each cat tested at each postoperative time, and an average was calculated for each experimental session. The support surface was measured as the surface delimited by the four legs using an image analysis system (canvas, 9TM, Deneba software, Miami, FL). Data recorded after vestibular lesion were compared to prelesion values by using individual references, that is, each animal acted as its own control.

### Equilibrium function recovery

Locomotor balance function was quantified using the rotating beam experimental device. Two compartments (0.5×0.6×0.5 m) were connected by a horizontal beam (length: 2 m; diameter: 0.12 m). The beam, placed 1.2 m off the ground, could be rotated along its longitudinal axis with a constant angular velocity ranging from 0 to 588 degree, 4 degree/s (about more than 1.5 turn/s). The beam was equipped with a safety net to ensure the animals were protected in case of fall. Animal reward consisted of a small piece of fish (or meat) placed in a small bowl in the target compartment. Cats were conditioned to cross over the beam. First crossings were made on the immobile beam and, thereafter, on the rotating beam, whose velocity was progressively increased after four consecutive trials without fall. Equilibrium function was quantified by measuring the highest speed of beam rotation that did not induce a fall. This maximal rotation speed determined the maximal locomotor balance performance (Max P). Preoperative training on the rotating beam necessitated six to ten training periods of 1 h per day, depending on the cats. Training was stopped when the cats' Max P was reached and stabilized at its highest level, which was found to be remarkably similar from one cat to another.

### Cell counts and statistical analysis

The VN and the SVZ were identified through Berman's stereotaxic atlases. BrdU-Ir was quantified for each VN (medial, inferior, lateral, and superior vestibular nuclei VN: medial vestibular nucleus [MVN], inferior vestibular nucleus [IVN], lateral vestibular nucleus [LVN], and superior vestibular nucleus [SVN], respectively) and for the SVZ. GFAP-Ir cells and GAD67-Ir neurons were analyzed in each VN on both sides (left/right: sham-operated cats; ipsilateral /contralateral: UVN-lesioned cats). The cell count was made with a Nikon microscope (Eclipse 80 i) equipped with a motorized X-Y-Z sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (Mercator; Explora Nova, La Rochelle, France). The total number of immunolabeled cells was estimated using the optical fractionator method (West et al., 1991). For each labeling, the quantified sections were systematically selected with a size step of 480 μm along the anteroposterior axis. We counted only Ir-cells in focus within the height of the dissector (10 μm) and inside the limits of the counting frame without touching the forbidden lines. Accordingly, the statistical analysis was evaluated by variance analysis (ANOVA) to test the effects of the group (NaCl or AraC), the side (deafferented vs.

intact), and the structure (MVN, IVN, LVN, SVN and SVZ) on BrdU-Ir, GFAP-Ir, and GAD67-Ir staining and to determine the interactions between these variables. ANOVA was followed by post-hoc analysis with the Scheffé test (state view II, SAS software Inc., Cary, NC).

## RESULTS

### AraC infusion blocks cell proliferation

Using 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) injected 3 h before the adult cats were killed by perfusion, we examined the cells newly generated in the VN and the SVZ. In control cats, a very low level of BrdU-immunoreactive (Ir) cells was observed in the VN complex and around the subependymal layer of the fourth ventricle, as previously described in this model (Tighilet et al., 2007) (MVN, 19±1.93; IVN, 33.19±2.02; LVN 24.5±1.93; SVN, 23.75±2.55). In contrast, a significantly high number of BrdU-Ir cells were found in the SVZ of these animals, with a mean value of 2902.5±82.3.

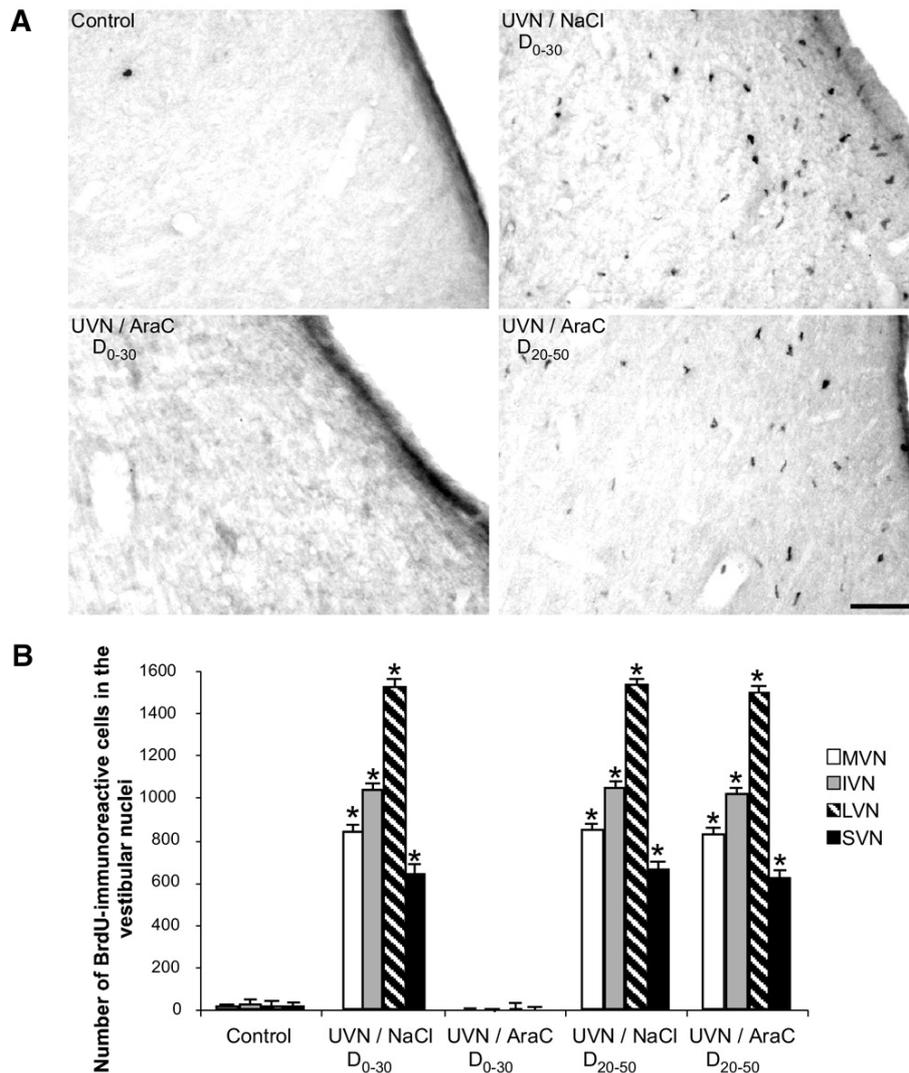
During vestibular compensation, we aimed to characterize the functional role of the reactive cells generated after UVN. Cell proliferation was blocked using AraC delivered in the vicinity of VN. Consistent with a previous report on adult UVN cats (Tighilet et al., 2007), we found a strong ratio of surviving BrdU-Ir cells in all the deafferented VN when UVN was coupled with a continuous infusion of sodium chloride (NaCl) during 30 days (Fig. 1A, B). We found an increase in BrdU-Ir, showing a multiplying factor of 2700–6250 according to the homologous VN (MVN, 843.74±25.5; IVN, 1044.0±22.83; LVN, 1530.37±11.33; SVN, 648.75±31.93). NaCl did not influence the rate of cell proliferation in UVN cats and could therefore be considered as innocuous. In contrast, the number of BrdU-Ir nuclei in the VN was close to zero in cats infused with the antimitotic drug immediately after UVN (UVN/AraC D<sub>0-30</sub> group), thus confirming the efficacy of AraC. AraC blocked the cell proliferation in the whole VN.

In cats submitted from the twentieth to the fiftieth day (D<sub>20-50</sub>) to NaCl or to AraC infusion, the number of BrdU-Ir cells in the VN was similar to that of the UVN cats infused early with NaCl (UVN/NaCl D<sub>0-30</sub>), see Fig. 1A, B. Delayed infusion had no impact on cell proliferation, and training the cats on the rotating beam did not influence the rate of cell proliferation in the VN (data not shown).

Furthermore, neither the UVN nor the AraC infusion in the fourth ventricle affected BrdU-Ir in the SVZ (Fig. 2A, B). The total number of BrdU-Ir nuclei in the SVZ of the UVN/AraC D<sub>0-30</sub> (3115.83±97.37) remained similar to the controls or to the UVN/NaCl D<sub>0-30</sub> cats (2902.5±82.31 and 2896.66±99.35, respectively). This finding indicates that AraC acts selectively and blocks local reactive cell proliferation only if the infusion occurs early after UVN.

### AraC infusion decreases the number of GFAP-immunoreactive cells

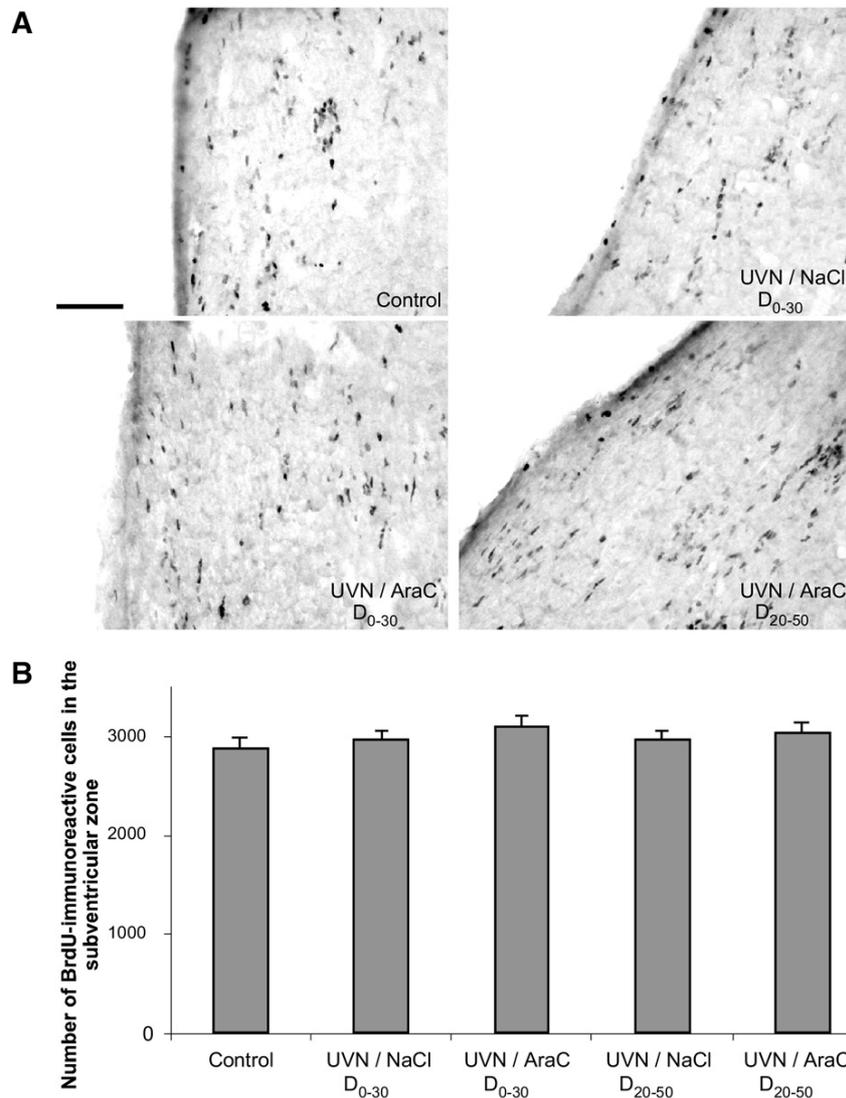
To determine the effect of UVN on reactive astrogenesis in the VN, immunohistochemical staining was carried out on brainstem sections at 30 days post-vestibular axotomy.



**Fig. 1.** Vestibular nerve section induced a strong increase in the number of BrdU-Ir cells in the deafferented VN. (A) Illustration of BrdU-Ir in the MVN in a representative control cat and in three experimental animals infused with AraC or NaCl at different times after UVN. Note that vestibular nerve section induced a strong increase in the number of BrdU-Ir cells in the deafferented MVN under an early (UVN/NaCl D<sub>0-30</sub>) or a delayed AraC (UVN/AraC D<sub>20-50</sub>) infusion in the fourth ventricle. A lack of BrdU-Ir cells was observed in the MVN of both control cats and cats under an early infusion of AraC (UVN/AraC D<sub>0-30</sub>). (B) Quantitative evaluation of the effects of different conditions of AraC or NaCl infusions (early vs. delayed) in the vestibular-neurectomized cats on BrdU-Ir cells in the deafferented vestibular nuclei. Data are mean values ( $\pm$ SEM) of the number of BrdU-Ir cells in the deafferented VN of control cats and unilateral-neurectomized cats infused with an early (UVN/NaCl D<sub>0-30</sub> and UVN/AraC D<sub>0-30</sub>) or a delayed (UVN/NaCl D<sub>20-50</sub> and UVN/AraC D<sub>20-50</sub>) AraC or NaCl infusion in the fourth ventricle. Only values recorded on the lesioned side are illustrated. Data from both sides of control cats were pooled to provide a direct comparison with the subgroups of UVN cats. \*  $P < 0.0001$  versus control and UVN/AraC D<sub>0-30</sub>. (Scale bar: 50  $\mu$ m and  $n = 4$  animals per group).

GFAP-Ir cells detected in the VN of the five groups of cats are presented in Fig. 3A. GFAP-Ir cells, characterized by richly branched cells with translucent cytoplasm, were sparse in the control group and became evident in the deafferented VN of UVN cats submitted to early NaCl infusion. The control group exhibited a relatively high number of GFAP-Ir cells in all the VN (MVN,  $35,469.58 \pm 536.62$ ; IVN,  $27,772.35 \pm 970.97$ ; LVN,  $40,872.58 \pm 495.71$ ; SVN,  $41,041.3 \pm 454.75$ ), see Fig. 3B. After UVN, a strong astroglial reaction

was observed on the deafferented VN only. In the UVN/NaCl D<sub>0-30</sub> group, the numbers of astrocytes were  $109,428.6 \pm 1035.87$  in the MVN,  $70,191.2 \pm 1949.8$  in the IVN,  $79,470.3 \pm 1808.3$  in the LVN,  $131,160.5 \pm 1199.04$  in the SVN. Infusion of AraC from D<sub>0-30</sub> in UVN cats significantly decreased GFAP-Ir in the deafferented VN as compared to the UVN/NaCl D<sub>0-30</sub> group ( $P < 0.0001$ ). However, the total number of GFAP-Ir cells in each deafferented VN of this AraC group remained significantly higher than for the control group



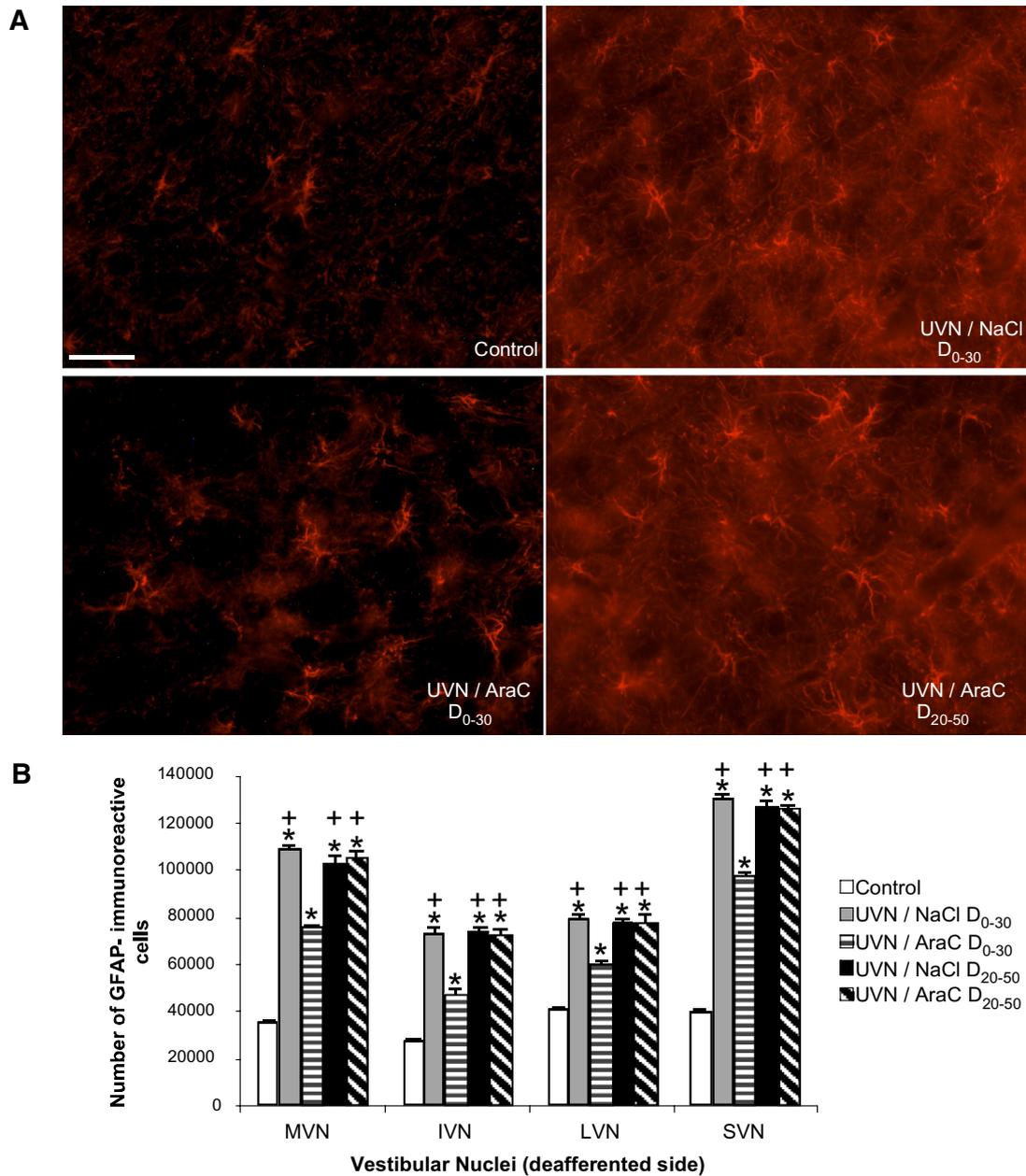
**Fig. 2.** The SVZ is known as a zone of continuous neurogenesis. (A) Illustration of BrdU-ir in the SVZ in a representative control cat and in three experimental cats infused with AraC or NaCl at different times after unilateral vestibular neurectomy. Note that vestibular nerve section had no effect on the number of BrdU-ir cells in the SVZ whatever the experimental groups. (B) Quantitative evaluation of the effects of different conditions of AraC or NaCl infusions (early vs. delayed) in the vestibular-neurectomized cats on BrdU-ir cells in the SVZ. Data are mean values ( $\pm$ SEM) of the number of BrdU-ir cells in the SVZ of the different groups of cats. Scale bar: 50  $\mu$ m and  $n=4$  animals per group.

( $P<0.0001$ ). The astroglial reaction observed in the UVN cats infused with NaCl or AraC from D<sub>20</sub> to D<sub>50</sub> was similar to that observed in the NaCl D<sub>0-30</sub> group. These data suggest that delayed infusion had no influence on GFAP-ir. The double immunohistochemical labeling (GFAP vs. BrdU) showed newly generated GFAP-ir cells only in the UVN/NaCl D<sub>0-30</sub> group (Fig. 4A–C); no co-localization of these two markers was detected in the UVN/AraC D<sub>0-30</sub> group (Fig. 4D–F).

#### AraC infusion decreases the number of GABAergic neurons

To clarify whether, after UVN, AraC affects GABA-ir in the VN, the number of GAD67 immunopositive neurons was

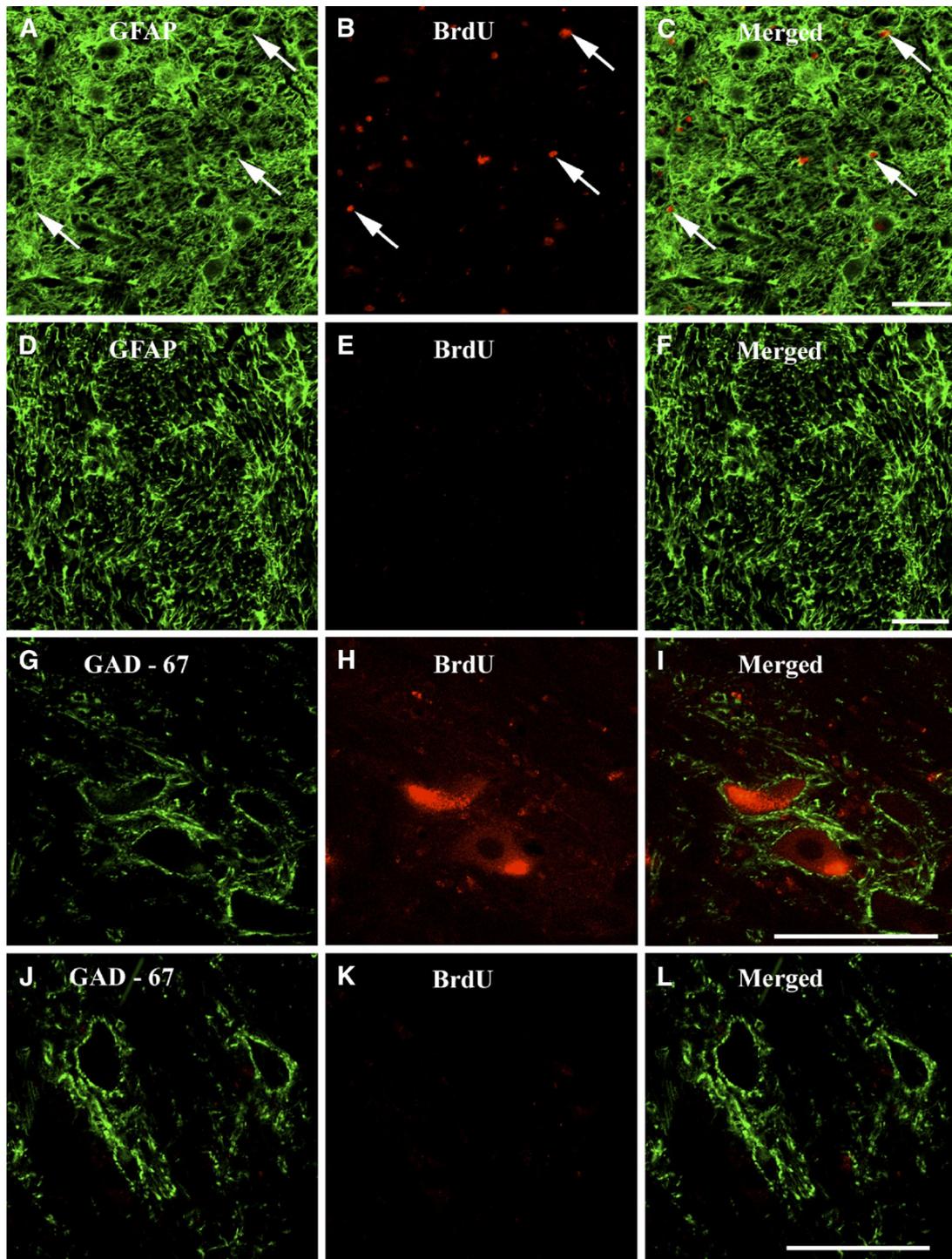
quantified in the different groups by the optical fractionator method (West et al., 1991). The number of GAD67-ir neurons was moderate and symmetric in both sides of the VN in the control group. The mean data for these animals were  $98.48\pm 7.91$  in the MVN,  $82.65\pm 5.01$  in the IVN,  $108.46\pm 5.90$  in the LVN, and  $69.12\pm 4.02$  in the SVN. In contrast, UVN significantly increased the number of GAD67-ir neurons in the deafferented MVN, IVN, and LVN, whatever the vestibular-neurectomized groups compared to the control group ( $P<0.0001$ ). No changes were observed in the SVN. In the UVN/NaCl D<sub>0-30</sub> group, the values were  $293.62\pm 14.68$  in the MVN,  $161.9\pm 5.2$  in the IVN,  $198.85\pm 8.62$  in the LVN, and  $72.45\pm 5.88$  in the SVN



**Fig. 3.** Nerve section gives rise to a strong glial cell reaction in the vicinity of the lesion. (A) Illustration of GFAP-ir in the MVN in a representative control cat and in three experimental animals infused with AraC or NaCl at different times after unilateral vestibular neurectomy. Vestibular nerve section induced a strong increase in the number of GFAP-ir cells in the deafferented MVN in all groups submitted to UVN. (B) Quantitative evaluation of the effects of different conditions of AraC or NaCl infusions (early vs. delayed) in the vestibular-neurectomized cats on GFAP-ir cells in the deafferented vestibular nuclei. Data are mean values ( $\pm$ SEM) of the number of GFAP-ir cells in the deafferented vestibular nuclei of control cats and unilateral-neurectomized cats infused with an early (D<sub>0-30</sub>) or a delayed (D<sub>20-50</sub>) AraC or NaCl infusion in the fourth ventricle. Only values recorded on the lesioned side are illustrated. Data from both sides of control cats were pooled to provide a direct comparison with the subgroups of UVN cats. \*  $P < 0.0001$  versus control; +  $P < 0.0001$  versus UVN/AraC D<sub>0-30</sub>. Scale bar: 50  $\mu$ m and  $n = 4$  animals per group.

(Fig. 5A, B). Despite the lack of the reactive cell proliferation in the VN under early AraC infusion from D<sub>0</sub> to D<sub>30</sub>, a significant increase in the number of GAD67-ir neurons was still observed in the deafferented VN, relative to the

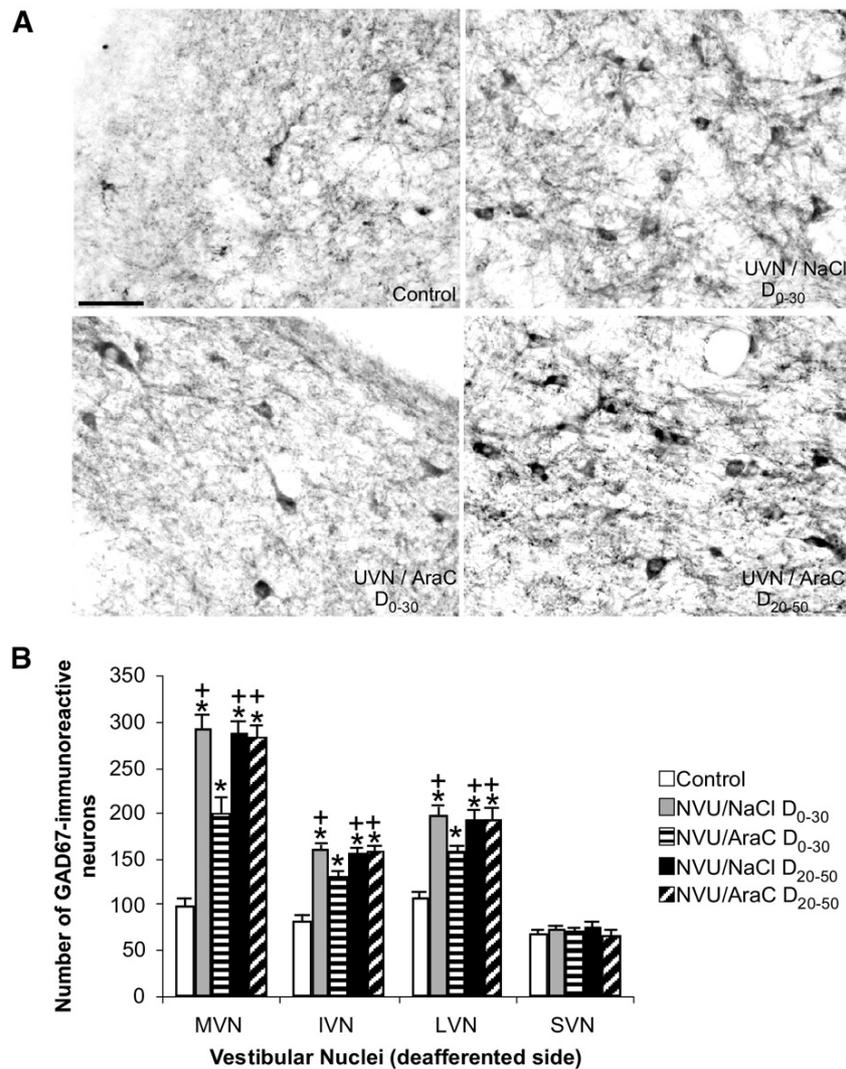
control group ( $P < 0.0001$ ). The number of GAD-ir neurons in the UVN/AraC D<sub>0-30</sub> remained significantly lower than in the other UVN groups of cats for the MVN, IVN, and LVN (Fig. 5B). Double immunohistochemical labeling (GAD67



**Fig. 4.** Confocal analysis of newly generated GFAP-Ir cells and GAD-67-Ir neurons in the deafferented MVN of cats infused with NaCl (A–C, G–I) or AraC (D–F, J–L) in the fourth ventricle from day 0 to 30 after unilateral vestibular neurectomy. The BrdU-Ir nuclei are in red (B, C, H, I) and the other markers of differentiation in green: GFAP (A, C, D, F) and GAD67 (G, I, J, L). Note that cats infused with AraC immediately after vestibular lesion and then during 30 days showed a total blockage of newly generated GAD-Ir neurons (L) and GFAP-Ir cells (F). Scale bar represent 50  $\mu$ m and  $n=4$  animals per group.

and BrdU) showed newly generated GAD67-Ir neurons only in the UVN/NaCl D<sub>0-30</sub> group (Fig. 4G–I); no co-

localization of these two markers was detected in the UVN/AraC D<sub>0-30</sub> group (Fig. 4J–L).



**Fig. 5.** GAD67-Ir neurons are expressed in all the vestibular nuclei. (A) Illustration of GAD67 immunoreactivity in the MVN in a representative control cat and in three experimental animals infused with AraC or NaCl at different times after unilateral vestibular neurectomy. Note that vestibular nerve section induced a significant increase in the number of GAD67-immunoreactive neurons in the deafferented MVN in all groups submitted to UVN. (B) Quantitative evaluation of the effects of different conditions of AraC or NaCl infusions (early vs. delayed) in the vestibular-neurectomized cats on GAD67-immunoreactive neurons in the deafferented vestibular nuclei. Data are mean values ( $\pm$ SEM) of the number of GAD67-immunoreactive neurons in the deafferented vestibular nuclei of control cats and unilateral-neurectomized cats infused with an early (D<sub>0-30</sub>) or a delayed (D<sub>20-50</sub>) AraC or NaCl infusion in the fourth ventricle. Only values recorded on the lesioned side are illustrated. Data from both sides of control cats were pooled to provide a direct comparison with the subgroups of UVN cats. \*  $P < 0.0001$  versus control; +  $P < 0.0001$  versus UVN/AraC D<sub>0-30</sub>. Scale bar: 50  $\mu$ m and  $n = 4$  animals per group.

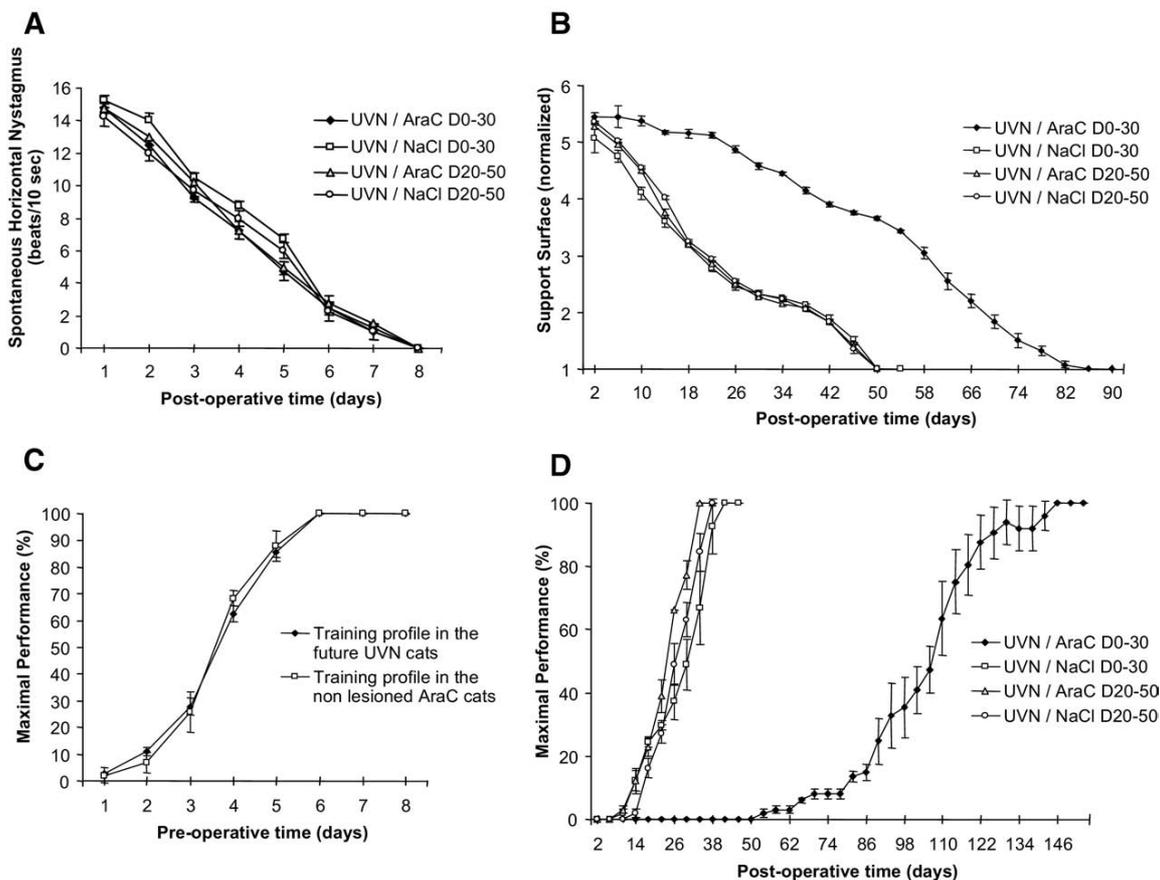
#### AraC infusion has no incidence on the HSN

For nystagmus recordings, cats were placed on an apparatus with their heads fixed, thus maintaining the horizontal semi-circular canals in the horizontal plane. The frequency of HSN was recorded by a camera and measured in the light as the number of quick phase beats toward the contralateral side relative to UVN in 10 s (five repeated measures per animal per sampling time). The ANOVA did not demonstrate significant effects depending on the groups, the postoperative time, or the interaction between these two factors. Immediately after

UVN, animals showed an HSN that disappeared progressively. One day after UVN, the frequency of HSN in all the groups was between 14 and 16 beats per 10 s and declined progressively to disappear totally at the 8 day postlesion delay whatever the groups (Fig. 6A). The AraC infusion did not alter the HSN, which fully recovered in UVN cats infused with AraC or with NaCl.

#### AraC infusion delays the posture function recovery

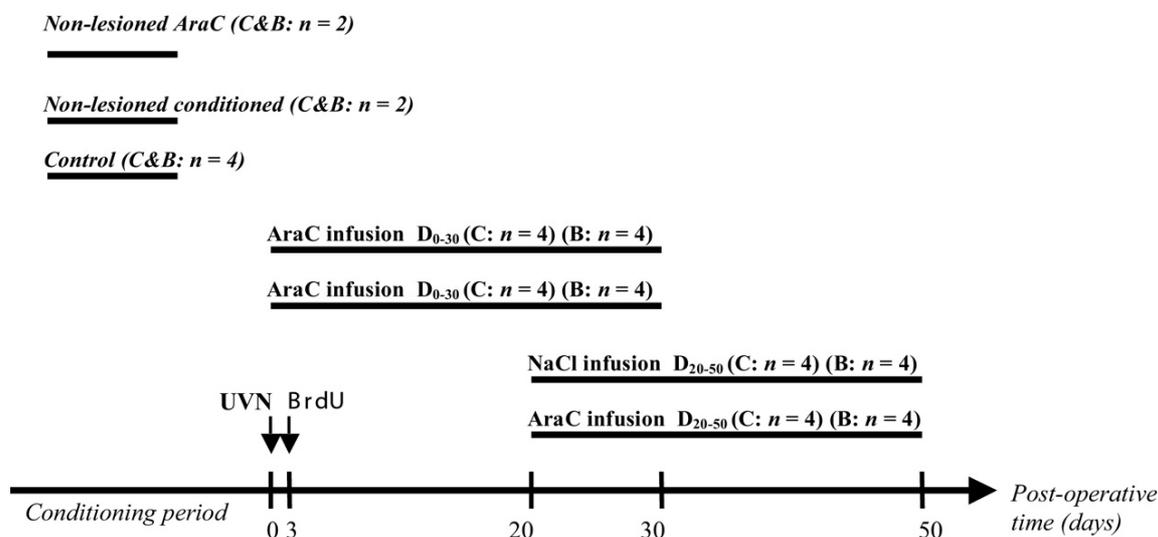
Static posture recovery was evaluated by measuring the surface delimited by the four legs of cats. Significant ef-



**Fig. 6.** (A) Curves illustrating the time course (on the abscissae) of disappearance of horizontal spontaneous nystagmus (HSN) frequency (on the ordinates) for each group of UVN cats infused with AraC or NaCl at different postoperative times. Each data point represents the mean number of HSN quick phase movements in 10 s for four animals (five repeated measures per animal per sampling). Error bars represent SEM. (B) Curves indicating the mean postoperative development of the support surface in the four groups of cats. These values are delimited by the four legs of the cats standing erect without walking and are measured in square centimetre. Data recorded after vestibular lesion were related to individual references and normalized with respect to the preoperative values referred to unity (one being close to 50 cm<sup>2</sup>). Standard errors of the mean are reported as vertical lines. Note the strong delay in time recovery when AraC is infused just after UVN (UVN/AraC D<sub>0-30</sub>) as compared to the other groups (86 days instead of 50 days). (C) The maximal performance (Max P in percentage) is defined as the highest beam rotation speed that did not lead to a fall on four consecutive crossings and is plotted as a function of the number of experimental training sessions in all the groups of cats. These curves illustrate the training time course for each group of cats before unilateral vestibular neurectomy. The training time course of the nonlesioned AraC group was not affected by the AraC infusion. Standard errors of the mean are reported as vertical lines. (D) Mean recovery curves illustrating maximal performance of the cat on the rotating beam, expressed in percent of the preoperative maximal performance (on the ordinates) as a function of the postoperative time in days (on the abscissae). Note the strong delay in time recovery when AraC is infused just after UVN (UVN/AraC D<sub>0-30</sub>) as compared to the other groups (146 days instead of 46 days). Standard errors of the mean are reported as vertical lines.

facts appeared depending on the groups ( $P < 0.0001$ ), the postoperative time ( $P < 0.0001$ ), and the interaction between these two factors ( $P < 0.0001$ ). As a rule, the UVN cats infused with NaCl and those infused with AraC after a 20-day delay recovered similarly and did not differ from control UVN cats without any infusion. These three groups of cats regained a normal support surface 7 weeks after vestibular nerve transection. Conversely, the recovery of the UVN/AraC D<sub>0-30</sub> group was strongly delayed. Fig. 6B shows the time course of posture function recovery in UVN cats infused with AraC or with NaCl. The UVN/AraC D<sub>0-30</sub> group exhibited

significantly higher values ( $5.5 \pm 0.38$ ) than the UVN/NaCl D<sub>0-30</sub> group ( $5.0 \pm 0.3$ ) at 1 day post-UVN. The support surface reached control values at 50 days post-UVN in the NaCl D<sub>0-30</sub> group while it remained significantly large in the AraC D<sub>0-30</sub> group ( $3.75 \pm 0.03$ ;  $P < 0.0001$ ). The complete compensation of this parameter by the D<sub>0-30</sub> AraC group was drastically delayed; it required 86 days. When AraC was infused from D<sub>20-50</sub> after UVN, the recovery profile of the posture function was similar to that of the NaCl D<sub>0-30</sub> group. These results suggest that early AraC infusion has an incidence on the support surface recovery.



**Fig. 7.** Study design: protocol elaborated for studying the effects of the rotating beam conditioning, the unilateral vestibular neurectomy, and the AraC or NaCl infusions on BrdU-immunoreactive cells in the vestibular nuclei and the subventricular zone and on GFAP-labeled and GAD67-labeled cells in the deafferented vestibular nuclei (C: cellular study; B: behavioral study).

#### AraC infusion delays locomotor balance recovery

**Fig. 6C** illustrates the mean development of the posturo-locomotor function in the cats infused or not with AraC during the preoperative conditioning period. Animals were conditioned to cross over the rotating beam, whose velocity was progressively increased. At 1 day post-UVN, all animals fell on the deafferented side, and they were unable to walk on the rotating beam up to 8 days after vestibular deafferentation. As for posture recovery, the ANOVA of the locomotor balance recovery demonstrated significant effects depending on the groups ( $P < 0.0001$ ), the postoperative time ( $P < 0.0001$ ), and the interaction between these two factors ( $P < 0.0001$ ). Cats of the NaCl group crossed over the beam at the highest speed (100% Max P) at 46 days post-UVN. At this time, the AraC D<sub>0-30</sub> cats were able to walk on only the immobile beam. The Max P of this group was strongly delayed (about three times more) and was reached at 146 days post-UVN. When AraC was infused from D<sub>20-50</sub> after lesion, the recovery profile of the locomotor balance function was similar to that of the UVN cats submitted to an early NaCl infusion (**Fig. 6D**). This result suggests that the delayed Max P performance under AraC infusion is not attributable to the nature of the drug. Recovery of locomotor balance (Max P) was complete in UVN cats infused with AraC or with NaCl, but it was strongly delayed in the AraC group when infusion was continuously done early from D<sub>0</sub> to D<sub>30</sub>. In summary, when AraC is infused immediately after UVN, only posturo-locomotor function recovery is delayed whereas the spontaneous horizontal nystagmus recovery remains comparable to that of the NaCl-infused group. Moreover, delayed AraC infusion has no effect on behavioral processes.

#### DISCUSSION

The question addressed by the present study was whether reactive cell proliferation observed after unilateral vestibular nerve section contributed to vestibular compensation. When AraC was infused immediately after the lesion, cell proliferation didn't occur in the VN complex and recovery of posturo-locomotor function was significantly delayed as compared to saline controls, as well as compared to animals that were infused after a postlesion delay. Transient HSN recovered at the same time delay whatever the groups of cats. We suggest that the cells generated in the VN have a functional role and facilitate the behavioral recovery of posture and equilibrium. Moreover, the first 3 weeks after UVN represent a critical period in which important neuroplasticity mechanisms take place for promoting vestibular function recovery.

#### Oculomotor and posturo-locomotor functions recovery required different plasticity mechanisms

This study shows that AraC infusion had no influence on HSN compensation. The disappearance of HSN may be explained by ocular fixation, a behavioral strategy used to block the spontaneous nystagmus. Mammals stabilize their gaze using their fovea: this ocular fixation process can therefore be used by the feline with their pseudo-fovea. In addition, the SVN, which is the structure most involved in oculomotor function, does not exhibit neurogenesis (Tighilet et al., 2007) and could thus require other plasticity mechanisms for compensation.

Whereas posturo-locomotor recovery of cats infused with NaCl or with AraC 20 days after UVN reached control values 4 to 5 weeks after lesion, precocious AraC cell proliferation blockage (UVN/AraC D<sub>0-30</sub>) markedly delayed

the recovery of postural and locomotor balance. For this group, the postural function was compensated at 3 months while the locomotor balance function was recovered later (5 months); for the other groups 1.5 month was required for both functions. A large number of newborn neurons were observed in the MVN, LVN, and IVN, which are mainly associated with static and dynamic postural functions (Wilson and Melvill Jones, 1979). This finding supports the notions that reactive cell proliferation contributes to restoration of the posturo-locomotor functions and that, since functional recovery is strongly delayed but complete after an early local AraC infusion, other compensatory mechanisms are involved. Thus, the functional recovery of these animals is not only dependent on neurogenesis and gliogenesis but it also requires other subprocesses at different levels. Different plasticity mechanisms underlying vestibular compensation have already been described: molecular and neurochemical changes at pre- and postsynaptic levels of the VN cells (Darlington and Smith, 2000; Paterson et al., 2006), synaptic plasticity (Gacek et al., 1998), sprouting of axon collaterals (Dieringer, 1995), and astroglial and microglial reactions (de Waele et al., 1996; Campos Torres et al., 1999). Similar findings in mice showed that, after unilateral labyrinthectomy, the blockade of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression induced by infusion of antisense oligonucleotides in the VN specifically delays the compensation of postural deficits without impact on ocular nystagmus (Bolger et al., 1999). Interestingly, the peak of BrdU positive cells 3 days after UVN in the deafferented VN (Tighilet et al., 2007) is correlated with a peak of BDNF and nerve growth factor Ir-cells (Tighilet et al., 2004), suggesting that, in this model, neurotrophins secreted by both neurons and glial cells could modulate cell proliferation, survival, and differentiation (Pencea et al., 2001). Besides, Gliddon et al. (Gliddon et al., 2005a) demonstrated in the guinea-pig that chronic infusion of GABA<sub>A</sub> receptor antagonist in the deafferented VN specifically modified the expression of postural syndromes and not oculomotor ones, yet without impact on their compensation rate. These data combined with ours strongly indicate that compensation of the HSN and posturo-locomotor functions would be governed by different processes (Curthoys et al., 1988) and that astrogenesis, neurogenesis, and neurotrophin or neuromediator expression in the VN complex may participate in their recovery. Furthermore, an infusion of AraC beginning 3 weeks after UVN had influence neither on the time course of the behavioral recovery, nor on the reactive cell proliferation and its differentiation. We conclude that the first 3 weeks after UVN represent a possible critical period in which important neuroplasticity mechanisms take place for promoting vestibular function recovery.

#### Role of the astroglial reaction in the recovery process

In physiological conditions, astrocytes play a crucial role in ionic homeostasis and the maintenance of an ideal environment for neuronal cell function, participating in clearance and metabolism of neurotransmitters like glutamate in the extracellular space and regulating extracellular pH

and levels of potassium (Lafon-Cazal et al., 2003; Mori et al., 2005). Astrocytes also release various gliotransmitters such as glutamate, ATP, adenosine, D-serine, cytokines, BDNF, and nerve growth factor, and they proceed actively on adjacent neurons, glial cells, and blood vessels (Volterra and Meldolesi, 2005). The increased number of GFAP-Ir cells observed in the deafferented VN might enhance the release of these various gliotransmitters in the extracellular space in order to locally favor neuronal survival, differentiation, excitability, or cell proliferation. Besides their involvement in functional and structural VN reorganization, these findings lead us to speculate that astrocytes might contribute highly to structural plasticity mechanisms and probably to the recovery of vestibular functions.

The prevalent response to brain injury is reactive gliosis, which leads to hypertrophy of astrocytes and to up-regulation of GFAP (Buffo et al., 2008). As previously observed (Tighilet et al., 2007), the UVN cats infused with NaCl showed a strong reactive GFAP-Ir in the deafferented VN. Similar findings have been demonstrated after axotomy in the hypoglossal nucleus (Svensson et al., 1993) and after unilateral inner ear lesion in the vestibular and cochlear nuclei (Campos-Torres et al., 2005). The increased number of GFAP-Ir cells could come in part from differentiation of the newly generated cells in the VN after UVN. They could also derive from mature astrocytes that retain developmental features, allowing dedifferentiation into other subtypes of astrocytes, neurons, or neural progenitors, as evidenced in the SVZ and in the hippocampus of mice (Seri et al., 2001; Mori et al., 2005). Buffo and colleagues demonstrated that reactive astrocytes reacquired developmental stem cell properties and were a novel source of multipotent cells in the cortex after brain injury in the adult mouse (Buffo et al., 2008). In our model, the reactive astrogliosis in the deafferented VN was decreased in the AraC-infused group (D<sub>0-30</sub>) but remained stronger than in the control group. This observation, combined with the total lack of BrdU-Ir nuclei in the deafferented VN, confirms the absence of newborn astrocytes after UVN in this group. The persistent astrogliosis observed in these animals might result from pre-existent astrocytes, upregulating GFAP protein expression after UVN and taking part in the neuroplasticity of the system after nerve transection. This notion is consistent with results of other authors who demonstrated that AraC treatment inhibited postlesional glial scar formation selectively after hypoglossal nerve transection in the rat. In addition, after AraC treatment following axotomy, astrocytes up-regulated GFAP-Ir without <sup>3</sup>H-thymidine incorporation or BrdU immunostaining (Graeber et al., 1988; Svensson et al., 1994).

#### Role of the GABAergic neurogenesis in the recovery process

As in our previous experiments (Tighilet and Lacour, 2001), the results presented here showed that, after UVN, a considerable amount of the cell proliferation observed in the deafferented VN differentiated into GABAergic neu-

rons. In contrast, in the deafferented VN of the AraC  $D_{0-30}$  group, which did not exhibit BrdU-Ir cells, the increased number of GAD67-Ir neurons suggests that pre-existing neurons upregulated GAD67. These two plasticity mechanisms (GABA neurogenesis vs. GAD67 upregulation) might occur in the deafferented VN in order to re-establish vestibular imbalance, which seems to be necessary for fine vestibular compensation. The GABAergic system is known to influence vestibular compensation (Gliddon et al., 2005b), to rebalance electrical activity between the VN on both sides (Darlington and Smith, 2000), and to control different steps of adult neurogenesis like differentiation (Represa and Ben-Ari, 2005; Bordey, 2007). The mechanism promoting neuronal and astroglial differentiation of the newly generated cells could implicate GABA inputs and GABA<sub>A</sub> receptors potentially located on neural stem cells (Stewart et al., 2002). It is known that GABAergic inputs to hippocampal progenitor cells promote activity-dependent neuronal differentiation (Tozuka et al., 2005) and regulate the synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain (Ge et al., 2006). Interestingly, we have previously observed a strong increase in GABA-staining varicosities in the deafferented VN complex after UVN in the cat (Tighilet and Lacour, 2001), and it has been proposed that changes in GABA receptor function in the deafferented VN neurons act as a potent mechanism underlying vestibular compensation (Cameron and Dutia, 1997).

Numerous hypotheses can be postulated to clarify the functional significance of such GABAergic neurogenesis in vestibular function recovery. As previously evoked (Tighilet et al., 2007), newborn GABAergic neurons on the lesioned side could be inhibitory neurons directly acting on the contralateral excitatory neurons. Similarly, newborn GABAergic neurons could act on inhibitory mature neurons in the ipsilateral VN. Both mechanisms could contribute to attenuating the electrical asymmetry between the homologous VN. Another hypothesis concerns the effect of GABA on the VN neuron activity after UVN. GABA is known to elicit an excitatory signal in immature neurons and even in some mature neurons under specific or pathological conditions. The depolarizing or hyperpolarizing response depends on the Cl<sup>-</sup> gradient across the cell membrane (Ge et al., 2007a; Yuan, 2008) and on the cation-chloride-cotransporters expressed by mature and newborn neurons. To clarify the functional role of GABA in our model, the nature of inhibitory versus excitatory action of GABA should be determined by further studies.

## CONCLUSION

In conclusion, the current study provides cellular and behavioral evidence for adult reactive astrogenesis and neurogenesis that contribute to vestibular compensation in the adult cat following UVN. Microenvironments of neurogenic zones are thought to have specific permissive factors for the proliferation, the differentiation, and the integration of new cells (Zhao et al., 2008). In the intact brain, the vestibular complex seems not to deliver adequate cues to allow secondary neurogenesis, but

after UVN, the local environment would express survival and optimal factors for new generated cells. The mature nervous system could recapitulate developmental process, leading new cells to survive, migrate, differentiate, and probably integrate existing neural circuitry required for fine vestibular compensation. Additional experiments will aim to specify the postlesional factors promoting this reactive vestibular astrogenesis and to elucidate the role of GABAergic neurogenesis and astrogenesis in vestibular compensation.

*Acknowledgments*—We thank Dr Marie-Pierre Blanchard for technical assistance in confocal imaging and Valerie Gilbert and Catherine Marra for taking care of the animals. This study was supported by grants from the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche and CNRS (UMR Université de Provence/CNRS N°6149).

## REFERENCES

- Arlotta P, Magavi SS, Macklis JD (2003) Induction of adult neurogenesis: molecular manipulation of neural precursors in situ. *Ann N Y Acad Sci* 991:229–236.
- Bolger C, Sansom AJ, Smith PF, Darlington CL (1999) An antisense oligonucleotide to brain-derived neurotrophic factor delays postural compensation following unilateral labyrinthectomy in guinea pig. *Neuroreport* 10:1485–1488.
- Bordey A (2007) Enigmatic GABAergic networks in adult neurogenic zones. *Brain Res Rev* 53:124–134.
- Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Gotz M (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3581–3586.
- Cameron SA, Dutia MB (1997) Cellular basis of vestibular compensation: changes in intrinsic excitability of MVN neurones. *Neuroreport* 8:2595–2599.
- Campos-Torres A, Touret M, Vidal PP, Barnum S, de Waele C (2005) The differential response of astrocytes within the vestibular and cochlear nuclei following unilateral labyrinthectomy or vestibular afferent activity blockade by transtympanic tetrodotoxin injection in the rat. *Neuroscience* 130:853–865.
- Campos Torres A, Vidal PP, de Waele C (1999) Evidence for a microglial reaction within the vestibular and cochlear nuclei following inner ear lesion in the rat. *Neuroscience* 92:1475–1490.
- Carlen M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisen J (2002) Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol* 12:606–608.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507–518.
- Curthoys IS, Smith PF, Darlington CL (1988) Postural compensation in the guinea pig following unilateral labyrinthectomy. *Prog Brain Res* 76:375–384.
- Darlington CL, Smith PF (2000) Molecular mechanisms of recovery from vestibular damage in mammals: recent advances. *Prog Neurobiol* 62:313–325.
- de Waele C, Campos Torres A, Jossot P, Vidal PP (1996) Evidence for reactive astrocytes in rat vestibular and cochlear nuclei following unilateral inner ear lesion. *Eur J Neurosci* 8:2006–2018.
- Dieringer N (1995) "Vestibular compensation": neural plasticity and its relations to functional recovery after labyrinthine lesions in frogs and other vertebrates. *Prog Neurobiol* 46:97–129.
- Gacek RR, Khetarpal U, Schoonmaker J (1998) Morphological and neurochemical correlates of vestibular compensation. *Auris Nasus Larynx* 25:193–201.

- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589–593.
- Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H (2007a) GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci* 30:1–8.
- Ge S, Sailor KA, Ming GL, Song H (2008) Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol* 586:3759–3765.
- Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H (2007b) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54:559–566.
- Gliddon CM, Darlington CL, Smith PF (2005a) Effects of chronic infusion of a GABA<sub>A</sub> receptor agonist or antagonist into the vestibular nuclear complex on vestibular compensation in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1126–1135.
- Gliddon CM, Darlington CL, Smith PF (2005b) GABAergic systems in the vestibular nucleus and their contribution to vestibular compensation. *Prog Neurobiol* 75:53–81.
- Graeber MB, Tetzlaff W, Streit WJ, Kreutzberg GW (1988) Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. *Neurosci Lett* 85:317–321.
- Gross CG (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1:67–73.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310:679–683.
- Lacour M (2006) Restoration of vestibular function: basic aspects and practical advances for rehabilitation. *Curr Med Res Opin* 22:1651–1659.
- Lacour M, Roll JP, Appaix M (1976) Modifications and development of spinal reflexes in the alert baboon (*Papio papio*) following an unilateral vestibular neurectomy. *Brain Res* 113:255–269.
- Lafon-Cazal M, Adjali O, Galeotti N, Poncet J, Jouin P, Homburger V, Bockaert J, Marin P (2003) Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse. Comparison with the cerebrospinal fluid proteome. *J Biol Chem* 278:24438–24448.
- Laplagne DA, Esposito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF (2006) Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol* 4:e409.
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223–250.
- Mori T, Buffo A, Gotz M (2005) The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 69:67–99.
- Moysé E, Bauer S, Charrier C, Coronas V, Krantic S, Jean A (2006) Neurogenesis and neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat brain: new vistas about autonomic regulations—a review. *Auton Neurosci* 126–127:50–58.
- Paterson JM, Short D, Flatman PW, Seckl JR, Aitken A, Dutia MB (2006) Changes in protein expression in the rat medial vestibular nuclei during vestibular compensation. *J Physiol* 575:777–788.
- Penceva V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21:6706–6717.
- Represa A, Ben-Ari Y (2005) Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 28:278–283.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184–187.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153–7160.
- Stewart RR, Hoge GJ, Zigova T, Luskin MB (2002) Neural progenitor cells of the neonatal rat anterior subventricular zone express functional GABA(A) receptors. *J Neurobiol* 50:305–322.
- Svensson M, Eriksson NP, Aldskogius H (1993) Evidence for activation of astrocytes via reactive microglial cells following hypoglossal nerve transection. *J Neurosci Res* 35:373–381.
- Svensson M, Mattsson P, Aldskogius H (1994) A bromodeoxyuridine labelling study of proliferating cells in the brainstem following hypoglossal nerve transection. *J Anat* 185 (Pt 3):537–542.
- Tighilet B, Brezun JM, Sylvie GD, Gaubert C, Lacour M (2007) New neurons in the vestibular nuclei complex after unilateral vestibular neurectomy in the adult cat. *Eur J Neurosci* 25:47–58.
- Tighilet B, Gustave D, Dufflo S, Gaubert C, Lacour M (2004) Role of the neurotrophins in vestibular compensation in the cat. In: Abstracts of the Barany Society XXIII international congress. Paris, France, July 7–9. *J Vestib Res* 14:95–303.
- Tighilet B, Lacour M (2001) Gamma amino butyric acid (GABA) immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. *Eur J Neurosci* 13:2255–2267.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47:803–815.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030–1034.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626–640.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482–497.
- Wilson VJ, Melvill Jones G (1979) *Mammalian vestibular physiology*. New York, London: Plenum.
- Yuan TF (2008) GABA effects on neurogenesis: an arsenal of regulation. *Sci Signal* 1:jc1.
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645–660.



## Résultats - Chapitre 2

### *Neurogenic potential of the vestibular nuclei and behavioural recovery time course in the adult cat are governed by the nature of the vestibular damage*

Dutheil S, Lacour M, Tighilet B.

In: *PLoS One* (2011), 6 (8) : e22262

#### **Résumé de l'article**

Dans cet article, nous avons examiné si le potentiel neurogène post-lésionnel des noyaux vestibulaires et si le décours de la compensation vestibulaire dépendaient de la nature de la désafférentation vestibulaire pratiquée chez le chat adulte.

Les résultats présentés ci-après ont porté sur trois modèles animaux de désafférentations vestibulaires unilatérales :

- 1) le premier groupe a reçu une injection de tétrodotoxine (TTX), à l'origine d'un blocage réversible et transitoire des afférences vestibulaires,
- 2) le second groupe a été soumis à une destruction mécanique des récepteurs vestibulaires périphériques par une labyrinthectomie (LU)
- 3) enfin le dernier groupe a subi une section du nerf vestibulaire (neurectomie vestibulaire, NVU).

Les chats de ces groupes expérimentaux ont fait l'objet d'analyses comportementales et cellulaires à divers stades post-opératoires, à savoir 1, 3, 7, 30 et 60 jours après la désafférentation. Nous avons administré du BrdU afin d'identifier la prolifération et la survie cellulaires dans les noyaux vestibulaires. Des marqueurs cellulaires spécifiques nous ont permis de caractériser le type cellulaire (astrocytes / neurones), le phénotype neurochimique des cellules néoformées, ainsi que les remaniements post-lésionnels concernant l'astroglie et le système GABAergique.

Nous avons observé des mécanismes de plasticité distincts relatifs à la nature de la désafférentation induite. La réaction gliale s'est avérée légèrement marquée dans le groupe TTX, un peu plus accentuée dans le groupe LU, et très forte dans le groupe NVU. Le pattern d'expression de l'enzyme de synthèse du GABA, la glutamic acid decarboxylase (GAD67), semble également dépendre

de la sévérité de la désafférentation vestibulaire et pourrait être reliée au profil d'expression des symptômes vestibulaires.

Il est particulièrement intéressant de constater que dans les deux groupes TTX et LU, aucune prolifération cellulaire n'a été observée dans les NV quels que soient les délais post-opératoires considérés. En revanche, la prolifération cellulaire réactionnelle observée dans le groupe NVU a confirmé les données antérieurement obtenues. Cette prolifération cellulaire localement restreinte aux NV désafférentés a donné lieu à une neurogenèse de phénotype GABAergique ainsi qu'à une astrogenèse dont les décours d'expression ont diminué entre le premier et le deuxième mois post-UVN.

Si le syndrome vestibulaire s'est manifesté de manière comparable quelques jours après la désafférentation vestibulaire pour les trois groupes, son décours a ensuite suivi une cinétique en lien avec la nature de la désafférentation. La récupération comportementale la plus rapide a été obtenue dans le groupe TTX (1 semaine), suivie par le groupe LU (2 semaines) puis NVU (6 semaines). Ainsi une désafférentation structurale et fonctionnelle engendre-t-elle une plus longue compensation vestibulaire et un éventail de mécanismes de plasticité plus considérable.

Cette étude est la première à mettre en évidence un potentiel de neurogenèse réactionnelle des NV dépendant de la nature de la désafférentation vestibulaire. Les réponses adaptatives du tissu nerveux ainsi que la disparition des désordres vestibulaires sont également sous la gouvernance de ce paramètre. Ces résultats pris dans leur ensemble ouvrent des perspectives aussi bien dans le domaine de la compréhension de la permissivité neurogène du tissu nerveux qu'en clinique réparatrice pour les patients vestibulaires ayant différentes étiologies.

# Neurogenic Potential of the Vestibular Nuclei and Behavioural Recovery Time Course in the Adult Cat Are Governed by the Nature of the Vestibular Damage

Sophie Dutheil, Michel Lacour, Brahim Tighilet\*

Département de Neurosciences, UMR 6149 "Neurosciences Intégratives et Adaptatives", Université de Provence/CNRS - Pôle 3C (Comportement, Cerveau, Cognition), Centre de Saint Charles, Marseille, France

## Abstract

Functional and reactive neurogenesis and astrogenesis are observed in deafferented vestibular nuclei after unilateral vestibular nerve section in adult cats. The newborn cells survive up to one month and contribute actively to the successful recovery of posturo-locomotor functions. This study investigates whether the nature of vestibular deafferentation has an incidence on the neurogenic potential of the vestibular nuclei, and on the time course of behavioural recovery. Three animal models that mimic different vestibular pathologies were used: unilateral and permanent suppression of vestibular input by unilateral vestibular neurectomy (UVN), or by unilateral labyrinthectomy (UL, the mechanical destruction of peripheral vestibular receptors), or unilateral and reversible blockade of vestibular nerve input using tetrodotoxin (TTX). Neurogenesis and astrogenesis were revealed in the vestibular nuclei using bromodeoxyuridine (BrdU) as a newborn cell marker, while glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamate decarboxylase 67 (GAD67) were used to identify astrocytes and GABAergic neurons, respectively. Spontaneous nystagmus and posturo-locomotor tests (static and dynamic balance performance) were carried out to quantify the behavioural recovery process. Results showed that the nature of vestibular loss determined the cellular plastic events occurring in the vestibular nuclei and affected the time course of behavioural recovery. Interestingly, the deafferented vestibular nuclei express neurogenic potential after acute and total vestibular loss only (UVN), while non-structural plastic processes are involved when the vestibular deafferentation is less drastic (UL, TTX). This is the first experimental evidence that the vestibular complex in the brainstem can become neurogenic under specific injury. These new data are of interest for understanding the factors favouring the expression of functional neurogenesis in adult mammals in a brain repair perspective, and are of clinical relevance in vestibular pathology.

**Citation:** Dutheil S, Lacour M, Tighilet B (2011) Neurogenic Potential of the Vestibular Nuclei and Behavioural Recovery Time Course in the Adult Cat Are Governed by the Nature of the Vestibular Damage. PLoS ONE 6(8): e22262. doi:10.1371/journal.pone.0022262

**Editor:** Maria Gasset, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spain

**Received:** January 6, 2011; **Accepted:** June 22, 2011; **Published:** August 11, 2011

**Copyright:** © 2011 Dutheil et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by grants from the "Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche" and CNRS (UMR Université de Provence/CNRS N° 6149). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: brahim.tighilet@univ-provence.fr

## Introduction

In all mammals, unilateral damage of the peripheral vestibular system induces a post-lesional vestibular syndrome made of static and dynamic signs. The static signs include oculomotor deficits (spontaneous horizontal nystagmus) and postural deficits (head tilt, increased body support surface) that are compensated within a few days or weeks, while the dynamic signs (vestibulo-ocular reflex asymmetry, impaired equilibrium function) are compensated much less completely or over a longer time [1,2,3]. Immediately after unilateral vestibular loss, ipsilateral vestibular nuclei (VN) are silenced whereas contralateral VN keep resting activity. Over time, behavioural deficits improve and compensate in a time window that approximately coincides with restoration of balanced electrical activity between the two sides [4]. This rebalanced activity within the VN is attributed to different cellular neuroplasticity mechanisms: molecular, neurochemical, and neurohormonal changes at pre- and post-synaptic levels, sensitivity changes of receptors, neuromediator release, sprouting of axon collaterals, and astroglial and microglial reactions [1,3,5,6,7,8].

In addition to these plasticity mechanisms, we demonstrated that unilateral vestibular neurectomy (UVN) in the adult cat induced intense cell proliferation in the deafferented VN. Most of the reactive newborn cells survived up to one month, differentiated into astrocytic, microglial cells and GABAergic neurons [9], and contributed actively to the successful recovery of posturo-locomotor functions [10]. Such a structural plasticity mechanism after vestibular loss is of particular interest to understand the vestibular compensation process and the factors favouring the expression of reactive neurogenesis in the adult damaged brain.

Adult neurogenesis is an ongoing process restricted to two zones in the healthy mammal brain: the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus in the hippocampus. Pathological conditions such as Alzheimer disease [11], Huntington disease [12], Parkinson disease [13], seizures [14], strokes [15] modulate the neurogenesis rate in the SVZ and SGV. Furthermore, specific damages of the central nervous system can lead to reactive neurogenesis even in non-neurogenic zones – in the dorsal vagal complex [16], in the corticospinal pathway [17], in the hypothalamus [18], in the cortex [19], in the striatum [20]. The determinants of such a

switch from non-neurogenic to a neurogenic area are still poorly known [21,22].

In this study, we asked first whether the plasticity mechanisms involved in recovery after vestibular loss, including the astroneurogenesis reaction, depend on the nature of the vestibular damage. To answer this question, we designed three experimental groups of adult cats that underwent different vestibular lesions: one group was submitted to a unilateral and reversible blockade of vestibular input by intratympanic injection of tetrodotoxin (TTX), a second group received a unilateral labyrinthectomy (UL) by destruction of the vestibular peripheral receptors in the inner ear, and a third group had a post-ganglion unilateral vestibular neurectomy (UVN). These three vestibular lesion models induce different type of VN deafferentation which should induce different neurobiological plasticity reactions: sudden and total structural and functional deafferentation after UVN (like in vestibular neuritis and Menière's disease surgery), more progressive and mainly functional deafferentation after UL (like in ototoxic drug administration, ageing), transient and reversible deafferentation after TTX (a model more or less close to benign paroxysmal positional vertigo, BPPV). We used bromodeoxyuridine (BrdU) as a newborn cell marker, glial fibrillary acidic protein (GFAP) as an astrocyte marker, and glutamate decarboxylase 67 (GAD67) as an indicator of GABAergic phenotype. Our working hypothesis was that the neurogenesis reaction should be expressed mainly after sudden and acute vestibular loss (UVN). Immunohistochemistry methods served to reveal both changes of plasticity markers expression from existing cells and the presence of newly generated astrocytes and GABAergic neurons. A second aim of the study was to determine whether these three models of vestibular deafferentation resulted in different time courses of behavioural recovery. For this purpose, we analysed the compensation of the spontaneous vestibular nystagmus and of the posturo-locomotor syndrome (support surface, locomotor equilibrium) as a function of time after vestibular damage. Finally, this experimental study opens widely to the question: do patients with vestibular pathologies of different aetiologies recover using different plasticity mechanisms?

## Results

### Cell proliferation analysis

As recently demonstrated [9,10] control animals did not exhibit BrdU-positive (BrdU<sup>+</sup>) cells in the whole VN and around the subependymal layer of the fourth ventricle, whereas UVN induced strong and notable cell proliferation restricted to the deafferented VN. The quantification of the BrdU<sup>+</sup> cells in the VN of UVN animals reproduced a pattern of expression similar to that in previous studies, with stronger cell proliferation in LVN and IVN than in MVN and SVN [9] (Figures 1A and 1B). Cell proliferation began 1 day after UVN, reached a peak at 3 days (+5671.14% in the MVN, +5605.88% in the IVN, +10536.36% in the LVN and +6454.62% in the SVN compared to controls), and then decreased to reach control values 30 days after UVN. Most of the newborn cells that peaked at D3 survived up to 2 months after UVN (Figure 1C) and integrated functional networks [10]. By contrast, in unilateral labyrinthectomy (UL) and TTX groups, very slight and non-significant numbers of BrdU<sup>+</sup> cells were detected in the VN whatever the post-lesion delay (D1, D3, D7, D30 and D60) and the side considered (ipsi- or contra-lateral). Statistical analysis did not display significant difference between these three groups (TTX versus UL versus controls).

### GAD67 expression in the deafferented vestibular nuclei

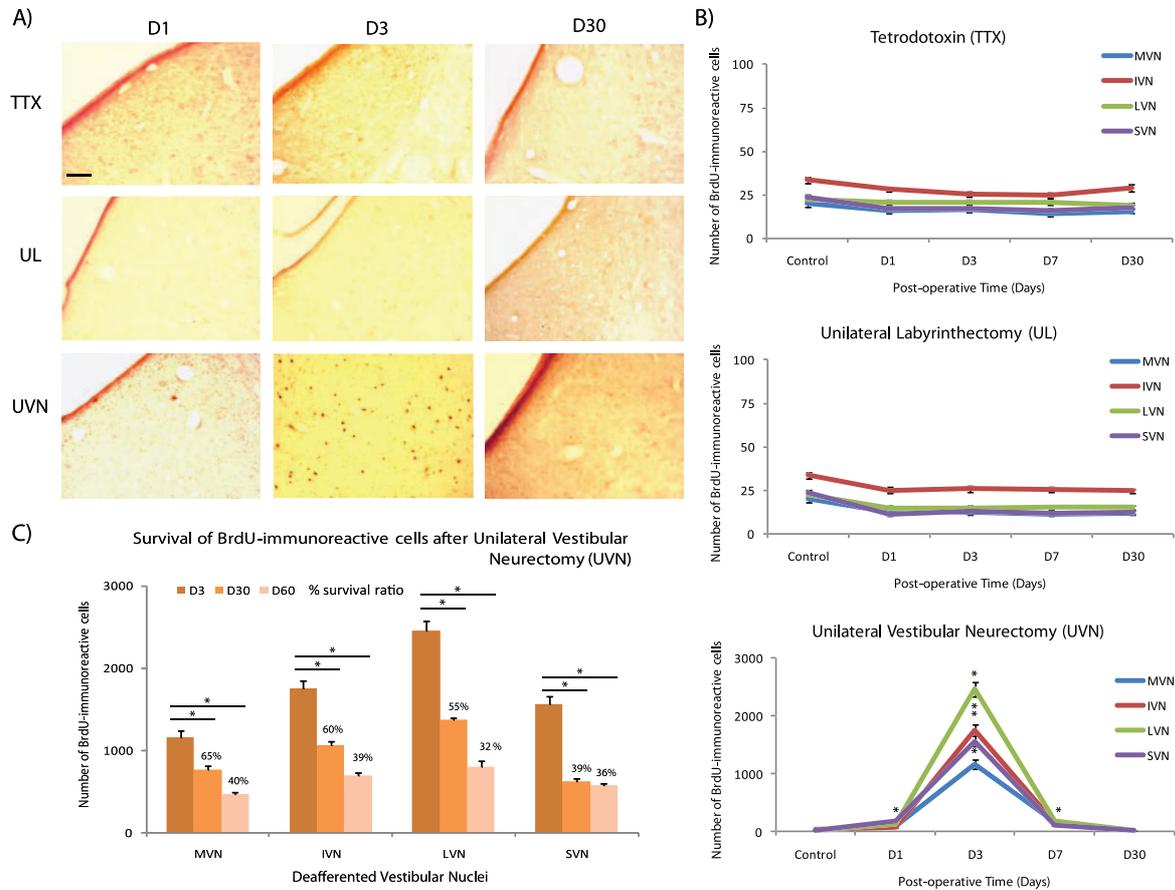
Whatever the nature of vestibular deafferentation, the SVN did not exhibit GAD67-immunoreactive changes. After UVN, the pattern of GAD67<sup>+</sup> expression enhanced in the deafferented MVN, IVN and LVN for all the postoperative delays. Compared to controls, the number of GAD67<sup>+</sup> cells increased at D1, peaked at D3 in the LVN (+301.58% compared to control group), and at D7 in the MVN and the IVN (+328.57% and +458.26% respectively compared to control group) and then decreased slightly but still remained significantly higher than control and TTX groups. At D60 post-UVN, the number of GAD67<sup>+</sup> cells remained significantly high ( $p < 0.0001$ ). Comparatively, UL led to a slighter increased number of GAD67<sup>+</sup> cells at D1 with a peak of expression at D3 (+295.91% in the MVN, +256.09% in the IVN, +215.09% in the LVN compared to controls). At D7 the number of GAD67<sup>+</sup> cells decreased slightly and remained significantly high at D60 (Figure 2). After TTX injection, the number of GAD67-immunoreactive cells increased slightly at D1, peaked at D3 (+161.63% in the MVN, +142% in the IVN and +115.62% in the LVN compared to controls) and declined progressively at D7 to reach control values at D30 for all the VN (Figure 2B). The double-immunohistochemistry against BrdU and GAD67 revealed numerous cells co-localizing these two markers in the UVN groups. So, a large subset of the newborn cells that incorporated BrdU at 3 days post-UVN, differentiated into GABAergic neurons and survived up to 2 months, as attested by confocal microscopy (Figure 3 a,b,c). Conversely, no colocalization of BrdU and GAD67 immunostainings was detected in the VN of both the TTX and the UL groups of cats at this chosen post-operative delay, suggesting a lack of newborn GAD67 neurons in these groups.

### GFAP expression in the deafferented vestibular nuclei

We found that UVN provided the strongest local astroglial reaction. In all the deafferented VN, the number of GFAP<sup>+</sup> cells strongly increased from D1 to D30. Data recorded at D30 were significantly higher than in the control group (+443.15% in the MVN; +360.29% in the IVN; +287.66% in the LVN; +381.07 in the SVN;  $p < 0.0001$ ). At D60, however, the number of GFAP<sup>+</sup> cells returned to control values. Note that among the VN, the deafferented SVN exhibited the highest number of GFAP<sup>+</sup> cells whatever the post-UVN delays. Compared to the control group, we observed that after UL the number of GFAP<sup>+</sup> cells increased significantly in all the deafferented VN from the first post-operative day (D1), peaked at D30 (+216.66% in the MVN, +341.28% in the IVN, +213.5% in the LVN, and +187.14% in the SVN compared to controls;  $p < 0.0001$ ) and then reached control values at D60 (Figure 4). TTX injection in the inner ear led nevertheless to a non-significant increase of the number of GFAP<sup>+</sup> cells in the VN. Furthermore, since the newly generated cells of the UVN group were neurochemically characterized by double-immunofluorescence stainings, we found that among the numerous newborn cells that incorporated BrdU at D3, a subset differentiated into astrocytes at D60, colocalizing BrdU and GFAP markers (Figure 3 d,e,f). In contrast, no BrdU/GFAP double-immunostainings were observed in the VN at the chosen post-operative delay in the TTX and the UL groups, suggesting a lack of newly generated astrocytes after these two kinds of vestibular deafferentations.

### Behavioural deficits after vestibular deafferentation

In mammals, the leading ocular motor effect of vestibular deafferentation is a high frequency, mainly horizontal, spontaneous nystagmus, with its quick phase directed toward the intact side



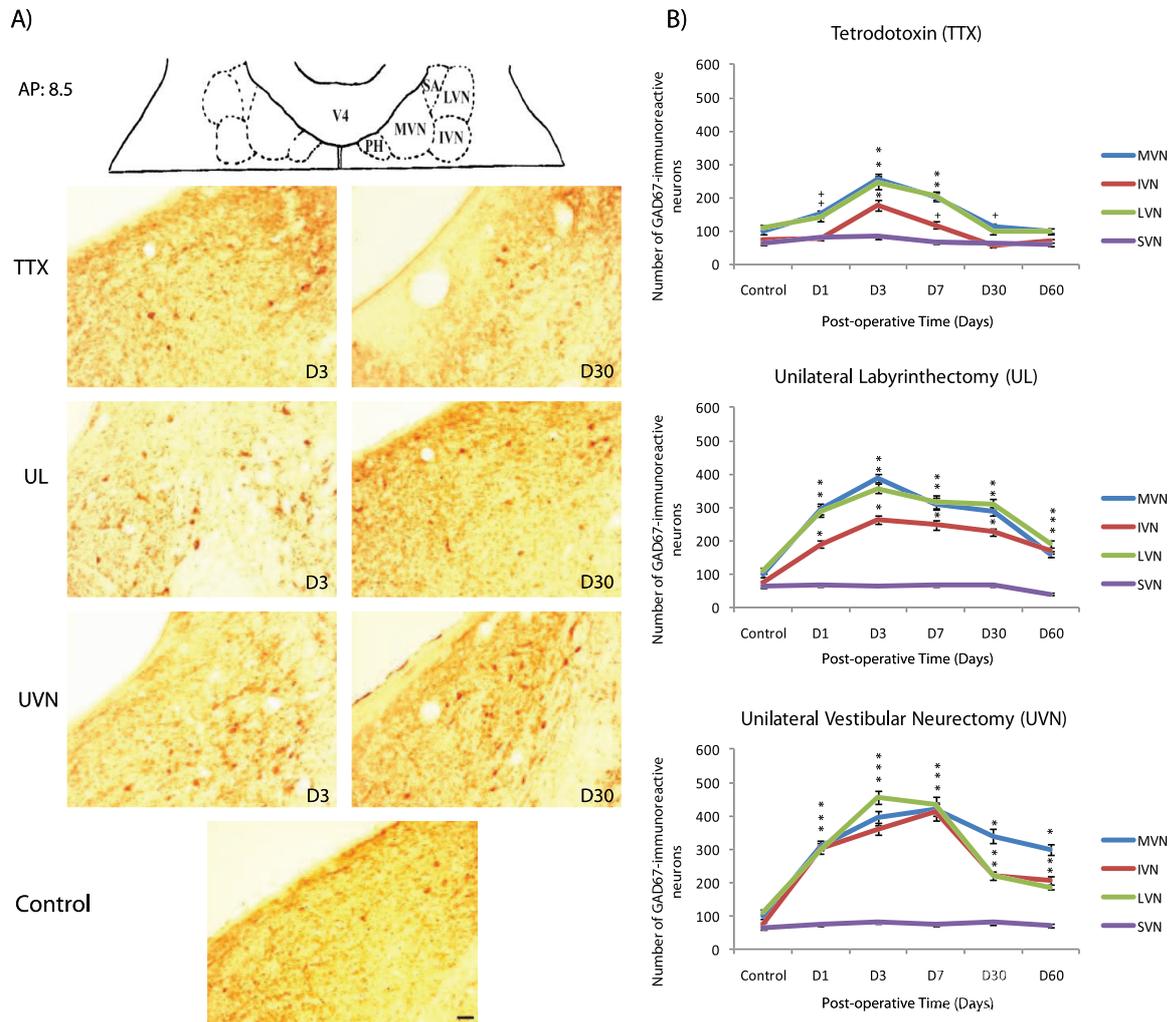
**Figure 1. Reactive cell proliferation depends on the nature of the vestibular deafferentation.** (A) Representative illustrations of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) immunostainings in the deafferented MVN in control cats and in cats examined 1, 3, and 30 days after unilateral tetrodotoxin injection (TTX), unilateral labyrinthectomy (UL), and unilateral vestibular neurectomy (UVN). Scale bar: 100  $\mu$ m. (B) Quantitative evaluation. Curves illustrating the mean values ( $\pm$  SEM, vertical bars) in the deafferented VN in control cats and in cats subjected to TTX, UL, and UVN and observed at 1, 3, 7, and 30 days after the different vestibular deafferentations. \* Indicates significant differences assessed by ANOVA followed by Scheffé test for all the VN ( $p < 0.0001$ ). (C) Survival of the newly generated cells 30 and 60 days after UVN. Histograms comparing the mean values ( $\pm$  SEM) of the number of BrdU-immunopositive cells in the deafferented VN 3, 30 and 60 day after UVN. BrdU was injected 3 days after UVN. \*Significant differences assessed by ANOVA followed by Scheffé test ( $p < 0.0001$ ). This comparison served to establish a survival ratio specific to each VN. Only values recorded on the lesioned side are illustrated. BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine; D: day; IVN: inferior vestibular nucleus; LVN: lateral vestibular nucleus; MVN: medial vestibular nucleus; SVN: superior vestibular nucleus; TTX: tetrodotoxin; UL: unilateral labyrinthectomy, UVN: unilateral vestibular neurectomy.  $n = 4$  animals per group. doi:10.1371/journal.pone.0022262.g001

[23]. Lesioned animals also exhibit postural imbalance, yaw curvature of the spine with midscapular point and sacrum directed to the lesioned side, circling and rolling toward the lesioned side, extension of the contralateral forelimb, and head nystagmus [23]. After deafferentation, they adopt a largely increased support surface, which decreases over time. Then, when they try to move, they fall down toward the lesioned side. The deficits observed after a unilateral vestibular deafferentation were the same after TTX injection, UL, or UVN, but the time course of recovery differed according to the severity of the damage.

**Spontaneous nystagmus.** Animals displayed a horizontal spontaneous nystagmus whatever the nature of vestibular deafferentation: TTX injection, UL, or UVN (Figure 5A). The compensation profile of the ocular nystagmus for the TTX and UL groups did not differ significantly: at the first day post-

deafferentation (D1), the frequency of the spontaneous nystagmus was 9.5 and 10 beats/ 10 sec respectively. It decreased gradually over time and reached 1.5 and 3 beats/ 10 sec at the third post-deafferentation day, and then disappeared completely at the fourth day. In contrast, after UVN the time course of vestibular nystagmus compensation was delayed relative to the TTX and UL groups ( $p < 0.0001$ ). Nystagmus frequency was 15 beats/sec the first day following UVN and declined linearly until its total disappearance at the eighth day post-UVN.

**Posture function recovery.** In four-footed animals standing erect, vestibular syndrome leads to an increased support surface delimited by the four paw pads. This parameter provides a good estimation of postural in stability and recovery. It displays the tonic asymmetries of extensor and flexor muscles of the anterior and posterior paws induced by the vestibular deafferentation

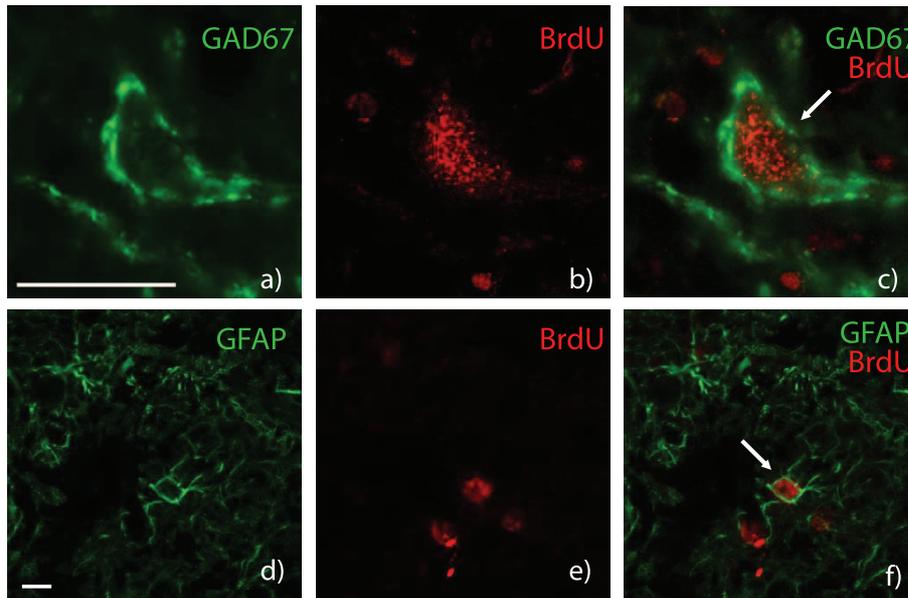


**Figure 2. Glutamic acid decarboxylase (GAD67) immunoreactivity is differentially expressed according to the vestibular damage.** (A) Schematic representation illustrating the localization of the antero-posterior (AP) axis adapted from Berman's stereotaxis Atlas (1968), where the photomicrographs of the medial vestibular nuclei were taken. PH: praepositus hypoglossi; SA: stria acustica; V4: fourth ventricle. GAD67-immunoreactive neurons are expressed in all the vestibular nuclei. Illustration of GAD67 immunoreactivity in the medial vestibular nucleus (MVN) in a representative control cat and in three experimental animals examined 3 and 30 days after TTX injection, unilateral labyrinthectomy (UL), or unilateral neurectomy (UVN). (B) Quantitative evaluation of the effects of the nature of vestibular deafferentation (TTX, UL, or UVN) on GAD67-immunoreactive neurons in the deafferented vestibular nuclei. Data are mean values ( $\pm$  SEM) of the number of GAD67-immunoreactive neurons in the deafferented vestibular nuclei of control cats and cats in the experimental groups. Only values recorded on the lesioned side are illustrated. Data from both sides of control cats were pooled for direct comparison with the subgroups of vestibular deafferented cats. GAD67: glutamic acid decarboxylase, the enzyme for GABA synthesis; D: day; IVN: inferior vestibular nucleus; LVN: lateral vestibular nucleus; MVN: medial vestibular nucleus; SVN: superior vestibular nucleus; TTX: tetrodotoxin; UL: unilateral labyrinthectomy, UVN: unilateral vestibular neurectomy. \* $p < 0.0001$ ; + $p < 0.01$  versus control. Scale bar: 90  $\mu$ m and  $n = 4$  animals per group. doi:10.1371/journal.pone.0022262.g002

[10,24,25]. Return to control values recorded pre-operatively was faster for the TTX group (6 days) than for the UL group (16 days) or the UVN group (46 days) ( $p < 0.0001$ ) (Figure 5B). The variance analysis (ANOVA) established significant effects depending on the groups ( $p < 0.0001$ ), the postoperative time ( $p < 0.0001$ ), and the interaction between these two factors.

**Locomotor balance recovery.** As observed for the posture function, animals of the TTX group showed the fastest recovery of their dynamic locomotor balance. They were able to cross the

rotating beam at their maximal performance (Max P) at the 6th day after deafferentation, whereas the cats of UL group reached their Max P 14 days after deafferentation (Figure 5C). In the UVN group, cats managed to walk on the rotating beam from 12–14 days after surgery and reached their Max P only 47 days after. Variance analysis of the locomotor balance function recovery (ANOVA) demonstrated significant effects depending on the groups ( $p < 0.0001$ ), the postoperative time ( $p < 0.0001$ ), and the interaction between these two factors ( $p < 0.0001$ ).



**Figure 3. Newly generated cells survive and differentiate into GABAergic neurons and astrocytes exclusively after vestibular neurectomy.** Confocal analysis of newly generated glutamate decarboxylase (GAD)-67-immunoreactive (Ir) neurons (**a, b, c**) and newly generated glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive (Ir) cells (**d, e, f**) in the deafferented MVN 60 days after UVN. BrdU was administered 3 days after the nerve section, and the animals were killed 57 days after. BrdU-immunoreactive cells are in red (**b, c, e, f**) and the other markers of cell differentiation in green: GAD67 (**a, c**) and GFAP (**d, f**). Scale bars represent 50  $\mu\text{m}$  (**a**) and 10  $\mu\text{m}$  (**e**). doi:10.1371/journal.pone.0022262.g003

## Discussion

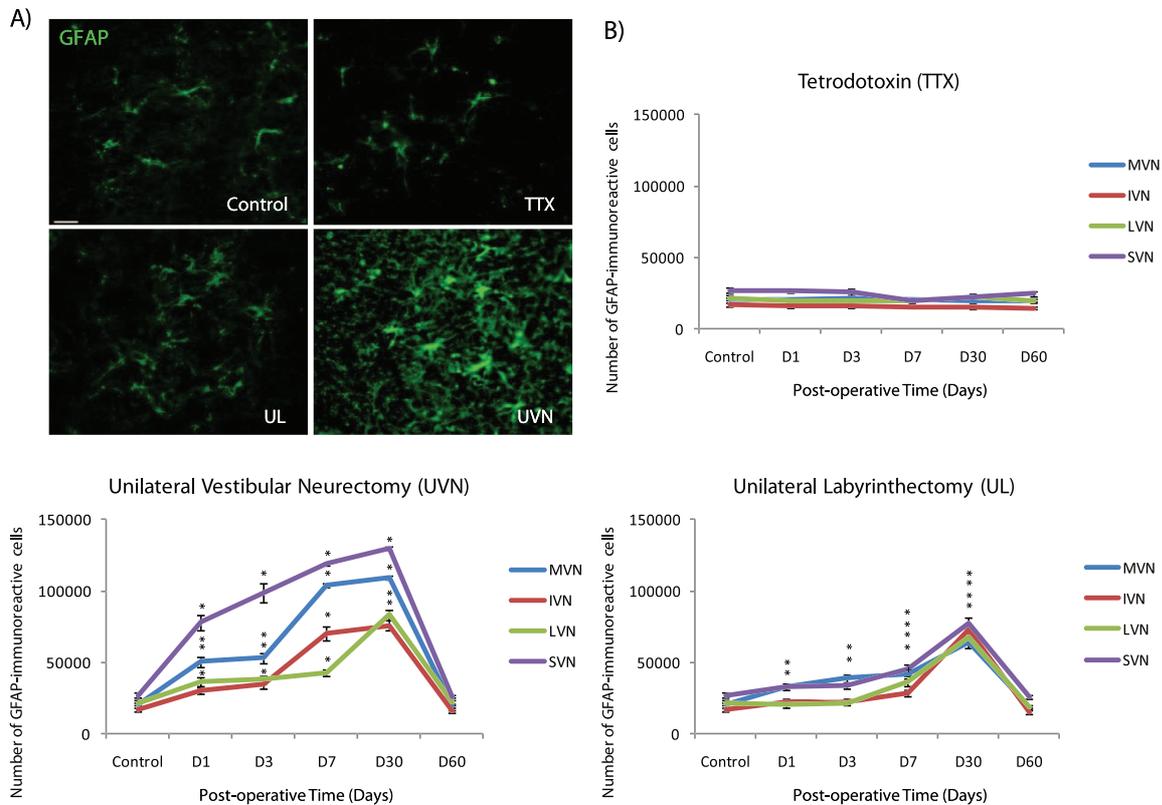
### Neurogenesis and astrogenesis responses in the vestibular nuclei: a structural process specific to the UVN model of vestibular deafferentation

We show for the first time that the VN become a neurogenic zone in response to specific vestibular damage: UVN led to a high number of newborn cells in the deafferented VN, as previously described in the same model [9]. These newly generated cells survived up to two months, differentiated into GABAergic neurons, astrocytes, or microglial cells, and further contributed to fine vestibular compensation [10]. By contrast, the UL model induced a functional loss of vestibular input, and did not show any BrdU<sup>+</sup> cells in the VN complex. TTX unilateral injection in the inner ear which induces a transient and functional blockade of electric activity of the ipsilateral vestibular nerve did not lead to any cell proliferation in the VN at the different post-operative times analyzed. One possible hypothesis explaining the reactive cell proliferation in the VN after UVN could be that new cells would contribute to neuronal balance between apoptosis and neurogenesis, as in the subgranular zone. Nevertheless, it appears that apoptotic cells were not detected in VN after UVN (TUNEL method and caspase 3 immunostainings, results not shown). Furthermore, after vestibular nerve transection, BrdU administration 3 days post-UVN labelled newborn cells that survived up to 2 months and differentiated into GABAergic neurons, astrocytes or microglial cells. Accordingly, such long-lived cells could not be considered as expiring cells and consequently, BrdU labeling would not be reliable to DNA repair or re-enter in abortive cell cycle of dying cells. Finally, The presence of nestin-Ir cells (a neural stem cell marker) in the deafferented VN after UVN [9] and the total blockade of cell proliferation in the VN in cats infused with an antimitotic drug [10] strongly suggests that the

BrdU immunolabelling is related to mitotic activity instead of DNA repair or apoptosis events.

Few studies have investigated reactive cell proliferation existence in the vestibular nuclei following vestibular lesion. Campos-Torres have found an increase in BrdU<sup>+</sup> cells after TTX unilateral injection or UL in rats. Nevertheless, these cells all differentiated into glial cells [6]. More recently, Zheng et al. observed also an increase of cell proliferation in the vestibular nucleus complex after bilateral vestibular deafferentation in the adult rat [26]. Approximately half of the newly generated cells population survived for up to 1 month in the experimental group. Intriguingly, they also found an increase of BrdU<sup>+</sup> cells with a significant survival rate in the sham-operated group, suggesting that this reactive plastic event might not have a functional significance in rats. In this study however, the nature of the BrdU<sup>+</sup> cells was not investigated: newborn surviving cells could so far differentiate into glial cells or, as suggested by authors, be a part of the microglial reaction already described after vestibular lesions and not necessary neurons [6]. The discrepancy with our previous data [10] could be related to the species differences and/or the nature of the surgeries: Zheng et al. practiced a bilateral aspiration of the contents of the canal ampullae and the utricle and saccule in rats, whereas we cut unilaterally the VIII<sup>th</sup> cranial nerve in cats.

In the UVN cat model, the severity of the deafferentation –total and fast, structural and functional – could induce tissue modifications allowing the cellular microenvironment to switch from a non-neurogenic to a neurogenic area. This agrees with the idea that stem cell function is modulated according to physiological changes and needs [27]. Accordingly, the reactive cell proliferation observed in our model of UVN cats may be due in part to the high concentrations of pro- and/or anti-inflammatory molecules released by the fast degeneration of the vestibular nerve. This hypothesis is supported by a recent study conducted in the rat



**Figure 4. The more severe the deafferentation, the stronger the astroglial reaction.** (A) The astroglial reaction in the vicinity of the lesion was stronger after vestibular nerve section than after unilateral labyrinthectomy or unilateral TTX injection. Illustration of GFAP immunoreactivity in the deafferented medial vestibular nucleus (MVN) in a representative control cat and in three experimental cats subjected to TTX, UL, and UVN and analyzed 30 days after these different kinds of vestibular deafferentations. (B) Quantitative evaluation of the effects of the different kinds of vestibular loss on GFAP-immunoreactive cells in the deafferented vestibular nuclei (VN). Data are mean values ( $\pm$  SEM) of the number of GFAP-immunoreactive cells in the deafferented vestibular nuclei of control and experimental groups. Only values recorded on the lesioned side are illustrated. Data from both sides of control cats were pooled for direct comparison with the subgroups of vestibular deafferented cats. GFAP: glial fibrillary acidic protein; D: day; IVN: inferior vestibular nucleus; LVN: lateral vestibular nucleus; MVN: medial vestibular nucleus; SVN: superior vestibular nucleus; TTX: tetrodotoxin; UL: unilateral labyrinthectomy, UVN: unilateral vestibular neurectomy. \*  $p < 0.0001$  versus control. Scale bar: 20  $\mu$ m and  $n = 4$  animals per group. doi:10.1371/journal.pone.0022262.g004

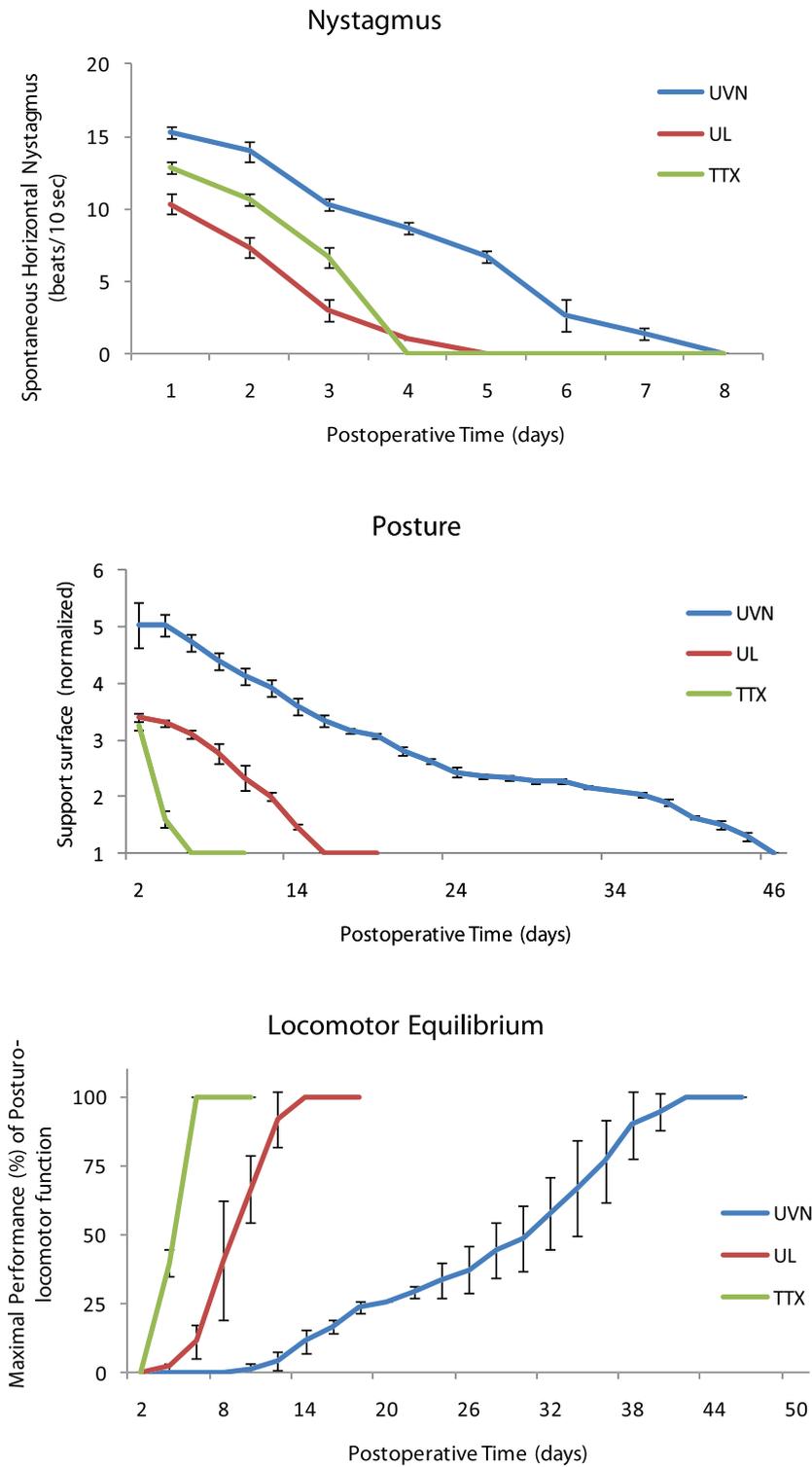
model of total unilateral vestibular loss that clearly showed a strong inflammatory response [28]. It is known that according to the pathological conditions, inflammatory responses can participate in cell proliferation, migration, differentiation, survival, and incorporation of newborn cells into neural networks [29]. We believe that since anti-inflammatory cytokines have mainly pro-neurogenic effects [30], they may be major players influencing the neurogenic environment in our animal model of UVN. From the present data, it can be concluded that the nature and the severity of the vestibular injury could promote specific tissue modifications enabling punctually the neurogenic potential in the deafferented VN, leading to reactive neurogenesis and afterwards functional integration of the newborn neurons [31].

#### GAD67 expression in the VN: a common reaction whose intensity depends on the nature of the vestibular damage

Results showed first that the number of GAD67<sup>+</sup> cells increased in the deafferented VN after vestibular damages, and second that GAD67 increased expression depended on the nature of the vestibular damage. Whatever the post-lesion days, we found that

UVN induced stronger and longer GAD67 expression than UL. TTX injection triggered the weakest and the most transient GAD67 expression. The intense GAD67 expression observed after UVN comes in part from differentiation of the newly generated cells into GABAergic neurons and from pre-existing GABAergic neurons increasing the level of their synthesizing enzyme. Intriguingly, a strong increase in GABA-staining varicosities was also observed in the deafferented VN following UVN. This result suggests a trophic effect of GABA through activation of GABA<sub>A</sub> receptors endowed by possible neural stem cells [32]. GABA is indeed known to provide differentiation of newborn cells into a neural lineage and to contribute to neurite outgrowth during development and adult neurogenesis [33].

The different GAD67 patterns of expression observed in the three experimental groups had duration-time profiles that coincided with the behavioural recovery time-courses observed in each model of vestibular lesion. GABA and its two receptors GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> are known to coordinate the vestibular pathways and to restore vestibular functions [34]. Injections or infusions of GABA<sub>A</sub> antagonists accelerate postural recovery of vestibular deafferented animals, while GABA<sub>A</sub> agonists have



**Figure 5. Behavioural recovery time course is governed by the nature of the vestibular damage.** (A) Curves illustrating the time course (on the abscissae) of disappearance of horizontal spontaneous nystagmus (HSN) frequency (on the ordinates) for each group of vestibular deafferented cats at different postoperative days. Each data point represents the mean number of HSN quick phase movements in 10 s for 4 animals (five repeated measures per animal per sampling). Error bars represent SEM. (B) Curves indicating the mean postoperative recovery of the support

surface in the three experimental groups of cats (TTX, UL, and UVN). Data recorded after vestibular deafferentation were related to individual references and normalized with respect to the preoperative values referred to unity (one being close to 50 cm<sup>2</sup>). Standard errors of the mean are reported as vertical lines. Note the delay in time recovery after UVN as compared to the other groups: 46 days instead of 6 for TTX and 16 for UL groups. **(C)** The maximal performance (Max P) is defined as the highest beam rotation speed that did not lead to a fall on four consecutive crossings. The curves are expressed in percent of the preoperative maximal performance (in the ordinates) as a function of the postoperative time in days (on the abscissae). Standard errors of the mean are reported as vertical lines.  
doi:10.1371/journal.pone.0022262.g005

opposite effects [35,36]. Interestingly, in accordance with results of Tighilet and Lacour [37] that observed a bilateral GAD67 increased expression in the VN one year after UVN, we also observed a bilateral GAD67 increased expression in the VN as soon as two months after UVN. At the behavioural level, vestibular compensation at this time was completed for the majority of vestibular symptoms. Since oculomotor function recovery is faster than posturo-locomotor recovery and depends on different plasticity mechanisms, we propose that this bilateral GAD67 increased expression would be a plastic neurochemical mechanism involved in the posturo-locomotor recovery and in its long-term maintenance. In line with this, chronic infusion of GABA<sub>A</sub> receptor antagonists in the deafferented VN of vestibulo-lesioned guinea pigs modified the expression of postural symptoms, with no alteration of the oculomotor deficits [36]. Moreover, antimetabolic drugs that block reactive cell proliferation after UVN drastically delay only the posturo-locomotor functions and have no incidence on horizontal nystagmus [10]. Resting discharge rebalance in the VN probably involves a decrease in the efficacy of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors in the intact side and an increase in neuronal excitability on the damaged side [38,39,40]. These mechanisms agree with electrophysiological data showing a spontaneous resting activity imbalance between the homologous VN at the acute stage after vestibular damage, which is rebalanced at the compensatory stage in the alert guinea pig [41] and the cat [42]. Different neurochemical and electrophysiological events may have occurred in the VN of the TTX and the UL groups, which expressed different rates of GAD67 expression and faster vestibular function recovery than the UVN group. Other hypotheses can be proposed to explain the contribution of the GABAergic system to recovery of vestibular functions. As previously described [9,10], newborn VN GABAergic neurons may integrate neural networks and contact different neuron targets in the VN to rebalance resting activity between the homologous VN. An alternative hypothesis is that the vestibular injury recapitulates developmental processes, leading to a change of expression of cation-chloride-cotransporters in the deafferented VN. Since cation-chloride cotransporters expression regulates the intracellular Cl<sup>-</sup> concentration, when GABA targets its GABA<sub>A</sub> receptor, it can lead to depolarizing effect in immature neurons by Cl<sup>-</sup> extrusion to the cell [43,44]. Both mechanisms would restore the resting activity on the deafferented VN, favouring vestibular compensation.

#### GFAP expression in the VN: a non common response to vestibular damage

UVN provided an intense astroglial reaction in the deafferented VN from D1; subsequently, the increased expression of GFAP peaked at D30 and returned to control level at D60. Our results showed also that UL provided a weaker astroglial reaction peaking at D30 in the deafferented VN. Further, unilateral TTX injection did not modify GFAP expression in the VN whatever the time-delay observed. These findings agree with results in rats that showed a lack of astroglial reaction in the VN after transtympanic TTX injection, and an astroglial reaction after UL [6]. The authors suggested that contrary to TTX injection, UL-induced

astroglial reaction would favour the expression of pro- and/or anti-inflammatory molecules like cytokines, known to regulate different steps of gliosis after central or peripheral injuries [45]. Hence, UVN induces more acute and faster nerve degeneration than UL, which could explain the more intense GFAP expression. In line with the hypothesis of Campos-Torres (2005), we suggest that UVN and consequently acute nerve section would recruit astrocytes and microglia to drive inflammatory response. Two months after UL and UVN, GFAP<sup>+</sup> in the VN returned to control level, probably because the inflammatory process had stopped. As reviewed by Robel [46], our results are in line with the time course of the astroglial reaction observed after different kind of central nervous system damages. Following injury, astrocytes start to express histological and enzymatic changes such as increased GFAP intermediate filament synthesis and somatic hypertrophy, which depend on the characteristics and the intensity of the injury [47]. Since astrocytes are known to regulate ionic homeostasis for an optimal neural environment, they adapt themselves to the severity of lesion. In addition, Robel described that in severe injuries, some reactive astrocytes can proliferate and incorporate BrdU as we observed in the deafferented VN after UVN [46]. Likewise, the authors also indicate that within an injury site, reactive astrocytes can be a source of cells with stem cell potential. So after UVN, astrocytes located in the VN might be instructed by specific acute signals to enable neurogenic features allowing subsequently cell proliferation, neuronal survival, and differentiation of the newly generated cells.

#### Behavioural correlates and clinical implications

The same acute behavioural syndrome was found in the three groups of cats after unilateral vestibular deafferentation either by TTX inner ear injection, UL, or UVN. The patterns of oculomotor and posturo-locomotor functional recovery differed nevertheless according to the groups, with the fastest recovery in the TTX group (1 week) than in the UL group (2 weeks) or the UVN group (6 weeks). This means that the nature of the vestibular deafferentation induces different time courses of functional recovery; the more severe and acute the deafferentation, the longer the duration of vestibular compensation. Indeed, the VN on the lesioned side are submitted after UVN to a fast, sudden and total deafferentation, both structural and functional (like surgery of Menière's disease, vestibular neuritis) [3,48]. By contrast, when the sensory hair cells at the peripheral labyrinth are destroyed (UL), the VN do not show so fast and complete structural deafferentation, because the primary vestibular neurons in Scarpa's ganglion are still alive. The VN are only functionally deafferented and this process can be very progressive and slow, or faster, depending again on the aetiology. A sophisticated structural mechanisms such as neurogenesis is not required on this case for recovery. Increased expression of neurotransmitters, neurohormones, and/or neurotrophic factors is sufficient to avoid vestibular cell apoptosis and to accelerate functional recovery [3]. Finally, blockade of action potentials in the vestibular nerve by TTX, in a reversible way and for a short time, is followed by very fast recovery. Correlatively, only a weak and transient increased expression of GAD67 was observed. We propose that there is no

need for the central nervous system to express robust plasticity mechanisms in such transient and/or reversible deficits.

In conclusion, we show for the first time *in vivo* that the vestibular nuclei can become a neurogenic zone in specific conditions. Depending on the nature of the vestibular damage, different and more or less specific cellular plasticity mechanisms are involved in the recovery process, and these recovery mechanisms underlie different recovery time courses. These new data are of interest for approaches to brain repair in understanding the factors favouring the expression of functional neurogenesis in adult mammals. Moreover, they are of clinical relevance in vestibular pathology for both drug treatment and rehabilitation in vestibular loss patients with different aetiologies.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

All experiments were carried out in strict accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication n° 80–23) revised 1996 for the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and associated guidelines, or the Policy on Ethics approved by the Society for Neuroscience in November 1989, and amended in November 72 1993. No institutional review board or ethics committee are requested to approve animal research in France. The people performing the experiments on the animals are licensed (ML:A13055-25,01.1914; BT:A13055-75 25,13.363). Every attempt was made to minimize both the number and the suffering of animals used in this experiment. Cats were housed in a large confined space with normal diurnal light variations and free access to water and food.

### Surgeries

**Unilateral Vestibular Neurectomy.** Animals were anaesthetized with ketamine (20 mg/kg, *i.m.*; Rhône Poulenc, Mérieux, France), received analgesic (Tolfedine, 0.5 ml, *i.m.*; Vetoquinol, Lure, France) and were kept at physiological body temperature using a blanket. The vestibular nerve was sectioned on the left-side at the post-ganglion level in order to leave the auditory division intact after mastoidectomy, partial destruction of the bony labyrinth, and surgical exposure of the internal auditory canal [49]. Animals were maintained under antibiotics for 7 days and analgesics for 3 days. The classical postural, locomotor, and oculomotor deficits displayed by the animals in the days following nerve transection were used as criteria indicating the effectiveness of the vestibular nerve lesion. Completeness of vestibular nerve section had been assessed by histological procedures in previous studies [50].

**Unilateral Labyrinthectomy.** The aim of a unilateral labyrinthectomy (UL) was to remove all vestibular sensory regions. Surgical labyrinthectomy was practised with the same approach as for UVN. After ossicles were removed and their tensor muscles were withdrawn, the whole vestibular receptors in the inner ear cavity were destroyed with a diamond drill. The cavity was then closed up with spongel and skin was stitched up.

**Unilateral tetrodotoxin (TTX) injection.** TTX has been used to block action potentials transiently and to shut down the vestibular nerve [6,51]. Surgery was carried out using an operative microscope according to the same approach described above. When the left tympanic bulla of animals showed round and oval windows, vestibular afferents were blocked with an injection within the windows of 150  $\mu$ l of 3 mM TTX (Tocris, Cookson Ltd, Bristol, UK) diluted in a phosphate buffer (PB 0.1 M, pH 7.4). This TTX dose induced blockage of the nervous activity during 3 days.

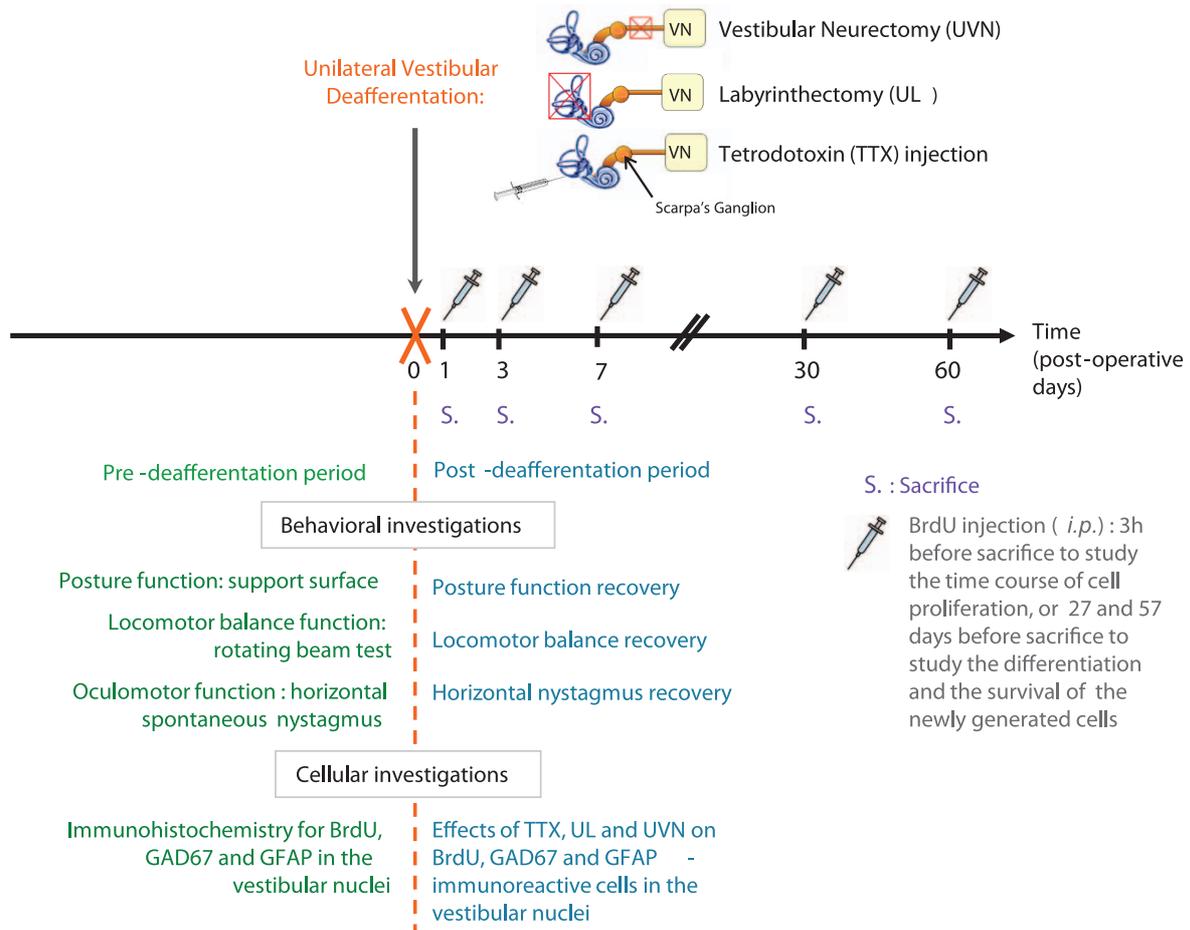
### Study design

To determine the effects of the different vestibular deafferentation models on both the plasticity mechanisms at a cellular level in the VN and on the time course of the cats' recovery at a behavioural level, we studied eight groups of animals. Based on our anterior data, to study the time course of reactive cell proliferation in the VN after UVN, we selected five post-deafferentation survival periods: 1, 3, 7, 30, and 60 days (D1, D3, D7, D30 and D60) (Figure 6). i) A group of sham-operated animals (n = 4) were used as a control group; they were submitted to anaesthesia and surgical approach of the different vestibular deafferentations without sectioning the nerve or destroying the receptors. These sham-operated animals were killed at different survival periods: two at three days and two at one month. They all received an intraperitoneal injection of BrdU 3 hours before sacrifice. ii) animals that underwent a unilateral vestibular neurectomy (UVN group: total n = 20), sacrificed at D1 (n = 4), D3 (n = 4), D7 (n = 4), D30 (n = 4), and D60 (n = 4) these cats were also used for the behavioural study, since we had shown that the training course on the rotating beam did not trigger modifications of the cell proliferation in the VN [10]. iii) animals that underwent a unilateral labyrinthectomy (UL) (UL group: total n = 20) were sacrificed at the following postoperative days: D1 (n = 4), D3 (n = 4), D7 (n = 4), D30 (n = 4), and D60 (n = 4) for both the cellular and the behavioural studies. iv) animals that underwent a unilateral tetrodotoxin (TTX) injection in the inner ear (TTX group: total n = 20) were sacrificed at different postoperative days for the cellular study: D1 (n = 4), D3 (n = 4), D7 (n = 4), D30 (n = 4), and D60 (n = 4) for both the cellular and the behavioural studies. To study the time course of reactive cell proliferation, whatever the experimental groups, animals belonging to the D1, D3, D7, D30, and D60 postoperative days received 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 3 h before death in order to examine the presence of adult newborn cells in the VN. To study the survival and the differentiation of the proliferating cells in the VN, two additional groups of cats were submitted to UVN, injected with BrdU (*i.p.*) at D3 when the cell proliferation reached its peak, and killed 30 days (n = 4) and 60 days (n = 4) after UVN (Figure 6).

### Behavioural investigations

**Spontaneous nystagmus recovery.** For nystagmus recording, one day after surgery, the cat was placed on an apparatus with its head fixed, thus maintaining the horizontal semi-circular canals in the horizontal plane. The frequency of the HSN was measured in the light as the number of quick phase beats towards the contralateral side relative to UVN in 10 sec (five repeated measures per animal per sampling time) with a video camera (Sony HDV) [25].

**Posture recovery.** The support surface measure serves to evaluate the postural stability of the animal. Posture deficits and recovery were evaluated by measuring the surface delimited by the four legs of the cat while standing erect at rest, without walking. Support surface can be regarded as a good estimate of postural control because it reflects the cat's behavioural adaptation compensating the static vestibulospinal deficits induced by the vestibular lesion [cf 24]. As a rule, the surface was very small in the normal cat (about 50–100 cm<sup>2</sup>) and greatly increased in the days following unilateral vestibular lesion. To quantify the support surface, cats were placed in a device with a graduated transparent floor that allowed them to be photographed from underneath. Five repeated measurements were done for each cat tested at each postoperative time, and an average was calculated for each experimental session. The support surface was measured as the surface delimited by the four legs by an image analysis system



**Figure 6. Study design.** Experimental protocol elaborated for studying the effects of the three kinds of vestibular deafferentations (tetrodotoxin injection, unilateral labyrinthectomy, or unilateral vestibular neurectomy) on cell proliferation (BrdU marker), astrogenesis (GFAP marker), and GABA immunostaining (GAD67 marker) in the vestibular nuclei at different post-operative days. The effect of these three kinds of vestibular deafferentations on functional recovery was analyzed in all groups by oculomotor and posturo-locomotor tests. The UL, UVN, and TTX models reproduce gradual, sudden, and transient unilateral loss of vestibular function, respectively, and are intended to mimic different vestibular pathologies or diseases (see text). TTX: tetrodotoxin; UL: unilateral labyrinthectomy, UVN: unilateral vestibular neurectomy; GAD67: glutamic acid decarboxylase the enzyme for GABA synthesis; GFAP: glial acidic fibrillary protein; BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine; *i.p.*: intraperitoneal. doi:10.1371/journal.pone.0022262.g006

(canvas, 9<sup>TM</sup>, Deneba software, Miami, FL). Data recorded after vestibular lesion were compared to pre-lesion values by using individual references, that is, each animal acted as its own control.

**Equilibrium function recovery.** Locomotor balance function was quantified using the rotating beam experimental device [49]. Two compartments (0.5×0.6×0.5 m) were connected by a horizontal beam (length: 2 m; diameter: 0.12 m). The beam, placed 1.2 m off the ground, could be rotated along its longitudinal axis with a constant angular velocity ranging from 0° to 588.4 °/s (about 1.5 turn/s). Behavioural training on the rotating beam consisted in depriving the animals of food for 12 h before the first training session. Animals were conditioned to cross over the beam and were rewarded by a small piece of fish (or meat) placed in a small bowl in the target compartment. First crossings were made on the immobile beam and, thereafter, on the rotating beam. As a rule, rotation velocity of the beam was progressively increased after four consecutive trials without fall. Equilibrium function was thus quantified by measuring the highest speed of

beam rotation that did not induce a fall. This maximal rotation speed determined the maximal locomotor balance performance (Max. P.). Preoperative training on the rotating beam necessitated 6 to 10 training periods of 1 h per day, depending on the cats. Training was stopped when the cats' Max. P. was reached and stabilised at its highest level, which was found to be remarkably similar from one cat to another.

**Statistical analysis.** Statistical analysis consisted of an analysis of variance (ANOVA) to test for changes at the different post-lesion delays in the spontaneous nystagmus, the support surface, and the maximal equilibrium performance of the cats. Results were considered significant at  $p < 0.05$ . (Table 1).

#### Cellular investigations

**Tissue preparation.** BrdU (10 mg/ml, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was dissolved in a solution of sodium chloride (NaCl) 0.9% heated to 56°C and injected in animals (200 mg/kg). Cameron and McKay (2001) showed in adult rat

**Table 1.** Statistical analysis of the effects of three vestibular deafferentations on vestibular compensation at the behavioural level.

Source of variation	df	F	P
<b>Horizontal nystagmus</b>			
Group (UVN/UL/TTX)	2	372.93	0.0001*
Post operative time	9	982.15	0.0001*
Group × post operative time	18	74.05	0.0001*
<b>Posture</b>			
Group (UVN/UL/TTX)	2	1197.83	0.0001*
Post operative time	24	720.20	0.0001*
Group × post operative time	48	145.99	0.0001*
<b>Equilibrium function</b>			
Group (UVN/UL/TTX)	2	262.50	0.0001*
Post operative time	21	203.04	0.0001*
Group × post operative time	42	43.59	0.0001*

Repeated-measure analysis of variance of the horizontal spontaneous nystagmus, posture recovery, and equilibrium function recovery. Group (unilateral vestibular neurectomized cats versus unilateral vestibular labyrinthectomized cats versus tetrodotoxine cats), and survival period are the main fixed effects providing the sources of variation among cats, as also illustrated by the significant interaction between these two variables (\*). df: degree of freedom; F: Scheffé's test; P: Probability level.  
doi:10.1371/journal.pone.0022262.t001

dentate gyrus that a single dose of BrdU 100, 50 or 25 mg/kg (body weight, *i.p.*) labeled 60%, 45% and 8% of S-phase cells respectively [52]. At 300 mg/kg, BrdU labeled most S-phase cells and had no physiological side effects. So, in line with conclusions of Taupin (2007), 200 mg/kg is a saturating concentration of BrdU for studying adult neurogenesis [53]. BrdU doses were not likely to generate side effects, but were sufficient to mark the cells in S-phase synthesizing DNA. Cats of each group were deeply anaesthetised with ketamine dihydrochloride (20 mg/kg, *i.m.*, Merial, Lyon, France) and killed by paraformaldehyde perfusion 3 hours, 27 days, or 57 days after the BrdU injection according to their experimental group. After removal from the skull, brains were cut into several blocks containing the VN. The blocks were rapidly frozen with CO<sub>2</sub> gas and stored at -80°C. Coronal sections (40-μm-thick) were cut in a cryostat (Leica, Reuil-Malmaison, France) for immunocytochemistry.

**Immunocytochemistry.** Immunocytochemical labelling of BrdU-immunoreactive (Ir) cells was performed according to previously validated protocols [9,54]. For BrdU-immunostainings, free-floating sections were first rinsed in 0.1 M PBS and incubated with 2N HCl and 0.5% Triton-X100 in PBS (30 min, 37°C) for DNA hydrolysis. Then sections were rinsed in 0.1 M sodium tetraborate buffer, pH 8.5 before overnight incubation with the primary antibody at 4°C, followed by incubation with the secondary antibody for 1.5 h at room temperature, and visualised using horseradish peroxidase avidin-D (Vector). GFAP and GAD67 immunoreactivity assays were performed according to Tighilet, Brezun et al. [9]. After several rinses, sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated, and cover-slipped in Depex mounting medium for peroxidase staining. Double-immunofluorescence stained sections were incubated with GFAP or GAD67 combined with BrdU<sup>+</sup> protocol. The optimal antibody dilutions and staining procedures are described in Table 2. Differentiation of the newly generated cells was analysed with double-labelling analysis performed using confocal imaging with a

Leica TCS SP2 laser scanning microscope equipped with a 63x/1.32 NA oil immersion lens. The fields of view were then examined by confocal microscopy, and 1-μm-step Z series were obtained.

**Cell counts and statistical analysis.** Cell counts were performed according to a previously validated protocol [10]. Great care was taken not to count blood cells as BrdU<sup>+</sup> cells. The VN were identified through Berman's stereotaxic atlas. BrdU<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup>, and GAD67<sup>+</sup> were quantified for each VN (medial, inferior, superior, and lateral vestibular nuclei: MVN, IVN, SVN, and LVN, respectively) from selected serial frontal sections collected from the dorsal (5.2) to the caudal (12.1) part of the brainstem and depending on the size and on the rostrocaudal length of each VN. GFAP<sup>+</sup> and BrdU<sup>+</sup> cells, and GAD67<sup>+</sup> neurons were analyzed in each VN on both sides (left/right: sham-operated cats; ipsilateral/contralateral: UVN-lesioned cats, see supporting information). We decided to analyze the VN subdivisions instead of analyzing the whole set of nuclei because i) these markers are expressed differentially in the VN after UVN. ii) the VN are involved differentially in the vestibular compensation processes. The SVN, which is the structure mostly involved in oculomotor function, does not exhibit neurogenesis. Conversely, a large number of newborn neurons were observed in the MVN, LVN, and IVN, which are mainly associated with static and dynamic postural functions.

Because astrocytes immunostain for the GABA synthesizing enzyme GAD67 [55], we followed strict morphologic criteria to distinguish GAD positive neurons from astrocytes. While it is usually straight forward to distinguish large- and middle-sized neurons from glial cells, the distinction between small neurons and large glial cells can be challenging. The following criteria were used as characteristic for neurons: a centrally located nucleolus, a distinctive nucleus, visible cytoplasm, presence of dendritic processes, and larger cell body size. Glial cells were identified by the following criteria: sparse cytoplasm, and smaller cell body size [56].

The cell count was done with a Nikon microscope (Eclipse 80 i) equipped with a motorized X-Y-Z sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (Mercator; Explora Nova, La Rochelle, France). The total number of immunolabelled cells was estimated using the optical fractionator method [57]. BrdU<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup>, and GAD67<sup>+</sup> were counted in optical disectors and sampled according to the so-called fractionator principles. The optical fractionator is a combination of the optical disector, a three-dimensional probe used for counting, and fractionator sampling, a scheme involving the probing of a known fraction of the tissue [57]. Three sampling fractions are used with the optical fractionator method. First, the section sampling fraction (ssf) represents the proportion of microscopical sections of the entire, serially sectioned brain structure that is sampled for evaluation. The area sampling fraction (asf) corresponds to the proportion of the sectional area that is investigated within the sampled sections. And finally, the thickness sampling fraction (tsf) captures the part of the investigated cross-sectional area of the sampled sections. The estimated total number of particles (*N*) of a brain structure in an animal is obtained by multiplying the reciprocals of the fractions with the total particle count ( $\sum Q^-$ ) per brain structure, obtained with the optical disectors [58]:  $N = \sum Q^- (1/ssf)(1/asf)(1/tsf)$ . The size of the region of interest (ROI) is implicitly determined from the combination of these fractions. This means that, with the optical fractionator technique, no information on the size of the ROI or the magnification of the microscope is needed. This also implies that this counting technique is independent of e.g. swelling and/or shrinking of the

**Table 2.** Antibodies and methods of detection.

Marker	Primary antibody	Secondary antibody	Technique - coloration
BrdU	Mouse 1/100, Dako	Horse anti-mouse 1/200, Vector	DAB - brown
GFAP	Rabbit 1/200, Dako	Goat anti-rabbit 1/200, Vector	DAB - brown
GAD67	Mouse 1/10000, Chemicon	Horse anti-mouse 1/200, Vector	DAB - brown
BrdU	Rat 1/100, Oxford Biot	Rabbit anti-rat 1/200, Interchim	Alexa Fluor 594 - red
GFAP	Rabbit 1/200, Dako	Goat anti-rabbit 1/200, Interchim	AlexaFluor 488 - green
GAD67	Mouse 1/100, Chemicon	Rabbit anti-mouse 1/200, Interchim	Alexa Fluor 488 - green

Combination and sequential processing of primary and secondary antibodies used for immunohistochemical and dual immunofluorescent stainings for BrdU, GFAP, or GAD67.

doi:10.1371/journal.pone.0022262.t002

tissue during processing [59,60]. For each labeling, the quantified sections were systematically selected with a size step of 480  $\mu\text{m}$  along the anteroposterior axis. We counted only Ir-cells in focus within the height of the dissector (10  $\mu\text{m}$ ) and inside the limits of

the counting frame without touching the forbidden lines [10]. Accordingly, the statistical analyses were evaluated by ANOVA to test the effects of the group (Control, TTX, UL or UVN), the side (deafferented vs intact), and the structure (MVN, IVN, LVN, SVN) on BrdU-, GFAP- and GAD67-positive cells and to determine whether there were any interactions between these variables. ANOVA was followed by *post-hoc* analysis with the Scheffé test (StatView II, SAS software Inc., Cary, NC) (Table 3). The coefficient of error (CE) of the estimated number of BrdU<sup>+</sup>, GAD67<sup>+</sup> and GFAP<sup>+</sup> cells in the ipsilateral and the contralateral VN of the sham and the experimental groups for each survival period tested is given in Tables S1, S2 and S3 in the supporting information. The CE values were within acceptable ranges as described in an earlier study [57].

**Table 3.** Statistical analysis of the effects of the three vestibular deafferentations on the BrdU, GFAP and GAD immunolabellings at the cellular level.

Source of variation	df	F	P
<b>BrdU positive cells</b>			
Group (Controls/UVN/UL/TTX)	3	394.67	0.0001*
Vestibular nuclei	3	5.87	0.0005*
Group×Vestibular nuclei	9	8.08	0.0001*
Side	1	247.13	0.0001*
Group×Side	3	400.71	0.0001*
Side×Vestibular nuclei	3	5.04	0.001*
Group×Side×Vestibular nuclei	9	8.10	0.0001*
<b>GAD67 positive cells</b>			
Group (Controls/UVN/UL/TTX)	3	2214.97	0.0001*
Vestibular nuclei	3	1707.44	0.0001*
Group×Vestibular nuclei	9	242.43	0.0001*
Side	1	10827.04	0.0001*
Group×Side	3	2375.57	0.0001*
Side×Vestibular nuclei	3	1296.03	0.0001*
Group×Side×Vestibular nuclei	9	289.97	0.0001*
<b>GFAP positive cells</b>			
Group (Controls/UVN/UL/TTX)	3	1689.38	0.0001*
Vestibular nuclei	3	432.71	0.0001*
Group×Vestibular nuclei	9	94.03	0.0001*
Side	1	2285.80	0.0001*
Group×Side	3	1637.98	0.0001*
Side×Vestibular nuclei	3	70.48	0.0001*
Group×Side×Vestibular nuclei	9	89.48	0.0001*

Repeated-measure analysis of variance of the number of BrdU-, GFAP- and GAD67-positive cells in the vestibular nuclei. Group (unilateral vestibular neurectomized cats versus unilateral vestibular labyrinthectomized cats versus tetrodotoxine cats), vestibular nuclei (MVN, medial vestibular nucleus; IVN, inferior vestibular nucleus; LVN, lateral vestibular nucleus and SVN, superior vestibular nucleus) and side (intact versus deafferented) are the main fixed effects providing the sources of variation among cats (\*).

df: degree of freedom; F: Scheffé's test; P: Probability level.

doi:10.1371/journal.pone.0022262.t003

### Supporting Information

**Table S1 Mean total BrdU immuno-positive cell numbers and CE of stereological analysis for estimation of total BrdU immuno-positive cells in the ipsilateral and contralateral vestibular nuclei complexes of the sham and the experimental groups of cats for each survival period tested.** Values are mean  $\pm$  SEM; CE: coefficient of error, BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine; D: day; IVN: inferior vestibular nucleus; LVN: lateral vestibular nucleus; MVN: medial vestibular nucleus; SVN: superior vestibular nucleus; TTX: tetrodotoxin; UL: unilateral labyrinthectomy, UVN: unilateral vestibular neurectomy. \* indicates a significant difference ( $p < 0.0001$ ) between the ipsilateral and contralateral sides. (PDF)

**Table S2 Mean total GAD67 immuno-positive cell numbers and CE of stereological analysis for estimation of total GAD67 immuno-positive cells in the ipsilateral and contralateral vestibular nuclei complexes of the sham and the experimental groups of cats for each survival period tested.** Values are mean  $\pm$  SEM; CE: coefficient of error, GAD67: glutamic acid decarboxylase, the enzyme for GABA synthesis; D: day; IVN: inferior vestibular nucleus; LVN: lateral vestibular nucleus; MVN: medial vestibular nucleus; SVN: superior vestibular nucleus; TTX: tetrodotoxin; UL: unilateral labyrinthectomy, UVN: unilateral vestibular neurectomy. (PDF)

**Table S3 Mean total GFAP immuno-positive cell numbers and CE of stereological analysis for estimation of total GFAP immuno-positive cells in the ipsilateral and contralateral vestibular nuclei complexes of the sham**

**and the experimental groups of cats for each survival period tested.** Values are mean  $\pm$  SEM; CE: coefficient of error, GFAP: glial fibrillary acidic protein, the enzyme for GABA synthesis; D: day; IVN: inferior vestibular nucleus; LVN: lateral vestibular nucleus; MVN: medial vestibular nucleus; SVN: superior vestibular nucleus; TTX: tetrodotoxin; UL: unilateral labyrinthectomy, UVN: unilateral vestibular neurectomy. (PDF)

## Acknowledgments

The authors kindly acknowledge Valérie Gilbert for taking care of the animals, Alain Tonetto from the “service commun de microscopie électronique de l’université de provence” for his technical assistance in confocal imaging and Abdessadek El Ahmadi for his expertise in statistical analysis.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BT SD ML. Performed the experiments: SD BT. Analyzed the data: SD. Contributed reagents/materials/analysis tools: SD BT. Wrote the paper: SD BT ML.

## References

- Darlington CL, Smith PF (2000) Molecular mechanisms of recovery from vestibular damage in mammals: recent advances. *Prog Neurobiol* 62: 313–325.
- Dieringer N (1995) ‘Vestibular compensation’: neural plasticity and its relations to functional recovery after labyrinthine lesions in frogs and other vertebrates. *Prog Neurobiol* 46: 97–129.
- Lacour M, Tighilet B (2010) Plastic events in the vestibular nuclei during vestibular compensation: the brain orchestration of a “deafferentation” code. *Restor Neurol Neurosci* 28: 19–35.
- Lacour M (2006) Restoration of vestibular function: basic aspects and practical advances for rehabilitation. *Curr Med Res Opin* 22: 1651–1659.
- Tighilet B, Manrique C, Lacour M (2009) Stress axis plasticity during vestibular compensation in the adult cat. *Neuroscience* 160: 716–730.
- Campos-Torres A, Touret M, Vidal PP, Barnum S, de Waele C (2005) The differential response of astrocytes within the vestibular and cochlear nuclei following unilateral labyrinthectomy or vestibular afferent activity blockade by transtympanic tetrodotoxin injection in the rat. *Neuroscience* 130: 853–865.
- Gacek RR, Khetarpal U, Schoonmaker J (1998) Morphological and neurochemical correlates of vestibular compensation. *Auris Nasus Larynx* 25: 193–201.
- Pateron JM, Short D, Flatman PW, Seckl JR, Aitken A, et al. (2006) Changes in protein expression in the rat medial vestibular nuclei during vestibular compensation. *J Physiol* 575: 777–788.
- Tighilet B, Brezun JM, Sylvie GD, Gaubert C, Lacour M (2007) New neurons in the vestibular nuclei complex after unilateral vestibular neurectomy in the adult cat. *Eur J Neurosci* 25: 47–58.
- Dutheil S, Brezun JM, Leonard J, Lacour M, Tighilet B (2009) Neurogenesis and astrogenesis contribution to recovery of vestibular functions in the adult cat following unilateral vestibular neurectomy: cellular and behavioral evidence. *Neuroscience* 164: 1444–1456.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, et al. (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer’s disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 343–347.
- Curtis MA, Penney EB, Pearson J, Dragunow M, Connor B, et al. (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.
- Winner B, Geyer M, Couillard-Despres S, Aigner R, Bogdahn U, et al. (2006) Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Exp Neurol* 197: 113–121.
- Scharfman HE (2004) Functional implications of seizure-induced neurogenesis. *Adv Exp Med Biol* 548: 192–212.
- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M (2010) Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr Opin Investig Drugs* 11: 298–308.
- Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moysé E (2005) In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130: 75–90.
- Chen J, Magavi SS, Macklis JD (2004) Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16357–16362.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310: 679–683.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405: 951–955.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM (2002) Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52: 802–813.
- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85: 523–569.
- Moysé E, Segura S, Liard O, Mahaut S, Mechawar N (2008) Microenvironmental determinants of adult neural stem cell proliferation and lineage commitment in the healthy and injured central nervous system. *Curr Stem Cell Res Ther* 3: 163–184.
- Smith PF, Curthoys IS (1989) Mechanisms of recovery following unilateral labyrinthectomy: a review. *Brain Res Brain Res Rev* 14: 155–180.
- Tighilet B, Lacour M (1995) Pharmacological activity of the Ginkgo biloba extract (EGb 761) on equilibrium function recovery in the unilateral vestibular neurectomized cat. *J Vestib Res* 5: 187–200.
- Tighilet B, Trottier S, Mourore C, Lacour M (2006) Changes in the histaminergic system during vestibular compensation in the cat. *J Physiol* 573: 723–739.
- Zheng Y, Masumura C, Chung P, Darlington CL, Smith PF (2010) Cell proliferation and survival in the vestibular nucleus following bilateral vestibular deafferentation in the adult rat. *Neurosci Lett* 468: 85–88.
- Nakada D, Levi BP, Morrison SJ (2011) Integrating physiological regulation with stem cell and tissue homeostasis. *Neuron* 70: 703–718.
- Liberge M, Manrique C, Bernard-Demanze L, Lacour M (2010) Changes in TNF $\alpha$ , NF $\kappa$ B and MnSOD protein in the vestibular nuclei after unilateral vestibular deafferentation. *J Neuroinflammation* 7: 91.
- Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC (2009) Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 108: 1343–1359.
- Mathieu P, Battista D, Depino A, Roca V, Graciarina M, et al. (2010) The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. *J Neurochem* 112: 1368–1385.
- Jakubs K, Bonde S, Iosif RE, Ekdahl CT, Kokaia Z, et al. (2008) Inflammation regulates functional integration of neurons born in adult brain. *J Neurosci* 28: 12477–12488.
- Earnheart JC, Schweizer C, Crestani F, Iwasato S, Itohara S, et al. (2007) GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *J Neurosci* 27: 3845–3854.
- Sernagor E, Chabrol F, Bony G, Cancedda L (2010) GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems. *Front Cell Neurosci* 4: 11.
- Gliddon CM, Darlington CL, Smith PF (2005) GABAergic systems in the vestibular nucleus and their contribution to vestibular compensation. *Prog Neurobiol* 75: 53–81.
- Flohr H, Abela W, Laneburg U (1985) Neurotransmitter and neuromodulator systems involved in vestibular compensation. *Rev Oculomot Res* 1: 269–277.
- Gliddon CM, Darlington CL, Smith PF (2005) Effects of chronic infusion of a GABA $\alpha$  receptor agonist or antagonist into the vestibular nuclear complex on vestibular compensation in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 1126–1135.
- Tighilet B, Lacour M (2001) Gamma amino butyric acid (GABA) immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. *Eur J Neurosci* 13: 2255–2267.
- Gittis AH, du Lac S (2006) Intrinsic and synaptic plasticity in the vestibular system. *Curr Opin Neurobiol* 16: 385–390.
- Guilding C, Dutia MB (2005) Early and late changes in vestibular neuronal excitability after deafferentation. *Neuroreport* 16: 1415–1418.
- Him A, Dutia MB (2001) Intrinsic excitability changes in vestibular nucleus neurons after unilateral deafferentation. *Brain Res* 908: 58–66.
- Ris L, de Waele C, Serafini M, Vidal PP, Godaux E (1995) Neuronal activity in the ipsilateral vestibular nucleus following unilateral labyrinthectomy in the alert guinea pig. *J Neurophysiol* 74: 2087–2099.
- Zennou-Azougui Y, Borel L, Lacour M, Ez-Zaher L, Ouaknine M (1993) Recovery of head postural control following unilateral vestibular neurectomy in the cat. Neck muscle activity and neuronal correlates in Deiters’ nuclei. *Acta Otolaryngol Suppl* 509: 1–19.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, et al. (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439: 589–593.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvoori E, Lahtinen H, et al. (1999) The K $^{+}$ /Cl $^{-}$  co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397: 251–255.
- Raivich G, Jones LL, Werner A, Bluthmann H, Doetschmann T, et al. (1999) Molecular signals for glial activation: pro- and anti-inflammatory cytokines in the injured brain. *Acta Neurochir Suppl* 73: 21–30.
- Robel S, Berninger B, Gotz M (2011) The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci* 12: 88–104.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, et al. (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 77–105.

48. Redon C, Lopez C, Bernard-Demanze L, Dumitrescu M, Magnan J, et al. (2010) Betahistine Treatment Improves the Recovery of Static Symptoms in Patients With Unilateral Vestibular Loss. *J Clin Pharmacol*.
49. Xerri C, Lacour M (1980) Compensation deficits in posture and kinetics following unilateral vestibular neurectomy in cats. The role of sensorimotor activity. *Acta Otolaryngol* 90: 414–424.
50. Lacour M, Roll JP, Appaix M (1976) Modifications and development of spinal reflexes in the alert baboon (*Papio papio*) following an unilateral vestibular neurectomy. *Brain Res* 113: 255–269.
51. Saxon DW, Anderson JH, Beitz AJ (2001) Transtympanic tetrodotoxin alters the VOR and Fos labeling in the vestibular complex. *Neuroreport* 12: 3051–3055.
52. Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435: 406–417.
53. Taupin P (2007) BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 53: 198–214.
54. Brezun JM, Daszuta A (2000) Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons. *Eur J Neurosci* 12: 391–396.
55. Lee M, Schwab C, McGeer PL (2011) Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia* 59: 152–165.
56. Christensen JR, Larsen KB, Lisanby SH, Scalia J, Arango V, et al. (2007) Neocortical and hippocampal neuron and glial cell numbers in the rhesus monkey. *Anat Rec (Hoboken)* 290: 330–340.
57. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231: 482–497.
58. West MJ (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci* 22: 51–61.
59. West MJ (1993) New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 14: 275–285.
60. Howard CV, Reed MG (2005) *Unbiased Stereology*. Abingdon, UK: Garland Bios Scientific Publishers. 277 p.

## Résultats - Chapitre 3

### *Effects of GABA<sub>A</sub> Receptors agonist or antagonist on vestibular compensation and reactive neurogenesis*

Dutheil S, Tighilet B.

En préparation, prochainement soumis

#### **Résumé de l'article**

Le système GABAergique est connu non seulement pour intervenir au cours de la compensation vestibulaire, mais aussi pour réguler les différentes étapes de la neurogenèse. La nature GABAergique des nouveaux neurones produits après section unilatérale du nerf vestibulaire (NVU) nous a conduit à étudier l'incidence de ce système neurochimique sur la neurogenèse réactionnelle vestibulaire et sur les déficits oculomoteurs et posturo-locomoteurs des animaux.

Trois groupes de chats ont été soumis à une neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) puis ont été immédiatement infusés avec un agent pharmacologique au niveau du IV<sup>e</sup> ventricule, en bordure des noyaux vestibulaires (NV), durant 30 jours. Le premier groupe a été infusé avec du muscimol : un agoniste des récepteurs de type GABA<sub>A</sub> (groupe NVU-muscimol) ; le second groupe a reçu une infusion de gabazine : un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> (groupe NVU-gabazine), enfin le troisième groupe a été infusé avec une solution saline de chlorure de sodium (groupe NVU-NaCl). Le BrdU a été administré lors du pic de prolifération cellulaire consécutif à la NVU. Des animaux ont été sacrifiés soit 3h après pour évaluer l'étendue de la prolifération cellulaire dans les NV, soit 27 jours après pour examiner la quantité de cellules en division ayant survécu, ainsi que leur phénotype cellulaire. Les données obtenues ont été comparées avec celles du groupe NVU-NaCl. Au niveau comportemental, nous avons examiné le décours temporel de la disparition du nystagmus horizontal spontané et nous avons utilisé des tests spécifiques pour évaluer la restauration de la fonction posturo-locomotrice de ces animaux.

Nous avons observé que les infusions avec l'agoniste (muscimol) et l'antagoniste (gabazine) des récepteurs GABA<sub>A</sub> ont modifié le pattern d'expression de la réaction gliale ainsi que le nombre de neurones GABAergiques dans les NV. En effet, la réaction gliale la plus importante a été relevée dans

le groupe UVN-gabazine, tandis que le plus grand nombre de neurones GABAergiques a été observé dans les NV du groupe infusé avec le muscimol.

En outre, il est intéressant de noter que la prolifération cellulaire a augmenté sous l'infusion des drogues GABAergiques, avec un très fort pic observé dans le groupe NVU-muscimol. Pourtant, aucune de ces nouvelles cellules n'a survécu au délai de survie de 30 jours. En revanche, la majorité des cellules néo-formées dans les NV désafférentés du groupe UVN-gabazine a survécu et s'est différenciée en cellules gliales, cellules jouant un rôle favorable pour la survie neuronale, et en neurones GABAergiques.

Comparativement au groupe NVU-NaCl, les animaux infusés avec de la gabazine ont récupéré plus rapidement leurs fonctions oculomotrices et posturo-locomotrices, alors que les animaux infusés avec du muscimol n'ont toujours pas récupéré 5 mois après la NVU.

Cette étude montre que le système GABAergique régule non seulement les différentes étapes de la neurogenèse réactionnelle dans les NV, mais aussi agit de concert sur la compensation vestibulaire, facilitant ou retardant drastiquement la récupération fonctionnelle des animaux.

## **Effects of a GABA<sub>A</sub> Receptors agonist or antagonist on vestibular compensation and reactive neurogenesis**

Running title: New insights on vestibular compensation and postlesional cell proliferation in the vestibular nuclei  
Dutheil S, Tighilet B.

*Laboratoire de Neurosciences Intégratives et Adaptatives, UMR 7260; SFR - Comportement, Cerveau, Cognition (Behavior, Brain, and Cognition) ; Aix-Marseille University – CNRS ; Centre Saint-Charles, Case B ; 3 Place Victor Hugo 13331 Marseille cedex 03, France. Correspondence to: Brahim Tighilet, Phone: +33413550881; Fax: +33413550869; Email: brahim.tighilet@univ-amu.fr*

*Figures: 6, words in abstract: 276, in introduction: 497, in discussion: 2116*

### **ABSTRACT**

Unilateral vestibular neurectomy (UVN) induces a strong reactive cell proliferation in the deafferented vestibular nuclei (VN). Most of the newborn cells survive, differentiate into astrocytes and GABAergic neurons and contribute to the recovery of the posturo- locomotor functions. The GABAergic system is known to modulate vestibular compensation and multiple steps of neurogenesis in other systems. In this study, we examined the effects of infusing GABA<sub>A</sub> Receptor (R) agonist and antagonist, first, on the reactive cell proliferation and survival of the newborn cells in the VN after UVN. Following chronic intracerebroventricular infusions of NaCl and GABA<sub>A</sub>R agonist (muscimol) or antagonist (gabazine), cell proliferation and differentiation into astrocytes and GABAergic neurons were revealed in the VN using bromodeoxyuridine (BrdU), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamate decarboxylase 67 (GAD67) immunoreactivity. At the behavioral level, we determined the effects of such drugs on the recovery of posturo-locomotor and oculomotor functions using behavioral tests. Results showed a high number of cell proliferation in the deafferented VN 3 days after UVN in the three groups, with the highest number of BrdU-positive<sup>(+)</sup> cells under muscimol infusion. Surprisingly, one month after UVN, BrdU<sup>+</sup> cells did not survive in the UVN-muscimol group, but survived in the UVN-gabazine and NaCl groups. The strongest astroglial reaction was located in the deafferented VN of the UVN-gabazine group. Relative to the UVN-NaCl group, cats infused with gabazine showed a strongly accelerated behavioral recovery time course. In contrast, this recovery was drastically delayed in the UVN-muscimol group. The present data provide the first evidence that in the adult cat, GABAergic signaling regulates different

steps of the reactive neurogenesis in the deafferented VN and differentially influences the vestibular function recovery.

**Key words** : adult neurogenesis, GABA<sub>A</sub> Receptor, vestibular compensation, gabazine, muscimol, functional recovery

## INTRODUCTION

It is well-known that a unilateral vestibular loss causes a depression of the resting activity discharge in the deafferented vestibular nuclei (VN) located in the brainstem. This severe imbalance is responsible for specific distressing symptoms leading to transient postural imbalance, circular walking, head and body twisting, spontaneous nystagmus and vestibulo-ocular reflex impairments (Cass and Goshgarian, 1990; Lacour, 2006). The progressive disappearance of these symptoms is a process called vestibular compensation. Since damaged receptors or vestibular nerve do not regenerate after vestibular neurectomy, multiple and parallel plasticity mechanisms take place in the VN and related central nervous structures. As some of the behavioral disorders ameliorate and/or totally disappear, the resting activity in the ipsilateral VN recovers progressively (Darlington and Smith, 2000). According to the nature of the vestibular damage, both the time course of the vestibular compensation and the plasticity mechanisms recruited within the VN differ. For instance, changes in the number of both reactive astrocytes and neurons synthesizing glutamic acid decarboxylase-67 (GAD-67), a key enzyme in GABA synthesis, depend on the nature of the deafferentation (Dutheil et al., 2011b). Strikingly, and exclusively after unilateral vestibular neurectomy (UVN), the deafferented VN become neurogenic and produce a substantial number of neural cells. These proliferative cells survive up to two months, differentiate into glial cells or GABAergic neurons contributing to the recovery of vestibular functions, highlighting a putative functional role of this reactive neurogenesis (Tighilet et al., 2007; Dutheil et al., 2009).

The GABAergic system is well-known to influence vestibular compensation (Gliddon et al., 2005a) and to rebalance electrical activity between the VN on both sides (Darlington and Smith, 2000). Besides, GABA type A receptors (GABA<sub>A</sub>R) are expressed in neuroblast, astrocyte-like cells as well as mature neurons and control different steps of the neurogenesis process, from proliferation to differentiation, including migration (Platel et al., 2010; Sernagor et al., 2010). In this study, we aimed to determine the effects of the proliferation, survival and differentiation of the cells in the VN, and second, on the time course of the vestibular function recovery. To answer these questions we designed three experimental groups of adult cats that underwent a UVN combined with an infusion in the fourth ventricle of saline NaCl (UVN-NaCl group), or GABA<sub>A</sub>R agonist muscimol (UVN-muscimol group), or GABA<sub>A</sub>R antagonist

gabazine (UVN-gabazine group). With a cellular approach, we investigated the effects of intracerebroventricular drugs infusions on plasticity events occurring in the VN. Bromodeoxyuridine (BrdU) was used to label newborn cells; BrdU-positive<sup>(+)</sup> cells were then visualized using immunohistochemistry methods, combined with double-labeling to determine the lineage of new cells. We used glial fibrillary acidic protein (GFAP) as an astrocyte marker and glutamate decarboxylase 67 (GAD67) as an indicator of GABAergic phenotype. At the behavioral level, we determined the effects of GABA<sub>A</sub>R agonist and antagonist on the recovery of posturo-locomotor and oculomotor function using appropriate behavioral tests. We examined the compensation of the spontaneous vestibular nystagmus and of the posturo-locomotor syndrome (support surface, locomotor equilibrium) as a function of time after vestibular damage.

## RESULTS

### **Proliferation and survival of the newborn cells in the deafferented vestibular nuclei**

To investigate whether GABA<sub>A</sub>R agonist and antagonist infusions have an impact on cell proliferation and survival in the VN following UVN, we used immunohistochemistry methods. Cell proliferation was examined by injecting BrdU and killing the animal 3 days after UVN, when the number of proliferative cells is maximal in the deafferented VN. As showed in our previous studies (Tighilet et al., 2007; Dutheil et al., 2009; Dutheil et al., 2011b), in the sham-operated control cats, BrdU-labeled cells were absent in the vestibular nuclei and around the fourth ventricle at D3 and D30 post-surgery. In contrast and in line with our previous studies, in the group of cats submitted to a vestibular nerve section and infused with saline (NaCl), we found a large number of BrdU-positive<sup>(+)</sup> cells in the deafferented VN 3 days after UVN. Quantification of the BrdU<sup>+</sup> cells in the VN complex of this group was comparable with the data collected for the same delay in adult UVN cats (Tighilet et al., 2007; Dutheil et al., 2009; Dutheil et al., 2011b). Interestingly, in the UVN-gabazine group, the number of BrdU<sup>+</sup> cells was significantly higher at the 3<sup>d</sup> post-operative day (+ 23% in the MVN, + 19 % in the IVN, + 17% in the LVN and + 126% in the SVN,  $p < 0.001$  compared to UVN-NaCl,  $n = 4$ ) and even further enhanced in the UVN-muscimol group (+ 195% in the MVN, + 79% in the IVN, + 97% in the LVN and + 297% in the SVN,  $p < 0.001$  compared with UVN-NaCl,  $n = 4$ ; *Figure 1*). When BrdU was injected at D30 post-UVN, the number of BrdU<sup>+</sup> proliferative cells was returned to control values independent of experimental groups (UVN-NaCl, UVN-muscimol and UVN-gabazine, respectively) and the side considered (ipsi- or contra-lateral).

To study the survival and the differentiation of the newly generated cells that peaked 3 days post-UVN, a three sub-groups of animals were killed 27 days after the BrdU injection. We observed that ~58% of BrdU<sup>+</sup> cells survived in the UVN-gabazine group (42% in the MVN, 70% in the IVN, 65% in the

LVN and 55% in the SVN compared with the number of BrdU<sup>+</sup> cells observed at D3 post-UVN in this group) and 54% survived in the UVN-NaCl group (59% in the MVN, 57% in the IVN, 58% in the LVN and 44% in the SVN). The data between these two groups were not statistically different (UVN-NaCl versus UVN-Gabazine). Strikingly, no BrdU<sup>+</sup> cells were found in the UVN-muscimol group 30 days after UVN.

### **Fate of the newly generated cells in the deafferented vestibular nuclei**

The BrdU<sup>+</sup> surviving cells differentiated and acquired their neurochemical phenotype about 20 days after birth. Immunohistochemistry using GAD67 and GFAP antibodies allowed a quantitative analysis of the number of GABAergic neurons and astrocytes respectively. In line with our previous reports (Tighilet et al., 2007; Dutheil et al., 2009; Dutheil et al., 2011b), UVN leads to a strong astroglial reaction at the 30<sup>th</sup> day post-UVN in the deafferented VN. Further, we found that the UVN-gabazine group displayed the strongest number of GFAP<sup>+</sup> cells in the deafferented VN compared with UVN-NaCl group (+ 42.5% in the MVN, + 59.4% in the IVN, + 79.3% in the LVN and + 53.2% in the SVN,  $n = 4$ ). Nevertheless, we observed a decreased number of GFAP<sup>+</sup> cells in the UVN-muscimol group compared with UVN-NaCl group (-55.4% in the MVN, -56.7% in the IVN, -54.4 % in the LVN and -51% in the SVN,  $n = 4$ ; *Figure 2*). Double immunohistochemistry against BrdU and GFAP showed that UVN-NaCl and UVN-gabazine groups displayed numerous cells with co-staining, whereas such colocalization was lacking in the UVN-muscimol group, suggesting that newborn astrocytes that had incorporated BrdU at the 3<sup>d</sup> post-UVN day did not survive until 30 day post-injection (*Figure 3A*).

In the neurectomized cats infused with muscimol, despite the non-survival of the newborn cells asserted by the lack of colocalizations of BrdU / GAD67 and BrdU / NeuN at day (D) 30, we observed a strong number of GAD67<sup>+</sup> pre-existent neurons in the deafferented VN, *Figure 3B* (+ 46.3% in the MVN, + 48.4% in the IVN, + 27.5% in the LVN and + 22.6% in the SVN compared with the UVN-NaCl group), suggesting an increase of GAD67 expression by mature pre-existent neurons. Further, a decrease of GAD67<sup>+</sup> cells was observed in the UVN-gabazine group compared with the UVN-NaCl (-39.7% in the MVN, -36.9% in the IVN, -28% in the LVN and -2.8% in the SVN).

### **Vestibular functional recovery**

Unilateral vestibular damage causes a vestibular syndrome characterized by a spontaneous horizontal nystagmus with its slow phase directed toward the lesioned side, postural imbalance, yaw and head tilt, circling and rolling toward the damaged side, extension of the contralateral forelimb as well as spatial and cognitive disorders.

*Nystagmus.* At the first post-UVN day, the frequency of the spontaneous nystagmus was 15.3 beat/10 sec in the UVN-NaCl, 15.5 in the UVN-muscimol and 8.8 in the UVN-gabazine groups respectively. The number of eye beats declined significantly in all experimental groups to reach control values at D5 in the UVN-gabazine group, D8 in the UVN-NaCl group and D13 in the UVN-muscimol group ( $p < 0.001$ ) (Figure 4A).

*Posture function recovery.* In four-footed animals standing erect, vestibular syndrome leads to an increased support surface delimited by the four paw pads. This parameter provides a good estimation of postural stability and recovery. It displays the tonic asymmetries of extensor and flexor muscles of the anterior and posterior paws induced by the vestibular deafferentation. Return to control values recorded pre-operatively was faster for the UVN-gabazine group (34 days) than for the UVN-NaCl group (48 days) or the UVN-muscimol group (104 days) ( $p < 0.0001$ ) (Figure 4B). The variance analysis (ANOVA) established significant effects depending on the groups ( $p < 0.0001$ ), the postoperative time ( $p < 0.0001$ ), and the interaction between these two factors.

*Locomotor balance recovery.* In line with data of the posture function, animals of the UVN-gabazine group recovered faster their dynamic locomotor balance and crossed the rotating beam at their maximal performance (Max P) at the 30<sup>th</sup> day after deafferentation, whereas the cats of the UVN-NaCl group reached their Max P 42 days after deafferentation, (Figure 4C). Interestingly, the UVN cats infused with muscimol were not able to walk on the rotating beam until 62 days after surgery and finally reached a plateau at a Max P of 63.49% of their Max P at D180. Variance analysis of the locomotor balance function recovery (ANOVA) demonstrated significant effects depending on the groups ( $p < 0.0001$ ), the postoperative time ( $p < 0.0001$ ), and the interaction between these two factors ( $p < 0.0001$ ).

## DISCUSSION

### **Muscimol and gabazine infusions increase the reactive cell proliferation in the vestibular nuclei**

The main objective of this study was to investigate, after UVN in the adult cat, the effects of the GABA<sub>A</sub>R activation on both the different steps of reactive neurogenesis in the vestibular nuclei (VN), and on the recovery of the vestibular functions. GABA<sub>A</sub>R are scattered throughout all the CNS and play multiple roles during development and in adulthood. In line with our previous findings, we observed that the VN was not a spontaneous neurogenic zone in the healthy animal. Control sham-operated cats did not exhibit newborn cells at the selected post-operative time (D3 and D30). Conversely, UVN which is a sudden total and structural deafferentation, induced a reactive neurogenesis in the deafferented VN (Tighilet et al., 2007; Dutheil et al., 2009; Dutheil et al., 2011b).

At the 3d post-operative day, results showed a substantial number of proliferative cells in the deafferented VN of animals submitted to muscimol infusion. This finding agrees with studies showing that GABA and GABA<sub>A</sub>R activity have proliferating effect *in vitro* (Fizman et al., 1999; Haydar et al., 2000; Represa and Ben-Ari, 2005; Nakamichi et al., 2009; Alfonso et al., 2012). Further, GABA signaling molecules are upregulated in certain tumors in central nervous system and in peripheral organs (Szczauraska et al., 2003; Young et al., 2010). GABA can increase the proliferation of tumor cells and the number of proliferative stem cells. Besides, it has been postulated that dysregulation of the GABAergic system might be responsible for tumor growth and their highly proliferative rate (Labrakakis et al., 1998). As GABA has been demonstrated to be a tumor signaling molecule (Young and Bordey, 2009), early after UVN, it would be possible that muscimol overstimulates cell proliferation in the deafferented VN.

Interestingly, a bilateral Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) increased expression peaked at 3 days post-UVN in the VN of adult cats (Tighilet et al., 1994). Moreover, BDNF is bilaterally upregulated in the lateral VN after unilateral labyrinthectomy in the guinea pig (Smith et al., 1998). This neurotrophin is notably known to promote cell proliferation, migration and neurites outgrowth in the developing brain (Represa and Ben-Ari, 2005; Porcher et al., 2011) and to activate transcription factors that can modulate the efficacy of GABAergic synapses with a positive feedback. We suggest that early after vestibular nerve section, muscimol infusion could act through GABA<sub>A</sub>R activation to increase BDNF expression in the VN contributing to the enhancement of the reactive cell proliferation. At D3, the number of BrdU<sup>+</sup> cells slightly increased in the UVN-gabazine group compared with UVN-NaCl group, but was lower than the UVN-muscimol group. Gabazine seems to stimulate also the reactive cell proliferation at his acute stage of vestibular syndrome. So, it seems that GABA<sub>A</sub>R blockade is not deleterious for mitotic activity. In accordance with this result, some authors showed an increased number of proliferative cells after GABA<sub>A</sub>R inhibition (Liu et al., 2005; Fernando et al., 2011). DNA synthesis also increased with bicuculline (an other GABA<sub>A</sub>R antagonist) administration in embryonic cortical neurons (LoTurco et al., 1995). Considering the increased number of newly-generated cells observed in the UVN-muscimol and UVN-gabazine groups, it seems that GABA<sub>A</sub>R agonist and antagonist both promote the proliferative potential of newborn cells in the early stage of vestibular compensation.

### **Only gabazine infusion allows newborn cell survival in the vestibular nuclei while muscimol hampers it**

Strikingly, despite the substantial amount of BrdU<sup>+</sup> cells generated in the VN of the UVN-muscimol group 3 days after UVN, 27 days later (Day 30 post-UVN) no BrdU<sup>+</sup> cells survived in the deafferented

VN. Interestingly, GABA is known to regulate negatively the neural stem cell pool by an autocrine feedback in the adult rat (Nguyen et al., 2003; Platel et al., 2008) and muscimol was found to induce GABAergic neuron death in the telencephalon of young rats (Honegger et al., 1998). In addition, GABA slows down the cell proliferation in the lateral ventricles (Haydar et al., 2000) and decreases mitotic activity of neural stem cells (Andang et al., 2008). We therefore suggest that under muscimol infusion, GABA<sub>A</sub>R activation might limit the proliferative cells in the deafferented VN in a limited temporal window. Besides, since a depolarizing activity is required for cell survival and integration into preexisting network (Overstreet-Wadiche et al., 2006), we suggest that possible hyperpolarizing currents promoted by muscimol infusion may hamper the cell survival and maturation, leading to their disappearance.

Remarkably, our results demonstrated that the highest percentage of BrdU<sup>+</sup> cells produced during the peak of cell proliferation (Day 3) massively survived in the group submitted to gabazine infusion, and to a lesser extent in the UVN-NaCl group. The massive survival of the newborn cells observed in the VN of UVN-gabazine cats could be related to the neuronal activity mediated by gabazine. Blockade of GABA<sub>A</sub>R could induce disinhibition in neuronal networks, leading to indirect enhancement of intrinsic depolarization. In neurogenic zones, the majority of newborn cells generated doesn't mature and dies a few days after production (Dupret et al., 2007). Experience and learning has been demonstrated to sculpt neuronal networks by promoting maturation of some newborn neurons while others die in the dentate gyrus (Tronel et al., 2010). This selective regulation of survival or death depends on input activity and notably on NMDA receptor activation (Tashiro et al., 2006; Tashiro et al., 2007; Tronel et al., 2010). Glutamate and GABA are both associated to promote the multistep process of adult neurogenesis (Haydar et al., 2000; Markwardt et al., 2011). Consequently, it would be interesting to examine electrophysiological properties of newborn cells in neurectomized cats infused with such drugs.

### **Muscimol and gabazine infusion influence glial and GABAergic populations**

A large number of astrocytic cells was observed in the UVN-gabazine group while it was lower in the UVN-NaCl group. Since neural precursors cells are equipped with GABA<sub>A</sub>R, it seems that their blockade with gabazine could favor the survival of newborn cells and the expression of astroglial lineage. Such hypothesis is in line with findings describing that GABA<sub>A</sub>R and GABA<sub>B</sub>R signals modulate cell proliferation and astroglial or neuronal differentiation of progeny cell (Nakamichi et al., 2009). Our data suggest that astrocytes favor neurogenic environment and bring a trophic support in the deafferented VN. It is well established that astroglial reaction can provide beneficial cell environment and ensure optimal neuronal functioning (Volterra and Meldolesi, 2005; Barres, 2008). In line with this hypothesis,

the lowest number of GFAP<sup>+</sup> cells was observed in the UVN-muscimol group, where newborn cells did not survive.

In addition, at D3 and D30 post-UVN, the highest number of GAD67<sup>+</sup> neurons was located in the deafferented VN of the UVN-muscimol group compared with the UVN-NaCl group and UVN-gabazine. As no surviving cells were detected in this group, the increased number of GAD67<sup>+</sup> neurons resulted from preexisting neurons upregulating GAD67 enzyme. In addition to the numerous cellular and molecular plasticity mechanisms recruited after UVN, it is possible that some transcription factors such Dlx2, Mash1 and/or Ngn2 could be overexpressed into astrocytes, influencing neuronal GABAergic fate as showed *in vitro* (Heinrich et al., 2010; Blum et al., 2011).

### **Gabazine and muscimol have opposite effects on vestibular function recovery**

Vestibular compensation consists in the progressive disappearance of the oculomotor, postural, cognitive and vegetative disorders consecutive to an unilateral vestibular deafferentation. The resting activity discharge depression of the ipsilateral second-order vestibular neurons is responsible for the vestibular symptoms appearance. Pharmacological treatments can accelerate or delay the behavioral recovery in mammals and rebalance neuronal spontaneous activity in the deafferented VN. Both GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors participate to vestibular reflex pathways and vestibular compensation (Gliddon et al., 2005b, a), since modifications of the GABAergic transmission into the VN complex alter the resting activity and the behavioural time-course recovery of lesioned animals.

Our data showed that gabazine accelerated, whereas muscimol delayed vestibular functions recovery. Nevertheless, GABA<sub>A</sub>R agonists and antagonists like diazepam and picrotoxin have been shown to affect spontaneous nystagmus frequency and even vertigo sensation in patients (McCabe et al., 1973; Ehrenberger et al., 1982; Ehrenberger and Felix, 1996). Also GABA<sub>A</sub>R agonist or antagonist injections into different regions of the VNC can induce spontaneous nystagmus according to the dose and the site of the injection (Gliddon et al., 2005b). This data differs from ours because both sides of the VN were targeted in our study. In addition, the nature of the vestibular deafferentation and the specie were also different.

Relative to the UVN-NaCl group that recovered posturo-locomotor function in 42 days, cats infused with gabazine recovered their posturo-locomotor functions in 30 days. Cats under gabazine infusion were able to cross the rotating beam earlier than cats under NaCl infusion. In line with our observations, systemic injection of GABA<sub>A</sub> antagonists accelerated posture recovery in the rat, whereas GABA<sub>A</sub>R

agonists de-compensated vestibular symptoms of animals that had already compensated (Flohr et al., 1985; Peppard, 1986) In the same way, in 1973, Precht showed that decerebrated cats injected systemically with GABA<sub>A</sub>R antagonists (bicuculline or picrotoxin) had a smaller reduction of spontaneous resting discharge on the ipsilateral side, that was beneficial to vestibular compensation (Precht et al., 1973). In addition, bicuculline delivered iontophoretically into the VN complex blocked the reduction of the resting activity mediated by the vestibular commissures (Furuya et al., 1991; Furuya and Koizumi, 1998) and perfusion with bicuculline and picrotoxin increased the resting firing rate of the neurons (Dutia et al., 1992; Vibert et al., 1995), both accelerating the behavioral recovery. Taken together, these data demonstrate that GABA<sub>A</sub>R agonists and antagonists act on resting activity imbalance between the homologous VN and participate to behavioral recovery.

Hence, at the cellular level, gabazine blocks GABA<sub>A</sub>R efficacy, promotes cell proliferation and survival, and participates to improvement of functional vestibular recovery at the behavioral level. As suggested by Sernagor et al., bicuculline administrated in olfactory bulb leads to a local disinhibition, promoting a glutamatergic excitatory drive (Sernagor et al., 2010). Such a mechanism could occur in the deafferented VN and restore the spontaneous activity in the deafferented VN inducing a faster vestibular function recovery in the UVN-gabazine group. In addition, it has been demonstrated that astrocytes release glutamate (Perea et al., 2009; Platel et al., 2010), notably in inflammatory conditions (Vesce et al., 2007). Since astrocyte reaction is enhanced in this experimental group, this could also favor the excitation level in the deafferented VN. Moreover, in UVN-gabazine group we observed that newborn neurons with GABAergic phenotype displayed ramified dendritic arbor and axonal process, suggesting maturation and functional integration of these cells into neuronal networks. This is in line with findings of Shen showing that a synaptic GABAergic inhibition promotes *in vivo* dendritic growth in the xenopus tadpoles (Shen et al., 2009).

In the UVN-muscimol group, the locomotor postural function recovery was drastically delayed (six month after UVN muscimol-infused cats did not recover pre-operative values (Max P) whereas UVN-NaCl and UVN-gabazine cats recovered their Max P at 30 and 42 days respectively). This result is quite similar to the time-course recovery of cats infused with an antimitotic agent - cytosine- $\beta$ -D-arabinofuranoside (AraC)- in the IV<sup>th</sup> ventricle after UVN (Dutheil et al., 2009). This antimitotic agent blocked totally cell proliferation in the VN and delayed drastically the posturo-locomotor function recovery of the animals. In addition, at cellular level, the astrocyte expression was the weakest in UVN-muscimol group, and decreased in the UVN-AraC cats (Dutheil et al., 2009). These data strongly suggest that newborn cells are required to fine vestibular compensation of postural deficits. Furthermore, blockade of the cell

proliferation in the dentate gyrus lead to neuronal activity disturbances (Kitamura et al., 2009; Lacefield et al., 2012). In line with this study, the disappearance of BrdU<sup>+</sup> cells in the UVN-muscimol group may induce such neuronal activity disorganizations impairing the vestibular function recovery. The fact that GABA<sub>A</sub>R agonist infusion increased GAD67<sup>+</sup> cells in the VN, enhances the inhibitory drive slowing down rebalancing activities between the homologous VN.

In line with these observations, Pompeiano showed that acute injection of muscimol into the LVN gave rise to hypotonia of the ipsilateral forelimbs and hypertonia of the contralateral forelimbs (Pompeiano et al., 1993). Inversely, injection of bicuculline in the same VN produced the opposite pattern. GABA<sub>A</sub>R agonist seems not to be beneficial for posturo-locomotor functions following vestibular damage. So, because of its inhibitory drive, GABA<sub>A</sub>R activation through muscimol might be deleterious for rebalancing the resting activity discharge between the homologous VN. We propose that muscimol might accentuate pathological acute conditions promoting a cocktail of signals that will first, increase cell proliferation and then, lead to BrdU<sup>+</sup> cells disappearance observed at D30 after UVN. Additional studies using apoptosis markers are needed to confirm this finding. Overall, these results strongly suggest that GABA<sub>A</sub>R are involved in the different steps of reactive vestibular neurogenesis, which is required to fine posturo-locomotor function recovery after UVN.

## **CONCLUSION**

Altogether, these finding agrees with previous work suggesting that reactive cell proliferation plays a functional role in vestibular compensation. Moreover, this study report for the first time that after UVN, GABA plays multiple roles ranging from beneficial to detrimental on the different steps of adult neurogenesis in the VN, a structure known as non-neurogenic. Muscimol appeared to strongly stimulate reactive cell proliferation but seemed to become deleterious for newborn cell survival and strongly impaired vestibular compensation. In contrast, with gabazine infusion, cell proliferation was stimulated, newborn cell mainly survived and differentiated into glial and neural cells that strongly seem to contribute to the accelerated vestibular functions recovery. GABA<sub>A</sub>R agents can influence the time-course of vestibular function recovery in the adult cat. Following UVN, signaling molecules and pathways, transcription factors, cytokines, GABA<sub>A</sub>R subunits, neurotransmitters and other molecular plasticity actors seems to constitute an intercellular dialogue that remove anti-neurogenic program in the deafferented VN. Fast and intense cell proliferation is thereafter allowed in this locus during a specific time-window (from D0 to D7). Such early endogenous plasticity events would probably favor the recovery of the neural resting activity in the deafferented VN that is necessary for functional recovery. Because proliferative activity is sensitive to environmental stimuli, it is a challenge to find new tools to

enhance neural stem cells proliferation, survival, maturation and functional integration without promoting side effects. Our results bring new issues to better understanding self-repair capacities of the adult brain notably after vestibular insult, and would help to improve patients treatments in accelerating compensation of the invalidating vestibular symptoms.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ethics Statement**

All experiments were carried out in strict accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication n° 80-23) revised 1996 for the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and associated guidelines, or the Policy on Ethics approved by the Society for Neuroscience in November 1989, and amended in November 72 1993. No institutional review board or ethics committee are requested to approve animal research in France. The people performing the experiments on the animals are licensed (ML:A13055-25,01.1914; BT:A13055-75 25,13.363). Every attempt was made to minimize both the number and the suffering of animals used in this experiment. We selected only the most important post-UVN time delay in light of the findings of our previous studies and in order to limit the number of cats used. Animals were housed in a large confined space with normal diurnal light variations and free access to water and food.

### **Surgeries**

Animals were anaesthetized with ketamine (20 mg/kg, *i.m.*; Rhône Poulenc, Mérieux, France), received analgesic (Tolfedine, 0.5 ml, *i.m.*; Vetoquinol, Lure, France) and were kept at physiological body temperature using a blanket. The vestibular nerve was sectioned on the left-side at the post-ganglion level in order to leave the auditory division intact after mastoidectomy, partial destruction of the bony labyrinth, and surgical exposure of the internal auditory canal (Xerri and Lacour, 1980). Animals were maintained under antibiotics for 7 days and analgesics for 3 days. The classical postural, locomotor, and oculomotor deficits displayed by the animals in the days following nerve transection were used as criteria indicating the effectiveness of the vestibular nerve lesion. Completeness of vestibular nerve section had been assessed by histological procedures in previous studies (Lacour et al., 1976). For the implantation and use of osmotic minipumps containing GABA<sub>A</sub> agonist (muscimol) or antagonist (gabazine) or sodium chloride (NaCl), a stainless steel cannula was implanted under anesthesia into the fourth (IV<sup>th</sup>) ventricle of the brain and connected to a subcutaneous minipump (Alzet, Alza Corporation, Palo Alto, CA; flow rate 2.5  $\mu$ l/h for 30 days). A midline incision was made through the skin and musculature in the back of the neck, and a cannula connected to plastic tubing was inserted between the dorsal wall of the brainstem and the ventral face of the cerebellum and then cemented with dental

cement to the skull. The air in the system was removed by filling up with saline or GABAergic drugs. As seen in Gliddon 2005 (Gliddon et al., 2005b), we choose doses high enough to provide an effect without side effects on animals. Finally the tubing was connected to an osmotic minipump, and the skin was incised.

### **Study design**

To determine the effects of the GABA<sub>A</sub> agonist or antagonist drugs infusion after UVN on both the reactive neurogenesis and on the time course of the cats' recovery at a behavioral level, we studied four groups of animals. On the basis of our anterior data, we selected two post-deafferentation survival periods: D3 and D30 (Figure 6). To study the time course of reactive cell proliferation, cats received 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 3 h before death in order to examine the presence of adult newborn cells in the VN. To study the survival and the differentiation of the proliferating cells in the VN, cats were submitted to UVN, injected with BrdU (*i.p.*) at D3 when the cell proliferation reached its peak, and killed 30 days after UVN (Figure 6). i) A group of sham-operated animals ( $n = 4$ ) were used as a control group; they were submitted to anesthesia and the same surgical approach than UVN without sectioning the nerve. These sham-operated animals received an intraperitoneal injection of BrdU 3 hours before sacrifice. ii) animals that underwent a unilateral vestibular neurectomy with continuous NaCl infusion were sacrificed at D3 ( $n = 4$ ), D30 ( $n = 4$ , these cats were also used for the behavioral study, since we had shown that the training course on the rotating beam did not trigger modifications of the cell proliferation in the VN (Dutheil et al., 2009). iii) animals that underwent a UVN with continuous muscimol infusion were sacrificed at D3 ( $n = 4$ ) or D30 ( $n = 4$ ) and D200 (these cats were used for the behavioral study). iv) animals that underwent a unilateral vestibular neurectomy with continuous gabazine infusion were sacrificed at D3 ( $n = 4$ ), and D30 ( $n = 4$ , these cats were also used for the behavioral study). Some limitations of this study are nevertheless to have investigated only the GABA<sub>A</sub>R activation or blockade, without examining the GABA<sub>B</sub> and GABA<sub>C</sub> contributions.

### **Behavioral investigations**

#### ***Spontaneous nystagmus recovery***

For nystagmus recording, one day after surgery, the cat was placed on an apparatus with its head fixed, thus maintaining the horizontal semi-circular canals in the horizontal plane. The frequency of the HSN was measured in the light as the number of quick phase beats towards the contralateral side relative to UVN in 10 sec (five repeated measures per animal per sampling time) with a video camera (Sony HDV) (Tighilet et al., 2006).

### ***Posture recovery***

The support surface measure serves to evaluate the postural stability of the animal. Posture deficits and recovery were evaluated by measuring the surface delimited by the four legs of the cat while standing erect at rest, without walking. Support surface can be regarded as a good estimate of postural control because it reflects the cat's behavioural adaptation compensating the static vestibulospinal deficits induced by the vestibular lesion (*cf* Tighilet and Lacour, 1995). As a rule, the surface was very small in the normal cat (about 50-100 cm<sup>2</sup>) and greatly increased in the days following unilateral vestibular lesion. To quantify the support surface, cats were placed in a device with a graduated transparent floor that allowed them to be photographed from underneath. Five repeated measurements were done for each cat tested at each postoperative time, and an average was calculated for each experimental session. The support surface was measured as the surface delimited by the four legs by an image analysis system (canvas, 9™, Deneba software, Miami, FL). Data recorded after vestibular lesion were compared to pre-lesion values by using individual references, that is, each animal acted as its own control.

### ***Equilibrium function recovery***

Locomotor balance function was quantified using the rotating beam experimental device (Xerri and Lacour, 1980). Two compartments (0.5 x 0.6 x 0.5 m) were connected by a horizontal beam (length: 2 m; diameter: 0.12 m). The beam, placed 1.2 m off the ground, could be rotated along its longitudinal axis with a constant angular velocity ranging from 0° to 588.4 °/s (about 1.5 turn/s). Behavioral training on the rotating beam consisted in depriving the animals of food for 12 h before the first training session. Animals were conditioned to cross over the beam and were rewarded by a small piece of fish (or meat) placed in a small bowl in the target compartment. First crossings were made on the immobile beam and, thereafter, on the rotating beam. As a rule, rotation velocity of the beam was progressively increased after four consecutive trials without fall. Equilibrium function was thus quantified by measuring the highest speed of beam rotation that did not induce a fall. This maximal rotation speed determined the maximal locomotor balance performance (Max. P.). Preoperative training on the rotating beam necessitated 6 to 10 training periods of 1 h per day, depending on the cats. Training was stopped when the cats' Max. P. was reached and stabilized at its highest level, which was found to be remarkably similar from one cat to another.

*Statistical analysis.* Statistical analysis consisted of an analysis of variance (ANOVA) to test for changes at the different post-lesion delays in the spontaneous nystagmus, the support surface, and the maximal equilibrium performance of the cats. Results were considered significant at  $p < 0.05$ . (Table 1).

## **Cellular investigations**

### ***Tissue preparation***

BrdU (10mg/ml, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was dissolved in a solution of sodium chloride (NaCl) 0.9% heated to 56°C and injected in animals (200 mg/kg). Cameron and McKay (2001) showed in adult rat dentate gyrus that a single dose of BrdU 100, 50 or 25 mg/kg (body weight, *i.p.*) labelled 60%, 45% and 8% of S-phase cells respectively (Cameron and McKay, 2001). At 300 mg/kg, BrdU labelled most S-phase cells and had no physiological side effects. So, in line with conclusions of Taupin (2007), 200 mg/kg is a saturating concentration of BrdU for studying adult neurogenesis (Taupin, 2007). BrdU doses were not likely to generate side effects, but were sufficient to mark the cells in S-phase synthesizing DNA. Cats of each group were deeply anaesthetised with ketamine dihydrochloride (20mg/kg, *i.m.*, Merial, Lyon, France) and killed by paraformaldehyde perfusion 3 hours, 27 days, or 57 days after the BrdU injection according to their experimental group. After removal from the skull, brains were cut into several blocks containing the VN. The blocks were rapidly frozen with CO<sub>2</sub> gas and stored at -80°C. Coronal sections (40- $\mu$ m-thick) were cut in a cryostat (Leica, Reuil-Malmaison, France) for immunochemistry.

### ***Immunocytochemistry***

Immunocytochemical labeling of BrdU-immunoreactive (Ir) cells was performed according to previously validated protocols (Brezun and Daszuta, 2000; Tighilet et al., 2007). For BrdU-immunostainings, free-floating sections were first rinsed in 0.1 M PBS and incubated with 2N HCl and 0.5 % Triton-X100 in PBS (30 min, 37°C) for DNA hydrolysis. Then sections were rinsed in 0.1 M sodium tetraborate buffer, pH 8.5 before overnight incubation with the primary antibody at 4°C, followed by incubation with the secondary antibody for 1.5 h at room temperature, and visualized using horseradish peroxidase avidin-D (Vector). GFAP and GAD67 immunoreactivity assays were performed according to Tighilet, Brezun et al. (Tighilet et al., 2007). After several rinses, sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated, and cover-slipped in Depex mounting medium for peroxidase staining. Double-immunofluorescence stained sections were incubated with GFAP or GAD67 combined with BrdU<sup>+</sup> protocol. The optimal antibody dilutions and staining procedures are described in Table 2. Differentiation of the newly generated cells was analyzed with double-labeling analysis performed using confocal imaging with a Leica TCS SP2 laser scanning microscope equipped with a 63x/1.32 NA oil immersion lens. The fields of view were then examined by confocal microscopy, and 1- $\mu$ m-step Z series were obtained.

### ***Cell counts and statistical analysis***

Cell counts were performed according to a previously validated protocol (Dutheil et al., 2009). Great care was taken not to count blood cells as BrdU<sup>+</sup> cells. The VN were identified through Berman's stereotaxic atlas. BrdU<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup>, and GAD67<sup>+</sup> were quantified for each VN (medial, inferior, superior, and lateral vestibular nuclei: MVN, IVN, SVN, and LVN, respectively) from selected serial frontal sections collected from the dorsal (5.2) to the caudal (12.1) part of the brainstem and depending on the size and on the rostrocaudal length of each VN. GFAP<sup>+</sup> and BrdU<sup>+</sup> cells, and GAD67<sup>+</sup> neurons were analyzed in each VN on both sides (left/right: sham-operated cats; ipsilateral /contralateral: UVN-lesioned cats, see supporting informations). We decided to analyze the VN subdivisions instead of analyzing the whole set of nuclei because i) these markers are expressed differentially in the VN after UVN. ii) the VN are involved differentially in the vestibular compensation processes. The SVN, which is the structure mostly involved in oculomotor function, does not exhibit neurogenesis. Conversely, a large number of newborn neurons were observed in the MVN, LVN, and IVN, which are mainly associated with static and dynamic postural functions. Because astrocytes immunostain for the GABA synthesizing enzyme GAD67 (Lee et al., 2011), we followed strict morphologic criteria to distinguish GAD positive neurons from astrocytes. While it is usually straight forward to distinguish large- and middle-sized neurons from glial cells, the distinction between small neurons and large glial cells can be challenging. The following criteria were used as characteristic for neurons: a centrally located nucleolus, a distinctive nucleus, visible cytoplasm, presence of dendritic processes, and larger cell body size. Glial cells were identified by the following criteria: sparse cytoplasm, and smaller cell body size (Christensen et al., 2007). The cell count was done with a Nikon microscope (Eclipse 80 i) equipped with a motorized X-Y-Z sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (Mercator; Explora Nova, La Rochelle, France). The total number of immunolabelled cells was estimated using the optical fractionator method (West et al., 1991). BrdU<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup>, and GAD67<sup>+</sup> were counted in optical disectors and sampled according to the so-called fractionator principles. The optical fractionator is a combination of the optical disector, a three-dimensional probe used for counting, and fractionator sampling, a scheme involving the probing of a known fraction of the tissue (West et al., 1991). Three sampling fractions are used with the optical fractionator method. First, the section sampling fraction (ssf) represents the proportion of microscopical sections of the entire, serially sectioned brain structure that is sampled for evaluation. The area sampling fraction (asf) corresponds to the proportion of the sectional area that is investigated within the sampled sections. And finally, the thickness sampling fraction (tsf) captures the part of the investigated cross-sectional area of the sampled sections. The estimated total number of particles ( $N$ ) of a brain structure in an animal is obtained by multiplying the reciprocals of the fractions with the total particle count ( $\sum Q$ ) per brain structure, obtained with the optical disectors (West,

1999):  $N = \sum Q \cdot (1/ssf)(1/asf)(1/tsf)$ . The size of the region of interest (ROI) is implicitly determined from the combination of these fractions. This means that, with the optical fractionator technique, no information on the size of the ROI or the magnification of the microscope is needed. This also implies that this counting technique is independent of e.g. swelling and/or shrinking of the tissue during processing (West, 1993; Howard and Reed, 2005). For each labeling, the quantified sections were systematically selected with a size step of 480  $\mu\text{m}$  along the anteroposterior axis. We counted only Ir-cells in focus within the height of the dissector (10  $\mu\text{m}$ ) and inside the limits of the counting frame without touching the forbidden lines (Dutheil et al., 2009). Accordingly, the statistical analyses were evaluated by ANOVA to test the effects of the group (Control, TTX, UL or UVN), the side (deafferented vs intact), and the structure (MVN, IVN, LVN, SVN) on BrdU-, GFAP- and GAD67-positive cells and to determine whether there were any interactions between these variables. ANOVA was followed by *post-hoc* analysis with the Scheffé test (StatView II, SAS software Inc., Cary, NC) (Table 3). The coefficient of error (CE) of the estimated number of BrdU+, GAD67+ and GFAP+ cells in the ipsilateral and the contralateral VN of the sham and the experimental groups for each survival period tested is given in Tables S1, S2 and S3 in the supporting information. The CE values were within acceptable ranges as described in an earlier study [57].

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from the "Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche" and "CNRS" (UMR 7260 Aix-Marseille Université). The authors wish to acknowledge Angélique Bordey for critical reading of the manuscript, Valérie Gilbert and Elodie Mansour for taking care of the animals, Alain Tonetto from the "service commun de microscopie électronique" for his technical assistance in confocal imaging and Abdessadek El Ahmadi for his expertise in statistical analysis.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1.** Reactive cell proliferation and survival are affected by GABA<sub>A</sub>R agonist and antagonist infusions after unilateral vestibular neurectomy. (A) Schematic representation illustrating the localization of the antero-posterior (AP) axis adapted from Berman's stereotaxis Atlas (1968), where the photomicrographs of the medial vestibular nuclei were taken. PH: praepositus hypoglossi; SA: stria acustica; V4: fourth ventricle. Photomicrographs showing 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) immunostainings in the deafferented MVN in cats submitted to unilateral vestibular neurectomy (UVN) and drug infusion in the fourth ventricle (NaCl, muscimol or gabazine). Animals received BrdU injection (i.p. 200 mg/kg body weight) and were perfused with paraformaldehyde at D3 - when the reactive cell proliferation was the most intense - and were killed 3h later to observe cell proliferation (D3) or 27 days

later to examine survival of these cells (D30). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . (B) Quantitative evaluation. Histograms comparing the mean values ( $\pm$  SEM) of the number of BrdU-immunopositive cells in the deafferented VN 3 and 30 days after UVN in cats submitted to NaCl, muscimol or gabazine infusion in the fourth ventricle. \* Indicates significant differences assessed by ANOVA followed by Scheffé test for all the VN ( $p < 0.0001$ ). This comparison served to establish a survival ratio specific to each VN. Only values recorded on the lesioned side are illustrated. BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine; D: day; IVN: inferior vestibular nucleus; LVN: lateral vestibular nucleus; MVN: medial vestibular nucleus; SVN: superior vestibular nucleus.  $n = 4$  animals per group.

**FIGURE 2.** Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity is differentially expressed in the vestibular nuclei of unilateral vestibular neurectomized cats according to the drug infused (NaCl, muscimol or gabazine). (A) Illustrations of GFAP immunoreactivity in the medial vestibular nucleus (MVN) of a representative control cat and of UVN-NaCl, UVN-muscimol and UVN-gabazine animals at D30. (B) Histograms showing the effects of the drug infusion (NaCl, muscimol or gabazine) on the number of GFAP-immunoreactive cells in the deafferented vestibular nuclei. Only values recorded on the lesioned side are illustrated. Data from both sides of control cats were pooled for direct comparison with the subgroups of vestibular deafferented cats. D: day; IVN: inferior vestibular nucleus; LVN: lateral vestibular nucleus; MVN: medial vestibular nucleus; SVN: superior vestibular nucleus. \*  $p < 0.0001$ ; +  $p < 0.01$  versus control. Scale bar: 60  $\mu\text{m}$  and  $n = 4$  animals per group.

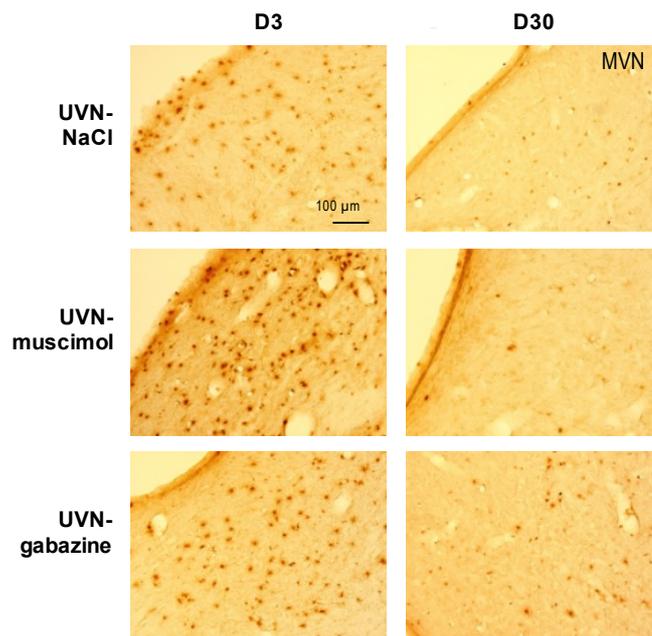
**FIGURE 3.** The number of glutamic acid decarboxylase (GAD67)-immunoreactive neurons depends on the drug infused (NaCl, muscimol or gabazine) after unilateral vestibular neurectomy (UVN). (A) Illustrations of GAD67 immunoreactivity in the medial vestibular nucleus (MVN) of a UVN-NaCl, a UVN-muscimol and a UVN-gabazine animals at D30. Immunohistochemistry and confocal microscopy for BrdU is in red, and for GAD67 is in green, revealing the existence of newly generated GABAergic neurons in the UVN-NaCl and UVN-gabazine groups. No colocalization of BrdU and GAD67 was detected in the UVN-muscimol group. (B) Histograms showing the effects of NaCl, muscimol or gabazine infusion in the fourth ventricle on the GAD67-immunoreactive cells in the deafferented vestibular nuclei. Only values recorded on the lesioned side are illustrated. Data from both sides of control cats were pooled for direct comparison with the subgroups of vestibular deafferented cats. D: day; IVN: inferior vestibular nucleus; LVN: lateral vestibular nucleus; MVN: medial vestibular nucleus; SVN: superior vestibular nucleus. \*  $p < 0.0001$ ; +  $p < 0.01$  versus control. Scale bar: 30  $\mu\text{m}$  and  $n = 4$  animals per group.

**FIGURE 4.** Behavioral recovery time course can be delayed or accelerated according to the nature of the GABAergic drug infused in unilateral vestibular neurectomized cats. (A) Curves illustrating the time course (on the abscissae) of disappearance of horizontal spontaneous nystagmus (HSN) frequency (on the ordinates) for each group of vestibular deafferented cats at different postoperative days. Each data point represents the mean number of HSN quick phase movements in 10 s for 4 animals (five repeated measures per animal per sampling). Error bars represent SEM. (B) Curves indicating the mean postoperative recovery of the support surface in the three experimental groups of cats (UVN-NaCl, UVN-muscimol, and UVN-gabazine). Data recorded after vestibular deafferentation were related to individual references and normalized with respect to the preoperative values referred to unity (one being close to 50 cm<sup>2</sup>). Standard errors of the mean are reported as vertical lines. Note the time recovery in the UVN-gabazine group compared with the other groups: 30 days instead of 42 for UVN-NaCl and 180 (63.49% Maximal Performance) for UVN-muscimol cats. (C) The maximal performance (Max P) is defined as the highest beam rotation speed that did not lead to a fall on four consecutive crossings. The curves are expressed in percent of the preoperative maximal performance (in the ordinates) as a function of the postoperative time in days (on the abscissae). Standard errors of the mean are reported as vertical lines.

**FIGURE 5.** Study design. Experimental protocol elaborated for studying the effects of the GABA<sub>A</sub>R agonist or antagonist infusion on cell proliferation (BrdU marker), astrogenesis (GFAP marker), and GABA immunostaining (GAD67 marker) in the vestibular nuclei at different post-UVN days. Moreover, behavioral analysis by oculomotor and posturo-locomotor tests were conducted to appreciate the kinetic of the functional recovery in all groups. BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine; i.p.: intraperitoneal injection; GAD67: glutamic acid decarboxylase; GFAP: glial fibrillary acidic protein; VN: vestibular nuclei; *n* = 4 animals per group.

Figure 1

A) AP: 8.5



B) Proliferation and survival of BrdU-immunoreactive cells in the vestibular nuclei after UVN and GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, agonist or NaCl infusion

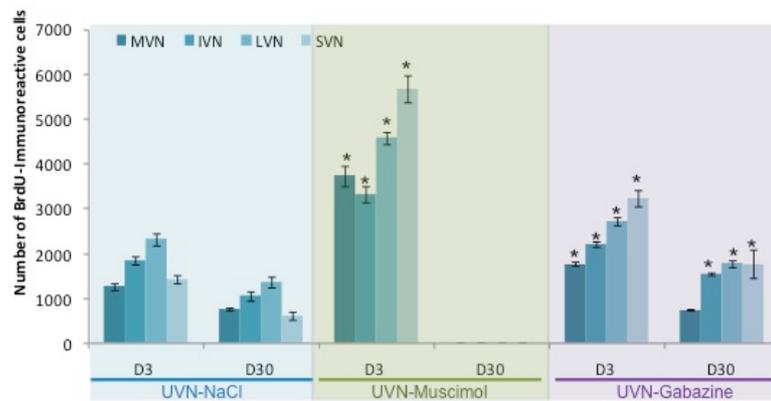


Figure 2

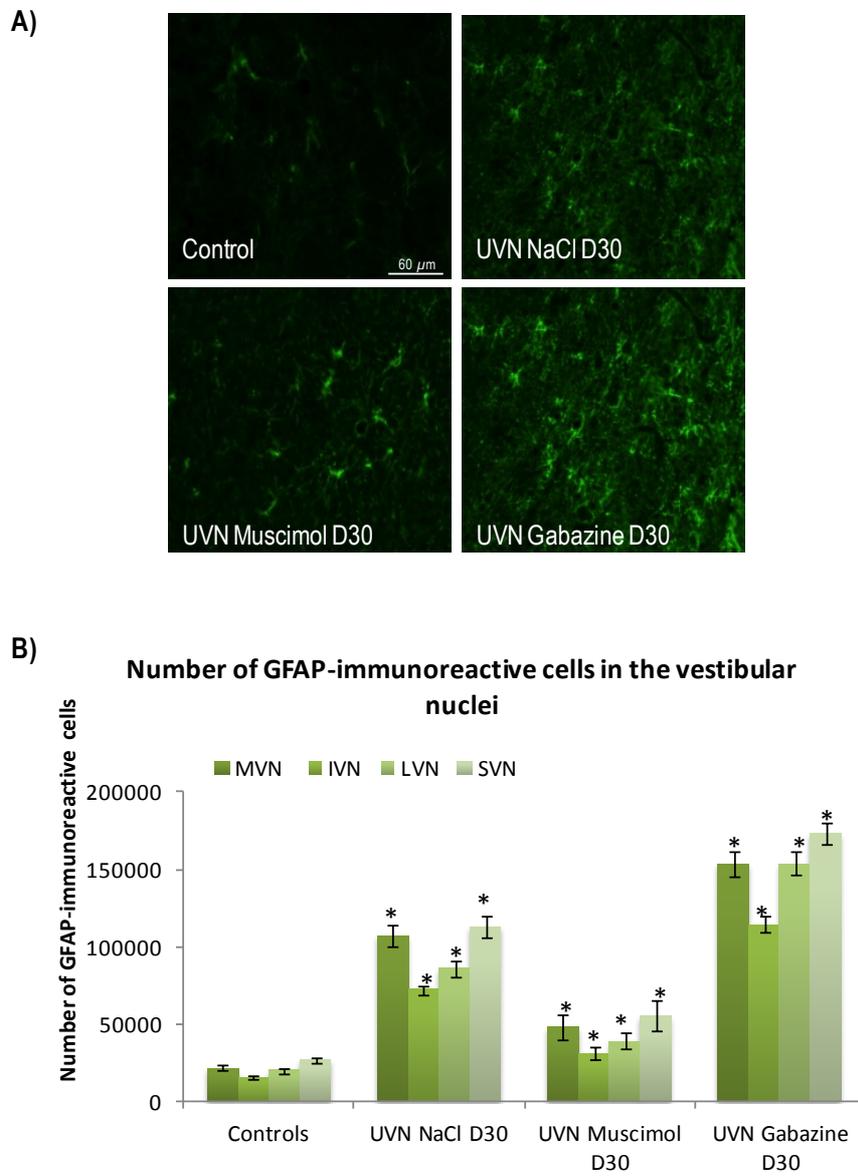


Figure 3

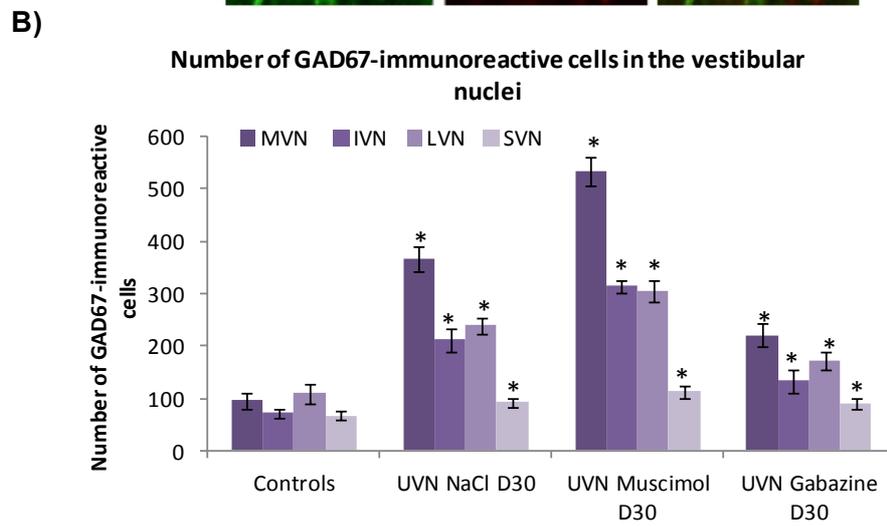
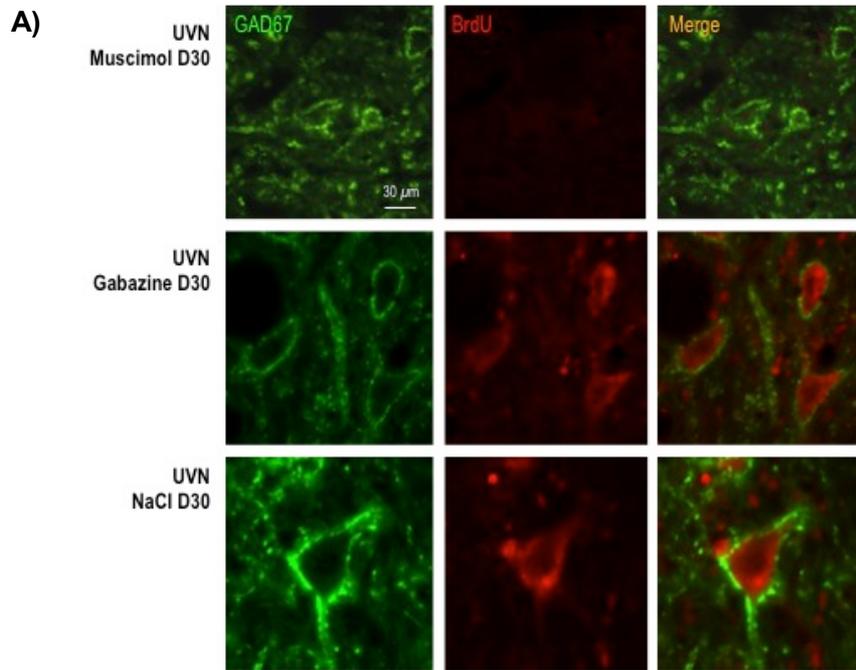


Figure 4

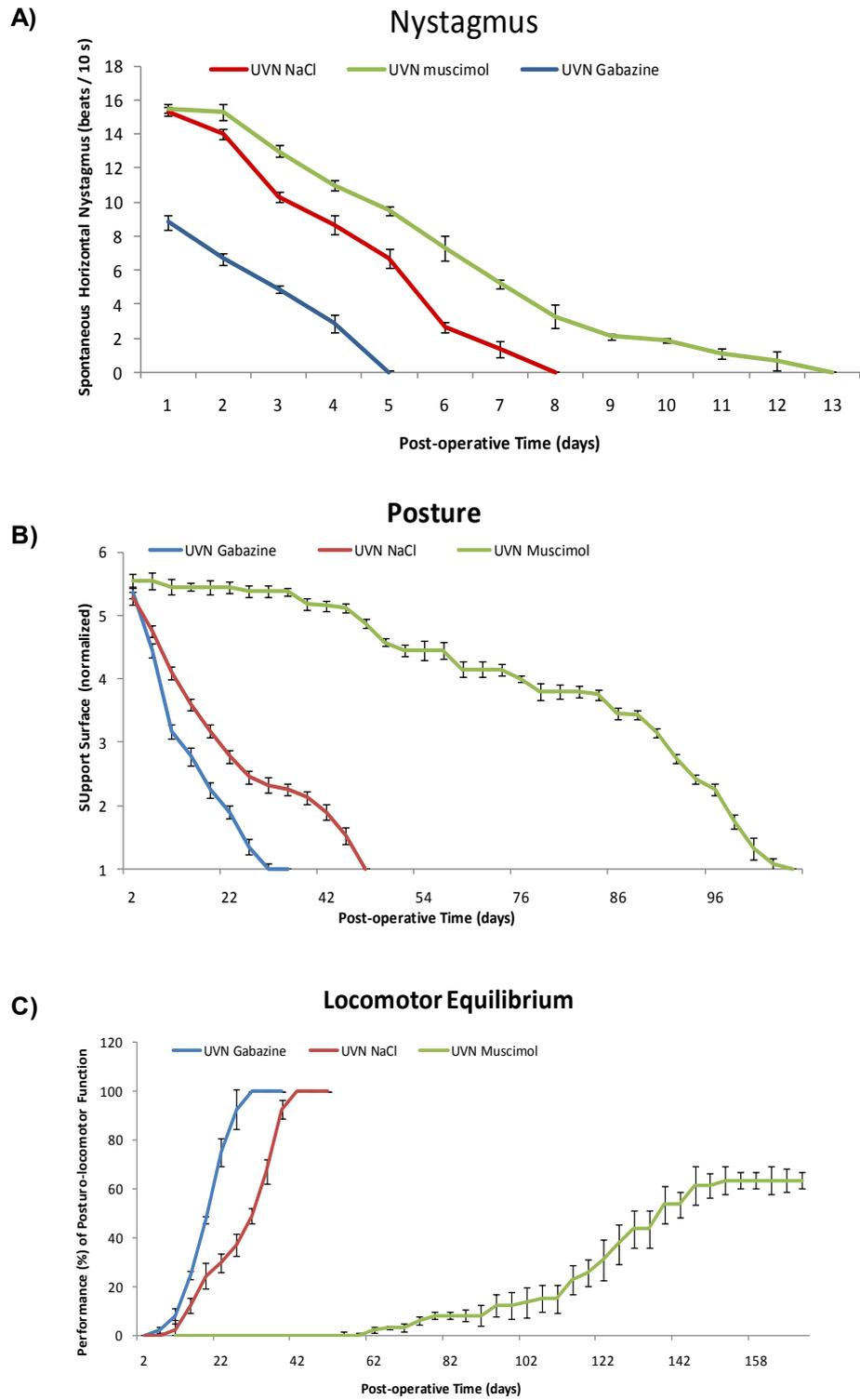
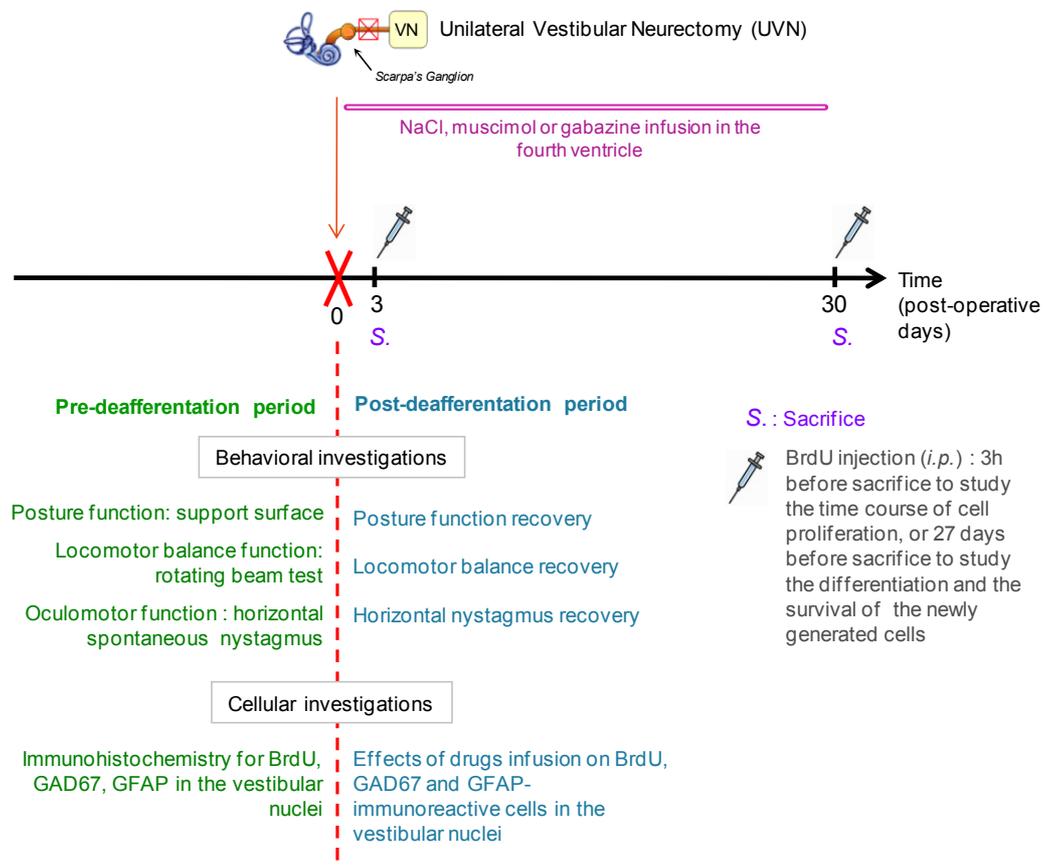


Figure 5





## Résultats - Chapitre 4

### *Modifications of neural cell proliferation in the vestibular nuclei and in the subgranular zone after vestibular damages in the adult cat*

Dutheil S, Tighilet B.

En préparation

#### **Résumé de l'article**

Le syndrome vestibulaire s'inscrit comme un phénomène anxiogène générant du stress chez les individus vestibulo-lésés. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est d'ailleurs activé à long-terme après une désafférentation vestibulaire chez le chat (Tighilet et al., 2009). Il en résulte une augmentation de la synthèse et de la libération d'hormones du stress (Corticotropin releasing factor : CRF ; Arginine vasopressine : AVP ; Cortisol) ayant pour cible des structures nerveuses impliquées dans la régulation du stress comme le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et l'hippocampe. De nombreux travaux de la littérature ont montré que le stress et ses hormones modulent le décours temporel de la compensation vestibulaire. En outre, l'hippocampe, qui utilise des informations issues du système vestibulaire pour élaborer ses cartes spatiales, comporte une zone de neurogenèse continue au niveau du gyrus dentelé : la zone sous-granulaire (ZSG). Il est de surcroît montré que les glucocorticoïdes générés lors d'un stress chronique entravent cette neurogenèse. L'objectif de cette étude a été d'examiner l'incidence d'une suppression vestibulaire partielle (NVU) ou totale (NVB) : premièrement, sur la prolifération et sur la survie cellulaire dans les noyaux vestibulaires et dans la zone sous-granulaire (ZSG), et deuxièmement, sur l'expression du CRF dans les noyaux paraventriculaires. Ce deuxième axe a consisté à établir une relation entre le stress généré par une perte vestibulaire et le niveau de neurogenèse dans les noyaux vestibulaires et dans la zone sous-ventriculaire du gyrus dentelé.

Les résultats obtenus ont montré qu'au délai post-lésionnel de 3 jours, comparativement à une NVU, une NVB induit une augmentation deux fois plus importante du nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> dans tous les noyaux vestibulaires. En outre, des observations en microscopie confocale ont révélé qu'à ce délai post-lésionnel précoce, certaines cellules BrdU<sup>+</sup> expriment également la GAD67. Ces nouvelles

cellules GABAergiques sont néanmoins dépourvues de processus dendritiques, contrairement aux cellules BrdU<sup>+</sup>/GAD67<sup>+</sup> ayant survécu au délai de 30 jours et s'étant dotées d'arborisations dendritiques et axonales.

De plus, une diminution drastique de cellules BrdU<sup>+</sup> est observée dans la ZSG 3 jours après désafférentation vestibulaire partielle ou totale. Trente jours plus tard, la prolifération cellulaire recouvre une expression proche du groupe contrôle dans le gyrus dentelé du groupe NVU. Dans le groupe NVB en revanche, le nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> demeure toujours fortement diminué par rapport au groupe contrôle. En outre, nos résultats concernant le marqueur du stress CRF ont montré qu'une neurectomie vestibulaire unilatérale ou bilatérale occasionne une forte augmentation bilatérale du nombre de neurones CRF<sup>+</sup> dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus.

Ces données montrent que des mécanismes de plasticité différents sont observés dans les noyaux vestibulaires, dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus postérieur, et dans la ZSG de l'hippocampe, selon que l'abolition des informations vestibulaires est totale ou partielle. Ces mécanismes post-lésionnels concourent fort probablement à la restauration des fonctions vestibulaires endommagées. Cette étude renforce l'existence d'un lien entre les désordres vestibulaires, le stress et la neurogenèse hippocampique. Les perturbations spatio-cognitives décrites dans la littérature après lésion vestibulaire, ainsi que la diminution de la neurogenèse hippocampique observée dans notre étude, pourraient impliquer le stress occasionné par une altération des informations vestibulaires.

## Modifications of neural cell proliferation in the vestibular nuclei and in the subgranular zone after vestibular damages in the adult cat

Dutheil S, Tighilet B.

The aim of this study was to evidence the consequences of a total or a partial vestibular loss on reactive neurogenesis in the vestibular nuclei. Further, since the hippocampus uses vestibular inputs to build spatial maps and is well known to produce ongoing neurogenesis, we examined whether changes in the number of newborn cells occur in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampus after vestibular damages. To determine whether stress-induced by the vestibular syndrome affects the neurogenesis in the SGZ and the vestibular nuclei, we examined corticotropin-releasing factor (CRF)-immunoreactive neurons changes in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Plasticity markers were evidenced at the immunohistochemical level with BrdU to label newborn cells, and we used glial fibrillary acidic protein (GFAP) as an astrocyte marker, glutamate decarboxylase 67 (GAD67) as an indicator of GABAergic phenotype, NeuN as a mature neuron marker, and CRF as a stress marker.

### **Preliminary results**

*Bilateral vestibular neurectomy induces stronger reactive cell proliferation than unilateral vestibular neurectomy*

Total suppression of vestibular inputs induced by a bilateral vestibular neurectomy (BVN) strongly increased the number of BrdU<sup>+</sup> cells in the deafferented vestibular nuclei (VN), *Figure 1*. Three days (D3) after BVN, cats showed a two- to three-fold increase in the number of BrdU<sup>+</sup> cells in the VN compared to UVN group [MVN: +93.15%; IVN: +70.5%; LVN: +41.65%; and SVN: +183.6%]. In line with our previous data, UVN induced a reactive cell proliferation exclusively in the deafferented side, while a bilateral and symmetric repartition of BrdU<sup>+</sup> cells was observed in the homologous vestibular nuclei complex after BVN ( $p < 0.001$ ).

*Newborn cells in the vestibular nuclei precociously upregulated GAD67 after a bilateral vestibular neurectomy*

Confocal analysis revealed that three days after BVN, BrdU<sup>+</sup> cells colocalized GAD67 in the VN. These cells exhibited small dendritic processes like immature stem cells. In contrast, no such colocalizations

were found in the deafferented VN of UVN cats at this same post-lesional delay (*Figure 2*). Thirty days after BVN, in mean 63% of the cells that incorporated BrdU at D3 survived.

*Plasticity mechanisms in the subgranular zone and the paraventricular nuclei of hypothalamus are differentially affected depending on the nature of the vestibular deafferentation*

In the subgranular zone, 3 days after UVN, BrdU<sup>+</sup> cells decreased strongly ( $33.1 \pm 3.7$  at D3; controls:  $101 \pm 11.2$ ) and reached progressively control values 1 month later ( $95.4 \pm 9.5$ ), whereas after BVN very few BrdU<sup>+</sup> cells were found at both 3 and 30 post-operative days compared with controls ( $5.6 \pm 0.8$  at D3 and  $4.1 \pm 0.7$  at D30), *Figure 3*. The variance analysis (ANOVA) established significant effects depending on the groups ( $p < 0.001$ ), the postoperative time ( $p < 0.001$ ), and the interaction between these two factors ( $p < 0.001$ ).

Furthermore, total or partial suppression of the vestibular inputs increased the number of corticotropin-releasing factor (CRF)-immunopositive neurons in the paraventricular nuclei of the hypothalamus (controls:  $76 \pm 7.2$ ; UVN group:  $131.9 \pm 23.4$ ; BVN group:  $172.5 \pm 18.9$ ) at the 3d post-lesional day. At the 30<sup>th</sup> post-lesional time delay, the number of CRF<sup>+</sup> neurons was still higher in the UVN and BVN groups than in controls (UVN group:  $125.8 \pm 17.1$ ; BVN group:  $167.3 \pm 15.8$ ), *Figure 5*. Variance analysis (ANOVA) demonstrated significant effects depending on the groups ( $p < 0.001$ ), the postoperative time ( $p < 0.001$ ), and the interaction between these two factors ( $p < 0.001$ ).

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Study design.** Experimental protocol elaborated for studying the effects of a unilateral or a bilateral vestibular neurectomy (UVN and BVN) on cell proliferation (D3), survival and differentiation (D30) of the newly generated cells in the subgranular zone (SGZ) and in the vestibular nuclei (VN). Corticotropin releasing factor (CRF) immunoreactivity was also analysed in the paraventricular nucleus (PVN) under both vestibular deafferentations. BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine; i.p.: intraperitoneal injection; GAD67: glutamic acid decarboxylase; GFAP: glial fibrillary acidic protein; VN: vestibular nuclei;  $n = 4$  animals per group; CRF: corticotropin releasing factor.

**Figure 2. (A) Illustration of the effects of a unilateral or a bilateral vestibular neurectomy (UVN and BVN) on the cell proliferation (D3) and the survival of the newly generated cells (D30) in the vestibular nuclei.** Compared to the UVN group, the BVN induced a two-fold increase in the number of BrdU-Immunoreactive (Ir) cells 3 days after the lesion in all the vestibular nuclei on both sides. In

addition, the percentage of the survival cells was significantly higher in the BVN group. No BrdU-immunoreactive cells were observed in the VN of the control group. Animals received BrdU injection (i.p. 200 mg/kg body weight) and were perfused with paraformaldehyde at D3 - when the reactive cell proliferation was the most intense - and were killed 3h later to observe cell proliferation (D3) or 27 days later to examine survival of these cells (D30). A Schematic representation is illustrated to indicate the localization of the antero-posterior (AP) axis adapted from Berman's stereotaxis Atlas (1968), where the photomicrographs of the medial vestibular nuclei were taken. PH: praepositus hypoglossi; SA: stria acustica; V4: fourth ventricle. Scale bar: 100  $\mu$ m. (B) Quantitative evaluation. Histograms comparing the mean values ( $\pm$  SEM) of the number of BrdU-immunopositive cells in the deafferented VN 3 and 30 days after UVN or BVN. \* Indicates significant differences assessed by ANOVA followed by Scheffé test for all the VN ( $p < 0.0001$ ). This comparison served to establish a survival ratio specific to each VN under both conditions of vestibular deafferentations. Only values recorded on lesioned side are illustrated. BrdU: 5-bromo-2'deoxyuridine; D: day; IVN: inferior vestibular nucleus; LVN: lateral vestibular nucleus; MVN: medial vestibular nucleus; SVN: superior vestibular nucleus.  $n = 4$  animals per group.

**Figure 3. Upper panel.** Confocal illustrations showing an early expression (D3) of GAD67 (green) by proliferative cells (BrdU in red) in the medial vestibular nucleus (MVN) after a bilateral vestibular neurectomy (BVN). Scale bar: 60  $\mu$ m.

**Lower panel.** Thirty days after (BVN D30), these double labelled cells survive in the deafferented MVN and develop dendritic processes. Scale bar: 30  $\mu$ m. BVN: bilateral vestibular neurectomy; BrdU: -bromo-2'deoxyuridine; GAD67: glutamic acid decarboxylase.

**Figure 4. Suppression of vestibular information alters differentially the hippocampal neural cell proliferation depending on the nature of the vestibular deafferentation.** A) Illustration of the effects of a unilateral or a bilateral vestibular neurectomy (UVN and BVN) on the cell proliferation (D3) and the survival of the newly generated cells (D30) in the subgranular zone (SGZ). After UVN, BrdU immunoreactive cells decreased strongly and reached progressively control values 1 month later. In contrast, after BVN very few BrdU-Ir cells were found at 3 and 30 post-operative days in the SGZ. (B) Quantitative evaluation. Histograms comparing the mean values ( $\pm$  SEM) of the number of BrdU-immunopositive cells in the subgranular zone (SGZ) 3 and 30 days after UVN or BVN. \* Indicates significant differences assessed by ANOVA followed by Scheffé test ( $p < 0.0001$ ). This comparison served to establish a survival ratio under both conditions of vestibular deafferentations. D: day;  $n = 4$  animals per group. BrdU: 5-bromo-2'deoxyuridin; UVN: unilateral vestibular neurectomy; BVN: bilateral vestibular neurectomy.

**Figure 5. Upper panel.** Confocal illustrations showing double labelled cells (NeuN in green/BrdU in red) in the subgranular zone (SGZ) 30 days after a unilateral vestibular neurectomy (UVN D30).

**Lower panel.** No colocalisation of these two markers were detected in the subgranular zone (SGZ) 30 days after a bilateral vestibular neurectomy (BVN D30). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . BrdU: 5-bromo-2'deoxyuridine; UVN: unilateral vestibular neurectomy; BVN: bilateral vestibular neurectomy; NeuN: Neuronal nuclei.

**Figure 6. A: Illustration of the lesion-induced changes of CRF-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus (PVN).** Illustration of typical labelling in a representative control cat and in four experimental animals observed at three days (D3) and thirty days (D30) after unilateral or bilateral vestibular neurectomy (UVN and BVN). Note that both unilateral or bilateral vestibular nerve section induced a strong increase in the number of CRF-immunoreactive neurons in the PVN. **B: Quantitative evaluation of the effects of a unilateral and bilateral vestibular neurectomy on CRF-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus (PVN).** Data are mean values ( $\pm$  S.E.M.) of the number of CRF-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus for control cats ( $n = 8$ ), unilateral and bilateral neurectomized cats examined at 3 days ( $n = 8$ ) and 30 days after lesion. Values recorded on both sides for all the groups of cats were pooled since they did not significantly differ. \*\* $P < 0.0001$  versus control. (1D: one day; 30 D: thirty days; 90 D: ninety days; PVN: paraventricular nucleus; UVN: Unilateral vestibular neurectomy.)

Figure 1

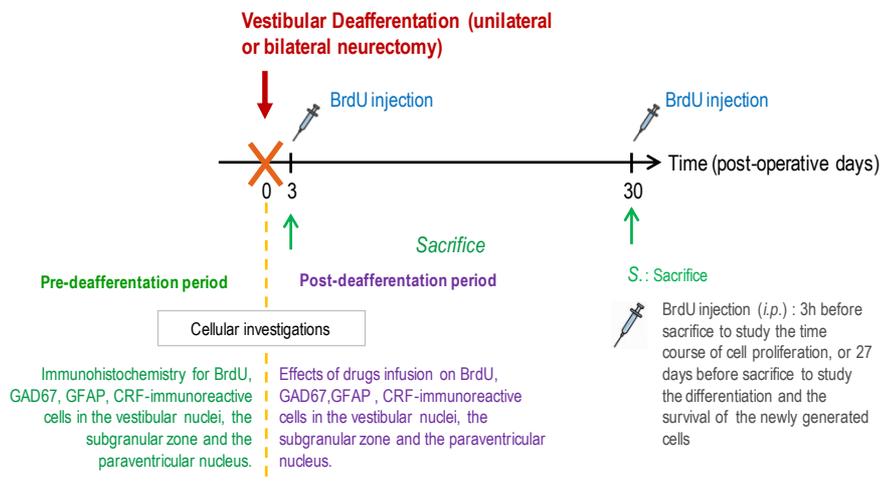
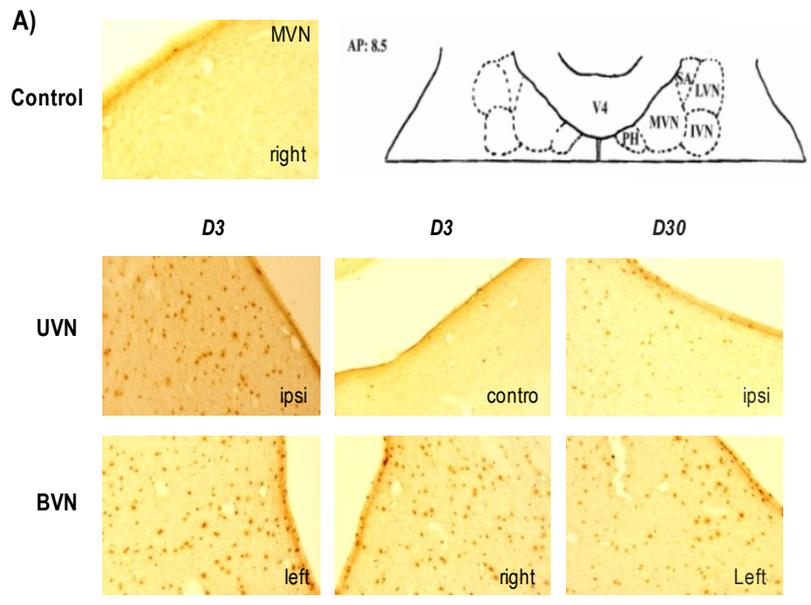


Figure 2



**B)** Survival of BrdU-immunoreactive cells after Unilateral and Bilateral vestibular Neurectomy (UVN and BVN)

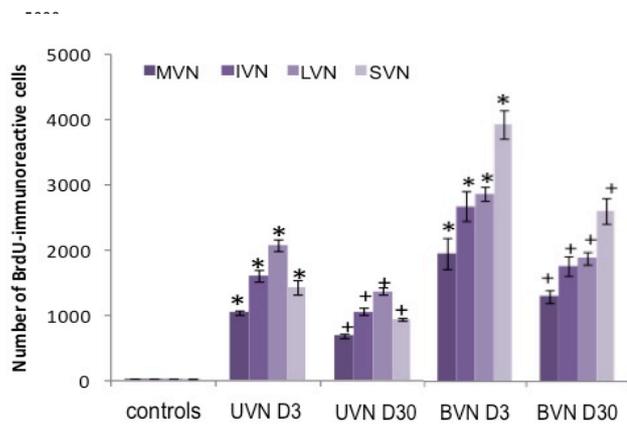


Figure 3

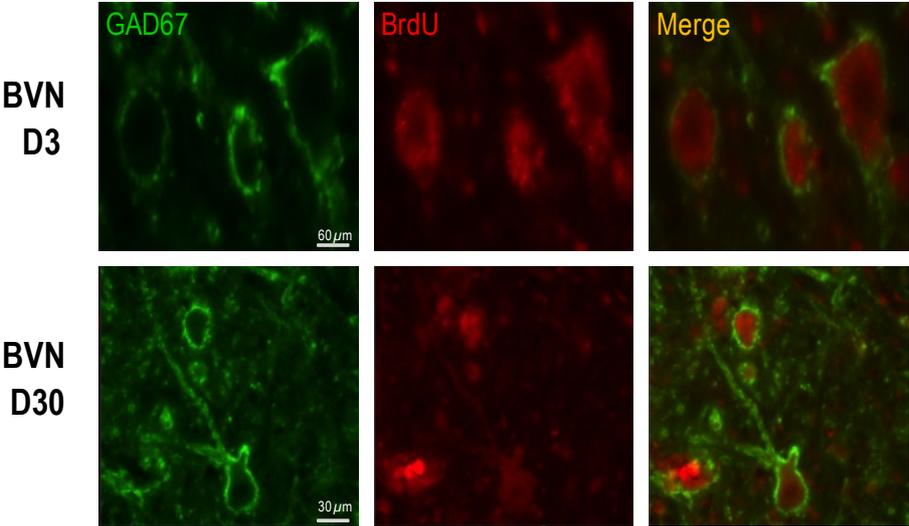


Figure 4

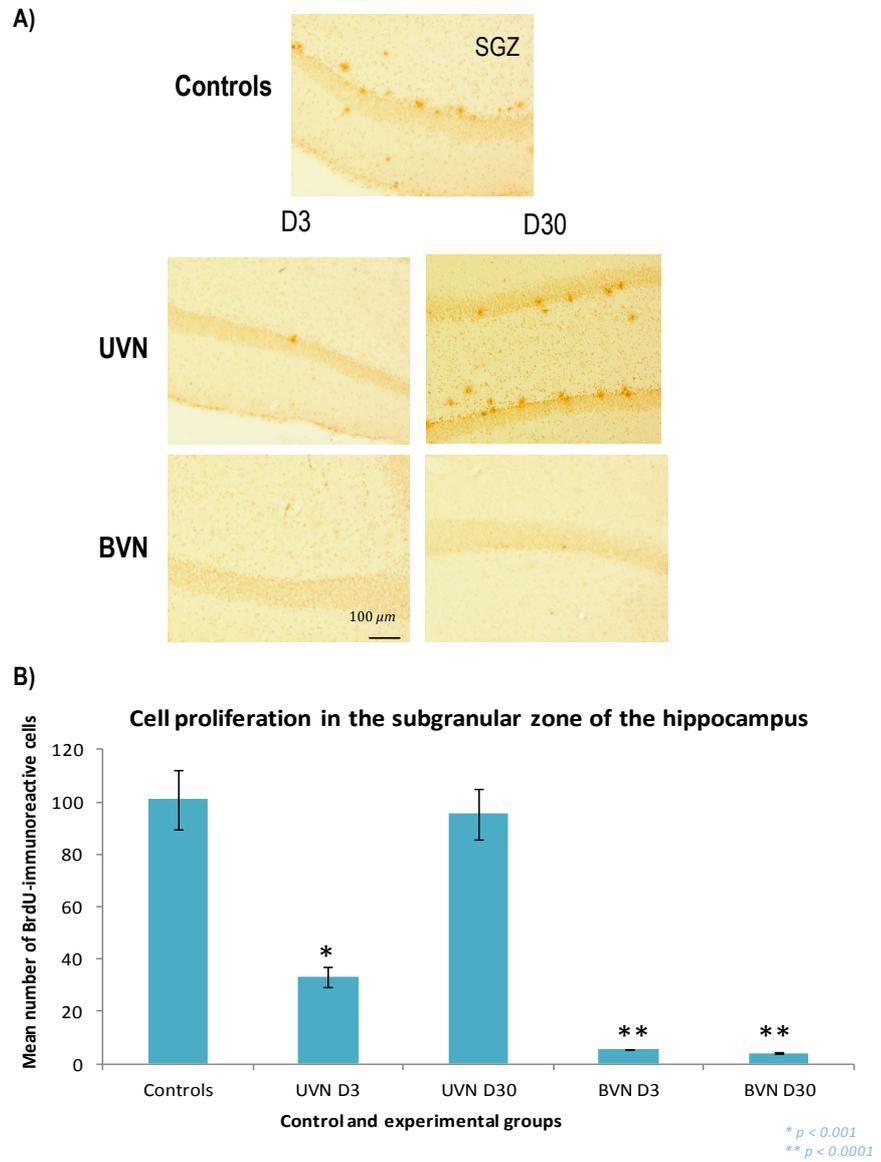


Figure 5

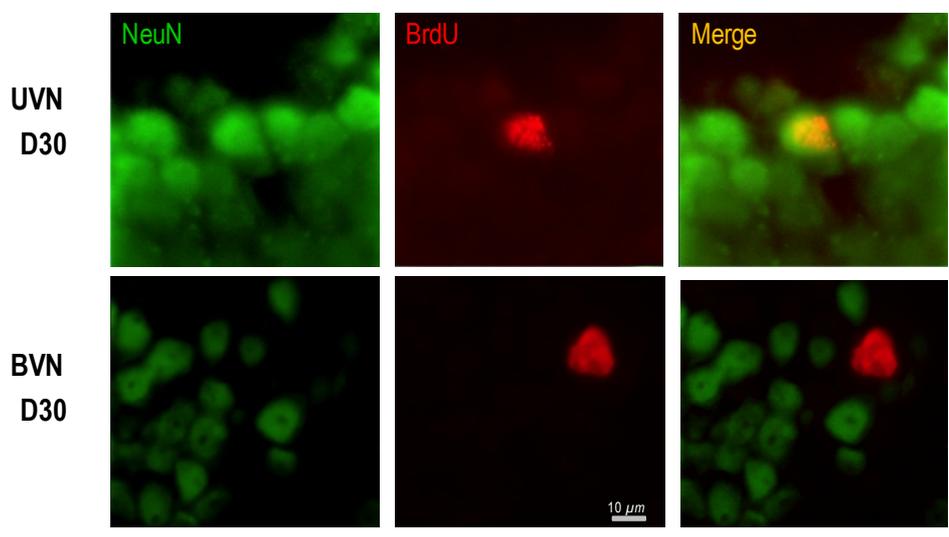
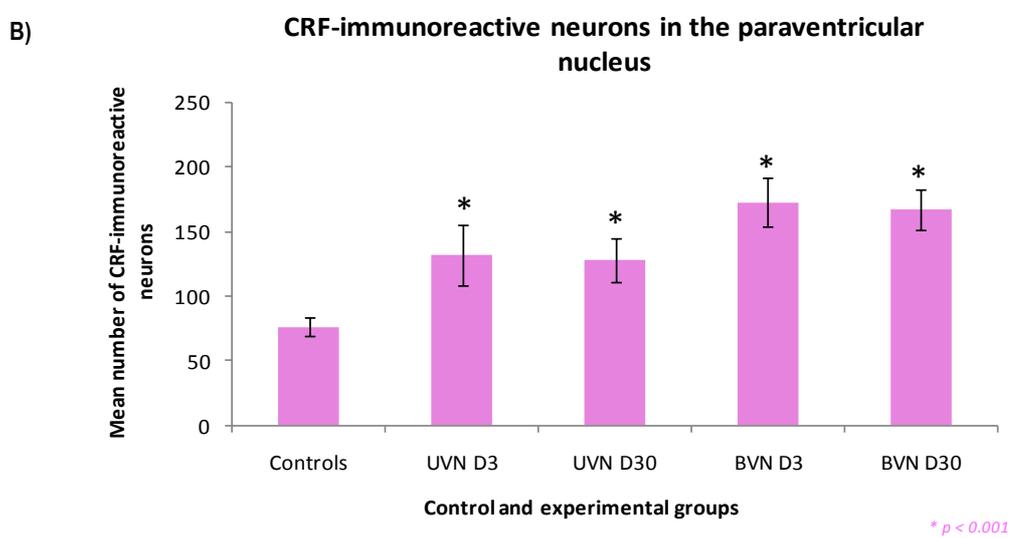
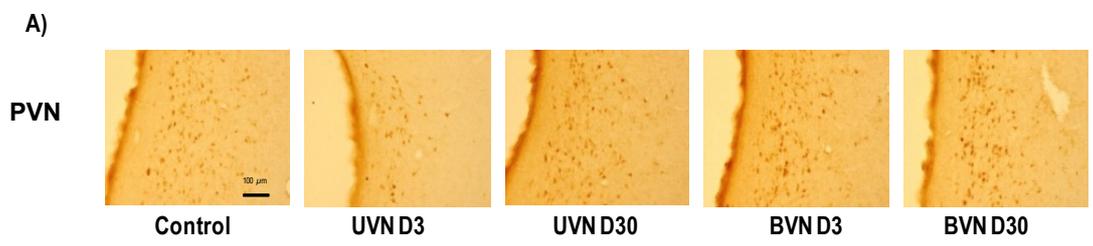


Figure 6



# Discussion



## Discussion

Ce travail de recherche se situe dans le cadre de l'étude de la neurogenèse réactionnelle et des mécanismes de plasticité adaptative observés principalement dans les noyaux vestibulaires après désafférentation vestibulaire. D'autres structures centrales telles que la zone sous-ventriculaire, le gyrus dentelé de l'hippocampe et le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ont également été étudiées au cours de recherches menées chez des chats adultes représentant des modèles de pathologie vestibulaire. Une attention particulière a été accordée au décours de la compensation des fonctions oculomotrices et posturo-locomotrices chez les animaux vestibulo-lésés. Ces études se sont articulées entre le niveau cellulaire et comportemental, nous amenant à dégager des orientations plurielles qui peuvent être regroupées en quatre parties :

La *première partie* traite du potentiel neurogène des noyaux vestibulaires et examine les facteurs du microenvironnement cellulaire pouvant conduire au déverrouillage transitoire des restrictions anti-neurogènes après neurectomie vestibulaire.

La *deuxième partie* aborde l'implication fonctionnelle des cellules néo-formées dans les noyaux vestibulaires au cours de la compensation vestibulaire. Elle examine quelles sont les conséquences de différentes atteintes vestibulaires en termes de plasticité neuronale, et de récupération comportementale.

La *troisième partie* concerne les effets du système GABAergique sur le décours de la compensation vestibulaire. Elle explore également le rôle de ce neurotransmetteur dans les étapes-clés de la neurogenèse adulte qui participe à la compensation vestibulaire.

Enfin, la *quatrième partie* s'intéresse à la l'influence des afférences vestibulaires respectivement sur l'expression de la corticolibérine (CRF) dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, et sur la prolifération cellulaire de la zone sous-granulaire du gyrus dentelé et des noyaux vestibulaires. Elle explore l'impact du stress sur la plasticité post-lésionnelle après une neurectomie vestibulaire.



## Première partie de la discussion

### Potentiel neurogène dans les noyaux vestibulaires

---

Si la neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) peut être assimilée au syndrome vestibulaire causé par un neurinome acoustique ou par la maladie de Menière, la labyrinthectomie unilatérale (LU) chez le chat représente un modèle animal assimilable aussi bien au processus graduel du vieillissement des récepteurs vestibulaires périphériques, qu'à une lésion vestibulaire causée par un traumatisme crânien ou à une intoxication aux antibiotiques. Enfin, le groupe subissant une injection de tétrodotoxine (TTX) paralysant l'activité électrique du nerf vestibulaire peut représenter un modèle de vertiges paroxystiques positionnels bénins chez l'homme (Lacour et al., 2009).

Les résultats immunohistochimiques révèlent que les caractéristiques et l'intensité de la désafférentation vestibulaire entraînent des mécanismes de plasticité spécifiques au niveau des noyaux vestibulaires (NV). Plus particulièrement, suite à NVU, une prolifération cellulaire marquée survient exclusivement dans les NV situés du côté désafférenté. Ce mécanisme de plasticité transitoire s'échelonne sur une fenêtre temporelle d'une semaine, indiquant que les NV possèdent un potentiel neurogène inductible dans des conditions post-lésionnelles. La nouveauté de cette étude a été de mettre en évidence que la permissivité neurogène locale ne dépend pas du déséquilibre de l'activité électrique spontanée entre les NV homologues, mais de la nature de la désafférentation induite. Aucune prolifération cellulaire significative n'a été relevée dans notre étude après LU et blocage de l'activité du nerf VIII par la TTX, et des mécanismes de plasticité distincts surviennent selon le type d'atteinte vestibulaire.

#### 1. Les noyaux vestibulaires : une nouvelle zone de neurogenèse ?

Chez l'animal contrôle, une très faible quantité de cellules BrdU-positives(+) est observée. En revanche, un jour après la NVU, des cellules BrdU+ commencent à abonder dans les NV désafférentés. Le pic de prolifération cellulaire culmine au troisième jour post-lésionnel, puis diminue progressivement pour recouvrer des valeurs contrôles en une semaine. Remarquablement, la majorité des cellules néo-formées survit au-delà de deux mois (Dutheil et al., 2011b). Une trentaine de jours après la lésion, l'étude de leur cinétique montre qu'elles se sont différenciées en cellules microgliales, en astrocytes et

en neurones en des proportions variables selon les NV (Tighilet et al., 2007; Dutheil et al., 2009; Dutheil et al., 2011b). La colocalisation de BrdU avec un marqueur spécifique des neurones matures, le Neuronal Nuclei (NeuN), a permis de confirmer qu'une neurogenèse survient effectivement dans les NV. En outre, d'après nos observations, les nouveaux neurones acquièrent un phénotype GABAergique. Bien qu'il ait été observé de fortes augmentations du nombre de neurones cholinergiques dans les NV désafférentés suite à une NVU, aucune colocalisation BrdU/ChAT - *i.e.* l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine - n'a été constatée chez les animaux lésés (Tighilet et al., 2007). Ces données ont suggéré que l'augmentation des populations neuronales cholinergiques dans les NV résultait probablement d'une régulation positive de la ChAT ou d'un changement de phénotype, et non d'une neurogenèse.

Suite à une labyrinthectomie unilatérale (LU) qui engendre une perte fonctionnelle des afférences vestibulaires d'un côté seulement, nous n'avons pas observé de différence significative entre le nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> décelées dans les NV de ce groupe et celui du groupe contrôle. De même, après l'injection de tétradotoxine, agent pharmacologique bloquant l'activité électrique du nerf vestibulaire ipsilatéral, aucune prolifération cellulaire n'a été remarquée dans les NV homologues, quels que soient les délais post-lésionnels considérés (Dutheil et al., 2011b). Nous en avons déduit qu'une désafférentation vestibulaire conduisant au déséquilibre de l'activité électrique entre NV homologues ne suffit pas à déverrouiller les restrictions anti-neurogènes locales.

### 1.1 Estimation du nombre de cellules en prolifération

Il apparaît que le nombre total de cellules BrdU<sup>+</sup> comptabilisées dans notre modèle de NVU est certainement sous-estimé. Notre protocole expérimental comporte une unique injection *i.p.* de BrdU (200 mg/kg), or dans d'autres études, plusieurs injections répétées sont préconisées pour recouvrir le cycle cellulaire. Par conséquent, dans nos modèles de lésion vestibulaire, seules les cellules étant en phase S lors de l'injection ont pu incorporer le BrdU : toutes les autres cellules en prolifération qui à ce moment-là étaient dans une autre phase du cycle cellulaire, n'ont pu être marquées. Puisque le cycle cellulaire dure entre 12 et 14h et que la phase S s'étend sur 4h environ, notre protocole ne reflète ainsi qu'un tiers de la totalité des cellules en prolifération. Si nous avions pratiqué de multiples injections de BrdU, certes à de plus faibles doses, toutes les 2h durant une demi-journée (Taupin, 2007), nous aurions certainement détecté davantage de cellules BrdU<sup>+</sup>. Gerd Kempermann a utilisé dans la plupart de ses études un protocole d'injections de BrdU réparti sur 6 jours, à une dose de 50 mg/kg chez des souris de neuf semaines (Kempermann and Gage, 1998). En nous basant sur un protocole similaire, il est certain que nous pourrions à l'avenir détecter une prolifération cellulaire plus importante chez des

animaux contrôles comme chez des animaux lésés, tel que cela a été mis en évidence dans le complexe vagal dorsal. Dans cet ensemble de noyaux du tronc cérébral, les auteurs de cette étude ont échelonné les injections de BrdU sur sept à dix jours en faisant varier les doses et les délais de survie (Bauer et al., 2005). Leurs résultats ont alors révélé l'existence d'une neurogenèse continue dans le complexe vagal dorsal.

## 1.2 Réparation cellulaire, dégénérescence et incorporation de BrdU

Lors du développement embryonnaire, les nouveaux neurones sont excédentaires ; seule une petite quantité survit et s'intègre fonctionnellement (Oppenheim, 1991; Biebl et al., 2000). Chez l'adulte, les structures neurogènes produisent également une abondance de nouvelles cellules dont près de 60% ne s'intègrent finalement pas dans les réseaux préexistants et meurent par apoptose : 30 jours après l'incorporation de BrdU, le taux de survie représente généralement 33 à 50% du pic cellulaire (Dayer et al., 2005; Kempermann, 2011b). Il avait été postulé que les NV étaient le site d'une mort cellulaire importante en réponse immédiate à la NVU, et qu'un tel signal était à l'origine du déclenchement de la neurogenèse post-lésionnelle. Pourtant, les marquages immunohistochimiques préliminaires des cellules apoptotiques (caspase 3 et méthode TUNEL) n'ont pas révélé de phénomène de mort neuronale significative dans le complexe des NV après une désafférentation vestibulaire (résultats non publiés). En outre, les cellules BrdU<sup>+</sup> observées ne peuvent ni correspondre à des cellules mourantes, ni à un phénomène de réparation de l'ADN puisqu'une majorité de cellules BrdU<sup>+</sup> survit à long terme et se différencie en divers types cellulaires. De plus, la réparation de l'ADN intervient à l'échelle de quelques nucléotides seulement, et survient dans l'ensemble du tissu nerveux ; or la localisation des cellules BrdU<sup>+</sup> remarquée après NVU est bien circonscrite aux NV désafférentés. L'observation de cellules marquées à la nestine (marqueur de progéniteurs neuraux) exclusivement dans les NV désafférentés (Tighilet et al., 2007) apporte un argument supplémentaire confirmant l'induction d'une neurogenèse réactionnelle.

Si la prolifération cellulaire réactionnelle après NVU s'inscrit comme un mécanisme de plasticité répliquable chez le chat neurectomisé, sa démonstration chez d'autres espèces reste encore à établir. L'équipe de Paul Smith a appliqué notre protocole chez le rat, et a découvert des résultats quelques peu différents des nôtres (Zheng et al., 2010a). Chez le rongeur, une prolifération cellulaire beaucoup moins importante a été observée aussi bien chez les animaux shams que chez les animaux lésés. En outre, un mois plus tard, le même nombre de cellules ayant incorporé le BrdU survit dans les deux groupes, amenant à s'interroger sur leur rôle fonctionnel. Il convient toutefois de signaler qu'en dehors de la différence d'espèce, la nature de la désafférentation vestibulaire consiste en une aspiration des

récepteurs vestibulaires, assimilable à la labyrinthectomie que nous pratiquons chez le chat. De plus, un échantillon relativement faible de rats a fait l'objet de cette étude ( $n = 3$ ) et à ce jour, il n'a pas encore été démontré la nature de la différenciation des cellules BrdU<sup>+</sup> dans les NV du rat adulte (Zheng et al., 2010b). Cette prolifération réactionnelle pourrait éventuellement refléter un phénomène de réparation de l'ADN ou d'un phénomène de dédifférenciation astrocytaire.

## 2. Origines potentielles des nouvelles cellules neurales observées dans les noyaux vestibulaires désafférentés

Plusieurs hypothèses quant à l'origine des nouvelles cellules sont envisageables. Tout d'abord, il se peut que des précurseurs neuraux migrent des zones neurogènes et contactent les NV désafférentés. Les précurseurs de la zone sous-ventriculaire (ZSV) peuvent se déplacer dans le système nerveux, a fortiori dans des conditions lésionnelles (Arvidsson et al., 2002; Lie et al., 2002; Parent et al., 2002; Tattersfield et al., 2004). Leur vitesse de migration au départ de la ZSV a été estimée à quelques micromètres par heure. Il n'est pas totalement exclu qu'une partie de la prolifération cellulaire observée dans les NV désafférentés observée provienne de cette zone neurogène. Bien que nous n'ayons pas observé de variations significatives de l'expression de la neurogenèse sous-ventriculaire après NVU (Dutheil 2009), il est possible qu'un protocole de marquage au BrdU plus sensible mette en évidence des fluctuations du nombre de cellules prolifératrices dans la ZSV. Kazunobu Sawamoto et ses collaborateurs de l'équipe d'Arturio Alvarez-Buylla, soutiennent que la migration de neuroblastes peut s'opérer à travers le flux du liquide céphalo-rachidien grâce au battement des cils des cellules épendymaires (Sawamoto et al., 2006). En raison de l'emplacement des NV en bordure du IV<sup>e</sup> ventricule, un tel mode migratoire, même s'il paraît quelque peu atypique, pourrait en effet être plausible. Il serait aussi envisageable que des précurseurs empruntent un mode de déplacement vasophilique, leur conférant une vitesse de déplacement non négligeable le long de vaisseaux sanguins (Ohab et al., 2006; Massouh and Saghatelyan, 2010).

En outre, nous pouvons suggérer qu'un approvisionnement en cellules souches neurales puisse aussi provenir d'une zone neurogène proche des NV comme le complexe vagal dorsal, où survient une légère neurogenèse continue chez le rat adulte (Bauer et al., 2005). Suite à une vagotomie, le nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> locales augmente considérablement (jusqu'à des valeurs 18 fois au-dessus du niveau contrôle dans le noyau moteur dorsal du vague) avec une cinétique de prolifération reflétant celle observée dans les NV. De plus, l'incorporation de BrdU est beaucoup plus importante du côté ipsilatéral que du côté controlatéral, et les cellules néo-formées survivent à long terme *in vivo*. Les précurseurs

issus du complexe vagal dorsal pourraient donc éventuellement migrer jusqu'aux NV désafférentés après NVU. De telles données restent à vérifier dans notre modèle animal.

La prolifération cellulaire précoce des NV peut également s'expliquer par la présence de précurseurs neuraux quiescents situés en bordure du IV<sup>e</sup> ventricule. En effet, les ventricules cérébraux, et plus particulièrement le plancher du IV<sup>e</sup> ventricule, sont connus pour présenter un potentiel neurogène (Shihabuddin et al., 2000; Martens et al., 2002). Les cellules épendymaires possèderaient de remarquables propriétés après lésion : elles seraient capables de réacquérir *in vitro* des facultés de multipotence intéressantes pour la réparation tissulaire (Barnabe-Heider et al.; Carlen et al., 2009). Dans des conditions spécifiques telles que la section du nerf VIII, les noyaux vestibulaires, qui sont en contact direct avec le IV<sup>e</sup> ventricule, pourraient être approvisionnés grâce à un stock de cellules souches quiescentes résidant aux abords des ventricules.

Enfin, les cellules néo-formées pourraient provenir de cellules « astrocyte-like » quiescentes contenues dans les NV, mais aussi d'astrocytes matures capables de se différencier en conditions pathologiques. De telles observations ont été réalisées *in vitro* et *in vivo* après une lésion tissulaire (Lang et al., 2004; Buffo et al., 2008) mais elles restent à démontrer de manière plus pertinente chez le mammifère adulte.

### **3. Quels acteurs interviennent dans le déverrouillage du potentiel neurogène des noyaux vestibulaires ?**

Quelle que soit l'origine des précurseurs, il faut qu'ils puissent non seulement survivre, mais aussi s'intégrer aux réseaux neuronaux préexistants dans les NV. On sait que des précurseurs issus de la moelle épinière ou de la substance noire se différencient en neurones lorsqu'ils sont transplantés dans un environnement neurogène, mais qu'en revanche ils génèrent uniquement des cellules gliales lorsqu'ils sont transplantés dans une zone non-neurogène de l'hippocampe (Shihabuddin et al., 2000; Lie et al., 2002). Nous pouvons donc avancer que même si les NV étaient approvisionnés en cellules souches générées dans d'autres régions cérébrales, certains signaux locaux doivent obligatoirement déverrouiller les restrictions anti-neurogènes des NV durant la première semaine post-NVU pour que la neurogenèse puisse s'y déployer. Ainsi, la rupture soudaine de l'homéostasie recrute-t-elle assurément une mosaïque d'acteurs proneurogènes : des cellules microgliales, des astrocytes (Tighilet et al., 2007; Dutheil et al., 2009), mais également des neuromédiateurs (GABA, acétylcholine et histamine) (Tighilet and Lacour, 1998, 2001; Tighilet et al., 2006), ainsi que des facteurs neurotrophiques (BDNF, NGF,

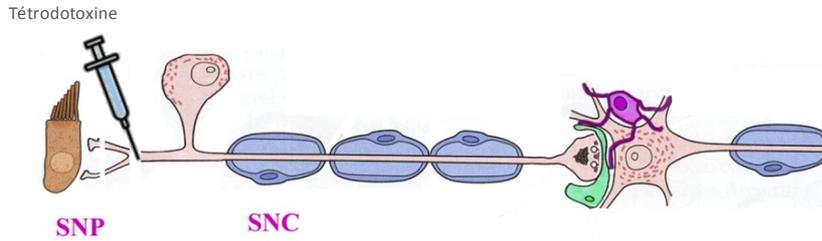
NT3) (Lacour and Tighilet, 2010), des protéines de la matrice extracellulaire (Deak et al., 2012) ou encore des facteurs de l'inflammation (Liberge et al., 2010).

### 3.1 Contributions gliales et vasculaires dans les noyaux vestibulaires

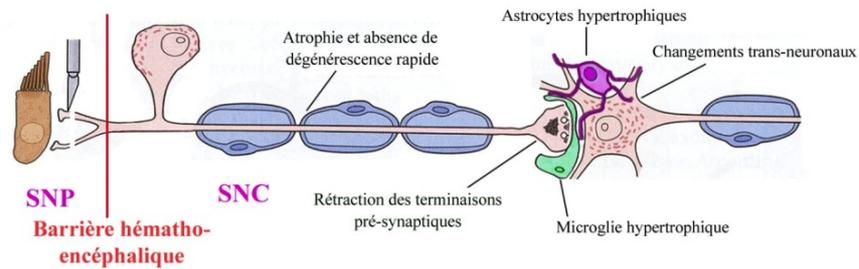
Nos données attestent qu'après LU, une astroglie relativement faible survient dans les NV entre le premier et le septième jour post-lésionnel (Dutheil et al., 2011b). Trente jours plus tard, un pic d'expression de GFAP est atteint bilatéralement dans les quatre noyaux vestibulaires tandis que deux mois plus tard, la quantité d'astrocytes réactionnels est revenue à des valeurs contrôles. Par contraste, en bloquant l'activité électrique du nerf vestibulaire par l'injection locale de TTX, nous avons trouvé qu'aucune réaction gliale significative survient, quels que soient les délais post-lésionnels. Des résultats similaires ont été obtenus chez le cochon d'inde par l'équipe de Catherine de Waelle qui a comparé chez cette espèce les effets occasionnés par les mêmes types de lésion (LU et TTX, voir *Figure 20*) (Campos-Torres et al., 2005).

La destruction des récepteurs vestibulaires périphériques (LU) annihile l'activité des fibres nerveuses afférentes, mais ne conduit pas à leur dégénérescence aussi rapidement qu'après NVU : elles survivent en effet durant une période supérieure à deux ans durant laquelle elles conservent des propriétés conductrices (Schuknecht, 1982; Lacour, 2006). La désafférentation par injection de TTX préserve également l'intégrité du nerf vestibulaire. Ceci pourrait expliquer que des mécanismes de plasticité moins drastiques qu'une neurogenèse locale soient mobilisés après une LU ou le blocage de l'activité électrique du nerf. Nos résultats indiquent également qu'après NVU, le nombre d'astrocytes et de cellules microgliales augmente considérablement dans les NV (Cass et al., 1989; Tighilet et al., 2007; Dutheil et al., 2009). La section du nerf vestibulaire entraîne effectivement une désafférentation anatomique soudaine et fonctionnelle qui conduit, d'une part, à la dégénérescence des fibres du nerf, et d'autre part, à la perte de leurs sites récepteurs dans les neurones de second ordre des NV (Cass et al., 1989). L'ensemble de ces données nous amène à postuler que l'asymétrie de l'activité électrique spontanée ne suffit pas à initier une réaction gliale. Cette dernière semble être la conséquence d'une atteinte structurale du système (*i.e.* après LU ou NVU) et doit être reliée à la réponse inflammatoire (Buffo et al., 2008; Sofroniew, 2009).

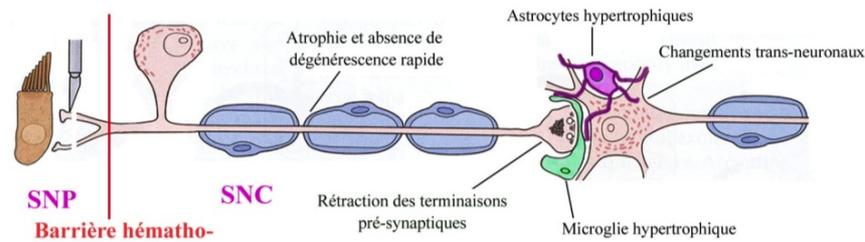
**Après injection de tétrodotoxine, l'activité électrique du nerf est transitoirement bloquée (GFAP -)**



**Réponse trans-glionnaire du nerf vestibulaire après labyrinthectomie (GFAP ++)**



**Réponse trans-glionnaire du nerf vestibulaire après neurectomie (GFAP ++++)**



Reproduit et modifié avec l'autorisation de l'auteur de la figure, Copyright © Antonio Campos-Torres

**Figure 20. Atteintes morphologiques du nerf vestibulaire et réaction astrocytaire dans les noyaux vestibulaires après différents types de lésion vestibulaire.** Après une lésion, les neurones subissent des changements morphologiques et métaboliques. La réaction astrocytaire qui peut survenir localement est graduelle et dépend des caractéristiques et de l'intensité de l'atteinte. Après injection de TTX dans l'oreille interne, l'activité électrique du nerf vestibulaire est transitoirement bloquée. Ce déséquilibre électrophysiologique ne suffit pas à déclencher une activation gliale significative (GFAP-) dans les noyaux vestibulaires chez le chat adulte. Après labyrinthectomie, une activation gliale modérée est observée dans les noyaux vestibulaires. Le nerf vestibulaire ne dégénère pas rapidement. Sa section engendre en revanche sa dégénérescence rapide et accentue la réaction gliale dans les noyaux vestibulaires.

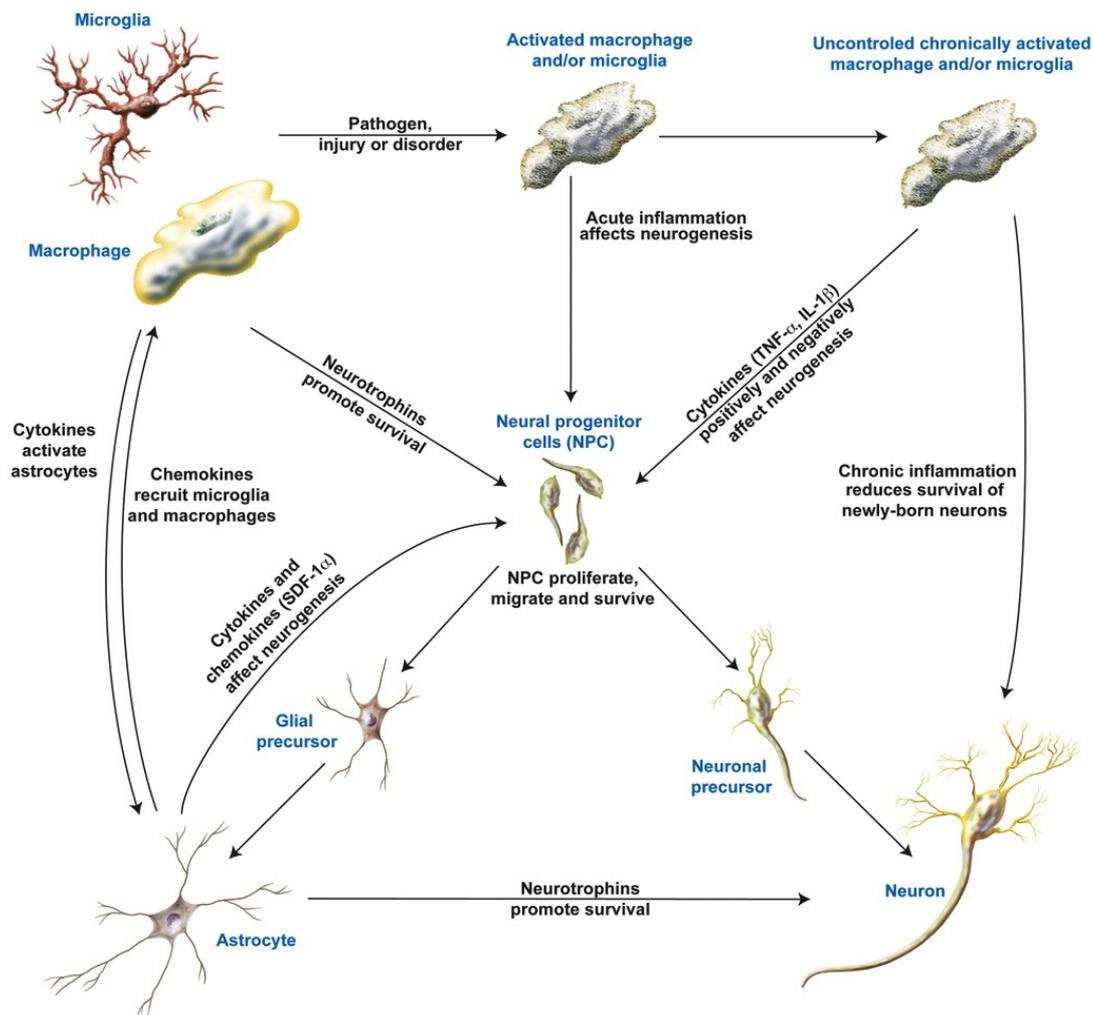
Les astrocytes, qui font partie intégrante des niches neurogènes du gyrus dentelé et de la zone sous-ventriculaire, sont réputés pour procurer un environnement favorable à l'intégration synaptique de nouveaux neurones ainsi qu'à leur maturation fonctionnelle dans les zones neurogènes (Lim and Alvarez-Buylla, 1999; Song et al., 2002). Les cellules souches possèdent d'ailleurs de nombreuses caractéristiques astrocytaires (propriétés passives, contacts vasculaires); elles expriment des marqueurs astrocytaires telle que la GFAP. De plus, la suppression des populations cellulaires exprimant la GFAP abolit par là-même la neurogenèse (Doetsch et al., 1997; Morshead et al., 2003; Morrens et al., 2012). Il a été rapporté que l'élimination de l'astrogliose réactionnelle par des manipulations génétiques chez la souris accentue non seulement l'atteinte locale du tissu et la taille de la lésion générées, mais accroît aussi la dégénérescence neuronale (Sofroniew, 2009). De tels résultats plaident en faveur du rôle bénéfique des astrocytes protoplasmiques aux alentours d'une lésion (Pekny and Nilsson, 2005). De surcroît, les astrocytes sont connus pour réguler les concentrations ioniques intra- et extra-cellulaires de potassium, pour éliminer les radicaux libres et réduire l'excitotoxicité imputable au glutamate (Anderson et al., 2003). Connectés entre eux par des jonctions communicantes (« gap junctions »), ils peuvent ainsi transporter et redistribuer des ions potentiellement délétères sur de longues distances. Tout comme les neurones, ils répondent à divers neuromédiateurs tels que le glutamate, la noradrénaline, l'histamine, l'acétylcholine, l'ATP et le GABA (Haydon, 2001). Les astrocytes protoplasmiques peuvent également libérer des neurotrophines, des facteurs de croissance, certains neuromédiateurs (*i.e.* glutamate) ou encore des morphogènes (*i.e.* sonic hedgehog, wnt), modulant alors la croissance neuronale et l'activité synaptique (LoTurco, 2000; Robel et al., 2011; Morrens et al., 2012). Leur présence abondante au cours du premier mois après une NVU suggère qu'ils pourraient d'une part, stimuler la neuro- et l'astro-genèse, et d'autre part, favoriser le retour de l'activité spontanée dans les NV ipsilatéraux. Cette hypothèse paraît d'autant plus plausible que de tels neuromédiateurs sont connus pour intervenir dans le complexe des noyaux vestibulaires et participer à la compensation vestibulaire. Dans le groupe LU, l'augmentation de la population astrocytaire contribuerait de même au rééquilibrage de l'activité électrique des NV homologues, mais ne serait pas suffisante pour lever les restrictions anti-neurogènes en vigueur localement.

Il est particulièrement intéressant de souligner qu'au cours de la première semaine post-lésionnelle, non seulement le volume et le nombre de vaisseaux sanguins augmentent, mais aussi que de nombreux clusters de cellules BrdU<sup>+</sup> sont observés à leurs bordures (observations préliminaires). De telles données laissent à penser que l'environnement vasculaire, réputé pour agir de concert avec la neurogenèse (Palmer et al., 2000; Louissaint et al., 2002), doit jouer un rôle significatif après neurectomie vestibulaire. En effet, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins peut favoriser la libération de facteurs trophiques, de cytokines anti-inflammatoires ou encore d'hormones conférant un

environnement neurogène (Saghatelian, 2009; Wager-Smith and Markou, 2011). En plus de la migration vasophile procurée par les capillaires sanguins, l'angiogenèse stimule la survie et la différenciation cellulaire (Cayre et al., 2009). L'analyse macroscopique des cellules BrdU<sup>+</sup> et de leurs relations avec les vaisseaux sanguins dans les NV suggère qu'elles puissent être pour certaines de nature astrocytaire (« astrocyte-like cells »). De telles configurations se retrouvent d'ailleurs dans les zones sous-granaire et sous-ventriculaire respectivement, où les cellules de type B et de type 1 s'amassent autour des vaisseaux sanguins et contactent directement les cellules endothéliales (Filippov et al., 2003; Shen et al., 2008). Une autre piste à explorer concerne les cellules BrdU<sup>+</sup>, qui sont potentiellement des précurseurs neuraux voire des neuroblastes en migration, et peuvent notamment avoir emprunté un mode de migration vasophile pour contacter les NV désafférentés, comme cela a pu être constaté chez le rongeur après un AVC (Ohab et al., 2006; Massouh and Saghatelian, 2010). Après LU et injection de TTX chez le chat, le nombre et le volume des vaisseaux sanguins ne semble pas varier dans les NV. Ces observations restent à préciser et s'avèreraient cohérentes avec la persistance d'un environnement non-neurogène.

### 3.2 Lésions et libération de facteurs de l'inflammation

Une lésion invasive telle que la section du nerf vestibulaire accentue les réponses microgliales et inflammatoires dans les NV (Liberge et al., 2010), sollicitant non seulement des macrophages résidents, mais aussi des leucocytes et des protéines du plasma (Medzhitov, 2008) susceptibles de participer à la permissivité neurogène locale. La contribution post-lésionnelle des cytokines avait déjà été envisagée par l'équipe de Catherine de Waelle en comparant les effets d'une labyrinthectomie (LU) et d'une injection de TTX dans les NV du cochon d'inde (Campos-Torres et al., 2005). Dans cette étude, les auteurs ont postulé que la réaction gliale occasionnée après la destruction mécanique des récepteurs vestibulaires était initiée par la libération de cytokines pro- et anti-inflammatoires. En effet, des augmentations d'IL1 $\beta$ , d'IL6, de TNF- $\alpha$  et de TGF- $\beta$ 1 ont été observées dans les NV désafférentés 6h après avoir pratiqué une LU (résultats non publiés mais mentionnés dans Campos-Torres et al., 2005). En revanche, l'inactivation du nerf vestibulaire par l'injection de TTX ne produit ni de réaction gliale significative, ni de modification d'expression des facteurs de l'inflammation. Ainsi la réaction gliale serait-elle le reflet de l'activité inflammatoire des NV suite à une désafférentation structurale. En effet, les cytokines pro- et anti-inflammatoires sont connues pour intervenir dans la cohorte des mécanismes de plasticité apparaissant après une lésion, voir *Figure 21* (Maeda et al., 1994; Raivich et al., 1999).



Originalement publié par Wiley dans Whitney 2009 J neurochem 108(6):1343 Copyright © Nicholas Whitney

**Figure 21. Illustration du rôle de l'inflammation dans les différentes étapes de la neurogenèse.** Lors d'une lésion, les neurones produisent des chémokines, qui recrutent des macrophages et des cellules microgliales (microglia). Les macrophages et les cellules microgliales deviennent activées et peuvent libérer certains facteurs proneurogènes telles que les neurotrophines, connues pour favoriser la survie et la prolifération des précurseurs neuraux (sur la figure : Neural Progenitors Cells, NPCs). Les astrocytes également produisent des chémokines qui participent à la migration des précurseurs jusqu'au site lésionnel, où ils libèrent à leur tour des neurotrophines. Une fois que les précurseurs ont reçu ces signaux neurotrophiques, ils peuvent migrer, proliférer et se différencier en adoptant une lignée neuronale ou gliale. Il arrive cependant que des astrocytes soient activés de manière chronique et deviennent délétères pour la survie des nouveaux neurones en libérant des facteurs anti-neurogènes.

Martine Liberge et ses collaborateurs ont également rapporté l'augmentation de TNF-α dans les NV médian et inférieur dès 4h après une LU chez le rat (Liberge et al., 2010). Cette cytokine proinflammatoire possède un rôle ambivalent, pouvant être tour à tour proneurogène et favorable à la

réparation du tissu nerveux, ou anti-neurogène voire neurotoxique selon les zones cérébrales, les modèles et les méthodes expérimentales employées (Whitney et al., 2009). Remarquablement, deux marqueurs de la neuroprotection : la protéine nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) et l'enzyme antioxydante manganese superoxide dismutase (MnSOD) sont régulées positivement dans les NV respectivement 8h et un jour après une labyrinthectomie (Liberge et al., 2010). Il semblerait ainsi que ces adaptations post-lésionnelles stimulent la survie neuronale et préviennent la mort cellulaire, favorisant la compensation vestibulaire des animaux hémilabyrinthectomisés. Une autre hypothèse intéressante serait que l'augmentation de l'expression d'IL-1 $\beta$  rapporté par Antonio Compos-Torres après une LU chez le rongeur explique en partie l'absence de neurogenèse vestibulaire dans les NV. Il a en effet été décrit que cette cytokine inhibe la prolifération cellulaire des précurseurs neuraux et accroît même leur apoptose de manière dose-dépendante (Wang et al., 2007). Ainsi serait-il pertinent d'observer l'expression d'IL-1 $\beta$  dans les NV sains et désafférentés durant la première semaine post-NVU et post-LU chez le chat.

Il semblerait qu'une LU ne réunisse pas les conditions nécessaires et suffisantes pour qu'une prolifération cellulaire réactionnelle survienne dans les NV, peut-être en raison de l'expression moindre de certains facteurs de l'inflammation comparativement à une NVU. Il est possible que suite à la section du nerf vestibulaire, une mobilisation importante d'IL6, de TNF- $\alpha$  et d'autres facteurs de la neuroprotection, participe ainsi à l'initiation de la neurogenèse et/ou à l'attraction de précurseurs neuraux quiescents voisins dans les NV désafférentés. En effet, l'expression de cytokines proinflammatoires telle que l'IL6 a été relevée dans des régions neurogènes et des souris knockout pour l'IL6 possèdent d'ailleurs une neurogenèse réduite dans ces zones-là (Barkho et al., 2006; Bowen et al., 2011). De plus, des gradients de concentration chémoattractifs induits par des processus inflammatoires peuvent influencer la migration de précurseurs neuraux (Das and Basu, 2008). Par exemple, chez le rat, la transplantation de précurseurs neuraux humains dans une zone ischémisée du cortex conduit à leur migration directe vers le site de la lésion, alors que chez des animaux sains, les précurseurs se déplacent radialement sur une courte distance par rapport au site d'injection (Kelly et al., 2004). Une zone lésée est donc capable de recruter et/ou de réveiller des cellules souches grâce à la libération de certains attracteurs. Il est envisageable que la section du nerf vestibulaire amplifie ainsi l'expression de certaines cytokines telle que l'IL6, contribuant d'une part, à suspendre les lois anti-neurogènes locales et d'autre part, à indiquer aux nouvelles cellules où se positionner dans le tissu. En outre, il a été montré que l'IL6 joue un rôle neurotrophique auprès des neurones et active les astrocytes adultes (Marz et al., 1999). Mettre en présence des astrocytes protoplasmiques en culture avec de l'IL6 leur confère non seulement des changements morphologiques caractéristiques des astrocytes fibreux, stimule l'expression des récepteurs IL6 à leur surface, mais encourage aussi la libération de facteurs

neurotrophiques tels que le NGF et le NT3 d'une manière dose-dépendante (Marz et al., 1999). Des associations cytokines-neurotrophines ont déjà été décrites dans des conditions inflammatoires et lésionnelles du système nerveux central (Wager-Smith and Markou, 2011) ; ces données sont d'un grand intérêt en clinique réparatrice humaine pour l'amélioration de la survie neuronale après une lésion et/ou une perturbation de l'homéostasie neurochimique (Otten and Gadiant, 1995).

### 3.3 Facteurs neurotrophiques et dialogues intercellulaires

Si les facteurs neurotrophiques endossent des responsabilités importantes tout au long de la vie, leur support est d'autant plus nécessaire après une lésion dans le système nerveux central adulte. Des voies de signalisation communes aux niches neurogènes et aux tissus lésionnels permettent de réguler positivement l'EGF, le FGF et le VEGF (Tao et al., 1997; Doetsch et al., 2002; Robel et al., 2011). En conditions pathologiques, il a été montré que des précurseurs mis en présence de VEGF prolifèrent et survivent d'autant mieux (Schanzer et al., 2004; Robel et al., 2011). Puisque chez des chats neurectomisés, des augmentations du volume et du nombre des vaisseaux sanguins auraient lieu dans les NV lors de la fenêtre temporelle où le tissu est permissif à la neurogenèse, il serait judicieux de caractériser l'évolution de l'expression du VEGF et/ou de ses récepteurs tyrosine kinase. Il a d'ailleurs été démontré que le VEGF sécrété par les cellules endothéliales a un pouvoir prolifératif dans les niches neurogènes et qu'après une axotomie, il peut guider les cônes de repousse axonale (Eichmann et al., 2005). Ce facteur de croissance pourrait faire partie de l'unité d'acteurs conférant au tissu une permissivité pour la genèse et l'intégration de nouvelles cellules. Dans la zone sous-grulaire (ZSG) et la zone sous-ventriculaire (ZSV), le BDNF joue également un rôle neuroprotecteur et neurogène important ; cette neurotrophine peut être libérée aussi bien par les neurones que par les astrocytes (Friedman et al., 1998). Ces derniers sont connus pour synthétiser *in vitro* de nombreux facteurs de croissance et des neurotrophines tels que le BDNF, le NGF, le NT-3 (Rudge et al., 1992). Ainsi la réaction astrocytaire prononcée après NVU pourrait-elle encourager la libération de tels agents favorables aux différentes étapes de la neurogenèse vestibulaire. Il a été mis en évidence que des souris NT-3 knockout soumises à une LU mettent deux fois plus de temps pour retrouver leurs fonctions posturales (Gacek and Khetarpal, 1998). De même, l'infusion spécifique d'oligonucléotides antisens contre le BDNF dans les NV de cochons d'inde retarde considérablement la récupération de certaines fonctions posturales telle la rotation de la tête et du corps de l'animal vers le côté ipsilatéral (Bolger et al., 1999). Ces données suggèrent que ces neurotrophines interviennent au cours de la compensation vestibulaire posturale. Il est fort intéressant de relever que dans notre modèle lésionnel de NVU chez le chat il a été observé que les NV sont le site d'une importante augmentation de cellules immunoréactives aux neurotrophines (article en préparation). Plus précisément, des pics d'expression de BDNF, de NGF

de NT-3 et de leurs récepteurs respectifs (TrkA, B et C) ont été remarqués trois jours après la lésion. Remarquablement, ce délai post-lésionnel correspond au pic de prolifération cellulaire survenant dans les NV désafférentés. Ainsi, ces facteurs neurotrophiques pourraient appartenir à un répertoire proneurogène commun, et encourager le retour à l'homéostasie de l'environnement cellulaire.

### 3.4 Régulation de l'acétylcholine dans les noyaux vestibulaires

Les récepteurs nicotiniques et muscariniques, ainsi que l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine (ChAT) sont exprimés dans les NV du mammifère adulte en conditions physiologiques (de Waele et al., 1995; Tighilet and Lacour, 1998). Une semaine après NVU chez le chat adulte, des augmentations bilatérales du nombre de neurones cholinergiques et de varicosités ChAT<sup>+</sup> ont été constatées dans les NV inférieur et supérieur. Celles-ci se maintiennent ipsilatéralement dans le NVI et bilatéralement dans le NVS jusqu'à un an après la lésion (Tighilet and Lacour, 1998). Ces modifications de la transmission cholinergique participent certainement au rééquilibrage de l'activité électrique spontanée. Il a effectivement été démontré que l'administration d'agonistes cholinergiques occasionne diverses réponses neuronales selon le stade considéré d'une part (aigu *versus* compensé), et les cibles sur lesquelles ils agissent d'autre part (Bradley and Dray, 1976; Muller and Singer, 1989; Smith and Darlington, 1991). D'après les observations réalisées un mois après le pic de prolifération cellulaire vestibulaire, les nouvelles cellules produites consécutivement à la section du nerf ne se différencient pas en neurones cholinergiques en dépit de l'augmentation de marquages ChAT<sup>+</sup> (Tighilet et al., 2007). L'acétylcholine pourrait ainsi faire partie des acteurs bénéfiques qui, durant la compensation vestibulaire, permettent la levée des restrictions neurogènes du tissu : plusieurs arguments indiquent en effet que ce neuromédiateur stimule la survie des précurseurs neuronaux et se retrouve à l'intérieur des niches de neurogenèse continue (Cooper-Kuhn et al., 2004; Kaneko et al., 2006; Ho et al., 2009).

### 3.5 Un autre neuromédiateur intéressant : l'histamine

Brahim Tighilet et ses collaborateurs ont montré qu'il existait un lien évident entre la compensation vestibulaire et l'augmentation de la synthèse d'histamine dans le système nerveux central du chat adulte (Tighilet and Lacour, 1997; Tighilet et al., 2005; Tighilet et al., 2006). En effet, si une section unilatérale du nerf vestibulaire induit des changements de l'immunoréactivité histaminergique dans le noyau tubéromammillaire de l'hypothalamus postérieur, en revanche, la section des nerfs vestibulaires gauche et droit (neurectomie vestibulaire bilatérale) n'engendre pas de telles modifications (Tighilet et al., 2006). Par conséquent, grâce à des voies vestibulo-hypothalamiques, la neurectomie unilatérale semble responsable de la synthèse d'histamine dans le noyau tubéromammillaire d'où les neurones histaminergiques se projettent directement vers les NV. L'histamine participe probablement au

rééquilibrage de l'activité spontanée des NV désafférentés. Plusieurs travaux ont d'ailleurs montré que l'activation des récepteurs histaminergiques H1 et H2 dépolarisait *in vitro* les neurones du NV médian chez le rat (Phelan et al., 1990; Serafin et al., 1993; Wang and Dutia, 1995). Ces données ont donc attesté d'une part, que les neurones du NV médian sont pourvus de récepteurs post-synaptiques H1 et H2, et d'autre part, que l'histamine possède une action excitatrice dans le NVM. Les NV sont aussi dotés d'autorécepteurs H3 au niveau pré-synaptique (Airaksinen and Panula, 1988; Pollard et al., 1993). Des antagonistes de l'autorécepteur H3 tels que la betahistine dihydrochloride ou le thioperamide accroissent en effet la concentration d'histamine dans les NV et accélèrent en parallèle la compensation vestibulaire d'animaux lésés (Arrang et al., 1983; Tighilet et al., 2006; Tighilet et al., 2007). Des traitements pharmacologiques histaminergiques sont ainsi utilisés depuis longtemps en clinique humaine et permettent aux patients de recouvrer plus rapidement l'usage des fonctions vestibulaires déficitaires (Lacour and Sterkers, 2001). Toutefois, les mécanismes d'action précis de ces agents pharmacologiques demeurent méconnus; il existe plusieurs variants des récepteurs histaminergiques disséminés dans l'ensemble du système nerveux central. Leur activation peut avoir diverses répercussions, telle que l'inhibition de la libération d'autres neuromédiateurs. Ce mécanisme a été décrit dans le NVM où l'activation des récepteurs H3 bloque la libération de GABA (Bergquist et al., 2006). De même, l'activation des récepteurs H1/H2 suspend la libération de GABA en empruntant une voie indirecte de nature glycinérique (Bergquist and Dutia, 2006). En outre, il est possible que l'histamine possède une influence proneurogène locale en favorisant la prolifération et la différenciation dans la lignée neuronale par une action sur les récepteurs H1 et H2, comme cela a déjà été rapporté *in vitro* au cours du développement du rat (Molina-Hernandez and Velasco, 2008). Il est envisageable également que ce neuromédiateur favorise la survie cellulaire, puisque cela a été relevé dans les structures de neurogenèse du rat adulte (Foley et al., 2009; Bernardino et al., 2012). Ces hypothèses permettraient d'expliquer en partie pourquoi la prolifération cellulaire réactionnelle à une NVU survient uniquement du côté désafférenté et non du côté sain. L'histamine ainsi libérée dans les NV désafférentés serait favorable aux différentes étapes de la neurogenèse réactionnelle et rétablirait l'excitabilité intrinsèque locale.

*En conclusion, chez le chat adulte vestibulo-lésé, les noyaux vestibulaires sont le siège d'une extraordinaire plasticité. Au niveau des synapses, des réorganisations structurales remodelent assurément le paysage dendritique et axonal, tandis que de nombreux acteurs chimiques entrent en jeu et sont en relation avec les cellules nerveuses. Cet ensemble de conditions réunies à l'intérieur des NV garantit un milieu optimal pour chacune des étapes de la neurogenèse après neurectomie vestibulaire. Ainsi, ces noyaux sont-ils capables d'accueillir transitoirement des phénomènes de plasticité aussi*

*fascinants que la production de nouvelles cellules qui survivent, se différencient, et contribuent semble-t-il, à la compensation vestibulaire posturo-locomotrice.*



## Deuxième partie de la discussion

### Implications fonctionnelles de la prolifération cellulaire induite dans les noyaux vestibulaires après lésion vestibulaire

---

L'une des questions fondamentales ayant trait à la neurogenèse adulte porte sur la fonctionnalité des nouveaux neurones. Si une certaine quantité de fonctions relatives aux cellules néo-formées dans le gyrus dentelé et dans le bulbe olfactif a commencé à émerger ces dernières années, de nombreuses incertitudes demeurent quant au rôle supposé des neurones produits dans les autres zones du système nerveux central. En l'occurrence, dans des conditions lésionnelles ou pathologiques, l'intégration locale de neurones néoformés n'apporte pas systématiquement de bénéfice fonctionnel (Parent et al., 2002). Dans notre modèle d'atteinte vestibulaire par section du nerf VIII, la découverte pionnière de nouvelles cellules survivant à long terme dans les noyaux vestibulaires (NV) désafférentés nous a conduits à nous interroger sur leur rôle au cours de la compensation vestibulaire. Bien que chez les animaux ayant été soumis à une neurectomie vestibulaire, les déficits posturaux, locomoteurs et oculomoteurs régressent au cours du temps, la contribution éventuelle de ces cellules néo-formées à la compensation vestibulaire restait à déterminer. Pour répondre à cette question, nous nous sommes inspirés des célèbres études de Fiona Doetsch (Doetsch et al., 1999a) et de Maia Kokoeva (Kokoeva et al., 2005) et avons eu recours à un agent antiméiotique : la cytosine- $\beta$ -D-arabino-furanoside (AraC), délivrée de manière continue dans le IV<sup>e</sup> ventricule, en bordure des NV. Cette infusion, effective sur une durée totale de trente jours, avait pour objectif d'empêcher la prolifération cellulaire induite dans les NV après neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) chez le chat adulte.

Les résultats de cette étude (Dutheil et al., 2009) indiquent que chez les animaux infusés à l'AraC immédiatement après une NVU (du 1<sup>er</sup> au 30<sup>e</sup> Jour ; groupe NVU/AraC J<sub>0-30</sub>), l'activité mitotique est effectivement bloquée contrairement au groupe NVU/NaCl J<sub>0-30</sub> qui a subi la même désafférentation vestibulaire combinée toutefois avec l'infusion d'une solution saline de chlorure de sodium (NaCl). En accord avec l'étude de Brahim Tighilet *et al.* publiée en 2007 (Tighilet et al., 2007), chez les animaux neurectomisés ayant été infusés avec du NaCl, une forte prolifération cellulaire réactionnelle est observée dans les NV désafférentés trois jours après la NVU.

#### 1. Contrôles de l'innocuité de l'agent antiméiotique

L'une des données majeures concerne les chats du groupe NVU/AraC J<sub>0-30</sub> chez lesquels la prolifération cellulaire post-lésionnelle a été abolie : on constate que la restauration de leurs fonctions posturo-locomotrices est considérablement retardée. Alors qu'un seul mois est nécessaire pour que les animaux NVU/NaCl J<sub>0-J30</sub> recouvrent leurs performances pré-opératoires, quatre mois en moyenne s'écoulent avant que les chats NVU/AraC J<sub>0-J30</sub> retrouvent les mêmes capacités. De même, pour la compensation de la fonction posturale statique - lorsque l'animal est au repos - la diminution de la surface du polygone de sustentation est doublement retardée dans le groupe NVU/AraC J<sub>0-J30</sub>. Afin de nous assurer que la solution antimitotique n'était pas en elle-même responsable du retard de la compensation des déficits posturo-locomoteurs, des animaux non-lésés ont également été infusés avec de l'AraC dans le IV<sup>e</sup> ventricule (groupe contrôle/AraC J<sub>0-30</sub>). Aucun effet secondaire n'a été constaté durant le mois qui a suivi la pose de la pompe Alzet délivrant l'AraC. En outre, deux autres groupes de chats ont été infusés de manière tardive, c'est-à-dire vingt jours après qu'ils ont subi la neurectomie (soit du 20<sup>e</sup> au 50<sup>e</sup> jour post-lésionnel). Les premiers ont reçu de l'AraC : groupe NVU/AraC J<sub>20-50</sub>, les seconds, du NaCl : groupe NVU/NaCl J<sub>20-50</sub>. De même, l'absence d'effets secondaires constatée aux niveaux postural, locomoteur et oculomoteur a témoigné en faveur de l'innocuité de l'AraC délivré aux doses choisies. En outre, les animaux de ces groupes infusés tardivement avaient commencé à récupérer une partie de leurs performances locomotrices et traversaient avec agilité le dispositif de la poutre tournante juste avant la mise en place de la pompe Alzet, au 20<sup>e</sup> jour post-NVU. Remarquablement, ces chats ont poursuivi leur courbe de progression sans régression de leurs performances après s'être remis de l'intervention chirurgicale. Ainsi a pu être écartée toute spéculation concernant le retard des fonctions posturo-locomotrices du groupe NVU/AraC J<sub>0-30</sub>. D'autres données récentes obtenues chez le rat montrent également que l'administration d'AraC n'induit pas de déficits locomoteurs et ne modifie pas la vitesse de navigation dans la piscine de Morris (Lemaire et al., 2012). Par conséquent, la délivrance de cet agent antimitotique n'affecte pas la locomotion des animaux et n'engendre pas la survenue de nouveaux symptômes vestibulaires préalablement compensés, phénomène connu sous le terme de décompensation vestibulaire.

## **2. La neurogenèse et l'astrogenèse : deux mécanismes de plasticité contribuant à la compensation de la fonction posturo-locomotrice**

Chez les animaux NVU/NaCl J<sub>0-J30</sub> et J<sub>20-50</sub>, les cellules ayant incorporé le BrdU injecté trois jours après la NVU ont pour la majorité survécu au-delà de deux mois (Dutheil et al., 2011b). Elles se sont différenciées en cellules gliales et en neurones de phénotype GABAergique, confirmant les résultats antérieurement obtenus dans le laboratoire (Tighilet et al., 2007). En outre, les neurones nouvellement formés s'intègrent fort probablement aux réseaux préétablis des NV comme le suggèrent nos

observations en microscopie confocale (présence de ramifications axonales et dendritiques chez les cellules BrdU/GAD67<sup>+</sup>). Le retard très prononcé de la compensation des fonctions posturo-locomotrices en l'absence de prolifération cellulaire dans les NV (groupe NVU/AraC J<sub>0</sub>-J<sub>30</sub>) suggère fortement que la neurogenèse GABAergique et l'astrogenèse participent aux processus de restauration de ces déficits chez le chat neurectomisé. Il est d'ailleurs fort intéressant de noter que dans les groupes où survient la prolifération cellulaire vestibulaire, un nombre important de cellules BrdU<sup>+</sup> est observé dans les noyaux vestibulaire médian, inférieur et latéral, qui sont tous trois impliqués dans les fonctions posturales statiques et dynamiques (Wilson and Melvill Jones, 1979). Ces cellules pourraient favoriser le retour à l'équilibre de l'excitabilité intrinsèque des NV, paramètre connu comme étant le corrélat électrophysiologique de la compensation vestibulaire. En effet chez le rat, entre les heures qui suivent une labyrinthectomie unilatérale et le deuxième jour post-lésionnel, l'asymétrie de l'activité neuronale des NV homologues diminue alors que s'observe en parallèle la réduction des symptômes statiques (Yamanaka et al., 2000 ; Johnston et al., 2002). Des résultats similaires, avec toutefois une constante de temps plus longue (5 semaines) ont également été décrits dans le NV latéral chez le chat après section du nerf vestibulaire (Zennou-Azogui et al., 1993), qui occasionne une désafférentation plus drastique et invasive que la labyrinthectomie. D'après les résultats comportementaux recueillis dans notre étude, l'astrogenèse et la neurogenèse réactionnelles, sans lesquelles le rééquilibrage de l'activité électrique s'opère probablement plus lentement après NVU, jouent manifestement un rôle significatif dans la compensation vestibulaire. Certes, les chats du groupe NVU/AraC J<sub>0</sub>-J<sub>30</sub> parviennent par retrouver leurs aptitudes posturo-locomotrices pré-opératoires ; toutefois, la réduction de leurs déficits requiert une période beaucoup plus conséquente que les animaux des autres groupes. La section du nerf vestibulaire associée au blocage de l'activité mitotique provoque assurément la mobilisation d'autres mécanismes de plasticité que l'astrogenèse et la neurogenèse, mais ils semblent moins efficaces. Il est en outre plausible que l'inhibition de l'astrogenèse ne fournisse plus au tissu les supports trophiques nécessaires au bon fonctionnement des neurones pré-existants, et explique notamment le retard de la récupération des animaux infusés précocement avec de l'AraC.

Il a été décrit que lors du processus de maturation des nouveaux neurones de la ZSG, leur probabilité d'être sélectionnés et d'être intégrés aux circuits pré-existants augmente au cours du temps et qu'ils acquièrent un rôle fonctionnel au bout de quatre semaines (Kee et al., 2007). Dans notre modèle expérimental de section du nerf, quatre semaines et davantage sont nécessaires pour que les chats NVU/NaCl recouvrent leurs performances pré-opératoires au dispositif de la poutre tournante. Cette constante de temps semble suggérer que la finalisation de la compensation des paramètres posturo-locomoteurs s'appuie sur la maturation des nouveaux neurones et leur intégration fonctionnelle aux réseaux des NV désafférentés. Des travaux complémentaires restent à effectuer pour affirmer le

lien de causalité entre la neurogenèse réactionnelle des NV désafférentés et la compensation vestibulaire. Il serait de surcroît intéressant de distinguer les contributions respectives de la gliogenèse et de la neurogenèse vestibulaires après NVU. Bloquer sélectivement la réaction microgliale grâce à l'olomoucine permettrait ainsi d'affiner nos données : cet agent, lorsqu'il est administré quotidiennement à des rats, bloque non seulement la réaction microgliale préalable à l'astrogliose, mais il supprime aussi l'expression de cytokines proinflammatoires (Tian et al., 2007a; Tian et al., 2007b).

### 3. Compensation de la fonction oculomotrice

Bien que la neurogenèse et l'astrogenèse contribuent à la récupération des fonctions posturo-locomotrices, leur blocage par l'AraC n'influence pas le décours temporel de la compensation du nystagmus horizontal spontané. En effet, quels que soient les groupes expérimentaux, la diminution des battements spontanés s'effectue de manière similaire (6 jours), impliquant qu'il reposerait sur d'autres mécanismes de plasticité (Dutheil et al., 2009). D'ailleurs, le noyau vestibulaire supérieur, majoritairement dévolu aux fonctions oculomotrices, est le NV qui comporte la plus faible proportion de neurogenèse réactionnelle. Remarquablement, une équipe de chercheurs néo-zélandais a montré qu'après lésion vestibulaire unilatérale et infusion d'oligonucléotides antisens contre le BDNF, les animaux présentaient un retard de la compensation des déficits posturaux mais qu'en revanche, le nystagmus oculaire n'était pas affecté (Bolger et al., 1999). Ces données sont en adéquation avec celles que nous avons obtenues sous infusion d'AraC. De même, il a été observé que l'infusion chronique d'antagonistes des récepteurs GABA de type A (GABA<sub>A</sub>) dans les NV désafférentés modifie l'expression des symptômes posturaux chez le cochon d'Inde, sans altérer l'expression des symptômes oculomoteurs (Gliddon et al., 2005b). Comme l'avait déjà suggéré Ian Curthoys une vingtaine d'années auparavant, la compensation des paramètres posturo-locomoteurs et oculomoteurs serait ainsi gouvernée par des mécanismes de plasticité distincts (Curthoys et al., 1988).

### 4. Les caractéristiques de la désafférentation déterminent le potentiel neurogène des NV ainsi que le décours de la compensation vestibulaire

En réponse à une lésion, d'innombrables réactions surviennent dans le tissu nerveux à plusieurs niveaux : à l'échelle cellulaire par exemple, les synapses se remodelent, modifient l'organisation des dendrites et des axones, et parfois, de nouvelles cellules sont produites. La neurogenèse est un phénomène adaptatif sophistiqué qui s'étend sur une longue échelle temporelle - supérieure à un mois - et qui nécessite le respect d'un nombre précis d'étapes (prolifération, maturation, survie et intégration fonctionnelle). Lorsque la compensation vestibulaire s'effectue en moins de deux semaines dans certains modèles lésionnels, la genèse de nouvelles cellules n'apparaît pas pertinente. D'autres sous-

processus suffisent pour rétablir l'équilibre électrique entre les NV homologues et « réparer » le tissu nerveux. Dans nos études, les chats soumis à une LU ou à une injection de TTX dans l'oreille interne retrouvent leurs fonctions oculomotrices et posturo-locomotrices en moins d'une quinzaine de jours (en moyenne une semaine dans le groupe TTX ; deux semaines dans le groupe LU). En parallèle, aucune prolifération cellulaire significative n'est observée dans les NV de ces groupes expérimentaux ; ce mécanisme de plasticité apparaît donc spécifique à la section du nerf vestibulaire et à sa cohorte de conséquences structurales et fonctionnelles. Puisque les animaux des groupes LU et TTX, ou encore ceux sujets à une NVU et infusés avec un agent antiméiotique, finissent par compenser leurs déficits oculomoteurs et posturo-locomoteurs (Dutheil et al., 2009; Dutheil et al., 2011b), la neurogenèse et l'astrogenèse ne peuvent être considérées comme des mécanismes de plasticité indispensables à la restauration fonctionnelle. Nous suggérons par conséquent que la neurogenèse vestibulaire survienne uniquement lorsque se conjuguent un ensemble de facteurs spécifiques tels l'abolition totale et définitive des afférences vestibulaires périphériques ainsi que les innombrables conséquences qu'engendrent la dégénérescence rapide du nerf vestibulaire (*i.e.* le recrutement de cellules microgliales et astrocytaires en grand nombre dans les NV, la sécrétion de facteurs de l'inflammation et de neurotrophines, ainsi que le recrutement d'autres acteurs proneurogènes) et qu'ils participent cependant au bon déroulement de la compensation vestibulaire des animaux.

D'après nos données, il apparaît également que le déséquilibre de l'activité électrique entre NV sains et lésés ne peut être envisagé comme un facteur inducteur de la neurogenèse. Cette hypothèse a été étayée par une récente étude où nous avons examiné les effets induits par une neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) ou bilatérale (NVB) chez le chat adulte (article à paraître). Dans le cas d'une NVB, le déséquilibre électrique entre NV homologues est inexistant, mais il est possible d'apprécier les conséquences relatives à la section du nerf vestibulaire. Les résultats ont montré une très forte prolifération cellulaire dans l'ensemble des NV homologues trois jours après sections bilatérales des nerfs vestibulaires : le nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> est en effet doublement supérieur à celui relevé dans les NV désafférentés du groupe NVU. Ces données confirment que la neurectomie bilatérale autorise ce groupe de noyaux du tronc cérébral à devenir transitoirement neurogènes indépendamment de l'asymétrie électrophysiologique dans les NV homologues. En outre, une abolition totale des afférences vestibulaires (NVB) stimule davantage la prolifération cellulaire qu'une abolition partielle (NVU). Il serait alors intéressant de comparer le niveau d'expression d'autres marqueurs de la plasticité potentiellement proneurogènes (*i.e.* facteurs neurotrophiques, cytokines, neuromédiateurs) entre les animaux des groupes NVU et NVB au cours de cette fenêtre temporelle.

Curieusement, nous avons également constaté dès le 3<sup>e</sup> jour post-NVB plusieurs cellules colocalisant le BrdU et la GAD67. Cette observation n'a pas été répliquée dans le groupe NVU au même délai post-lésionnel. Nous avons trouvé particulièrement intéressant de remarquer que les cellules BrdU<sup>+</sup>/GAD67<sup>+</sup> présentes à ce délai précoce dans les NV des chats vestibulo-lésés bilatéralement ne possèdent pas de prolongements neuritiques : leur morphologie s'apparente à celle des neurones immatures. Ceci implique qu'après section des deux nerfs vestibulaires, les cellules néo-formées dans les NV désafférentés sont capables de réguler positivement, et de manière précoce, l'enzyme de synthèse du GABA. Puisqu'au cours du développement, le système GABAergique est le premier système neurochimique qui se met en place, et qui contrôle l'excitabilité du milieu (Represa and Ben-Ari, 2005; Ben-Ari et al, 2007), un tel mécanisme pourrait favoriser la restauration fonctionnelle et s'inscrire parmi les hypothèses de la théorie vestibulo-centrique. Il serait envisageable que suite à la suppression totale des informations vestibulaires, les précurseurs neuraux présents dans les NV synthétisent de manière précoce la GAD67, afin de réguler l'excitabilité intra-NV après la désafférentation.

A une autre échelle, il a été rapporté que suite à une labyrinthectomie bilatérale, l'activité électrique spontanée des neurones des noyaux vestibulaires (NV) redevient presque normale quelques heures après la lésion (McCall and Yates, 2011). Plusieurs auteurs ont postulé qu'outre les mécanismes de plasticité propres aux NV, d'autres connexions « non labyrinthiques » jouent un rôle important. Effectivement, la hausse rapide de l'activité dans les NV après double labyrinthectomie peut s'expliquer notamment par les relations excitatrices qui les relient à certaines structures centrales. Ainsi, les autres systèmes sensoriels fournissant des informations en partie gravitaires, pourraient se substituer aux informations otolithiques et à leur tour, encourager la hausse de l'activité électrique intra-NV. Des marqueurs rétrogrades ont révélé que les NV recevaient des afférences directes de la matière grise spinale, de nombreux noyaux du tronc cérébral et du cortex cérébral (Wilson et al., 1999; Jian et al., 2005). De telles associations pourraient alors concourir à ramener précocement un certain niveau d'excitabilité dans les NV désafférentés.

Trente jours après neurectomie unilatérale ou bilatérale, la majorité des cellules ayant incorporé le BrdU durant le pic de prolifération cellulaire (3<sup>e</sup> jour) survit et une partie d'entre elles se différencie en neurones GABAergiques. D'après nos observations en microscopie confocale, ces derniers sont dotés d'une arborisation dendritique et d'un axone semblables à ceux des neurones pré-existants, indiquant qu'ils se seraient intégrés aux réseaux neuronaux des NV et seraient probablement fonctionnels. Il serait pertinent de vérifier les propriétés électrophysiologiques de ces nouveaux neurones.

## Troisième partie de la discussion

### Rôle du GABA dans les différentes étapes de la neurogenèse vestibulaire et dans la restauration des fonctions vestibulaires

---

La troisième partie de cette thèse porte d'une part sur l'influence du système GABAergique sur la compensation vestibulaire, et d'autre part sur les différentes étapes de la neurogenèse dans les noyaux vestibulaires (NV) après une neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU). Les résultats indiquent que la nature de la désafférentation vestibulaire entraîne des profils d'expression spécifiques de l'enzyme de synthèse du GABA, la glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), à l'intérieur des NV. En outre, l'infusion d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs GABA de type A (GABA<sub>A</sub>) dans le IV<sup>e</sup> ventricule après NVU occasionne des répercussions distinctes aussi bien sur le plan comportemental que cellulaire.

#### 1. La nature de la désafférentation vestibulaire induit un pattern d'expression spécifique de la glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67)

En conditions physiologiques, le GABA régule l'équilibre entre excitation et inhibition. Aussi un dysfonctionnement de ce système neurochimique peut-il mener à des désordres importants telles que des crises d'épilepsie (Ben-Ari et al., 2007). Présents aussi bien à la surface des neurones matures que des neuroblastes et des cellules astrocytaires, les récepteurs de type A (GABA<sub>A</sub>) interviennent dans des fonctions cruciales du système nerveux central, y compris dans la régulation de la neurogenèse primaire et secondaire (Platel et al., 2010; Sernagor et al., 2010). En outre, les sous-unités de ces récepteurs ionotropiques peuvent être modulées par le stress (Skilbeck et al., 2010).

Dans différents modèles expérimentaux de désafférentation vestibulaire chez le chat adulte, il est intéressant de noter que les patterns d'expression de GAD67 dans les NV se distinguent selon la nature de la désafférentation. Chaque type d'atteinte vestibulaire engendre certes des augmentations locales du nombre de neurones GAD67<sup>+</sup> dès le premier jour post-lésionnel, mais leur nombre varie en fonction du caractère structural et/ou fonctionnel de la désafférentation (Dutheil et al., 2011b). En effet, chez le chat adulte, une NVU accentue dans les NV le nombre de neurones exprimant la GAD67 comparativement à une LU. En revanche, l'injection de TTX bloquant l'activité du nerf VIII occasionne une faible augmentation de neurones GAD67<sup>+</sup>. Quels que soient les groupes expérimentaux (NVU, LU,

TTX), un pic du nombre de neurones GAD67<sup>+</sup> survient au 3<sup>e</sup> jour post-lésionnel dans les NV médian, inférieur et latéral (Dutheil et al., 2011b). En revanche, dans le NV supérieur, le nombre de neurones GAD67<sup>+</sup> ne change pas significativement. Quatre semaines plus tard, le NVM, le NVI et le NVL possèdent encore un nombre de cellules GAD67<sup>+</sup> supérieur à celui observé chez les animaux non-lésés. Il est fort intéressant de noter que chez des chats soumis à une NVU, le nombre de varicosités GABAergiques augmente significativement dans le MVN désafférenté durant la première semaine post-lésionnelle et persiste jusqu'à un an (Tighilet and Lacour, 2001). A ce long délai post-lésionnel, une augmentation significative du nombre de neurones GAD67<sup>+</sup> est constatée bilatéralement dans les NVM. Ces données soulignent le rôle particulièrement important du système GABAergique dans la plasticité post-lésionnelle et adaptative.

Les études concernant les modifications du système GABAergique après atteinte vestibulaire sont nombreuses. Chez le singe soumis à une désafférentation vestibulaire unilatérale, le marquage GABAergique augmente ipsilatéralement dans le NVL, alors qu'il diminue du côté opposé (Thompson et al., 1986). Ceci suggère que chez cette espèce, la régulation du système GABAergique ipsi- et controlatéral participe à la compensation vestibulaire. Chez le rat soumis à une LU, entre 6h et 50h après la lésion, les niveaux d'ARNm des enzymes de synthèse du GABA (GAD65, GAD67) augmentent dans les NV ipsilatéraux, tandis que l'efficacité des récepteurs GABAergiques se modifie ipsi- et controlatéralement (Horii et al., 2003). Bien qu'il ait été postulé qu'une lésion du système vestibulaire puisse en elle-même être responsable de ces changements d'efficacité des récepteurs, il s'avère qu'ils sont en réalité imputables à l'asymétrie électrique (Yamanaka et al., 2000). Ces données sont en accord avec ce que nous avons observé chez le chat adulte (Dutheil et al., 2011b). Il est connu qu'une désafférentation unilatérale annihile l'activité électrique des NV désafférentés tout en accroissant l'excitabilité des NV controlatéraux. Ce déséquilibre électrique est en grande partie imputable aux connexions commissurales inhibitrices qui connectent les NV homologues. Sur des coupes de tissu provenant d'animaux hémi-labyrinthectomisés, la section des fibres commissurales empêche la diminution de l'activité de décharge spontanée des neurones ipsilatéraux observée normalement après LU (Yamanaka et al., 2000). En parallèle, chez des rats hémi-labyrinthectomisés dont les fibres commissurales sont préservées, l'efficacité fonctionnelle des récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub> du NVM du côté lésé est régulée négativement. D'après les auteurs de l'étude, de tels changements adaptatifs contribuent à diminuer la sensibilité des neurones ipsilatéraux à l'inhibition commissurale qui les réduit au silence suite à la LU. Par contraste, du côté controlatéral, les récepteurs GABAergiques sont régulés positivement dans le NVM, bien que la libération de GABA y soit réduite voire supprimée le lendemain de la lésion (Yamanaka et al., 2000). Il est intéressant de noter que la libération de ce neurotransmetteur inhibiteur peut néanmoins être restaurée en présence d'un antagoniste des

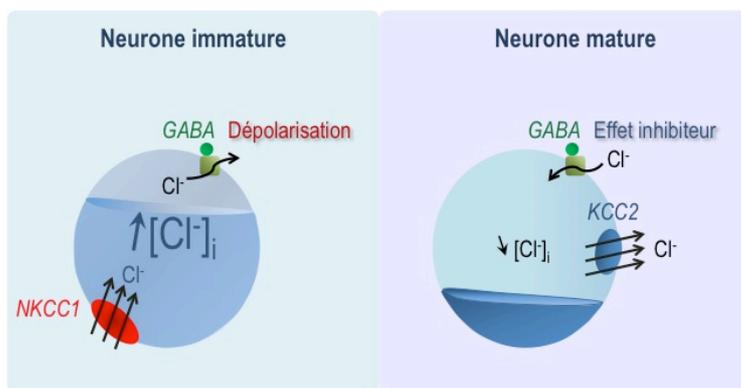
récepteurs glycinergiques tel que la strychnine (Bergquist et al., 2006). Cette voie glycinergique gère indirectement la transmission GABAergique, du moins dans le NVM. De surcroît, il a été rapporté que l'histamine régule négativement la libération de GABA, non seulement par l'intermédiaire des autorécepteurs H3, mais aussi grâce aux récepteurs H1/H2 capables d'activer la voie glycinergique. Il se pourrait ainsi que la concentration de glycine, accentuée controlatéralement après LU, participe au retour à l'équilibre des NV homologues. L'histamine abolirait alors progressivement, via la transmission GABAergique et glycinergique, l'asymétrie électrique et diminuerait l'efficacité des commissures inhibitrices (Bergquist et al., 2006).

Dans nos trois modèles expérimentaux de lésion vestibulaire chez le chat (TTX, LU, NVU), les évolutions de l'expression de GAD67 dans les NV se rapprochent respectivement de la cinétique de la compensation des déficits posturo-locomoteurs (Dutheil et al., 2011). Bien qu'il ait été démontré que les sous-unités des récepteurs GABAergiques ne sont pas modifiées après LU chez le rongeur (Eleore et al., 2005; Gliddon et al., 2005a) il serait néanmoins judicieux d'étudier les éventuelles modifications moléculaires des sous-unités des récepteurs GABA<sub>A</sub> après NVU chez le chat adulte.

## **2. Hypothèses sur la contribution fonctionnelle des nouveaux neurones GABAergiques des noyaux vestibulaires lors de la compensation vestibulaire**

Le GABA est connu pour participer à la compensation vestibulaire après lésion en rééquilibrant l'activité électrique des NV homologues (Darlington and Smith, 2000; Gliddon et al., 2005a). Après NVU, une grande quantité de nouvelles cellules produites dans les NV désafférentés survit et se différencie en neurones GABAergiques (Tighilet et al., 2007; Dutheil et al., 2009; Dutheil et al., 2011b). Ce résultat pose la question du rôle du GABA au cours de la compensation vestibulaire. Puisque dans les zones de neurogenèse adulte, la survie des nouveaux neurones et leur intégration efficace dépend de leur activité (Tashiro et al., 2006), nous pouvons supposer que les neurones GABAergiques néoformés durant la première semaine post-lésionnelle intègrent des réseaux pré-existants et participent à l'activité électrique intrinsèque des NV désafférentés. Nous savons d'après plusieurs études que le retour de l'excitabilité des NV ipsilatéraux s'opère progressivement après NVU et correspond au corrélat neurophysiologique de la récupération des fonctions vestibulaires (Smith and Curthoys, 1988a; Ris et al., 1995; Lacour and Tighilet, 2010). Il paraît ainsi étonnant, à première vue, que les nouveaux neurones produits soient de phénotype GABAergique, et donc potentiellement inhibiteurs. Plusieurs hypothèses sont envisageables pour rendre compte de ce phénomène : tout d'abord, au cours du développement, et y compris chez l'adulte, avant que les récepteurs glutamatergiques ne soient synthétisés, les neurones immatures expriment une panoplie de récepteurs GABAergiques à leur

surface (Represa and Ben-Ari, 2005; Karten et al., 2006; Ge et al., 2007). Durant les deux ou trois premières semaines de leur développement neuronal, leur activation par le GABA induit une dépolarisation (voir Figure 22). Ce phénomène, propre au développement et à certaines conditions pathologiques chez le mammifère adulte *in vitro*, s'explique par le gradient d'ions chlorures  $\text{Cl}^-$  de part et d'autre de la membrane plasmique. En effet, chez les rongeurs, durant les deux premières semaines post-natales, les cotransporteurs NKCC1 sont beaucoup plus nombreux que leurs homologues KCC2, et participent à la concentration élevée d'ions  $\text{Cl}^-$  à l'intérieur des cellules (Ge et al., 2007; Yuan, 2008). Par conséquent, l'activation des récepteurs  $\text{GABA}_A$  occasionne une sortie d'ions  $\text{Cl}^-$  hors de la cellule qui engendre une dépolarisation. Les semaines suivantes, les cotransporteurs KCC2 prennent progressivement le relai et modifient le gradient de concentration en ions  $\text{Cl}^-$ , si bien que l'ouverture des récepteurs  $\text{GABA}_A$  cause désormais une entrée d'ions  $\text{Cl}^-$  et par conséquent, une hyperpolarisation (Ge et al., 2007). Il est possible que dans notre modèle de lésion vestibulaire chez le chat adulte, la régulation positive de cotransporteurs NKCC1 survienne dans les NV désafférentés devenus neurogènes. En effet, Alain Marty et Isabel Llano ont montré que de tels phénomènes pouvaient survenir *in vitro* chez l'adulte en conditions pathologiques (Marty and Llano, 2005). Il est également possible que sans aller jusqu'à la régulation positive des cotransporteurs NKCC1, les cotransporteurs KCC2 puissent être internalisés et modifier également le gradient de concentration d'ions  $\text{Cl}^-$ . Ce phénomène a été rapporté par Laurent Vinay après section de la moelle épinière chez le rat adulte (Boulenguez et al., 2010).



**Figure 22. Actions du GABA sur son récepteur  $\text{GABA}_A$  au cours du développement.** (Gauche) Les cotransporteurs cations chlorure NKCC1 sont responsables de l'accumulation intracellulaire d'ions chlorures  $\text{Cl}^-$  dans les neurones immatures. Ainsi, l'ouverture des récepteurs ionotropiques  $\text{GABA}_A$  conduit à la sortie de  $\text{Cl}^-$ , ce qui occasionne une dépolarisation. (Droite) Les

neurones matures possèdent des cotransporteurs cations chlorure KCC2 qui contribuent à la faible concentration intracellulaire d'ions  $\text{Cl}^-$ . En raison du gradient de concentration, l'ouverture des récepteurs  $\text{GABA}_A$  provoque dans ce cas-là une entrée d'ions  $\text{Cl}^-$  et engendre une hyperpolarisation.

Ainsi le GABA pourrait-il détenir une double action, inhibitrice ou dépolarisante, sur les réseaux de neurones locaux, si bien qu'il pourrait rehausser durant les premières semaines après NVU, l'excitabilité ipsilatérale des NV.

Une autre hypothèse envisageable est que les neurones GABAergiques nouvellement produits et finalement sélectionnés pour survivre au sein des réseaux neuronaux contactent d'autres neurones inhibiteurs. Ils pourraient désinhiber ainsi certains neurones des NV désafférentés et remonter par conséquent le niveau de dépolarisation intrinsèque de manière indirecte. De telles données ont d'ailleurs été mises en évidence chez le chat : suite à une lésion vestibulaire, une partie des neurones désafférentés est effectivement modulée par le mécanisme de désinhibition controlatérale (Shimazu and Precht, 1966). Il convient de noter toutefois que la contribution des neurones GABAergiques néoformés ne pourrait s'opérer qu'après un certain délai, lorsque les cellules BrdU<sup>+</sup> se seraient différenciées et auraient développé des arborisations dendritiques et axonales efficaces. D'autres mécanismes de plasticité plus précoces entrent donc assurément en jeu pour réguler l'excitabilité des NV désafférentés au cours des deux premières semaines post-lésionnelles.

Enfin, quand la prolifération cellulaire réactionnelle est bloquée dans les NV par l'infusion d'AraC (groupe NVU/AraC J<sub>0</sub>-J<sub>30</sub>), il est intéressant de remarquer que l'expression de GAD67 augmente bilatéralement dès le 3<sup>e</sup> jour post-lésionnel (Dutheil et al., 2009). Les neurones pré-existants amplifient alors leur niveau de synthèse de GAD67, même en l'absence de l'activité mitotique post-lésionnelle intra-NV. Cette régulation positive s'opère cependant en de plus faibles proportions que dans les groupes expérimentaux où survient la prolifération cellulaire réactionnelle dans les NV. Il est en conséquence envisageable que l'expression de l'enzyme de synthèse du GABA soit accentuée par la lésion vestibulaire, mais il est possible aussi qu'elle soit stimulée par les nouvelles cellules produites localement.

*L'ensemble de ces résultats nous a conduits à nous interroger sur l'influence directe du système GABAergique non seulement, sur la compensation vestibulaire chez le chat adulte, mais aussi, sur son action éventuellement neurogène dans les NV. Ces deux questions ont servi de point de départ à l'étude des effets de l'infusion d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> au voisinage des NV suite à une NVU (article prochainement soumis).*

### **3. L'environnement GABAergique influence non seulement la prolifération cellulaire vestibulaire, mais aussi la destinée des nouvelles cellules produites dans les noyaux vestibulaires**

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont des canaux ioniques hétéro-pentamériques dont l'activité peut être altérée par de nombreux modulateurs tels les endostéroïdes ou le zinc (Lambert, et al. 2003; Smart 2004 neuroscientist 10 :432). Dans notre modèle de section du nerf vestibulaire chez le chat adulte, l'infusion de muscimol (un agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>) ou de gabazine (un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>), favorisent d'une part l'expression de la prolifération cellulaire dans les noyaux vestibulaires désafférentés trois jours après la lésion, et d'autre part, déterminent le devenir des cellules néo-formées.

### 3.1 L'infusion de muscimol accentue la prolifération cellulaire réactionnelle

Au troisième jour post-lésionnel, lorsque du muscimol est infusé de manière continue au voisinage des NV, la prolifération cellulaire locale s'accroît considérablement par rapport aux animaux uniquement sujets à une NVU. La littérature scientifique prouve (Smart et al., 2004) aux agonistes GABAergiques des effets contrastés sur la prolifération cellulaire des précurseurs neuraux, pouvant aussi bien raccourcir leur cycle cellulaire, diminuer leur synthèse d'ADN ou augmenter leur prolifération (Represa and Ben-Ari, 2005). Un certain nombre d'études *in vitro* portant sur le GABA révèle son action prolifératrice et facilitatrice, notamment pour la formation de neurosphères (Fiszman et al., 1999; Haydar et al., 2000; Nakamichi et al., 2009; Alfonso et al., 2012) y compris en conditions pathologiques. L'activité de l'enzyme de synthèse du GABA est d'ailleurs amplifiée au sein de tumeurs affectant d'autres organes que le cerveau (Young et al., 2010). Dans de telles conditions, le système GABAergique est perturbé et pourrait dérégler la prolifération cellulaire. En effet, des récepteurs GABA<sub>A</sub> fonctionnels ont été découverts à la surface de cellules issues de glioblastomes ou de médulloblastomes (Young et al., 2010; Alfonso et al., 2012). Il se pourrait que suite à la neurectomie vestibulaire, le muscimol sur-stimule dans un premier temps la prolifération cellulaire réactionnelle. Ce résultat digne d'intérêt pourrait aussi s'expliquer en partie par la contribution indirecte de facteurs neurotrophiques, sollicités grâce à l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub>. Il a été prouvé que ces récepteurs favorisent la libération de BDNF et encouragent un panel d'actions trophiques lors du développement (Owens and Kriegstein, 2002; Overstreet-Wadiche et al., 2006; Porcher et al., 2011). Réciproquement, l'activation des récepteurs TrkB encourage l'expression des récepteurs GABA<sub>A</sub> à la surface de neurones cérébrocorticaux embryonnaires et provoque également la libération locale de BDNF (Porcher et al., 2011). Ces données recueillies chez de jeunes animaux, pourraient éventuellement se retrouver dans notre modèle lésionnel de pathologie vestibulaire. Ainsi, est-il plausible que le BDNF, connu pour favoriser la prolifération, la croissance et la survie des cellules puisse potentialiser d'autant plus la division cellulaire réactionnelle des NV lorsque les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont activés par l'infusion de muscimol. Il a d'ailleurs été observé

que le BDNF et d'autres facteurs neurotrophiques étaient davantage synthétisés dans les NV les premiers jours suivant la NVU chez le chat adulte (Tighilet et al., 1994).

### 3.2 L'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> par le muscimol entrave la survie des nouvelles cellules dans les noyaux vestibulaires

En dépit de la très forte quantité de cellules BrdU<sup>+</sup> constatée 3 jours après l'injection du BrdU dans le groupe NVU-muscimol, 27 jours plus tard en revanche, aucune cellule néo-formée n'est observée dans les NV des animaux de ce groupe. Ainsi, si l'infusion d'un agoniste GABAergique induit une forte prolifération cellulaire 3 jours post-NVU, un mois plus tard, les nouvelles cellules n'ont pas survécu. Ces données sont à rapprocher de celles de Paul Honegger et de ses collaborateurs, qui ont rapporté que le muscimol induit la mort de neurones GABAergiques du télencéphale mis en culture tridimensionnelle chez le jeune rat (Honegger et al., 1998). Au cours du développement, l'application de GABA et de glutamate sur des coupes corticales augmente certes la prolifération cellulaire en bordure des ventricules latéraux où la prolifération cellulaire est la plus intense, mais la présence de ces neuromédiateurs au niveau de la ZSV freine la mitose des progéniteurs locaux (Haydar et al., 2000). D'autres travaux indiquent que des agonistes GABAergiques provoquent une augmentation du volume des cellules souches en phase S de la crête neurale et diminuent également leur activité mitotique (Andang et al., 2008). De plus, on sait que l'alcool, qui agit sur les récepteurs GABA<sub>A</sub>, raccourcit la survie des précurseurs neuraux de la ZSG et diminue le nombre de cellules dans le gyrus dentelé chez le rat adulte et chez l'humain (Nixon and Crews, 2002; Klintsova et al., 2007; Morris et al., 2010). Ces données révèlent donc que le GABA peut ralentir les premières étapes de la neurogenèse au cours du développement. Chez la souris adulte, il a été montré que l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> dans la ZSV augmente ponctuellement la concentration intracellulaire d'ions calcium Ca<sup>2+</sup> et réduit la prolifération de cellules « astrocyte-like », ralentissant la machinerie cellulaire (Antonopoulos et al., 1997; Liu et al., 2005; Fernando et al., 2011). Dans ce cas, le GABA agit de façon paracrine et envoie un feedback négatif enrayant l'activité mitotique, probablement lorsque celle-ci dépasse les besoins ambiants (Nguyen et al.; Platel et al., 2008). De telles données avaient déjà été décrites *in vitro* sur des progéniteurs corticaux dans les années 1990 (LoTurco et al., 1995) et également rapportées dans le striatum postnatal chez le rat (Nguyen et al., 2003) Même si les mécanismes exacts de signalisation cellulaire à l'œuvre restent encore à préciser (Alfonso et al., 2012), il apparait manifestement que le GABA possède la faculté de réduire la prolifération des cellules en division et qu'il peut moduler la permissivité neurogène locale. Nous suggérons que dans notre modèle de lésion vestibulaire chez l'animal adulte, l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> puisse dans un premier temps favoriser la prolifération cellulaire après la NVU, mais que dans un second temps, cette prolifération puisse être freinée par un phénomène d'inhibition médié par les récepteurs GABA<sub>A</sub>. Certaines études ont exposé

que le GABA pouvait influencer la destinée des nouvelles cellules du gyrus dentelé en encourageant la synthèse de NeuroD, un régulateur positif de la différenciation neuronale (Tozuka et al., 2005), néanmoins il est reconnu que la maturation et la survie des progéniteurs dépend de leur activité (Overstreet-Wadiche et al., 2006). Ainsi, dans notre étude, il est possible qu'en recevant des courants GABAergiques hyperpolarisants dus à la présence de muscimol, les progéniteurs neuraux ayant incorporé du BrdU au 3<sup>e</sup> jour post-lésionnel ne soient pas suffisamment actifs pour maturer et être sélectionnés. Cette hypothèse s'inscrirait alors parmi les causes probables menant à la disparition des cellules immunomarquées au BrdU du groupe NVU-muscimol un mois après la NVU.

Nos résultats ont également mis en évidence que la quantité la plus élevée de cellules GAD67<sup>+</sup> a été comptabilisée un mois après la NVU dans les NV du groupe infusé avec du muscimol. Cette observation ne peut être liée à la différenciation des nouvelles cellules en neurones GABAergiques puisque nous n'avons pas noté de cellules BrdU<sup>+</sup> ayant survécu à ce délai post-lésionnel. De plus, les astrocytes n'expriment pas la GAD67 (New and Rabkin, 1998), c'est pourquoi nous avons exclu la possibilité que des cellules gliales puissent être GAD67<sup>+</sup>. Trente jours après la lésion, l'accroissement du marquage GAD67<sup>+</sup> indique que des neurones pré-existants ont régulé positivement l'enzyme de synthèse du GABA. Il est envisageable que dans ces conditions post-lésionnelles, certains d'entre eux aient changé de phénotype. Enfin, la faible proportion d'astrocytes quantifiée dans ce groupe expérimental rejoint des données obtenues *in vitro* indiquant que les cellules gliales, qui possèdent des récepteurs GABA<sub>A</sub> fonctionnels, sont sensibles à l'administration d'agonistes et d'antagonistes GABAergiques (Nakamichi et al., 2009).

### 3.3 Le blocage des récepteurs GABA<sub>A</sub> par la gabazine stimule la prolifération cellulaire vestibulaire

Nos résultats ont mis en évidence que la prolifération cellulaire réactionnelle des NV désafférentés est augmentée sous infusion de gabazine, bien qu'elle soit inférieure à celle observée dans le groupe NVU-muscimol. Ce résultat suppose que le blocage des récepteurs GABA<sub>A</sub> n'est pas une entrave à l'activité mitotique dans les NV. De même, en présence de bicuculline, un autre antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>, il a été décrit que la synthèse d'ADN est augmentée dans les neurones corticaux embryonnaires mis en culture. Ceci suggère qu'en conditions physiologiques, la libération tonique de GABA participe à la régulation de la prolifération cellulaire dans le néocortex (LoTurco et al., 1995). Récemment, Ruani Fernando *et al.* ont révélé que l'accroissement du nombre de cellules prolifératrices dans la ZSV faisait suite à l'administration journalière de bicuculline (Fernando et al., 2011). De plus, Xiuxin Liu et ses collaborateurs ont montré que l'application d'un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> entraîne également une augmentation du nombre de cellules « GFAP-like » ayant incorporé du BrdU

dans la ZSV (Liu et al., 2005). Nos résultats corroborent de telles données puisque dans le groupe NVU-gabazine, outre l'accroissement du nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> dans les NV désafférentés au 3<sup>e</sup> jour post-lésionnel, une augmentation substantielle de cellules GFAP<sup>+</sup> est observée. Les astrocytes sont connus pour synthétiser des facteurs favorables à la prolifération cellulaire et à la survie de nouvelles cellules (Mori et al., 2005) ; dans le groupe NVU-gabazine, l'environnement deviendrait donc d'autant plus favorable à la neurogenèse. En outre, il peut être envisagé que dans les NV, bien que les récepteurs GABA<sub>A</sub> soient bloqués, les autres types de récepteurs GABAergiques tels que les récepteurs GABA<sub>B</sub> voire GABA<sub>C</sub> prennent le relais et constituent un itinéraire bis en réponse au GABA. Toutefois, peu d'études se sont portées sur la présence de ces récepteurs à la surface des précurseurs neuronaux, des neuroblastes ou encore des cellules gliales (Gascon et al., 2006; Sernagor et al., 2010), et l'on ignore encore leurs possibles contributions dans les zones de neurogenèse adulte.

### 3.4 L'infusion continue de gabazine après neurectomie vestibulaire favorise la survie des nouvelles cellules dans les noyaux vestibulaires

Dans le groupe NVU-gabazine, contrairement à ce qui a été observé dans le groupe NVU-muscimol, près de 70% des cellules apparues au 3<sup>e</sup> jour post-lésionnel ont survécu au délai de 30 jours. L'analyse de leurs caractéristiques phénotypiques a révélé un nombre important d'astrocytes ainsi qu'une quantité plus faible de nouveaux neurones GABAergiques comparativement aux groupes NVU-NaCl et NVU-muscimol. D'après ces résultats, nous postulons que les astrocytes possèdent un rôle bénéfique, voire trophique, à l'égard des cellules néo-formées dans les NV désafférentés. Le groupe infusé avec du muscimol est d'ailleurs celui où est comptabilisée la plus faible quantité d'astrocytes. Or, il est connu que l'activation gliale peut être favorable à l'environnement cellulaire (Barres, 2008). Dans l'hippocampe d'ailleurs, le réseau neurones-astrocytes remplit d'importantes fonctions pour le fonctionnement optimal des circuits neuronaux (Volterra and Meldolesi, 2005). La surexpression de certains facteurs de transcription tels que Neurog2 et/ou Dlx2 combinés ou non avec Mash1, conduit à la différenciation d'astrocytes réactionnels cultivés en neurosphères : dans un premier temps, ils retrouvent des propriétés propres aux cellules souches, puis se spécialisent dans une lignée neuronale glutamatergique ou GABAergique (Heinrich et al., 2010). Dans une expérience, Magdalena Götz et ses collaborateurs ont surexprimé dans des astrocytes provenant du cortex adulte lésé, un facteur de transcription particulier : le neurogenin 2 (Ngn2). Les astrocytes se sont non seulement différenciés et reprogrammés en neurones excitateurs ou inhibiteurs, mais ils ont aussi établi des contacts synaptiques avec les neurones voisins, se dotant pour certains de propriétés électrophysiologiques propres à leur nouveau phénotype (Blum et al., 2011). Même si ces données ont été obtenues *in vitro* chez l'animal sain, elles n'en sont pas moins importantes pour la réparation post-lésionnelle. Dans notre modèle expérimental, une astrogenèse et une neurogenèse GABAergique sont observées dans les NV

désafférentés sous infusion de NaCl et de gabazine ; il n'est pas exclu que certains facteurs de transcription comme Dlx2, Mash1 et/ou Ngn2 soient surexprimés dans les astrocytes et pilotent la production de nouveaux neurones GABAergiques fonctionnels. Il serait pertinent d'examiner si la surexpression de ces facteurs de transcription engendre *in vitro* une prolifération cellulaire dans le tissu nerveux des NV. En outre Noritaka Nakamichi *et al.* ont montré que l'adoption d'un phénotype neuronal ou glial était sous la dépendance d'une fine régulation entre signaux GABAergiques et glutamatergiques (Nakamichi et al., 2009). A l'avenir, déterminer si parmi les neurones produits, certains sont également de phénotype glutamatergique et possèdent des transporteurs vGluT1, GLAST ou excitatory amino acid transporter (EAAT1/EAAT2) renforcerait notre compréhension des mécanismes de plasticité propres à la compensation vestibulaire.

Dans le groupe NVU-gabazine, la proportion importante de cellules neurales produites lors du pic de prolifération cellulaire ayant survécu un mois après la NVU pourrait notamment s'expliquer en termes électrophysiologiques. Dans les zones de neurogenèse continue chez l'adulte, seulement la moitié des neurones générés parviennent à maturité ; cette régulation s'effectue de façon « expérience-dépendante », entre autres grâce à l'activation des récepteurs NMDA qui conduit à la complexification de l'arborisation dendritique des nouveaux neurones (Tashiro et al., 2006; Dupret et al., 2007; Tashiro et al., 2007; Tronel et al., 2010). L'infusion locale d'un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> après une NVU perturbe assurément l'homéostasie de l'environnement cellulaire. Il est plausible que cette manipulation expérimentale soit à l'origine de phénomènes de désinhibition participant à la hausse de l'excitabilité des neurones vestibulaire de second-ordre. Le blocage des récepteurs GABA<sub>A</sub> peut aussi amener à la mise en place de stratégies compensatoires au niveau moléculaire, rehaussant par alors l'activité intrinsèque des NV désafférentés. En considérant que les neurones néoformés dans les NV soient actifs grâce à l'administration continue de gabazine, ils pourraient alors survivre et s'intégrer fonctionnellement aux réseaux pré-existants. En effet, trente jours après la NVU, nous avons observé que les cellules colocalisant du BrdU et de la GAD67 possèdent des ramifications similaires à celles de neurones matures, attestant de leur plausible intégration aux réseaux locaux.

#### **4. Le déroulement de la compensation vestibulaire est influencé par l'infusion d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub>**

Cette étude constitue la première description des conséquences comportementales et cellulaires d'une neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) combinée à l'infusion d'agonistes et d'antagonistes GABAergiques à proximité des noyaux vestibulaires (NV). Lorsque survient un syndrome vestibulaire, plusieurs niveaux d'atteinte se recoupent les uns avec les autres : du plan moléculaire jusqu'au plan comportemental, des réflexes basiques sont affectés et fréquemment associés à des désordres végétatifs.

#### 4.1 Compensation du nystagmus horizontal spontané

Après NVU chez le chat adulte soumis à une infusion continue de muscimol, la disparition du nystagmus horizontal spontané prend quelques jours supplémentaires (13 jours) comparativement aux groupes d'animaux NVU-gabazine et NVU-NaCl qui requièrent 5 et 8 jours respectivement. Pourtant, il a été démontré que l'administration d'agonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> réduit la fréquence d'apparition du nystagmus spontané chez les animaux ayant subi une labyrinthectomie (Gliddon et al., 2005b). Cette divergence de résultats s'explique peut-être par la nature de la désafférentation vestibulaire, qui n'engendre pas les mêmes répercussions tant au niveau cellulaire que comportemental (Dutheil et al., 2011b). En outre, dans son étude chez le cochon d'inde, Catherine Gliddon a sélectivement administré les agents pharmacologiques dans les NV ipsilatéraux ou controlatéraux. En revanche, dans notre protocole expérimental, le muscimol et la gabazine ont été infusés dans le liquide cébrospinal au niveau du IV<sup>e</sup> ventricule, sans cibler l'un ou l'autre des côtés. Notre mode de diffusion non sélectif peut par conséquent représenter une autre raison à l'origine de ces résultats différents.

#### 4.2 Compensation des paramètres posturo-locomoteurs

Si Catherine Gliddon a montré dans son modèle animal que l'administration de drogues GABAergiques modifie l'expression des déficits vestibulaires sans affecter le décours temporel de la compensation vestibulaire (Gliddon et al., 2005b), d'autres études ont montré que le décours de la compensation vestibulaire peut pourtant être modifié. L'injection d'antagonistes GABAergiques accélère la compensation des déficits posturaux y compris chez l'homme, tandis que l'administration d'agonistes GABAergiques peut provoquer chez un animal pour lequel les symptômes statiques ont disparu, une décompensation réversible des déficits posturaux (Ehrenberger et al., 1982; Flohr et al., 1985).

Les déficits posturo-locomoteurs observés sous infusion de gabazine dans notre modèle animal se compensent rapidement. En effet, les chats du groupe NVU-NaCl récupèrent leurs fonctions posturo-locomotrices en 42 jours environ, tandis que les animaux du groupe NVU-gabazine sont plus précocement capables de traverser le dispositif expérimental de la poutre tournante. Ils mettent alors deux semaines de moins (30 jours) pour retrouver leurs performances pré-opératoires. D'autres études ont également révélé le rôle facilitateur d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> au cours de la compensation vestibulaire chez différentes espèces (Flohr et al., 1985; Peppard, 1986). Les travaux de Precht ont indiqué que chez des chats décérébrés et vestibulo-lésés, l'injection de bicuculline ou de picotroxine (un autre antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>) confère une action bénéfique à la compensation vestibulaire (Precht et al., 1973). En outre, l'administration de bicuculline dans les NV par

ionophorèse, d'une part, bloque la réduction de l'activité spontanée ipsilatérale médiée par les commissures vestibulaires (Furuya et al., 1991; Furuya and Koizumi, 1998) et d'autre part, augmente localement l'activité de décharge des neurones ; la conjugaison de ces deux phénomènes accélère en conséquence la compensation comportementale des animaux vestibulo-lésés (Dutia et al., 1992; Vibert et al., 1995).

Ainsi que l'a suggéré Evelyne Sernagor au sujet de l'effet neurotrogène de la bicuculline dans le bulbe olfactif, il est envisageable que le blocage des récepteurs GABA<sub>A</sub> engendre une désinhibition locale dans les NV, débouchant sur un phénomène d'excitation glutamatergique (Sernagor et al., 2010). De plus, dans le groupe NVU-gabazine, une importante réaction astrocytaire est observée dans les NV désafférentés. Or, les astrocytes sont connus pour libérer différents transmetteurs incluant le glutamate et l'ATP (Perea et al., 2009; Platel et al., 2010), notamment en conditions inflammatoires (Vesce et al., 2007). Leur nombre conséquent suivant l'atteinte vestibulaire combinée au blocage des récepteurs GABA<sub>A</sub> pourrait ainsi stimuler la libération de certains neuro- et glio-transmetteurs excitateurs favorables au retour de l'excitabilité intrinsèque des NV désafférentés, et par conséquent accélérer la restauration des fonctions posturo-locomotrices des animaux de ce groupe. En outre, dans le gyrus dentelé, 18 jours après leur production, les nouveaux neurones possèdent un seuil d'induction plus bas pour la potentialisation à long terme que celui des neurones matures (Schmidt-Hieber et al., 2004). Il serait possible qu'il en soit de même pour les nouvelles cellules des NV désafférentés : ceci faciliterait le rééquilibrage de l'excitabilité intrinsèque en faveur de la compensation vestibulaire.

Un autre résultat digne d'intérêt concerne l'infusion continue d'un agoniste GABAergique qui retarde considérablement la compensation des déficits posturo-locomoteurs des animaux neurectomisés. En effet, les chats du groupe NVU-muscimol retrouvent une fonction d'équilibration statique pré-opératoire en 104 jours (versus 42 dans le groupe NVU-NaCl) ; mais au bout de 180 jours, leurs performances d'équilibration dynamique sur le dispositif de la poutre tournante n'atteignent que 63% des valeurs contrôles. Ottavio Pompeiano *et coll.* ont rapporté que l'injection de muscimol dans le NV latéral engendrait l'hypotonie des pattes ipsilatérales et l'hypertonie des pattes controlatérales chez des chats non vestibulo-lésés, mais ayant reçu une stimulation du cortex moteur (Pompeiano et al., 1993). Le muscimol pourrait donc aggraver les désordres posturaux en accentuant l'hypotonie musculaire ipsilatérale des animaux. En effet, les chats du groupe NVU-muscimol ont mis davantage de temps pour récupérer leurs performances pré-opératoires comparativement aux chats chez lesquels la prolifération cellulaire vestibulaire avait été bloquée avec l'infusion d'un agent antimitotique (Dutheil et al., 2009). En effet, nous avons montré dans cette étude que les nouvelles cellules générées en réaction à la lésion vestibulaire participaient très probablement à la récupération des fonctions posturo-

locomotrices chez le chat adulte. Dans cette nouvelle étude, l'infusion de muscimol conduit également à la disparition des cellules néo-formées un mois post-NVU. Ainsi n'est-il pas surprenant d'observer des résultats comportementaux comparables dans ce groupe où aucune cellule BrdU<sup>+</sup> n'est détectée à J30. Dans d'autres structures tel le gyrus dentelé, il a d'ailleurs été prouvé que le blocage de la prolifération cellulaire conduit à des perturbations de l'activité neuronale, et augmente l'activité gamma des neurones ainsi que la potentialisation à long-terme (Kitamura et al., 2009; Lacefield et al., 2012). Puisque des phénomènes de potentialisation et de dépression à long-terme ont aussi été décrits dans les NV (Petrossi et al., 2003), il ne serait pas étonnant que la disparition des nouvelles cellules produites dans les NV désafférentés, combinée à l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub>, suscite des désorganisations de l'activité électrique nuisant à la compensation vestibulaire. Ces nouvelles données constituent un argument supplémentaire en faveur de la contribution des nouvelles cellules neurales vestibulaires à la compensation des déficits posturo-locomoteurs.

*Finalemment, les d'études s'intéressant aux effets du GABA dans le système nerveux central ont mis en évidence un vaste répertoire d'actions possibles, dépendant fortement des niches cérébrales et des populations cellulaires étudiées (Haydar et al., 2000). En outre, de nombreux facteurs intermédiaires indirects (i.e. facteurs de transcription, neuromédiateurs, facteurs de croissance, neurotrophines, facteurs de l'inflammation, cellules gliales, vascularisation) contribuent parallèlement aux phénomènes de plasticité observés notamment dans les NV après NVU, communiquant aussi bien avec les neurones qu'avec les autres types cellulaires du tissu nerveux. Même si Lyndell Eleore et al. ont montré qu'après destruction des récepteurs vestibulaires périphériques chez le rat, les sous-unités des récepteurs GABA<sub>A</sub> n'étaient pas modifiées (Eleore et al., 2005) il se pourrait que la section du nerf VIII chez le chat adulte puisse engendrer de tels remaniements moléculaires et influencer également sur le rôle du GABA dans les NV. Ainsi, l'expression spatio-temporelle de certaines sous-unités des récepteurs GABA<sub>A</sub>, telles que les sous-unités  $\alpha 4$  et  $\delta$  (médiante une transmission tonique) ou la sous-unité  $\alpha 2$  (responsable d'une transmission phasique) pourraient moduler, de concert avec le système glutamatergique, les différentes étapes de la neurogenèse tel que cela a été montré au cours du développement (Sernagor et al., 2010; Duveau et al., 2012).*

*En conclusion, notre étude attribue à ce neurotransmetteur un rôle-clé dans les phénomènes de plasticité post-lésionnelle dans le système vestibulaire, capable non seulement de stimuler la prolifération cellulaire, de décider du devenir des nouvelles cellules, mais aussi de calibrer le décours de la compensation vestibulaire.*

## Quatrième partie de la discussion

### Impact du stress sur la plasticité post-lésionnelle après une neurectomie vestibulaire

---

Les informations vestibulaires se combinent aux entrées visuelles et somesthésiques pour élaborer des cartes spatiales. Bien qu'aucune voie neuronale directe n'aie été décrite entre l'hippocampe et les noyaux vestibulaires, diverses connexions anatomiques polysynaptiques semblent relier les NV et l'hippocampe, cheminant par des voies thalamo-corticales ou par la formation réticulée pontique (Hufner et al., 2011). Des stimulations vestibulaires modulent d'ailleurs l'activité des cellules de direction de la tête localisés dans le thalamus (Blair and Sharp, 1996) ainsi que le taux de décharge des neurones hippocampiques en l'absence d'informations visuelles (Ohab and Carmichael, 2008). Chez l'homme, grâce à l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle, il a été possible de visualiser qu'une stimulation calorique de l'oreille interne active la formation hippocampique (Vitte et al., 1996). Il apparaît en outre que les habilités de mémorisation et d'orientation spatiales sont durablement affectées aux niveaux comportemental et cellulaire après une lésion vestibulaire (Poucet and Benhamou, 1997; Horii et al., 2004; Baek et al., 2010; McCall and Yates, 2011).

#### 1. La neurogenèse hippocampique est affectée par la suppression partielle ou totale des afférences vestibulaires

Dans notre modèle de neurectomie vestibulaire chez le chat adulte, nous nous sommes intéressé à l'impact d'une lésion unilatérale (NVU) ou bilatérale (NVB) sur la neurogenèse continue du gyrus dentelé. Nos résultats montrent que trois jours après NVU et NVB, le nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> dans la zone sous-granulaire (ZSG) a considérablement diminué par rapport aux animaux non lésés. Trente jours plus tard, dans le groupe bilatéralement lésé, le nombre de cellules néo-formées demeure comparable aux faibles valeurs relevées au délai post-lésionnel de 3 jours. Cela suggère que la permissivité neurogène de la niche de la ZSG est perturbée à long terme lorsque les afférences vestibulaires sont supprimées totalement. De telles observations seraient en adéquation avec les données comportementales recueillies auprès de patients et d'animaux lésés bilatéralement : leurs représentations spatiales sont en effet durablement perturbées (Russell et al., 2003; Brandt et al., 2005) et environ 80% des patients souffrant d'atteinte vestibulaire bilatérale ne recouvriraient pas leurs capacités spatiales pré-opératoires (Zingler et al., 2008). Chez les rongeurs, les cellules de lieu de l'hippocampe situées dans les régions CA1 et CA3 codent d'ordinaire la localisation spatiale mais ne répondent plus correctement suite à l'inactivation bilatérale des nerfs vestibulaires par la TTX

(Stackman et al., 2002; Russell et al., 2003). Ceci suggère que l'abolition des informations vestibulaires affecte le fonctionnement de l'hippocampe aussi bien aux niveaux cellulaire et comportemental, qu'électrophysiologique. Par ailleurs, les informations auditives, qui sont également acheminées par le nerf VIII jusqu'aux noyaux cochléaires du tronc cérébral, peuvent aussi moduler d'autres structures telle que l'hippocampe. Chez des rongeur soumis à des traumatismes auditifs, la mort des neurones pyramidaux et granulaires est accentuée dans la formation hippocampique (Saljo et al., 2002) tandis que le taux de décharge des cellules de lieu est affecté et que la neurogenèse hippocampique diminue à long terme (Goble et al., 2009; Kraus et al., 2010). En outre, des militaires ou d'autres individus souffrant de désordres auditifs suite à une explosion et à la propagation d'ondes de choc arborent des déficits cognitifs combinés à des altérations de la mémoire (Belanger et al., 2009). Il a aussi été montré que la survenue d'un tinnitus s'accompagne souvent de stress et de symptômes dépressifs (Halford and Anderson, 1991; Folmer et al., 1999). De telles données établissent ainsi que des conditions pathologiques touchant aux systèmes vestibulo-cochléaires peuvent moduler aussi bien la fonctionnalité que les caractéristiques structurales de l'hippocampe.

Il convient toutefois de mentionner que Yiwen Zheng et ses collaborateurs ont récemment trouvé qu'une atteinte vestibulaire bilatérale occasionne non pas une diminution, mais une augmentation du nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> dans le gyrus dentelé chez le rat (Zheng et al., 2012). Ces résultats, en désaccord avec les nôtres peuvent s'expliquer par la nature de la désafférentation induite d'une part (la lésion vestibulaire de cette étude est assimilable à une labyrinthectomie qui, comme nous l'avons montré en 2011 (Dutheil et al., 2011b) occasionne des conséquences différentes de celles induites par une neurectomie), par les faibles échantillons retenus pour chaque groupe d'autre part (inférieurs à  $n = 3$ ) et enfin par l'espèce considérée. Il se pourrait également que les marquages BrdU<sup>+</sup> reflètent des phénomènes de mort cellulaire ou de réparation de l'ADN plutôt que de prolifération cellulaire (Taupin, 2007). La quantité de cellules ayant incorporé le marqueur BrdU 72h après la désafférentation bilatérale et ayant survécu au-delà de quatre semaines demeure relativement faible et en-deçà du niveau de la prolifération cellulaire ayant cours dans le gyrus dentelé d'animaux shams (Zheng et al., 2012). Ainsi, de nombreuses cellules BrdU<sup>+</sup> élaborées trois jours après la lésion ont certainement dégénéré.

Par contraste, un mois après une neurectomie vestibulaire unilatérale chez le chat adulte, l'expression de la prolifération cellulaire dans la ZSG recouvre bilatéralement des valeurs proches de celles des animaux contrôles. Nos résultats montrent aussi que des cellules colocalisent du BrdU et du NeuN, indiquant la présence de nouveaux neurones. Il est fort intéressant de noter que les études de Thomas Brandt et de Katharina Hüfner ont révélé que si une lésion vestibulaire unilatérale ne cause pas de changements de volume de l'hippocampe chez les patients, en revanche, une atteinte bilatérale

s'accompagne d'une atrophie volumique de 16,9% de l'hippocampe dorsal. Cet effet, bilatéral et propre à l'hippocampe, est de surcroît corrélé à de faibles performances lorsque les patients évoluent dans une variante virtuelle de la piscine de Morris (Schautzer et al., 2003; Brandt et al., 2005). Il serait intéressant d'étudier, à l'aide de techniques d'imagerie par résonance magnétique, si une diminution de volume hippocampique survient également à long terme dans notre modèle animal de neurectomie vestibulaire bilatérale. Chez le rat héli-labyrinthectomisé, six mois sont nécessaires pour qu'il retrouve des performances similaires aux animaux contrôles, tandis que des déficits persistent au-delà de 14 mois post-opératoires chez ceux qui ont été lésés bilatéralement (Zheng et al., 2006; Baek et al., 2010). Ainsi, d'après ces données, la suppression totale des afférences vestibulaires, qui affecte chez le chat la prolifération des cellules neurales de la ZSG, pourrait-elle également être à l'origine de perturbations des facultés de mémorisation et d'orientation spatiale telles qu'elles ont été relatées chez les rongeurs et les patients humains (Smith et al., 2010a). D'ailleurs, un blocage ou un dérèglement de la neurogenèse hippocampique engendre également des troubles cognitifs en lien avec la mémoire spatiale à long terme (Snyder et al., 2005; Koehl and Abrous, 2011; Lemaire et al., 2012) et l'intégration continue de nouvelles cellules hippocampiques serait l'un des mécanismes de plasticité soutenant la mémoire spatiale. Les cellules néoformées possèdent en outre un seuil d'induction de la potentialisation à long terme inférieur à celui des neurones matures et facilitent la plasticité synaptique sous-tendant l'acquisition de nouvelles connaissances et l'adaptation aux demandes environnementales (Aimone et al., 2010). Il a aussi été décrit qu'entraîner des rats à exécuter des tâches sollicitant l'hippocampe stimule la survie des neurones néoformés dans la ZSG (Gould et al., 1999b). D'après cet ensemble de résultats, nous pouvons envisager l'existence d'un lien de causalité entre la lésion vestibulaire, la neurogenèse dans la ZSG et les désorganisations spatio-cognitives. La compensation vestibulaire peut, du reste, être considérée comme un processus de réapprentissage sensori-moteur impliquant entre autre l'hippocampe (Lacour et al., 1981). L'une des hypothèses qui pourrait rendre compte des perturbations spatio-cognitives relevées dans la littérature scientifique ainsi que de la diminution de la neurogenèse hippocampique suite à un désordre vestibulaire, pourrait impliquer le stress occasionné par une désafférentation vestibulaire (MacLennan et al., 1998).

## **2. Stress, prolifération cellulaire et compensation vestibulaire**

Placer des animaux dans un environnement hypo- ou hyper-gravitaire ou les soumettre à des accélérations engendre une réaction de stress sollicitant l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien combinée à l'activation de certaines structures hypothalamiques, tel que le noyau paraventriculaire (Gustave Dit Duflo et al., 2000; Murakami et al., 2002). Ce dernier synthétise la corticolibérine (CRF) et l'arginine vasopressine (AVP) qui conduisent *in fine* à la libération de glucocorticoïdes. Le syndrome vestibulaire s'inscrit également comme un phénomène anxiogène, tant au niveau comportemental que

cellulaire. Une interruption des afférences vestibulaires perturbe vraisemblablement l'homéostasie cérébrale et occasionne chez toutes les espèces une série de symptômes aussi invalidants que stressants. Après une LU chez le rat ou une NVU chez le chat, l'activité des neurones du noyau paraventriculaire s'accroît, sous-tendant une réponse adaptative au stress causé par la lésion vestibulaire (Cameron and Dutia, 1999; Gustave Dit Duflo et al., 1999).

Il a été décrit l'existence de marquages CRF<sup>+</sup> ainsi que de récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'ensemble des noyaux vestibulaires (Lindsay et al., 2005; Zhang et al., 2005). Bien que l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien soit activé à long-terme après une neurectomie vestibulaire chez le chat (Tighilet et al., 2009) ou une LU chez le rongeur (Gliddon et al., 2003b), le CRF est régulé négativement dans les NV. Ceci suggère l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négative qui pourrait octroyer une action bénéfique au tissu ; en effet, de faibles concentrations de glucocorticoïdes sont capables de favoriser la neuroprotection, voire la neurogenèse (Lyons et al., 2010; Parihar et al., 2011). En outre, les stéroïdes peuvent moduler l'activité des neurones du MVN en agissant sur les récepteurs AMPA/kainate et GABA<sub>A</sub> (Seemungal et al., 2001; Grassi et al., 2007). Dans les NV, zone de haute plasticité post-lésionnelle, l'impact du stress serait ainsi limité au cours de la compensation vestibulaire mais se répercuterait sur d'autres structures centrales.

Une équipe de recherche a démontré qu'il existait une voie anatomique polysynaptique dite « vestibulo-paraventriculaire », reliant les NV et le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Markia et al., 2008). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Nos résultats montrent qu'après une NVU et une NVB, le nombre de cellules CRF<sup>+</sup> augmente significativement dans le noyau paraventriculaire trois jours après la lésion. Cette augmentation est même légèrement supérieure dans le groupe NVB comparativement au groupe NVU. Elle se maintient un mois après la lésion pour les deux groupes expérimentaux, en accord avec les données obtenues antérieurement dans le laboratoire (Tighilet et al., 2009). D'autres équipes de recherche ont de même indiqué des augmentations de cortisol et de corticostérone chez l'homme et chez le rongeur après atteinte vestibulaire (Gliddon et al., 2003b; Horner and Cazals, 2005; van Crujisen et al., 2005) mais ces données restent contrastées chez l'animal (Lindsay et al., 2005; Zhang et al., 2005).

Il est reconnu que le stress remodèle structurellement le tissu nerveux et qu'il est à l'origine de microlésions (Wager-Smith and Markou, 2011). Des changements mineurs dans l'arborisation dendritique peuvent en effet avoir des répercussions sur les propriétés biophysiques des neurones, allant jusqu'à perturber les capacités cognitives des animaux (Mainen and Sejnowski, 1996). En outre, il est

admis que non seulement l'hippocampe possède de nombreux récepteurs aux glucocorticoïdes, mais aussi que la libération de corticostérone diminue la neurogenèse du gyrus dentelé et affecte les capacités cognitives des animaux (Issa et al., 1990; Cameron and McKay, 1999; Montaron et al., 2006). Par conséquent, la régulation positive de cellules CRF<sup>+</sup> dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus pourrait illustrer dans notre modèle la baisse de la prolifération cellulaire se répercutant dans le gyrus dentelé après une lésion vestibulaire (NVU et NVB) d'une part, et justifier certains déficits cognitifs consécutifs à une atteinte vestibulaire d'autre part. Une telle hypothèse a aussi été formulée par Kari Kraus et ses collaborateurs pour rendre compte de la diminution du nombre de cellules néoformées dans l'hippocampe après avoir soumis des rats à des traumatismes sonores (Kraus et al., 2010).

Nos données indiquent également qu'un mois post-NVU, malgré la quantité importante de marquages CRF-immunopositifs maintenus dans le noyau paraventriculaire, la prolifération cellulaire augmente de nouveau dans le gyrus dentelé alors qu'elle demeure très faible dans le groupe NVB. Ces observations laissent supposer que d'autres facteurs proneurogènes (gliogenèse, angiogenèse, libération de neuromédiateurs, de peptides et de facteurs de croissance) priment dans la niche neurogène, atténuant l'impact de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien lorsque des afférences vestibulaires (du côté non-lésé) parviennent encore à l'hippocampe. De surcroît, après une hémilabyrinthectomie, des phénomènes de plasticité à long-terme tels que des diminutions des récepteurs aux glucocorticoïdes ou encore des changements de sous-unités des récepteurs NMDA ont été décrits dans l'hippocampe (Liu et al., 2003; Lindsay et al., 2005). De telles modifications à l'échelle moléculaire pourraient expliquer que les hormones du stress, principalement connues pour moduler négativement la prolifération cellulaire, puissent conférer des actions antagonistes (anti-neurogènes puis proneurogènes) à des délais post-lésionnels différents. Il est intéressant de noter également qu'un stress d'origine vestibulaire stimule des neurones noradrénergiques du locus coeruleus et encourage la libération de noradrénaline dans les NV. Il est connu que le stress active aussi les neurones catécholaminergiques de certains noyaux du tronc cérébral qui, en réponse, libèrent de la noradrénaline (Habib et al., 2001; Tighilet et al., 2009). Or, ce neuromédiateur possède un effet protecteur sur les neurones de la ZSV (Bauer et al., 2003) et accentue la prolifération cellulaire dans la ZSG (Jhaveri et al., 2010; Masuda et al., 2012). Ainsi est-il envisageable qu'au cours de la compensation vestibulaire, l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien puisse conduire à promouvoir un environnement neurogène grâce à la libération de facteurs tels que la noradrénaline.

Enfin, le stress est capable de moduler le décours de la compensation vestibulaire, et même de l'accélérer jusqu'à un certain seuil ; au-delà, une anxiété importante a tendance à aggraver les

symptômes (Yamamoto et al., 2000; Dutia, 2010). Certains auteurs ont avancé que la dépression défavorisait la récupération des fonctions vestibulaires chez les patients vestibulo-lésés (Guidetti et al., 2008). D'ailleurs, ces derniers présentent souvent des symptômes anxio-dépressifs, et réciproquement, des personnes stressées et/ou atteintes de dépression majeure peuvent subir des troubles vestibulaires (Kalueff et al., 2008; Smith et al., 2010b). De tels désordres s'expliqueraient en partie par les relations existant entre le système vestibulaire et le système nerveux autonome.

*En conclusion, nos résultats indiquent que la compensation vestibulaire rallie un vaste éventail de phénomènes de neuroplasticité qui s'agencent à de multiples niveaux, de l'échelle génétique à l'échelle comportementale. Ces mécanismes concourent à la restauration de fonctions nerveuses endommagées ainsi qu'à la compensation des déficits vestibulaires. Il apparaît que la neurogenèse des NV et celle de la ZSG en sont des contributeurs importants. Leur expression, régulée à divers niveaux, est notamment affectée par le stress consécutif à l'atteinte vestibulaire. Il serait ainsi intéressant de stimuler positivement la prolifération cellulaire dans la ZSG les jours suivant une neurectomie vestibulaire, afin d'examiner la survie des nouvelles cellules et la récupération comportementale des animaux. Le niveau d'expression de la neurogenèse hippocampique ainsi que le décours de la restauration fonctionnelle pourront également être appréciés par le blocage et la stimulation in vivo de facteurs du stress.*

## Conclusions et perspectives

Les différentes pathologies du système vestibulaire sont extrêmement invalidantes (vertiges, nausées, vomissements, pertes d'équilibre et de repères spatiaux). Comprendre comment le système nerveux central s'adapte et autorise une récupération comportementale après une lésion est un préalable au choix de traitements ciblés, ainsi qu'à la mise en œuvre de meilleures procédures de réhabilitation. Nos différents modèles expérimentaux de désafférentation vestibulaire reproduisent non seulement des pathologies à survenue rapide (névrite vestibulaire, neurinome de l'acoustique, chirurgie de la maladie de Ménière) ou progressive (vieillesse), mais servent aussi de méthode curative prescrite à certains patients. En effet, la labyrinthectomie et la neurectomie vestibulaires sont deux pratiques chirurgicales proposées aux patients résistant aux traitements pharmacologiques. Ainsi l'étude des mécanismes de plasticité post-lésionnelle chez le chat adulte représente-t-elle un cadre d'observation pertinent non seulement pour la recherche fondamentale, mais aussi pour la recherche appliquée.

En outre, la procédure expérimentale de neurectomie vestibulaire chez le chat adulte s'inscrit comme un modèle original, novateur et particulièrement facile à étudier pour cerner les modulateurs qui concourent à l'induction d'un environnement neurogène. D'un point de vue phylogénétique, le tronc cérébral fait partie des plus anciennes zones de l'encéphale et est le siège d'une neurogenèse continue notamment chez les oiseaux (Ferretti, 2011). Il est vraisemblable que le tissu nerveux ait conservé des traces de potentialité neurogène dans certains noyaux du tronc cérébral. Cette faculté pourrait ainsi s'exprimer dans des conditions lésionnelles particulières, promptes à déverrouiller les restrictions neurogènes en vigueur. En effet, après une lésion, le système nerveux semble récapituler des étapes du développement pour réparer le tissu et palier la zone atteinte. Pour ce faire, il puise dans le répertoire de facteurs intrinsèques dont il dispose (libération de neurotrophines, de facteurs de l'inflammation, de neuromédiateurs, remodelage synaptique, recrutement de cellules gliales et microgliales, accroissement des interactions neuro-vasculaires).

Durant la première semaine après la section du nerf vestibulaire, une vaste variété de mécanismes de plasticité se conjuguent de façon combinatoire et hiérarchique à l'intérieur des noyaux vestibulaires (NV) : une astrogenèse et une neurogenèse surviennent dans une période de temps délimitée, les neurones préexistants régulent positivement l'enzyme de synthèse du GABA ou de l'acétylcholine. L'expression de certains neuromédiateurs comme l'histamine augmente parallèlement à la libération de



- *Migrent-ils depuis d'autres zones de neurogenèse telles que la zone sous-ventriculaire ou les noyaux du complexe vagal dorsal ?*
- *Quelles caractéristiques structurales possèdent-ils ?*
- *S'apparentent-ils à des cellules de type B ou de type 1 (astrocyte-like) ?*
- *Quels facteurs précis concourent au déverrouillage de l'environnement neurogène dans les NV seulement après section du nerf vestibulaire ?*
- *Les NV désafférentés deviennent-ils effectivement une zone neurogène permissive après NVU ?*  
Si l'on transplante des précurseurs neuraux issus du gyrus dentelé et/ou de la ZSV dans les NV désafférentés, survivent-ils et se différencient-ils en neurones requis par le tissu hôte ?
- *Les cytokines proinflammatoires semblent nécessaires pour convertir les astrocytes en astrocytes réactifs. Une autre piste intéressante pourrait consister à limiter la réponse inflammatoire en bloquant la réaction microgliale et, indirectement, la réaction astrocytaire (Tian et al., 2007a). Ainsi, la contribution de la neurogenèse après NVU pourrait-elle être distinguée de celle de l'astrogliose.*
- *L'expression de cotransporteurs cation chlorure NKCC1 et KCC2 est-elle modifiée dans les NV suite à une neurectomie vestibulaire ?* De telles modulations pourraient faire partie des mécanismes de plasticité post-lésionnelle contribuant au retour de l'excitabilité électrique entre NV homologues. En effet, la régulation positive de NKCC1 et/ou la régulation négative de KCC2 participeraient à l'accroissement de l'excitabilité neuronale, notamment en présence de GABA.

Ainsi, de nombreux axes de recherche demeurent à explorer aussi bien dans le domaine de la plasticité post-lésionnelle, que dans celui des cellules souches neurales, promettant d'importantes retombées dans le domaine médical.

# Annexes



# Tell Me Your Vestibular Deficit, and I'll Tell You How You'll Compensate

**Michel Lacour, Sophie Dutheil, Brahim Tighilet,  
Christophe Lopez, and Liliane Borel**

*Aix-Marseille Université, UMR 6149 Université de Provence/CNRS,  
Marseille Cedex 03, France*

Most patients with unilateral vestibular loss exhibit a similar static and dynamic vestibular syndrome consisting of vestibulo-ocular, posturolocomotor, and perceptive deficits. This vestibular syndrome recovers more or less completely and more or less rapidly over time. One open question is whether recovery mechanisms differ according to vestibular pathology and/or patients. It is reported here (1) data from three different cat models of unilateral vestibular loss reproducing vestibular pathology with sudden (unilateral vestibular neurectomy [UVN] model), gradual (unilateral labyrinthectomy [UL] model), or reversible (tetrodotoxine [TTX] model) loss of vestibular function, and (2) clinical observations in a population of unilateral vestibular loss patients suffering the same pathology (Menière's disease). Animal models show that time courses and mechanisms of recovery depend on the type of vestibular deafferentation, and clinical findings show that Menière's patients compensate their postural and perceptive deficits using different vicarious processes. Taken together, results point to a more complex picture of compensation after unilateral vestibular loss, which cannot be reduced either to a common recovery mechanism or to a single process identical for all individuals. These findings should guide physiotherapists in treatment and rehabilitation for vestibular deficits.

**Key words:** vestibular pathology; unilateral vestibular neurectomy; unilateral labyrinthectomy; tetrodotoxine; posturo-locomotor function recovery; neurogenesis; idiosyncratic vicarious processes; cat; Menière's disease

## Introduction

The anatomical and functional organization of the vestibular system is now well understood,<sup>1,47</sup> and its contribution to a wide range of functions, from postural and oculomotor reflexes to spatial representation and cognition, has recently been underscored.<sup>9</sup>

Afferent fibers contacting sensory type I and type II hair cells have their cell bodies located in Scarpa's ganglion. Axons from these bipolar cells group into different branches of the vestibular nerve and project onto four main

vestibular nuclei (VN) in the brain stem. Three types of Scarpa's ganglion neurons can be distinguished on the basis of their anatomical and functional characteristics: neurons with chalice-like dendritic terminals innervating the center of the sensory epithelium (type I sensory cells), with an irregular resting discharge and a fast adaptation to prolonged stimulation (phasic units); neurons with "en bouton" dendritic terminals innervating the periphery of the sensory epithelium (type II sensory cells), with a regular resting discharge and no adaptation to sustained stimuli (static units); and dimorphic neurons contacting both type I and type II cells in the sensory epithelium and exhibiting mixed response properties (phasicotonic units). Second-order vestibular neurons located in the VN complex show resting discharge averaging

Address for correspondence: Michel Lacour, Aix-Marseille Université, UMR 6149 Université de Provence/CNRS, Pôle 3C, Case B, Centre de St. Charles, 3 Place Victor Hugo – 13331 Marseille Cedex 03, France. michel.lacour@univ-provence.fr

40 impulses/s in many species. These vestibular neurons receive convergent multimodal sensory inputs from the visual and somatosensory systems and, additionally, from the contralateral VN (via the commissural pathways), the cerebellum and the cerebral cortex. The VN complex projects to ocular and spinal motoneurons and influences the stabilization and orientation of gaze, of the head and of the body in space. The VN also projects to various cortical areas implicated in self- as well as extrapersonal perception and, consequently, vestibular inputs contribute to high-level functions like internal spatial representation.

The vestibular syndrome observed after lesion in the periphery involves successive levels of damage, from basic reflex problems to higher-order deficits.<sup>12,13,23</sup> Patients with unilateral vestibular loss suffer primarily from balance and gait problems related to an impaired vestibulospinal reflex, oscillopsia corresponding to impairment of the vestibulo-ocular reflex, and perceptive deficits, including vertigo and spatial disorientation. This syndrome completely ameliorates over time, in a process described in the literature as “vestibular compensation.”<sup>12,13,23,45</sup>

While neural plasticity mechanisms and their relation to functional recovery have been thoroughly investigated in many species,<sup>14</sup> many open questions remain. Why, for example, can the time course of recovery be so different between patients? Are distinct recovery mechanisms involved in different vestibular pathologies? Why do some unilateral vestibular-loss patients remain poorly compensated while others do not? Are there different ways to compensate a given pathology, with some being more efficient than others?

The first objective of this chapter is to assess whether recovery-time courses and mechanisms are strongly dependent on vestibular pathology. This point is illustrated by investigations in three experimental models of unilateral vestibular loss, corresponding to pathologies with sudden, gradual, and reversible vestibular

deficits. Clinical observations in Menière’s patients are reported in a second part, wherein it is shown that although patients suffer from the same disease and are treated surgically in the same way, they recover by using different strategies or reference frames.

## **Vestibular Pathologies and Corresponding Animal Models**

Unilateral vestibular-defective patients complain of similar symptoms (vertigo, oscillopsia, dizziness, and instability) despite vestibular pathologies of different origins. Indeed, many pathology conditions can affect peripheral vestibular function,<sup>10</sup> and clinical classification based on degenerative disorders, acquired disorders of known cause, and acquired disorders of unknown (or multiple) causes was proposed by Schuknecht.<sup>39</sup> The basic pathophysiological mechanisms of vestibular deficits include the loss of sensory hair cells or neuronal cells, alteration of the hydrodynamics and motion mechanics of the inner ear, and paralysis of sensorineural function. The severity of the initial deficits as well as the recovery-time course of vestibular compensation are believed to differ according to the various underlying pathologies. Furthermore, since mechanisms of plasticity after brain injury are found to be strongly dependent on the nature of the lesion (total versus partial, acute versus chronic, fast versus slow starting), one can assume that recovery mechanisms should likewise differ.

### **Gradual and Partial Loss of Unilateral Vestibular Function**

With advancing age come impairments of most sensorimotor and cognitive functions, and these include degenerative changes in the vestibular system. In fact, age-related degenerative changes are the most common cause of gradual and partial loss of vestibular function. Reductions in the sensory hair-cell populations averaging 20% for the maculae and 40% for

the crista ampullaris were reported in individuals over 70 years, albeit with significant interindividual variations.<sup>34,35</sup> This finding was confirmed by Merchant and colleagues<sup>30</sup> in their normative data on sensory hair-cell count in the vestibular organs of individuals from birth to 100 years of age. The authors found a similar significant loss of type II cells with increasing age in the maculae and the crista of all three canals, and a significant loss of type I cells at a rate greater in the cristae than in the maculae. A parallel reduction in the number of vestibular nerve fibers, averaging 37%, was reported in individuals between 75 and 85 years of age compared with individuals below 35 years of age, again with pronounced interindividual variations.<sup>3</sup> Furthermore, and corresponding to changes in their vestibular afferent pattern, the vestibular nuclei showed a neuronal loss averaging 3–5% per decade between the ages of 40 and 93 years, as well as a decreased volume of the VN complex.<sup>28,41</sup>

Acoustic neuroma may affect vestibular nerve fibers and afferent vestibular inputs to the VN complex in a fashion similar to age-related changes. A tumor's size and its growth speed are two factors contributing to the altered transmission of vestibular input to the VN. Progressive and partial loss of vestibular function is found in the case of small-size tumors or even larger vestibular schwannomas of the cerebellopontine angle that fill the internal auditory canal. In this latter case, a slow-growing schwannoma induces progressive pressure atrophy of the cochlear and vestibular nerve trunks. In contrast, a faster and more complete loss of vestibular function is expected with larger acoustic neuromas exhibiting fast growth, or as a consequence of removing the tumor during surgery.

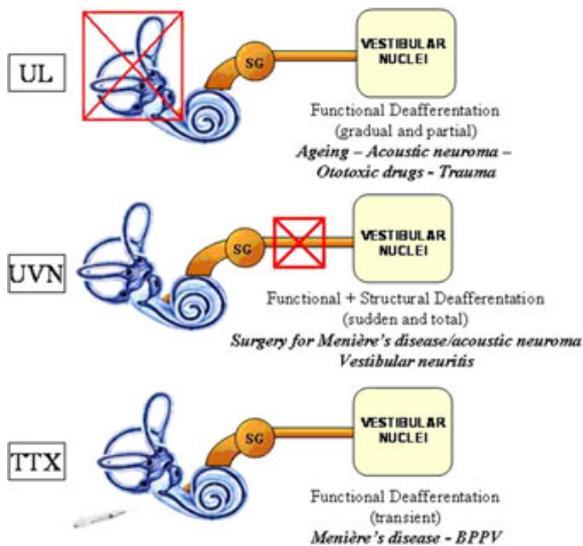
In spite of age-related degenerative changes that start as early as 40 or 50 years of age,<sup>28</sup> the critical impact of these changes on balance function is seen about 30 years later.<sup>2,46</sup> This strongly suggests that reduction in the vestibular input may be compensated for by other sensory cues, including visual

and proprioceptive inputs.<sup>10,29</sup> Sensory substitution processes have been reported in both vestibular-defective patients and animal models of vestibular deafferentation.<sup>23</sup> Consistent with this phenomenon are reports of individuals free of signs of vestibular deficit, or showing few symptoms for a long time, in spite of vestibular schwannoma. Because the central nervous system (CNS) is able to gradually adjust, slow tumor-induced degenerative changes in these patients can be compensated for online. Reweighting of remaining sensory cues is very likely involved, and this does not exclude local structural reorganizations within the VN.

Ototoxic drugs (aminoglycosides like gentamicin or streptomycin) and trauma of the head (fracture of the temporal bone, otitic barotrauma, whiplash-associated disorders) are other known causes of peripheral vestibular disorders inducing gradual loss of sensory cells and primary vestibular neurons. Progressive loss of sensory hair cells, for instance, is seen with streptomycin, and the amount of sensory cell loss depends on drug dosage and the duration of treatment, with a higher sensitivity for the hair cells of the semicircular canals compared to those in the utricle and saccule.

### **Animal Model**

The animal model corresponding to gradual and partial loss of unilateral vestibular function employs a unilateral labyrinthectomy (UL) to achieve deafferentation. This lesion of the peripheral vestibular system, which spares Scarpa's ganglion, causes progressive degenerative changes characterized—in the cat—by slow transganglionic degeneration of vestibular nerve fibers. This process continues for several years after UL.<sup>37</sup> Additionally, Scarpa's neurons continue to feed VN neurons with afferent tonic input related to resting discharge of their axons.<sup>19</sup> The UL model, therefore, reproduces a partial and gradual deafferentation of the VN cells. Deafferentation of the VN complex is more functional than structural within this model (Fig. 1).



**Figure 1.** Animal models of vestibular pathologies. Three animal models of unilateral vestibular loss are illustrated: unilateral labyrinthectomy (UL: **upper panel**), unilateral vestibular neurectomy (UVN: **middle panel**), and transtympanic injection of tetrodotoxin (TTX: **lower panel**). The UL, UVN, and TTX models reproduce gradual, sudden, and transient unilateral loss of vestibular function, respectively, and are supposed to mimic more or less accurately different vestibular pathologies or diseases (see text). (Abbreviation: SG, Scarpa's ganglion.)

### Sudden and Total Loss of Unilateral Vestibular Function

The best way to cause a sudden and complete unilateral loss of vestibular function is to surgically cut the vestibular nerves on one side. This procedure induces a total structural (loss of anatomic connections) and functional (loss of all vestibular information) deafferentation of the ipsilateral VN complex. One example of this type of deafferentation is Menière's patients who undergo a curative vestibular neurectomy, while a second one consists of those patients treated surgically for acoustic neuromas and vestibular schwannomas, since the vestibular nerves are cut when the tumor is removed.

Among the most common causes of fast-onset total (or subtotal) destruction of peripheral vestibular function are ischemic necrosis, head trauma, and bacterial and viral labyrinthitis. Another classic example of acute unilateral

loss of vestibular function is vestibular neuritis. Postmortem exams in patients with vestibular neuritis may reveal a complete atrophy of the vestibular nerve branches on the affected side with no accompanying morphological changes to the ipsilateral vestibular end organs, whereas both vestibular nerve and sensory hair cells appear normal on the unaffected side.

### Animal Model

The cat model of unilateral vestibular neurectomy (UVN) reproduces very well a total and sudden loss of vestibular function. Postganglion axotomy due to UVN associates functional deafferentation of the VN complex (UL model) with structural (anatomic) deafferentation, since all primary vestibular afferents degenerate (Fig. 1). Fast Wallerian degeneration after UVN contrasts with the relatively slow transganglionic degeneration of vestibular nerve fibers after UL.<sup>22</sup> In this case, however, one important difference in between the animal model and the corresponding human vestibular pathology is the absence of compensatory processes prior to UVN in the cat.

### Transient Impairment of Unilateral Vestibular Function

Patients with Menière's disease show dramatic vestibular symptoms during their crises, but often have few objective findings between attacks. A typical clinical picture involves recurring episodes of severe vertigo with nausea and vomiting, fluctuating hearing loss, and tinnitus. It was hypothesized that overaccumulation of endolymph results in recurring paroxysmal contamination of the perilymph with neurotoxic ( $K^+$ ) endolymph.<sup>38</sup> Periodic endolymphatic membrane ruptures, with subsequent transient potassium palsy of the vestibular nerve fibers, were also postulated as the causative factor for vertigo attacks and postural instability in Menière's disease.

Benign paroxysmal positional vertigo (BPPV), the most common cause of peripheral vertigo induced by vestibular end-organ

disorder, also can be seen as a reversible and partial dysfunction of the peripheral vestibular system. The clinical picture of this disorder is violent vertigo and intense nystagmus associated with head movement in the plane of the affected semicircular canal, or with changes in head position. Patient history is usually quite typical, and a positive response to the Hallpike maneuver test is virtually diagnostic. Cupulolithiasis has been proposed as a pathophysiological mechanism,<sup>36</sup> but there are now convincing arguments instead for canalolithiasis and a “heavy clot-induced” endolymph flow mechanism as the causative factor. Lying on the affected side, for instance, moves free-floating endolymph particles and produces a particle-induced endolymph current that displaces the cupula away from the utricle. The result is an increase in the resting discharge rate of first-order vestibular neurons in Scarpa’s ganglion, which creates the static vestibular asymmetry in the resting activity between the two VN complexes and results in the BPPV symptoms of nystagmus and vertigo attack. Avoidance of specific aggravating head movements, however, prevents this transient impairment and allows patients to remain symptom free. BPPV may resolve itself spontaneously over weeks or months, and can be treated effectively with physiotherapy that employs the liberatory maneuver<sup>40</sup> or modified otolith repositioning procedures.

### **Animal Model**

One means of reproducing transient unilateral loss of vestibular function in an animal model is to block primary vestibular afferents’ resting discharge with tetrodotoxine (TTX). Transtympanic TTX injection functionally deafferents the VN complex on the injected side, and creates postural and oculomotor syndromes similar to those observed after UL.<sup>11</sup> TTX vestibular syndrome is reversed once the drug has cleared the system several days after TTX injection, and the time course of this recovery is dose-dependent. Although the TTX model mimics transient uni-

lateral loss of vestibular function, its mechanism is not closely analogous to known vestibular pathologies.

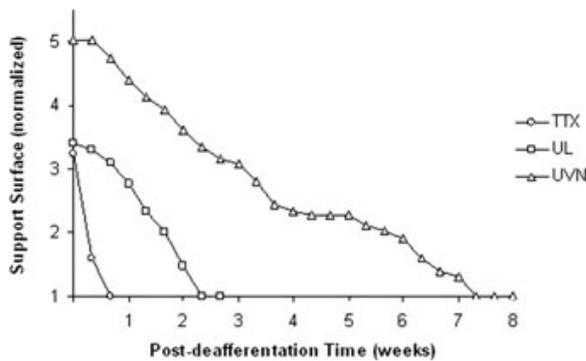
## **Animal Models of Vestibular Pathologies Do Not Recover Similarly**

Here we report data collected from our three experimental models of unilateral vestibular loss. We investigated the time course of posture recovery in TTX, UL, and UVN cats using behavioral tests and immunohistochemical methods to measure reactive neurogenesis (cell proliferation and differentiation) as a possible underlying recovery mechanism within the VN using. Readers may refer to our original papers on behavior<sup>15,42,43,48</sup> and immunohistochemistry<sup>15,44</sup> for more details.

### **The Time Course of Recovery Depends on the Type of Vestibular Loss**

After TTX injection, UL, or UVN, all animals exhibited the typical vestibular syndrome consisting of ocular nystagmus, postural asymmetry, and falls toward the lesioned side. Postural syndrome was qualitatively similar in all three cat models of unilateral vestibular loss. Initial postural signs comprised head tilt and falls toward the side of the lesion, and postural asymmetry with an increase in support surface. The recovery time course from the initial deficits were, however, quantitatively different between cat models.

Figure 2 illustrates the mean time courses of posture recovery recorded in the TTX, UL, and UVN cats. TTX-treated cats showed lower initial deficits and faster recovery compared to the others. On average, the postinjection normalized support surface was 3.3 times larger in this group than control measurements taken before TTX treatment, and animals fully recovered within one week. The UL cats exhibited similar initial postural deficits, but took longer (around two weeks) to fully recover. UVN cats



**Figure 2.** Posture recovery depends on the type of vestibular loss. Time course of posture recovery in the three experimental models of unilateral vestibular loss in cats: unilateral vestibular neurectomy (UVN: *open triangles*), unilateral labyrinthectomy (UL: *open squares*), and unilateral transtympanic injection of tetrodotoxin (TTX: *open circles*). Support surface (on the ordinates) was evaluated in  $\text{cm}^2$  and normalized with respect to the prelesion values referred to unity for each cat as a function of the postdeafferentation time (*abscissae*, in weeks). Significant differences ( $P < 0.001$ ) were found in the recovery profiles between UVN and UL animals, and between UL and TTX cats. (Modified from Dutheil *et al.*<sup>15</sup>)

exhibited the largest postural deficits of the three groups in the days following vestibular lesion (5 times the control value) and the longest time period for recovery. On average, a return to normal posture required six weeks or more in the UVN group.

### Recovery Mechanisms Depend on the Type of Vestibular Loss

Neurogenerative capacity of the adult central nervous system may help promote endogenous repair of the adult CNS after stroke or injury.<sup>20</sup> At least part of the behavioral recovery process after vestibular lesion has been attributed to plastic events in the deafferented VN.<sup>14,23</sup> The question of whether cell proliferation and differentiation, a repair process involved in CNS structures after deafferentation,<sup>21</sup> was also present in our different models of vestibular deafferentation was, therefore, of interest.

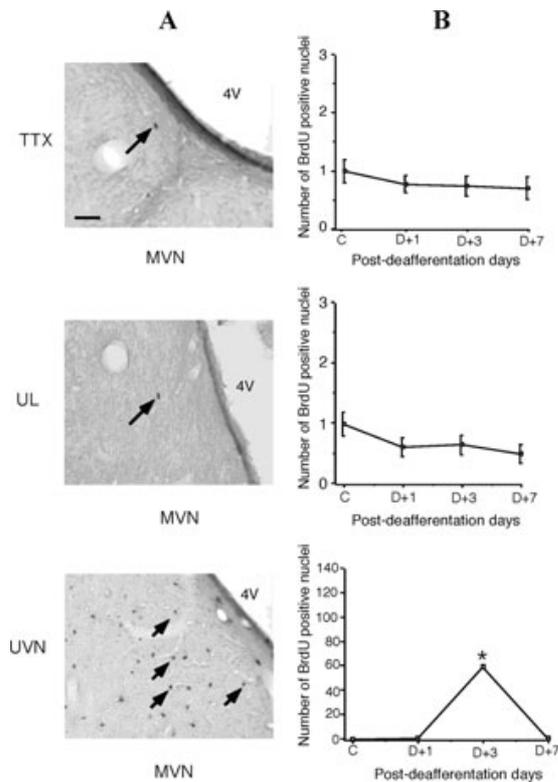
We provided the first demonstration of reactive neurogenesis in the deafferented VN in our

UVN model. A high number of dividing cells with typical 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) - immunoreactive nuclei were found exclusively in the deafferented VN, with a peak in cell proliferation at 3 days after UVN.<sup>44</sup> Most of the newly generated cells survived up to one month after UVN and gave rise to a variety of cell types. Confocal analyses revealed three cell lineages: a low proportion of microglial cells (OX 42/BrdU-immunoreactive cells), high proportions of astrocytes [glial fibrillary acidic protein (GFAP) /BrdU-immunoreactive cells], and newly generated neurons [neuronal nucleus (NeuN) /BrdU-immunoreactive cells]. All the newly generated neurons consisted of small- and medium-sized GABAergic neurons. The functional role of reactive neurogenesis was further investigated by injecting the UVN cats with antimetabolic drugs, which completely block cell proliferation. Results showed antimetabolic-induced dramatic delay of compensation for both ocular motor and posture deficits,<sup>16</sup> suggesting that the newly generated GABAergic neurons play an important role in the recovery process.

In contrast, newly generated neurons are totally absent in the TTX and UL cats. Figure 3A illustrates BrdU-immunostaining in the deafferented medial VN of representative UVN, UL, and TTX cats examined 3 days after vestibular deafferentation. Whereas intense cell proliferation peaked at 3 days in the UVN animals, no cell proliferation was observed in the UL and TTX cats (Fig. 3B). We can conclude, then, that reactive neurogenesis is a plasticity mechanism restricted to the UVN model.

### Conclusions

Taken together, our results demonstrate that both recovery profile and underlying recovery mechanisms differ according to the type of vestibular deafferentation. Transient (the TTX model) and gradual (the UL model) loss of vestibular function are compensated faster than acute and sudden vestibular loss (the UVN model), and do not involve reactive



**Figure 3.** (A, B) Recovery mechanisms depend on the type of vestibular loss. Cell proliferation in the deafferented medial vestibular nuclei (MVN) in the three animal models of unilateral vestibular loss in cats: unilateral vestibular neurectomy (UVN), unilateral labyrinthectomy (UL), and unilateral transtympanic injection of tetrodotoxin (TTX). Cell proliferation in response to vestibular deafferentation was performed by injection of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), a marker of cell mitotic activity. (A) Photomicrographs of BrdU immunostaining in the medial VN of UVN, UL, and TTX of cats observed 3 days after vestibular deafferentation. Note the intense cell proliferation in the UVN cats (arrows) contrasting with the total lack of newly generated cells in both the UL and TTX animals. (Scale bar: 50  $\mu$ m. 4V: fourth ventricle.) (B) Quantification of the number of BrdU-positive nuclei in the medial VN. Compared to control cats (C), there is no change in the TTX and UL animals, whatever the postdeafferentation time (in days: *abscissae*). In contrast, there is a peak of cell proliferation at 3 days (D + 3) after UVN (Modified from Dutheil *et al.*<sup>15</sup>)

neurogenesis as a probable key recovery mechanism. In addition, microglial and astroglial reactions are present after gradual and sudden loss, but not after transient vestibular loss. It appears, therefore, that the repertoire of brain plasticity mechanisms implicated in the recov-

ery process after unilateral vestibular loss exhibits a graded response, depending on whether vestibular deafferentation is functional or structural. Blockade of vestibular afferent activity by transtympanic tetrodotoxin injection is very likely too short-acting to elicit microglial and astroglial reactions, as was already reported in the rat UL model.<sup>11</sup>

We have confirmed in the UL cat model the same central vestibular glial reaction found in UL rats,<sup>11</sup> but the role of this reaction in recovery remains to be more precisely determined. This reaction most probably is due to central tissue inflammation following the peripheral lesion. Growth factors and cytokines released by activated glial cells may promote the survival of deafferented vestibular neurons in the VN complex, as suggested in other nerve-injury paradigms.<sup>32,33</sup> Reactive GABAergic neurogenesis, observed only in the UVN model, remains an open question, but it is likely beneficial for behavioral recovery, since preventing cell proliferation and differentiation induces a strong delay in vestibular compensation.<sup>16,44</sup>

### Interindividual Differences in the Recovery Process for a Given Vestibular Pathology

Here we report observations from patients suffering Menière's disease and having undergone the same surgical treatment (unilateral vestibular neurotomy) to alleviate their vertigo. We have clearly demonstrated that Menière's patients use several different sensory strategies to compensate for their postural deficits, and that representation of their vertical orientation, which is necessary for orienting their body in space, is based on different reference frames. Readers may refer to our original papers<sup>6-9,23-27</sup> for more details.

### Sensory Strategies as Idiosyncratic Vicarious Processes

Using static posturography for investigating posture control in Menière's patients examined

in eyes open (EO) and eyes closed (EC) conditions one week after being submitted to a curative UVN, we showed a bimodal distribution of individual values of the mean percentage difference in sway area between conditions. The whole population was split into two significantly different subgroups: one with patients swaying less in the EO condition (54% of the Menière's population), and the other with patients swaying less in the EC condition (46% of the Menière's population) This partition revealed two different types of unilateral vestibular defective patients—visual (V) and nonvisual (NV)—distinguished by their employment of different sensory strategies for controlling their posture.

These strategies underscore the concept of the subjects' behavioral repertoire, composed of vicarious processes, compensating the vestibular loss, with idiosyncratic selection of orientation reference frames depending on the subjects' internal spatial representation. The idea of differential weighting of visual cues for static balance control, though, had been reported earlier in Menière's patients<sup>4,5</sup> and patients suffering from vestibular neuritis.<sup>18</sup> On the basis of dynamic posturographic recordings, Nashner and colleagues<sup>31</sup> and Black and Nashner<sup>5</sup> suggested as well that vestibular patients must select an alternative orientation reference based either on vision or on a support surface, that is, proprioception. Moreover, perceptive changes reported among unilateral vestibular-loss patients in judgments of visual vertical pointed again to differential reweighting and selection of allocentric versus egocentric reference frames (see the following section).

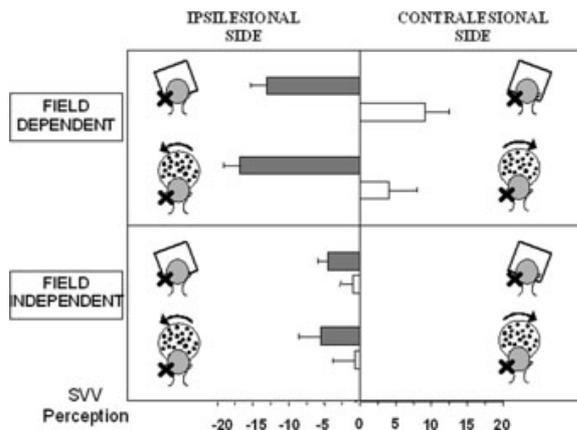
### Vertical Perception as Selection of Different Orientation Reference Frames

Visual-field dependency was assessed before unilateral vestibular loss using the rod-and-frame test. Subjective visual vertical (SVV) judgment was tested with a frame tilted 20° toward the ipsilesional or the contralesional side.

Once again, patients were easily divided into two well-defined and significantly different subpopulations. Some patients exhibited a large frame effect (field-dependent patients [FD]), while the remaining patients showed a weaker frame effect (field-independent patients [FI]). The group to which a patient belongs is based on a differential weighting of visual cues in SVV perception, with some relying more on an allocentric frame of reference (FD) and others on egocentric or gravitational frames of reference (FI).

After unilateral vestibular loss, subjective visual vertical perception differed greatly between FD patients and FI patients. For ipsilesional tilt of the frame, FD patients had large deviations of the SVV in the direction of the frame tilt. As a rule, FI patients had weaker SVV deviations. The greatest difference between the two groups occurred for a frame tilted toward the contralesional side. FD patients tilted the perceived vertical in the direction of the frame tilt, while FI patients always tilted the SVV toward the lesioned side. Such changes, which occurred maximally one week after vestibular loss, remained for up to 3 months (Fig. 4). Patients reported that frame tilt toward the treated side was more disturbing. Additionally, when patients were required to set the subjective vertical in front of a large disk rotating in the frontal plane, SVV changes due to unilateral vestibular loss were similar to those described with the tilted frame, both for the FD and FI patients. We therefore hypothesize that similar perceptual deficits can be observed during manipulation of static and dynamic visual references.

When vertical and horizontal references were provided, SVV was improved in both subpopulations, suggesting that all patients rely on the same allocentric strategy. They all rely on visual references they know to be stable and indicative of verticality (wall, door, and windows edges). This likely explains why the recovery time course of postural deficits is shorter in lighted environments with vertical and horizontal visual references than in darkness.



**Figure 4.** Visual-field dependency after vestibular loss. Comparison between subjective visual vertical perception with tilted frame (static visual condition) and with optokinetic stimulation in the frontal plane (dynamic visual condition) for ipsilesional (filled histograms) and contralesional (open histograms), and for field-dependent (FD) and field-independent (FI) patients tested 3 months after unilateral vestibular loss. Note similar subjective visual vertical perception for both static and dynamic visual conditions, but significant differences between FD and FI patients.

## Conclusions

We have summarized our view of the postural and perceptive syndromes underscoring the leading role of internal spatial representation.<sup>9</sup> We suggest that vestibular-induced changes after unilateral vestibular loss are based on a dynamic mental representation of space elaborated on the basis of the available sensory cues. This mental representation is updated continuously by taking into account the environmental context and postural constraints, as well as the subject's psychological status. That compensation of similar vestibular deficits may show interindividual differences between patients suffering from the same pathology can be more easily understood in the light of this conception. Brain selection of new reference frames among the preexisting ones operates differently according to the subjects, illustrating the repertoire of various fast-adaptive processes. This on-line fast selection and reweighting of reference frames is likely favored by the overlap of

the neural substrates for egocentric, allocentric, and geocentric reference frames demonstrated in neuroimaging investigations in healthy subjects.<sup>17,49</sup>

## Concluding Remarks

The process of compensation following unilateral vestibular loss has generally been considered as a monolithic concept referring to similar recovery mechanisms, albeit complex and plural ones, in all vestibular pathologies and for all patients. We do not view the compensation process in that light. Instead, we propose two distinct determinants of the mechanisms vestibular compensation.

First, we suggest that the type of vestibular lesion determines the nature of the induced recovery mechanisms. The CNS response differs, depending on whether vestibular deafferentation is sudden, gradual or transient, partial or total. Fast-adaptive processes (reweighting of remaining sensory inputs, switching reference frames, shifting sensorimotor strategies) are predominantly involved after functional deafferentation, and do not necessitate a deep reorganization of the neuronal networks, whereas mechanisms of neuroplasticity (neurogenesis, axonal sprouting) are required for compensating structural deafferentation. Different "soft-like" or "hard-like" recovery processes with short or long time constants, respectively, are therefore differentially implicated, depending upon the nature of the vestibular pathology in question.

Second, we propose that different fast-adaptive processes observed for a given pathology depend on the subjects' behavioral repertoire, internal spatial representation and perceptive style. Idiosyncratic selection of reference frames and sensorimotor strategies is the rule rather than the exception in vestibular compensation. What has been seen until now as random variability should instead be considered as vicarious processes related to a subject's own history.

Of course, our models for central compensation have some limitations regarding vestibular pathology, since they cannot reproduce exactly what happens in a particular disease. However, we believe that rehabilitation of patients with vestibular deficits should be guided by these findings, and that programs should consider both the nature of a patient's disease and the particular compensation strategies employed by individual patients.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

### References

1. Angelaki, D.E. & K.E. Cullen. 2008. Vestibular system: the many facets of a multimodal sense. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**: 125–150.
2. Baloh, R.W., S. Corona, K.M. Jacobson, et al. 1998. A prospective study of posturography in normal older people. *J. Am. Geriatr. Soc.* **46**: 438–443.
3. Bergström, B. 1973. Morphology of the vestibular nerve. II. The number of myelinated vestibular nerve fibers in man at various ages. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* **76**: 173–179.
4. Black, F.O. 1982. Vestibular function assessment in patients with Menière's disease: the vestibulo-spinal system. *Laryngoscope* **92**: 1419–1436.
5. Black, F.O. & L.M. Nashner. 1984. Vestibulo-spinal control differs in patients with reduced versus distorted vestibular function. *Acta Otolaryngol. (Stockh.) (Suppl. 406)*: 110–114.
6. Borel, L., F. Harlay, J. Magnan & M. Lacour. 2001. How changes in vestibular and visual reference frames combine to modify body orientation in space. *Neuroreport* **12**: 3137–3141.
7. Borel, L., F. Harlay, J. Magnan, et al. 2002. Deficits and recovery of head and trunk orientation and stabilization after unilateral vestibular loss. *Brain* **125**: 880–894.
8. Borel, L., F. Harlay, C. Lopez, et al. 2004. Walking performance of vestibular-defective patients before and after unilateral vestibular neurotomy. *Behav. Brain Res.* **150**: 191–200.
9. Borel, L., C. Lopez, P. Péruch & M. Lacour. 2008. Vestibular syndrome: a change in internal spatial representation. *Clin. Neurophysiol.* In press.
10. Brandt, T. 1999. *Vertigo. Its Multisensory Syndromes*, 2nd ed. Springer. London.
11. Campos-Torres, A., M. Touret, P.P. Vidal, et al. 2005. The differential response of astrocytes within the vestibular and cochlear nuclei following unilateral labyrinthectomy or vestibular afferent activity blockade by transtympanic tetrodotoxin injection in the rat. *Neuroscience* **130**: 853–865.
12. Curthoys, I.S. 2000. Vestibular compensation and substitution. *Curr. Opin. Neurol.* **13**: 27–30.
13. Curthoys, I.S. & G.M. Halmagyi. 1995. Vestibular compensation: a review of the oculomotor, neural, and clinical consequences of unilateral vestibular loss. *J. Vestib. Res.* **5**: 67–107.
14. Dieringer, N. 1995. Vestibular compensation: neural plasticity and its relations to functional recovery after labyrinthine lesion in frogs and other vertebrates. *Prog. Neurobiol.* **46**: 97–129.
15. Dutheil, S., M. Lacour & B. Tighilet. 2008. Different adult cat models of unilateral vestibular loss induce differential astroglial and neuronal responses within the vestibular nuclei and different behavioural recovery time-courses. Submitted.
16. Dutheil, S., J.M. Brezun, J. Léonard, et al. 2008. Infusion of cytosine-b-D-arabinoofuranoside (Ara-C) blocks vestibular lesion-induced cell proliferation in the vestibular nuclei and delays behavioural recovery in the adult cat. Submitted.
17. Galati, G., G. Committeri, J.N. Sanes & L. Pizzamiglio. 2001. Spatial coding of visual and somatic sensory information in body-centered coordinates. *Eur. J. Neurosci.* **14**: 736–746.
18. Gagey, P.M. & M. Toupet. 1991. Orthostatic postural control in vestibular neuritis: a stabilometric analysis. *Ann. Oto-Rhino-Laryngol.* **100**: 971–975.
19. Jensen, D.W. 1983. Survival of function in the deaf-ferented vestibular nerve. *Brain Res.* **8**: 376–378.
20. Kempermann, G. 2006. *Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain*. Oxford University Press. New York.
21. Kokaia, Z. & O. Lindvall. 2003. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**: 127–132.
22. Kunkel, A.W. & N. Dieringer. 1994. Morphological and electrophysiological consequences of unilateral pre-versus post-ganglionic vestibular lesions in the frog. *J. Comp. Physiol.* **174**: 621–632.
23. Lacour, M. 2006. Restoration of vestibular function: basic aspects and practical advances for rehabilitation. *Curr. Med. Res. Opin.* **22**: 1651–1659.
24. Lacour, M., J. Barthélémy, L. Borel, et al. 1997. Sensory strategies in human postural control before and after unilateral vestibular neurotomy. *Exp. Brain Res.* **115**: 300–310.
25. Lopez, C., M. Lacour, J. Magnan & L. Borel. 2006. Visual field dependence-independence before and after unilateral vestibular loss. *Neuroreport* **17**: 797–803.

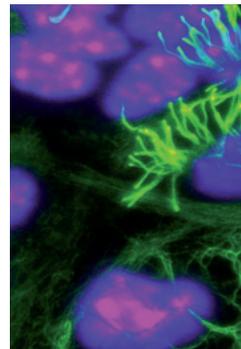
26. Lopez, C., M. Lacour, A.E. Ahmadi, *et al.* 2007. Changes of visual vertical perception: a long-term sign of unilateral and bilateral vestibular loss. *Neuropsychologia* **45**: 2025–2037.
27. Lopez, C., M. Lacour, J. Léonard, *et al.* 2008. How body position changes visual vertical perception after unilateral vestibular loss. *Neuropsychologia* **46**: 2435–2440.
28. Lopez, I., V. Honrubia & R.W. Baloh. 1997. Aging and the human vestibular nucleus. *J. Vestib. Res.* **7**: 77–85.
29. Manchester, D., M. Woollacott, N. Zederbauer-Hylton & O. Marin. 1989. Visual, vestibular and somatosensory contributions to balance control in the older adult. *J. Gerontol.* **44**: M118–M127.
30. Merchant, S.N., L. Velasquez-Villasenor, K. Tsuji, *et al.* 2000. Temporal bone studies of the human peripheral system. Normative vestibular hair cell data. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **181**(Suppl.): 3–13.
31. Nashner, L.M., F.O. Black & C. Wall. 1984. Adaptation to altered support and visual conditions during stance: patients with vestibular deficits. *J. Neurosci.* **2**: 536–544.
32. Raivich, G., M. Bohatschek, C.U. Kloss, *et al.* 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Rev.* **30**: 77–105.
33. Raivich, G., L.L. Jones, A. Werner, *et al.* 1999. Molecular signals for glial activation: pro- and anti-inflammatory cytokines in the injured brain. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* **73**: 21–30.
34. Rosenhall, U. 1973. Degenerative patterns in the aging human vestibular neuro-epithelia. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* **76**: 208–220.
35. Rosenhall, U. & W. Rubin. 1975. Degenerative changes in the human vestibular sensory epithelia. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* **79**: 67–80.
36. Schuknecht, H.F. 1969. Cupulolithiasis. *Arch. Otolaryngol.* **90**: 765–778.
37. Schuknecht, H.F. 1982. Behaviour of the vestibular nerve following hemilabyrinthectomy. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **91**(Suppl.): 16–32.
38. Schuknecht, H.F. 1989. *Menière's Disease*. Vol. 1. Lippincott, Philadelphia.
39. Schuknecht, H.F. 1993. Pathology of the peripheral vestibular system. In *The Vestibule-ocular Reflex and Vertigo*. J.A. Sharpe & H.O. Barber, Eds.: 269–277. Raven Press, New York.
40. Semont, A., G. Freyss & E. Vitte. 1988. Curing the BPPV with a liberatory maneuver. *Adv. Otorhinolaryngol.* **42**: 290–293.
41. Tang, Y., I. Lopez & R.W. Baloh. 2002. Age-related change of the neuronal number in the human medial vestibular nucleus: a stereological investigation. *J. Vestib. Res.* **11**: 357–363.
42. Tighilet, B., J. Léonard & M. Lacour. 1995. Betahistine dihydrochloride treatment facilitates vestibular compensation in the cat. *J. Vestib. Res.* **5**: 53–66.
43. Tighilet, B., S. Trottier, C. Mourre & M. Lacour. 2006. Changes in the histaminergic system during vestibular compensation in the cat. *J. Physiol. (Lond.)* **573**: 723–739.
44. Tighilet, B., J.M. Brezun, S. Gustave Dit Duflo, *et al.* 2007. New neurons in the vestibular nuclei complex after unilateral vestibular neurectomy in the adult cat. *Eur. J. Neurosci.* **25**: 47–58.
45. Vidal, P.P., C. de Waele, N. Vibert & M. Muhlethaler. 1998. Vestibular compensation revisited. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **119**: 34–42.
46. Whipple, R.H., L. Wolfson, C. Derby, *et al.* 1993. Altered sensory function and balance in older persons. *J. Gerontol.* **48**: 71–76.
47. Wilson, V.J. & G. Melvill Jones. 1979. *Mammalian Vestibular Physiology*. Plenum Press, New York.
48. Xerri, C. & M. Lacour. 1980. Compensation of posturo-locomotor deficits after unilateral vestibular neurectomy in the cat. Role of sensorimotor activity. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* **90**: 414–420.
49. Zaehle, T., K. Jordan, T. Wustenberg, *et al.* 2007. The neural basis of the egocentric and allocentric spatial frame of reference. *Brain Res.* **1137**: 92–103.

> En dehors de deux structures précises : la zone sous-granulaire et la zone sous-ventriculaire, le cerveau du mammifère adulte est considéré comme non neurogène, c'est-à-dire incapable de produire de nouveaux neurones. Cependant, les influences environnementales qui s'opposent à cette activité peuvent être mises entre parenthèses dans certaines conditions. C'est ce qui se passe lorsque l'on réalise une neurectomie vestibulaire unilatérale chez le chat adulte. Nos travaux révèlent en effet l'existence d'une neurogenèse réactionnelle dans les noyaux vestibulaires désafférentés situés dans le tronc cérébral. Plus étonnant encore, nous avons montré que cette prolifération cellulaire post-lésionnelle était fonctionnelle et participait aux processus de restauration des fonctions posturo-locomotrices. <

## Une nouvelle zone de neurogenèse fonctionnelle

### Les noyaux vestibulaires du tronc cérébral

Sophie Dutheil, Michel Lacour, Brahim Tighilet



UMR 6149,  
Neurosciences  
intégratives et adaptatives,  
pôle 3C : Comportement,  
cerveau, cognition,  
Centre de Saint-Charles, case B,  
3, place Victor Hugo, 13331  
Marseille Cedex 3, France.  
[brahim.tighilet@univ-provence.fr](mailto:brahim.tighilet@univ-provence.fr)

SNC du mammifère adulte. Toutefois, à ce jour, seulement deux structures bien précises, la zone sous-granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire qui borde les ventricules latéraux, renouvellent continuellement leur stock de neurones (Figure 1). Ces zones sont dites de neurogenèse car elles génèrent de nouveaux neurones [39]. La grande majorité d'entre eux survit et s'intègre ensuite dans des circuits neuronaux qui contribuent à la transmission de l'information dans le cerveau : tâches d'apprentissage, de mémorisation, d'orientation spatiale, ou encore de reconnaissance olfactive [1].

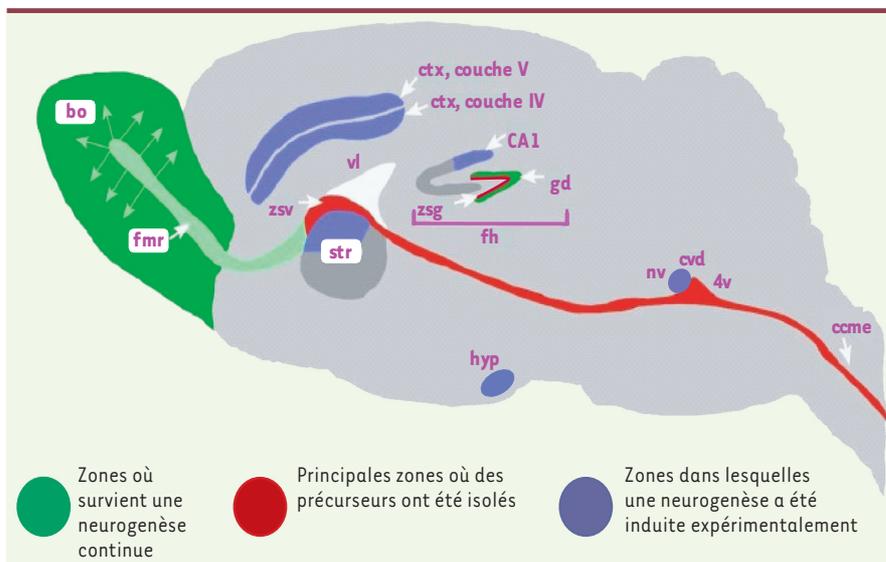
Par contraste, tout le reste du SNC est considéré comme étant non neurogène car les progéniteurs neuraux potentiellement présents sont maintenus dans un état de quiescence. L'environnement ne permet pas la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires. Ainsi, des progéniteurs neuraux de la zone sous-granulaire ou de la zone sous-ventriculaire transplantés dans des zones non neurogènes meurent ou s'y différencient uniquement en cellules gliales [2-4]. En revanche, lorsque des progéniteurs provenant de n'importe quelle région du SNC sont transplantés dans des zones de neurogenèse, ils s'y différencient selon le type neuronal requis par le tissu hôte, neurones granulaires dans la zone sous-granulaire et interneurons dans la zone sous-ventriculaire [3-6]. Il apparaît donc que le devenir des progéniteurs neuraux au sein de leur tissu hôte est avant tout commandité par l'environnement extracellulaire, au détriment des paramètres intrinsèques aux cellules [7, 8]. De manière intéressante, les influences qui semblent s'opposer à la neurogenèse dans la quasi-totalité du SNC pourraient être ponctuellement mises entre parenthèses dans certaines conditions. En effet, de nombreux travaux chez le mammifère adulte ont révélé que des pathologies particulières (ischémie, scléroses multiples,

### Le renouvellement des neurones dans le cerveau adulte

Au même titre que les cellules intestinales ou sanguines, de nouveaux neurones sont capables d'être générés tout au long de la vie au sein de leur tissu d'appartenance. Ainsi, contrairement au dogme érigé en 1928 par Ramon y Cajal<sup>1</sup> : « Une fois le développement terminé, les sources de la croissance et de la régénération des axones et des dendrites sont tarées de manière irrévocable. Dans le cerveau adulte, les voies nerveuses sont fixées et immuables : tout peut mourir, rien ne peut régénérer... », il est désormais communément admis qu'une fois le développement achevé, le cerveau ne se fige pas en une entité rigide. À l'âge adulte, le système nerveux central (SNC) reste un organe d'une extrême malléabilité qui s'adapte sans cesse à son environnement. De nombreux progéniteurs neuraux (nous utiliserons le terme progéniteur pour qualifier indifféremment les cellules souches neurales et leurs descendants immédiats) sont disséminés dans le

<sup>1</sup> Ramon y Cajal, S (1928). *Degeneration and regeneration of the nervous system*, vol. 2. New York, USA, Haffner Publishing Co, p. 750.





**Figure 1.** Les différentes structures cérébrales contenant des progéniteurs neuronaux, une neurogenèse continue et une neurogenèse induite expérimentalement dans le cerveau du mammifère adulte. Schéma représentant les deux régions où survient une neurogenèse continue chez le mammifère adulte (vert : zone sous-ventriculaire/bulbe olfactif et gyrus dentelé de l'hippocampe) et les principales régions où des populations de progéniteurs neuronaux ont été identifiées (rouge : zone sous-granulaire du gyrus dentelé et neuraxe rostro-caudal qui s'étend de la

zone sous-ventriculaire antérieure jusqu'au canal central de la moelle épinière). Une neurogenèse limitée induite expérimentalement a également été mise en évidence dans d'autres régions du système nerveux central (violet : noyaux vestibulaires, complexe vagal dorsal, couches IV et V du cortex, aire CA1, striatum, hypothalamus). Certaines régions dans lesquelles l'existence d'une neurogenèse est controversée ont été omises par souci de simplicité. ccme : canal central de la moelle épinière ; ctx : cortex ; cvd : complexe vagal dorsal ; fh : formation hippocampique ; gd : gyrus dentelé de l'hippocampe ; hyp : hypothalamus ; vl : ventricule latéral ; bo : bulbe olfactif ; fmr : flux migratoire rostral ; zsg : zone sous-granulaire (du gyrus dentelé) ; zsv : zone sous-ventriculaire ; str : striatum ; 4v : IV<sup>e</sup> ventricule ; nv : noyaux vestibulaires (modifié d'après [7]).

chorée de Huntington, maladie d'Alzheimer) ou certaines lésions s'accompagnaient d'une neurogenèse réactionnelle dans des zones du SNC considérées jusque-là comme incapables de produire de nouveaux neurones [8, 9] (Figure 1). Sous l'influence de signaux spécifiques, un tissu considéré comme non neurogène peut donc s'affranchir des restrictions endogènes et permettre une prolifération cellulaire limitée dans le temps pour renouveler son stock neuronal local.

### Naissance et intégration de nouveaux neurones dans les noyaux vestibulaires après lésion vestibulaire

#### Atteinte vestibulaire et compensation vestibulaire

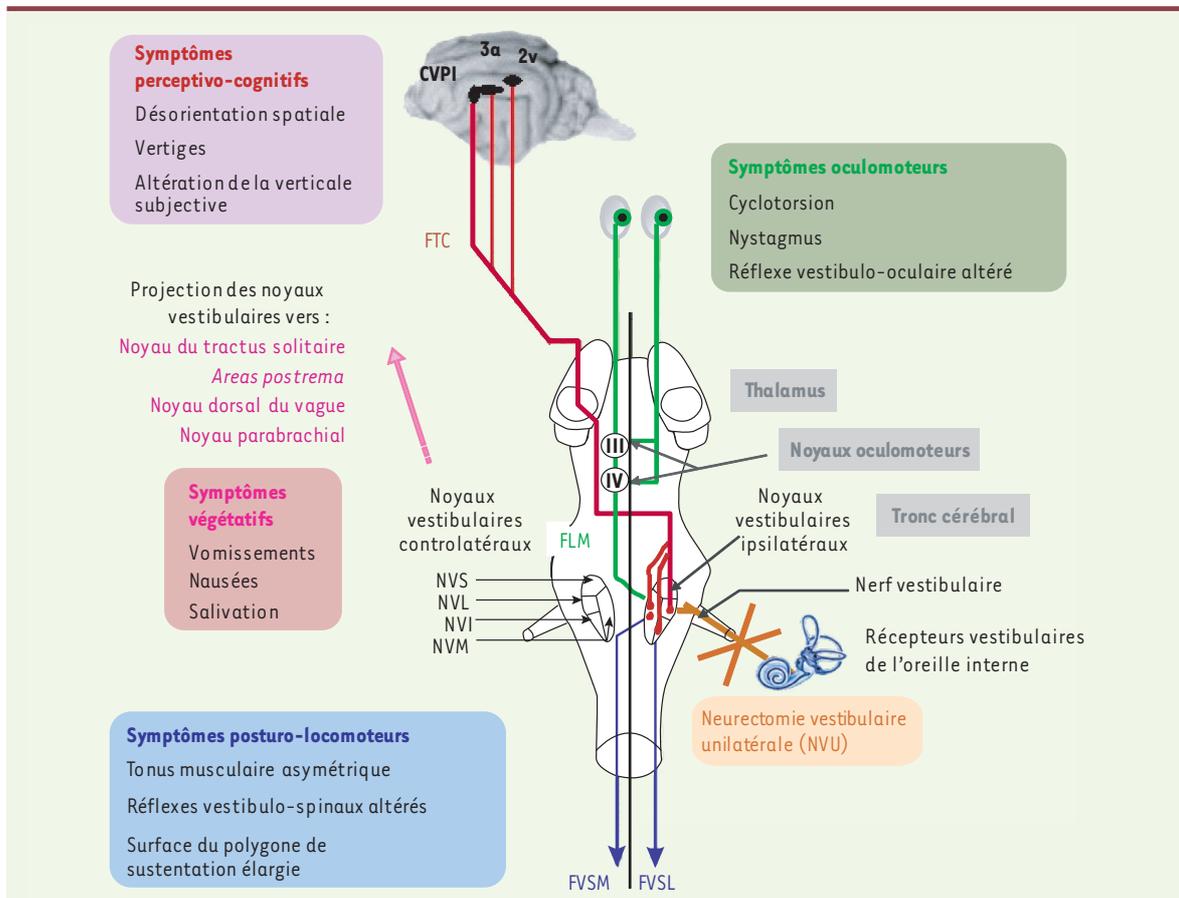
Les fonctions vestibulaires sont assurées par des informations captées de manière symétrique par des récepteurs vestibulaires situés dans l'oreille interne : les canaux semicirculaires et les otolithes<sup>2</sup>. Ces deux types de récepteurs sont sensibles respectivement aux accélérations angulaires et linéaires (incluant le vecteur gravitaire). Les messages véhiculés par les nerfs vestibulaires convergent d'abord vers les noyaux vestibulaires, transitent par des relais thalamiques pour achever leur trajet dans un ensemble d'aires corticales (cortex vestibulaire pariéto-insulaire, aires 3a et 2v). Le traitement et l'intégration de ces signaux vestibulaires et d'autres signaux issus de modalités sensorielles différentes (proprioception

et vision en particulier) gèrent le contrôle de la posture et de la locomotion, de la stabilisation du regard et de l'orientation spatiale. Une atteinte vestibulaire unilatérale résultant de lésions traumatiques, d'atteintes virales (névrite) ou encore d'hydrops (maladie de Ménière) engendre systématiquement une quadruple symptomatologie aussi bien chez l'homme que chez de nombreuses espèces. Ce syndrome comprend des désordres posturo-locomoteurs, oculomoteurs, végétatifs et cognitifs (Figure 2) dont l'expression diminue progressivement avec le temps grâce au phénomène de « compensation vestibulaire » [10]. Lorsque les désordres vestibulaires ne se compensent toutefois pas d'eux-mêmes et que les patients atteints de la maladie de Ménière ne répondent pas aux traitements pharmacologiques, la pratique d'une neurectomie vestibulaire unilatérale<sup>3</sup> (NVU) permet de les soulager définitivement de leurs crises vertigineuses.

Nos travaux de recherche sont consacrés depuis plusieurs années à la compensation vestibulaire qui représente un excellent modèle d'étude des phénomènes de plasticité post-lésionnelle dans le système nerveux central. Les déficits statiques observés au stade aigu d'une lésion

<sup>2</sup> L'organe récepteur comprend des cellules ciliées dont les cils sont emprisonnés dans une substance gélatineuse contenant des petits cristaux appelés otolithes.

<sup>3</sup> Il s'agit de la section du nerf vestibulaire.

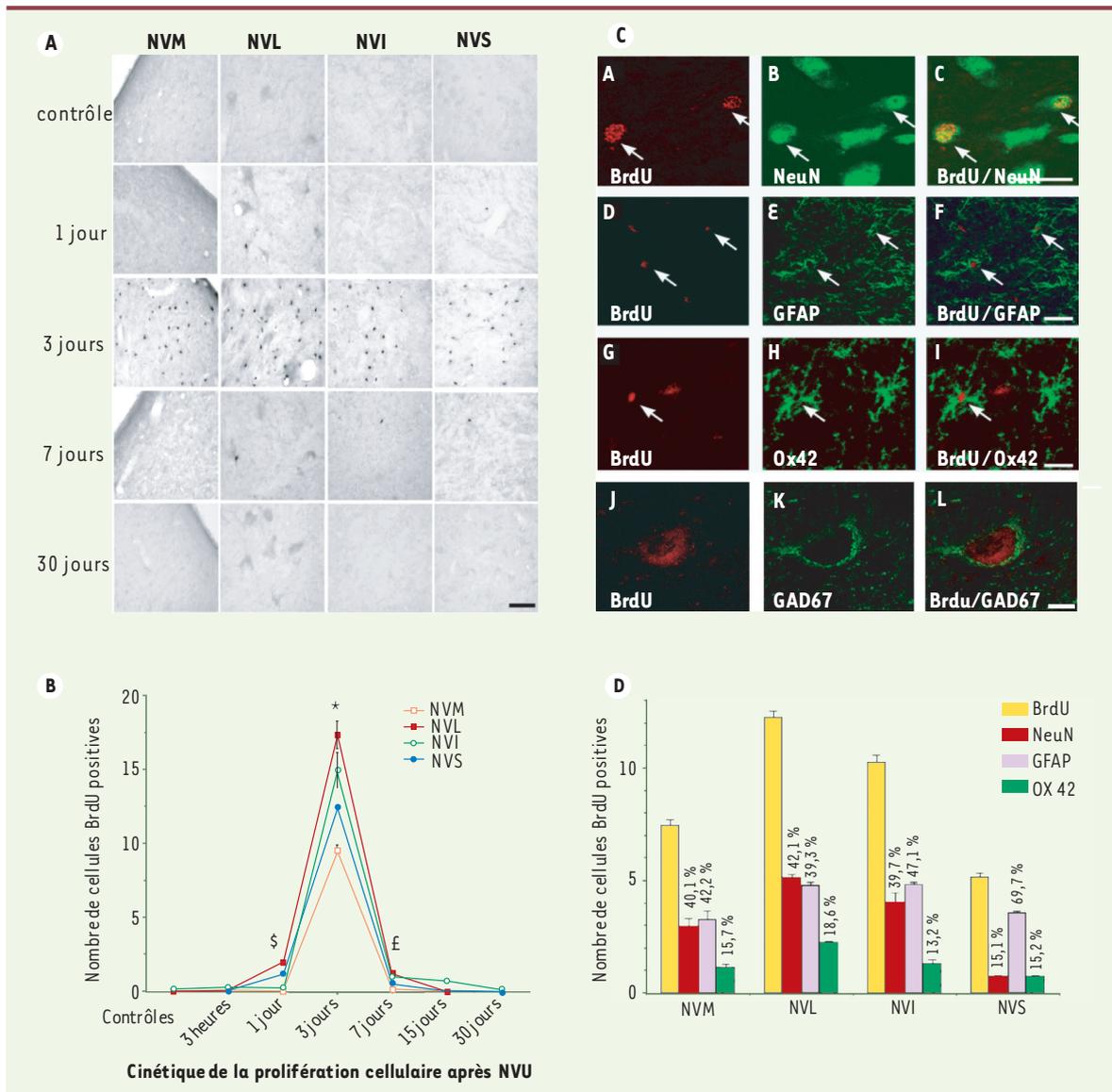


**Figure 2. Organisation anatomo-fonctionnelle du complexe des noyaux vestibulaires (NV).** Le nerf vestibulaire contacte les cellules sensorielles des récepteurs labyrinthiques périphériques (canaux semi-circulaires, utricule et saccule) et se projette ipsilatéralement sur les 4 différents noyaux vestibulaires (NV) : médian (NVM), inférieur (NVI), latéral (NVL) et supérieur (NVS). Les NV sont localisés dans la partie dorso-latérale de la jonction bulbo-protubérantielle du tronc cérébral, sous le plancher du IV<sup>e</sup> ventricule. Ils forment le premier relais des réflexes vestibulo-oculaires, vestibulo-spinaux, vestibulo-végétatifs et des voies ascendantes vestibulo-corticales impliquées dans l'orientation spatiale. Les NV sont à l'origine de messages pré moteurs (commande de la musculature oculaire et somatique) au service de la régulation de la posture et de la stabilisation du regard. Ils projettent, par le faisceau longitudinal médian (FLM) sur les noyaux oculomoteurs (noyau oculomoteur III, noyau trochléaire ou abducens IV) dont les motoneurons commandent la musculature oculaire afin de produire des réactions compensatoires de l'œil stabilisant les images sur la rétine lors de mouvements de la tête. Les projections vestibulo-spinales, originaires du NVL ipsilatéral, atteignent tous les étages médullaires via le faisceau vestibulo-spinal latéral (FVSL). Les projections controlatérales des NV médian, inférieur et latéral constituent le faisceau vestibulo-spinal médian (FVSM) et commandent les motoneurons du cou et de la partie supérieure de l'axe du corps. Les NV reçoivent des afférences cérébelleuses, médullaires (proprioceptives), visuelles (optocinétiques), des noyaux vestibulaires controlatéraux et des aires corticales. Chez les mammifères supérieurs, il existe plusieurs aires corticales plurisensorielles impliquées dans la réception des messages vestibulaires (aire 3a, aire 2v, cortex vestibulaire pariéto-insulaire) cheminant par le FTC (faisceau thalamo-cortical).

vestibulaire (nystagmus oculaire<sup>4</sup>, inclinaison de la tête du côté lésé, asymétrie du tonus des muscles des membres, élargissement de la surface de sustentation, nausées) (Figure 2) résultent de l'asymétrie de l'activité électrique spontanée entre les noyaux vestibulaires (NV)

homologues situés dans le tronc cérébral. En effet, consécutivement à l'atteinte vestibulaire, les NV ipsilatéraux à la lésion deviennent silencieux tandis que les NV controlatéraux conservent une activité électrique. Ce déséquilibre électrophysiologique qui se réajuste peu à peu avec une constante de temps variable selon les espèces est considéré comme le substrat neurophysiologique

<sup>4</sup> Le nystagmus est un mouvement involontaire et saccadé du globe oculaire qui comprend deux composantes, une dérive lente et une secousse de rappel rapide. Il est défini par le sens de sa secousse rapide.



de la compensation vestibulaire [11, 12]. À l'inverse, les déficits dynamiques comme l'altération du gain du réflexe vestibulo-oculaire<sup>5</sup> lors d'un mouvement de la tête du côté lésé ne sont pas compensés, ou seulement partiellement et avec une constante de temps plus longue [13]. Une partie des processus responsables de ce retour à l'équilibre électrophysiologique entre les NV ipsi- et controlatéraux a été attribuée à des mécanismes de neuroplasticité survenant dans les NV : réorganisations moléculaires et neurochimiques pré- et post-synaptiques, pousses neuritiques, réactions astrocytaires et microgliales, chan-

gement de sensibilité des récepteurs membranaires, régulation du nombre de récepteurs membranaires, libération de neuromédiateurs et de neurohormones [14-19]. Le SNC fait donc preuve d'une extraordinaire capacité d'adaptation post-lésionnelle qui met en jeu un ensemble de mécanismes qui s'échelonnent à tous niveaux, du moléculaire au comportemental.

#### Induction d'une zone de neurogenèse après neurectomie vestibulaire unilatérale

Dans notre modèle expérimental de NVU chez le chat adulte (technique décrite dans l'encadré), de fortes augmentations du nombre de neurones exprimant les

<sup>5</sup> Le réflexe vestibulo-oculaire stabilise le regard, c'est-à-dire compense les mouvements de la tête pour permettre à l'homme ou à l'animal de voir clairement l'environnement dans lequel sa tête tourne. Pendant une rotation de la tête, le RVO imprime à l'œil une rotation d'amplitude et de vitesse égales mais de sens opposé à celle de la tête, de sorte que l'axe visuel est maintenu stable dans l'espace.



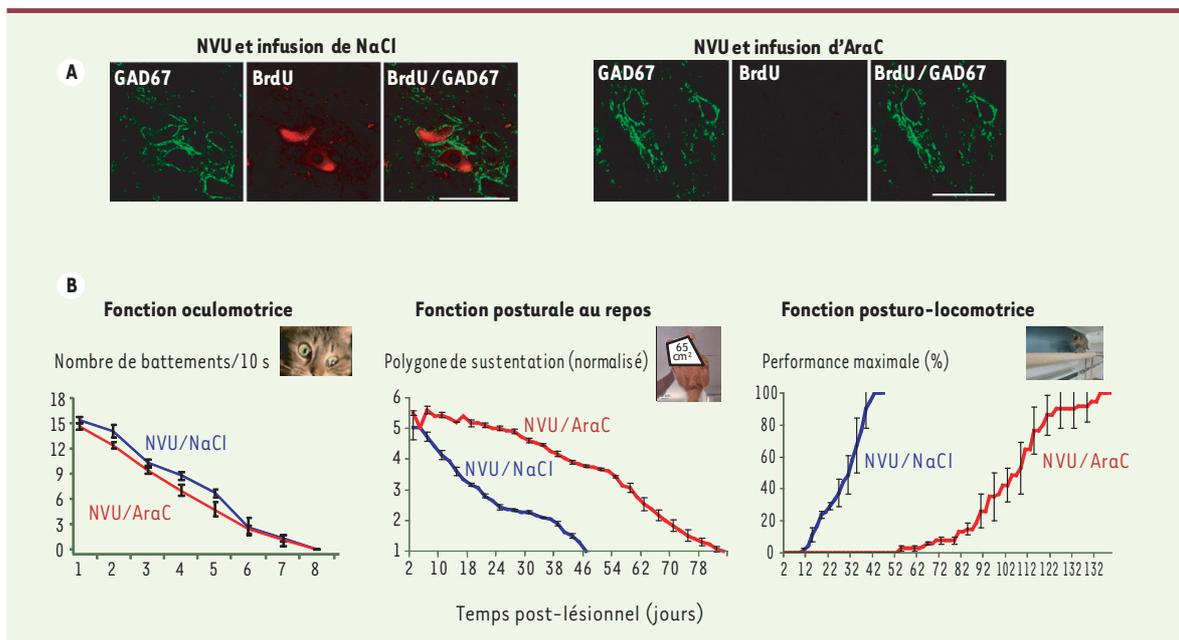
◀ **Figure 3. Décours temporel de la prolifération cellulaire dans les noyaux vestibulaires désafférentés après neurectomie vestibulaire unilatérale chez le chat adulte.** **A.** Microphotographies illustrant le marquage BrdU immunopositif (BrdU<sup>+</sup>) dans les noyaux vestibulaires (NV) de chats contrôles et dans les NV désafférentés de chats examinés 1, 3, 7 et 30 jours après une neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU). Chez les animaux contrôles aucune cellule BrdU<sup>+</sup> n'est présente dans les NV. Échelle : 100  $\mu$ m. **B.** Quantification du nombre de cellules néoformées marquées au BrdU dans le complexe des noyaux vestibulaires (NV) du côté de la NVU. Par rapport à des animaux contrôles chez qui aucune cellule en division mitotique n'est observée dans les NV, un pic de prolifération cellulaire apparaît 3 jours après la NVU dans les 4 principaux NV : le latéral (NVL), l'inférieur (NVI), le médian (NVM) et le supérieur (NVS). La prolifération cellulaire est quasiment absente dès la fin de la 1<sup>re</sup> semaine post-lésionnelle. **C.** Différenciation cellulaire dans les noyaux vestibulaires désafférentés après neurectomie vestibulaire unilatérale chez le chat adulte. L'utilisation de marqueurs spécifiques des cellules microgliales (Ox42, anticorps monoclonal anti-CD11b/c), des astrocytes (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) et des neurones (NeuN) permet de déterminer la nature des cellules en prolifération (BrdU). L'analyse en microscopie confocale montre que des nouvelles cellules ont incorporé du BrdU 3 jours après NVU, ont survécu et se sont différenciées en neurones, en astrocytes et en microglie 30 jours après la lésion. Les noyaux BrdU<sup>+</sup> sont en rouge et les autres marqueurs de différenciation en vert : NeuN<sup>+</sup> (B, C) ; GFAP<sup>+</sup> (E, F) ; Ox42<sup>+</sup> ; (H, I) ; GAD67<sup>+</sup> (K, L). Un nouveau neurone GABAergique appartenant au noyau vestibulaire médian désafférenté est illustré (J, K, L). Le marquage nucléaire au BrdU (J) indique qu'il s'agit d'une nouvelle cellule qui a survécu à ce délai post-lésionnel ; le marquage GAD67 (K) montre qu'elle exprime l'enzyme de synthèse du GABA. La colocalisation par cette cellule des 2 marqueurs (L) démontre qu'il s'agit d'un neurone GABAergique de moyenne taille (barre de calibration : 20  $\mu$ m). **D.** Histogrammes représentant le nombre de cellules BrdU<sup>+</sup>, NeuN<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup> et Ox42<sup>+</sup> dans les NV 30 jours après NVU. Les pourcentages indiqués sont calculés dans la population BrdU<sup>+</sup>. L'analyse des colocalisations en microscopie confocale montre qu'un fort pourcentage de cellules se différencient en neurones (environ 40 %) ou en astrocytes (pourcentage similaire) dans les noyaux vestibulaires latéral (NVL), inférieur (NVI) et médian (NVM), tandis que le taux de neurones est très faible dans le noyau supérieur (NVS) qui, en revanche, a un fort taux d'astrocytes. On remarquera que la proportion de cellules microgliales est faible et comparable (environ 15 %) dans tous les noyaux vestibulaires.

phénotypes GABAergique [20] et cholinergique [21] ont été observés dans les NV du côté ipsilatéral à la lésion. Ces résultats ont été interprétés comme reflétant des changements de phénotypes neuronaux concomitants de la régulation positive d'enzymes nécessaires à la synthèse de GABA et d'acétylcholine. Cependant, une nouvelle hypothèse a été avancée en 2002 avec la découverte de progéniteurs neuronaux au niveau du plancher du IV<sup>e</sup> ventricule. En effet, si l'on administrait localement des facteurs de croissance, ces cellules devenaient capables de générer de nouveaux neurones *in vivo* [22]. De plus, une prolifération cellulaire consécutive à une vagotomie a été mise en évidence dans le complexe dorsal du vague, à proximité des NV [23]. Ces résultats nous ont conduits à postuler que l'accroissement du nombre de neurones GABAergiques et cholinergiques observé après NVU pouvait résulter d'une prolifération cellulaire.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé un marqueur des cellules en division : le bromodéoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules lors de la phase S du cycle cellulaire. Cet agent est généralement utilisé pour dater les nouvelles cellules et évaluer la prolifération cellulaire. Nous avons démontré l'existence d'une forte prolifération de cellules ayant incorporé le BrdU (BrdU<sup>+</sup>) uniquement dans les NV situés du côté de la lésion (Figures 3A et B), avec un pic culminant 3 jours après la lésion [24, 25]. Des travaux en cours indiquent également un pic d'expression de neurotrophines (*brain-derived neurotrophic factor* [BDNF] et *nerve growth factor* [NGF]), agents proneurogènes favorisant la survie et la différenciation cellulaires, après ce même délai post-lésionnel. L'étude de la cinétique des nouvelles cellules formées en fonction du temps post-lésionnel a indiqué qu'une majorité survivait au-delà d'un mois - la proportion variant selon les différents NV (60

à 70 % en moyenne). Certaines de ces cellules se sont différenciées en cellules gliales (astrocytes, microglie, voir Figure 3C et D), confirmant la réaction gliale déjà décrite par d'autres auteurs chez le rat [14]. D'autres cellules BrdU<sup>+</sup> exprimaient aussi le marqueur NeuN (*neuronal nuclei*) spécifique des neurones matures, mettant ainsi en évidence la différenciation des nouvelles cellules en neurones (Figure 3C). Ces résultats ont ainsi démontré pour la première fois la naissance de nouveaux neurones dans les NV désafférentés après une lésion vestibulaire chez l'animal adulte.

Nous avons par la suite caractérisé le phénotype de ces nouveaux neurones et trouvé qu'ils exprimaient la GAD67 (*glutamic acid decarboxylase 67*), enzyme de synthèse du GABA. Les données recueillies en microscopie confocale ont mis en évidence une colocalisation des deux marqueurs BrdU et GAD67 (Figure 3C) pour certains de ces neurones, démontrant l'existence d'une neurogenèse de type GABAergique dans les NV du côté de la lésion. Ce résultat est à rapprocher d'observations que nous avons faites antérieurement [20] montrant chez le chat une augmentation du nombre de neurones exprimant le GABA après NVU. De manière intéressante, nous n'avons pas observé de neurones cholinergiques parmi les cellules BrdU<sup>+</sup>. L'absence d'une neurogenèse cholinergique suggère que l'augmentation du nombre de neurones cholinergiques dans les NV désafférentés résulterait d'un changement de phénotype neuronal [21]. Ce résultat original témoigne vraisemblablement



**Figure 4. Illustration du rôle fonctionnel de la neurogenèse.** **A.** Gauche : microphotographies illustrant de nouveaux neurones immunopositifs pour la GAD67 (vert) et pour le BrdU (rouge) dans le noyau vestibulaire médian désafférenté d'un chat après neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) et auquel du NaCl a été administré pendant 30 jours. Droite : après NVU et infusion d'un agent antimétabolite pendant 30 jours (cytosine- $\beta$ -D arabinofuranoside : AraC), les neurones immunopositifs pour la GAD67 ne sont pas marqués au BrdU, indiquant l'absence de nouveaux neurones GABAergiques dans ce groupe d'animaux. Le BrdU est injecté 3 jours après NVU et les animaux sont perfusés 27 jours plus tard. Microscopie confocale, calibration 50  $\mu$ m. **B.** Effets de l'infusion intracérébroventriculaire d'AraC sur la restauration des fonctions oculomotrice, posturale et locomotrice après NVU. Les courbes illustrent la valeur moyenne obtenue pour chaque groupe d'animaux. L'erreur standard de la moyenne est représentée par les barres verticales. Gauche : la fréquence du nystagmus est évaluée en fonction du nombre de battements rapides de l'œil de l'animal par unité de temps (10 secondes). Centre : les courbes illustrent la valeur moyenne de la surface du polygone de sustentation obtenue pour chaque groupe d'animaux. Les valeurs, mesurées en  $\text{cm}^2$ , sont normalisées par rapport aux valeurs enregistrées avant la désafférentation, chaque animal constituant sa propre référence. Droite : la moyenne de la performance maximale d'équilibration cinétique (ordonnées) est exprimée en pourcentage de la performance pré-opératoire en fonction du temps post-lésionnel exprimé en jours (abscisses) pour les différents groupes d'animaux.

de l'importance du système GABAergique dans la compensation des déficits vestibulaires chez le mammifère adulte et signe l'existence de nouveaux mécanismes de plasticité adaptatifs post-lésionnels.

### Origine des nouvelles cellules et contrôle de leur intégration fonctionnelle dans les noyaux vestibulaires

Les ventricules cérébraux hébergent des progéniteurs neuronaux qui conserveraient au stade adulte leur capacité de proliférer et de se différencier en divers types neuronaux ou gliaux [4, 22]. Les NV, situés en bordure du IV<sup>e</sup> ventricule, pourraient donc héberger des progéniteurs neuronaux quiescents puisque chez le mammifère adulte, en conditions physiologiques, aucune prolifération cellulaire spontanée ne survient dans cette zone cérébrale. Ces cellules produites dans les NV pourraient également provenir de cellules épendymaires ou endothéliales

présentes en bordure du IV<sup>e</sup> ventricule ou encore de certains types d'astrocytes capables de se différencier [26, 27]. Une autre piste se dessine également : des progéniteurs pourraient migrer de la zone sous-ventriculaire jusqu'aux NV, en se déplaçant éventuellement le long de vaisseaux sanguins [28, 29].

Nous avons mis en évidence que la section unilatérale du nerf vestibulaire convertit les NV en une zone neurogène. L'émergence de cette neurogenèse réactionnelle pourrait s'expliquer par la rupture de l'homéostasie du microenvironnement cellulaire occasionnant le recrutement d'une cascade de mécanismes de neuroplasticité proneurogènes. En effet, nous avons observé dans notre modèle expérimental que la section et la dégénérescence rapide du nerf vestibulaire produisaient dans les NV désafférentés une augmentation des cellules micro-



### PROCÉDURE CHIRURGICALE DE NEURECTOMIE VESTIBULAIRE UNILATÉRALE (NVU)

La section du nerf vestibulaire (nerf VIII, vestibulocochléaire) est réalisée sous microscope opératoire selon une approche rétrosigmoïde dans des conditions d'asepsie rigoureuse. Les animaux sont anesthésiés à l'aide d'une solution de kétamine dihydrochloride injectée en intramusculaire (20 mg/kg, Rhône Poulenc, Mérieux, France) et reçoivent une injection d'analgésique (Tolfédine, 0,5 ml, Vetoquinol, Lure, France). Une couverture chauffante permet de maintenir l'animal anesthésié à une température comprise entre 37 et 38°C. L'incision des tissus situés en arrière du pavillon auditif gauche permet l'accès à la *bulla* tympanique. La perforation de celle-ci à l'aide d'une fraise diamantée débouche sur l'oreille interne. La cavité labyrinthique est abordée par une ouverture creusée au-dessus des fenêtres ronde et ovale qui dévoile la VIII<sup>e</sup> paire de nerfs crâniens. La section du nerf est pratiquée au niveau post-ganglionnaire où le nerf vestibulaire est séparé du nerf cochléaire, à mi-distance entre le ganglion de Scarpa et le tronc cérébral. Par la suite, le conduit auditif interne est obturé à l'aide de spongel cicatrisant et les tissus superficiels sont recousus. Les animaux sont placés sous antibiotiques pendant 6 jours et reçoivent des analgésiques pendant les 48 heures suivant la lésion. L'apparition du syndrome vestibulaire (symptômes oculomoteurs, posturaux et locomoteurs) au réveil de l'animal confirme cliniquement la réussite de la neurectomie vestibulaire unilatérale.

giales et des astrocytes [24, 25], une augmentation de l'efficacité des systèmes GABAergique, cholinergique et histaminergique [20, 21, 26], ainsi qu'une augmentation du nombre de neurones exprimant le BDNF, le NGF, la neurotrophine 3 (NT3) et leurs récepteurs à activité tyrosine kinase respectifs (TrkA, TrkB et TrkC) [18]. Dans une étude récente, nous avons également observé que les glucocorticoïdes, connus pour entraver la neurogenèse [27], étaient régulés négativement dans les NV après NVU [28]. Ces résultats sont à rapprocher de données de la littérature mentionnant le rôle de ces facteurs respectifs dans la modulation des différentes étapes de la neurogenèse, allant de la prolifération des cellules souches neurales jusqu'à leur différenciation et intégration dans des circuits neuronaux complexes [8, 29-31]. D'autres facteurs actuellement en cours d'étude (facteurs de l'inflammation) également exprimés fortement dans les NV désafférentés [32] agiraient de concert pour promouvoir localement et ponctuellement un environnement neurogène dans les NV désafférentés.

### Neurogenèse des NV et restauration des fonctions posturo-locomotrices

La présence inattendue de cette neurogenèse secondaire dans les NV désafférentés nous a également conduits à nous interroger sur son rôle fonctionnel dans la restauration des fonctions vestibulaires. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un agent antimototique : la cytosine- $\beta$ -D arabinofuranoside (AraC) qui bloque la prolifération cellulaire dans les NV. Une solution d'AraC ou de chlorure de sodium a été administrée de manière continue dans le liquide

céphalo-rachidien du IV<sup>e</sup> ventricule, en bordure des NV, durant 30 jours *via* une pompe osmotique Alzet à des chats ayant subi une NVU et chez des contrôles. Les conséquences cellulaires et comportementales du blocage de la neuroglionénèse par l'AraC ont été évaluées. Chez les animaux ayant reçu de l'AraC immédiatement après NVU (du 1<sup>er</sup> au 30<sup>e</sup> jour), l'activité mitotique a été totalement absente (diminution de cellules BrdU\* de 99,66 % dans le NVM, 99,91 % dans le NVI, 99,77 % dans le NVL et 99,42 % dans le NVS, correspondant respectivement aux noyaux vestibulaires médian [NVM], inférieur [NVI], latéral [NVL] et supérieur [NVS]) et la restauration des fonctions posturale et locomotrice a été considérablement retardée (trois mois au lieu d'un mois chez les animaux témoins) (voir Figure 4A et B). Ces données témoignent de l'implication de la neurogenèse GABAergique et de l'astrogenèse dans les processus de restauration des fonctions posturo-locomotrices. Cependant des travaux complémentaires sont nécessaires pour affirmer le lien de causalité entre neurogenèse et compensation vestibulaire.

En revanche, la rapide récupération de la fonction oculomotrice (6 jours) n'a pas été altérée par l'infusion d'AraC. Ceci suggère que la compensation du nystagmus oculaire horizontal spontané reposerait sur d'autres mécanismes de plasticité, qui interviendraient temporellement en amont de la neurogenèse et la gliogenèse [25]. En adéquation avec cette hypothèse, les travaux d'une équipe de chercheurs néo-zélandais ont montré qu'après lésion vestibulaire unilatérale, l'infusion d'oligonucléotides antisens bloquant l'expression du BDNF (facteur favorisant entre autres la neurogenèse) chez la souris conduisait à un retard dans la compensation des déficits posturaux, sans incidence sur le nystagmus oculaire [33]. Dans une autre étude, l'infusion chronique d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> dans les NV désafférentés a modifié l'expression des symptômes posturaux chez le cochon d'Inde, sans altérer l'expression des symptômes oculomoteurs [34]. Ainsi la compensation des paramètres posturolocomoteurs et oculomoteurs serait gouvernée par des mécanismes de plasticité différents.

### Le GABA : un acteur principal du retour à l'homéostasie des noyaux vestibulaires

La littérature sur la compensation vestibulaire mentionne depuis de nombreuses années l'importance du système GABAergique dans la restauration des fonctions vestibulaires [35]. Dans notre modèle de NVU,

la présence d'une neurogenèse GABAergique fonctionnelle est un résultat original qui attribue au système GABAergique un rôle pivot dans la récupération des déficits survenant après atteinte vestibulaire. Le système GABAergique est en effet connu pour contribuer de manière importante au rééquilibrage de l'activité électrique entre les NV homologues [15]. Nous proposons que les nouveaux neurones GABAergiques appartenant aux NV désafférentés pourraient inhiber localement des neurones inhibiteurs, rehaussant ainsi l'excitabilité intrinsèque. Une autre hypothèse serait que des réorganisations du milieu extracellulaire puissent conduire à une réexpression ponctuelle de cotransporteurs de cations et de chlorures Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> 2Cl<sup>-</sup> de type 1 (NKCC1). En effet, dans les premiers stades du développement et suite à certaines lésions engendrant une neurogenèse réactionnelle chez l'adulte, le GABA peut avoir une action dépolarisante sur les cellules pourvues de récepteurs de type GABA<sub>A</sub> et de NKCC1 [36, 37]. Dans ces conditions particulières, la présence de NKCC1 à la surface des membranes neuronales conduit à une accumulation intracellulaire de Cl<sup>-</sup>. Par conséquent, l'ouverture d'un récepteur ionotropique GABA<sub>A</sub> induit une sortie d'ions Cl<sup>-</sup> créant ainsi un flux dépolarisant. Un tel phénomène pourrait ainsi se produire en réaction à la NVU et favoriser l'augmentation progressive de l'activité électrique des neurones des NV désafférentés au cours de la compensation vestibulaire.

## Conclusions

Nos données originales et novatrices dans le domaine de la compensation vestibulaire pourraient offrir de nouvelles pistes en clinique humaine. Les différentes pathologies du système vestibulaire sont extrêmement invalidantes (vertiges, nausées, vomissements, pertes d'équilibre et de repères spatiaux). Comprendre comment le système nerveux central s'adapte et met en place une récupération comportementale après une lésion est un préalable au choix de traitements ciblés et efficaces, ainsi qu'à la mise en œuvre de meilleures procédures de réhabilitation.

Notre modèle expérimental, désafférentation vestibulaire induisant une neurogenèse fonctionnelle dans les noyaux vestibulaires du mammifère adulte, permet de déterminer les facteurs permettant à une zone cérébrale non neurogène de pouvoir ponctuellement produire de nouveaux neurones. Cependant, nous avons récemment démontré que la neurogenèse réactionnelle ne survenait qu'après désafférentation structurale et fonctionnelle des NV (NVU), alors qu'elle demeure inexistante après une désafférentation fonctionnelle plus progressive (labyrinthectomie : destruction chirurgicale des récepteurs labyrinthiques) [38]. La neurectomie vestibulaire reproduit des pathologies vestibulaires de survenue rapide (névrite vestibulaire, neurinome de l'acoustique, chirurgie du Ménière) tandis que la labyrinthectomie est plus proche d'un processus progressif de vieillissement des récepteurs vestibulaires périphériques, de leur lésion par traumatisme crânien ou de leur intoxication par des antibiotiques. Ainsi, il apparaît que les mécanismes de compensation vestibulaire dépendent étroitement de l'étiologie du trouble. Une

meilleure connaissance de ces mécanismes permettrait de mieux cibler la pharmacologie et la rééducation fonctionnelle en pathologie vestibulaire. ♦

## SUMMARY

### Discovering a new functional neurogenic zone : the vestibular nuclei of the brainstem

The adult mammal brain is mostly considered as non-neurogenic, except in the subventricular zone of the lateral ventricles and the subgranular zone of the dentate gyrus, where ongoing neurogenesis occurs. However, anti-neurogenic influences can be removed in pathological conditions or after specific injury. That is what happens in a model of unilateral vestibular neurectomy (UVN) that mimics human pathology in adult cats. We showed for the first time that a UVN promoted an intense reactive cell proliferation in the deafferented vestibular nuclei located in the brainstem. The new cells survived up to one month, differentiated into glial cells - microglia or astrocytes - or GABAergic neurons, so highlighting a GABAergic neurogenesis. Surprisingly, we further showed that post-UVN reactive cell proliferation contributed successfully to fine restoration of vestibular posturo-locomotor functions. In conclusion, these pioneering studies bring new pieces of a promising puzzle in both stem cell and vestibular therapy domains. ♦

## CONFLITS D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008 ; 132 : 645-60.
2. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, et al. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 11879-83.
3. Lie DC, Dzieczapolski G, Willhoite AR, et al. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 2002 ; 22 : 6639-49.
4. Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, et al. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 2000 ; 20 : 8727-35.
5. Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions of the adult brain. *Ann Neurol* 1999 ; 46 : 867-77.
6. Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, et al. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 1996 ; 383 : 624-7.
7. Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, et al. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 2005 ; 75 : 321-41.
8. Moysé E, Segura S, Liard O, et al. Microenvironmental determinants of adult neural stem cell proliferation and lineage commitment in the healthy and injured central nervous system. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008 ; 3 : 163-84.
9. Taupin P. Neurogenesis in the pathologies of the nervous system. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 711-4.
10. Lacour M. Restoration of vestibular function : basic aspects and practical advances for rehabilitation. *Curr Med Res Opin* 2006 ; 22 : 1651-9.



## Références

### A

- Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J (2006) Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal* 6:53-80.
- Abrous DN, Adriani W, Montaron MF, Aurousseau C, Rougon G, Le Moal M, Piazza PV (2002) Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J Neurosci* 22:3656-3662.
- Aguirre A, Gallo V (2004) Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J Neurosci* 24:10530-10541.
- Aguirre A, Dupree JL, Mangin JM, Gallo V (2007) A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nat Neurosci* 10:990-1002.
- 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. *J Cell Biol* 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. *J Neurosci* 29:4408-4419.
- Aimone JB, Deng W, Gage FH (2010) Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends Cogn Sci* 14:325-337.
- Airaksinen MS, Panula P (1988) The histaminergic system in the guinea pig central nervous system: an immunocytochemical mapping study using an antiserum against histamine. *J Comp Neurol* 273:163-186.
- Akita J, Takahashi M, Hojo M, Nishida A, Haruta M, Honda Y (2002) Neuronal differentiation of adult rat hippocampus-derived neural stem cells transplanted into embryonic rat explanted retinas with retinoic acid pretreatment. *Brain Res* 954:286-293.
- Alfonso J, Le Magueresse C, Zuccotti A, Khodosevich K, Monyer H (2012) Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell Stem Cell* 10:76-87.
- Allen E (1912) Cessation of mitosis in central nervous system of the albino rat. *J Comp Neurol* 22:547.
- Alonso G (2000) Prolonged corticosterone treatment of adult rats inhibits the proliferation of oligodendrocyte progenitors present throughout white and gray matter regions of the brain. *Glia* 31:219-231.
- Alonso G (2005) NG2 proteoglycan-expressing cells of the adult rat brain: possible involvement in the formation of glial scar astrocytes following stab wound. *Glia* 49:318-338.
- Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM (2006) Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 26:10508-10513.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389:856-860.
- 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. *Anat Rec* 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. *J Comp Neurol* 137:433-457.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Altman J, Das GD (1966) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 126:337-389.
- Alvarez-Buylla A, Nottebohm F (1988) Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature* 335:353-354.

- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F (1988) Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during, and after song learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8722-8726.
- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F (1990) Proliferation "hot spots" in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5:101-109.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2:287-293.
- Amrein I, Slomianka L, Poletaeva II, Bologova NV, Lipp HP (2004) Marked species and age-dependent differences in cell proliferation and neurogenesis in the hippocampus of wild-living rodents. *Hippocampus* 14:1000-1010.
- Andang M, Hjerling-Leffler J, Moliner A, Lundgren TK, Castelo-Branco G, Nanou E, Pozas E, Bryja V, Halliez S, Nishimaru H, Wilbertz J, Arenas E, Koltzenburg M, Charnay P, El Manira A, Ibanez CF, Ernfors P (2008) Histone H2AX-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* 451:460-464.
- Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M (2003) Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res* 28:293-305.
- Antonopoulos J, Pappas IS, Parnavelas JG (1997) Activation of the GABAA receptor inhibits the proliferative effects of bFGF in cortical progenitor cells. *Eur J Neurosci* 9:291-298.
- Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC (1983) Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* 302:832-837.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-970.

## B

- Baek JH, Zheng Y, Darlington CL, Smith PF (2010) Evidence that spatial memory deficits following bilateral vestibular deafferentation in rats are probably permanent. *Neurobiol Learn Mem* 94:402-413.
- Baker SA, Baker KA, Hagg T (2004) Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci* 20:575-579.
- Balaban CD, Porter JD (1998) Neuroanatomic substrates for vestibulo-autonomic interactions. *J Vestib Res* 8:7-16.
- Balu DT, Lucki I (2009) Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev* 33:232-252.
- Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH, Zhao X (2006) Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev* 15:407-421.
- Barnabe-Heider F, Goritz C, Sabelstrom H, Takebayashi H, Pfrieger FW, Meletis K, Frisen J Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 7:470-482.
- Barnea A, Nottebohm F (1994) Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11217-11221.
- Barres BA (1999) A new role for glia: generation of neurons! *Cell* 97:667-670.
- Barres BA (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60:430-440.
- Basak O, Taylor V (2009) Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cell Mol Life Sci* 66:1057-1072.
- Baskys A, Bayazitov I, Fang L, Blaabjerg M, Poulsen FR, Zimmer J (2005) Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology* 49 Suppl 1:146-156.
- Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW (1999) Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 19:1708-1716.

- Bath KG, Lee FS (2010) Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Neurobiol* 70:339-349.
- Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moysse E (2005) In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130:75-90.
- Bauer S, Moysse E, Jourdan F, Colpaert F, Martel JC, Marien M (2003) Effects of the alpha 2-adrenoreceptor antagonist dexefaroxan on neurogenesis in the olfactory bulb of the adult rat in vivo: selective protection against neuronal death. *Neuroscience* 117:281-291.
- Baum LW (2005) Sex, hormones, and Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60:736-743.
- Baumgart EV, Barbosa JS, Bally-Cuif L, Gotz M, Ninkovic J (2012) Stab wound injury of the zebrafish telencephalon: a model for comparative analysis of reactive gliosis. *Glia* 60:343-357.
- Becker S (2005) A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. *Hippocampus* 15:722-738.
- Bedard A, Levesque M, Bernier PJ, Parent A (2002) The rostral migratory stream in adult squirrel monkeys: contribution of new neurons to the olfactory tubercle and involvement of the antiapoptotic protein Bcl-2. *Eur J Neurosci* 16:1917-1924.
- Beech RD, Cleary MA, Treloar HB, Eisch AJ, Harrist AV, Zhong W, Greer CA, Duman RS, Picciotto MR (2004) Nestin promoter/enhancer directs transgene expression to precursors of adult generated periglomerular neurons. *J Comp Neurol* 475:128-141.
- Belachew S, Aguirre AA, Wang H, Vautier F, Yuan X, Anderson S, Kirby M, Gallo V (2002) Cyclin-dependent kinase-2 controls oligodendrocyte progenitor cell cycle progression and is downregulated in adult oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 22:8553-8562.
- Belanger HG, Kretzmer T, Yoash-Gantz R, Pickett T, Tupler LA (2009) Cognitive sequelae of blast-related versus other mechanisms of brain trauma. *J Int Neuropsychol Soc* 15:1-8.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87:1215-1284.
- Ben Abdallah NM, Slomianka L, Vyssotski AL, Lipp HP (2010) Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiol Aging* 31:151-161.
- Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O (1997) Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10432-10437.
- Benitez-Temino B, Morcuende S, Mentis GZ, de la Cruz RR, Pastor AM (2004) Expression of Trk receptors in the oculomotor system of the adult cat. *J Comp Neurol* 473:538-552.
- Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* 21:6718-6731.
- Beraneck M, McKee JL, Aleisa M, Cullen KE (2008) Asymmetric recovery in cerebellar-deficient mice following unilateral labyrinthectomy. *J Neurophysiol* 100:945-958.
- Berendse HW, Booij J, Francot CM, Bergmans PL, Hijman R, Stoof JC, Wolters EC (2001) Subclinical dopaminergic dysfunction in asymptomatic Parkinson's disease patients' relatives with a decreased sense of smell. *Ann Neurol* 50:34-41.
- Bergami M, Rimondini R, Santi S, Blum R, Gotz M, Canossa M (2008) Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15570-15575.
- Bergquist F, Dutia MB (2006) Central histaminergic modulation of vestibular function - a review. *Sheng Li Xue Bao* 58:293-304.
- Bergquist F, Ruthven A, Ludwig M, Dutia MB (2006) Histaminergic and glycinergic modulation of GABA release in the vestibular nuclei of normal and labyrinthectomised rats. *J Physiol* 577:857-868.
- Berman AL (1968) The brain stem of the cat. A Cytoarchitectonic Atlas with Stereotaxic Coordinates. Madison: Wisconsin University Press.
- Berman AL, Jones EG (1982) The thalamus and basaltelencephalon of the cat. A Cytoarchitectonic Atlas with Stereotaxic Coordinates. Madison: Wisconsin University Press.

- Bernabeu R, Sharp FR (2000) NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1669-1680.
- Bernal GM, Peterson DA (2011) Phenotypic and gene expression modification with normal brain aging in GFAP-positive astrocytes and neural stem cells. *Aging Cell* 10:466-482.
- Bernardino L, Eiriz MF, Santos T, Xapelli S, Grade S, Rosa AI, Cortes L, Ferreira R, Bragaça J, Agasse F, Ferreira L, Malva JO (2012) Histamine stimulates neurogenesis in the rodent subventricular zone. *Stem Cells* 30:773-784.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A (2002) Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11464-11469.
- Berthoz A, Israel I, Georges-Francois P, Grasso R, Tsuzuku T (1995) Spatial memory of body linear displacement: what is being stored? *Science* 269:95-98.
- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233-238.
- Bhardwaj RD, Curtis MA, Spalding KL, Buchholz BA, Fink D, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Gage FH, Druid H, Eriksson PS, Frisen J (2006) Neocortical neurogenesis in humans is restricted to development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12564-12568.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291:17-20.
- Bienhold H, Flohr H (1980) Role of cholinergic synapses in vestibular compensation. *Brain Res* 195:476-478.
- Bjornebekk A, Mathe AA, Brene S (2005) The antidepressant effect of running is associated with increased hippocampal cell proliferation. *Int J Neuropsychopharmacol* 8:357-368.
- Blackmore DG, Golmohammadi MG, Large B, Waters MJ, Rietze RL (2009) Exercise increases neural stem cell number in a growth hormone-dependent manner, augmenting the regenerative response in aged mice. *Stem Cells* 27:2044-2052.
- Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K (2009) Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 61:820-838.
- Blair HT, Sharp PE (1996) Visual and vestibular influences on head-direction cells in the anterior thalamus of the rat. *Behav Neurosci* 110:643-660.
- Blakeslee S (2000) A decade of discovery yields a shock about the brain. In: *New York Times*. New York.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Blum R, Heinrich C, Sanchez R, Lepier A, Gundelfinger ED, Berninger B, Gotz M (2011) Neuronal network formation from reprogrammed early postnatal rat cortical glial cells. *Cereb Cortex* 21:413-424.
- Blumenthal JA, Babyak MA, Moore KA, Craighead WE, Herman S, Khatri P, Waugh R, Napolitano MA, Forman LM, Appelbaum M, Doraiswamy PM, Krishnan KR (1999) Effects of exercise training on older patients with major depression. *Arch Intern Med* 159:2349-2356.
- Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, John Mann J, Arango V (2009) Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 34:2376-2389.
- Bolger C, Sansom AJ, Smith PF, Darlington CL (1999) An antisense oligonucleotide to brain-derived neurotrophic factor delays postural compensation following unilateral labyrinthectomy in guinea pig. *Neuroreport* 10:1485-1488.
- Bolteus AJ, Bordey A (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 24:7623-7631.
- Bondolfi L, Ermini F, Long JM, Ingram DK, Jucker M (2004) Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 25:333-340.
- Borel L, Harlay F, Magnan J, Lacour M (2001) How changes in vestibular and visual reference frames combine to modify body orientation in space. *Neuroreport* 12:3137-3141.

- Borel L, Lopez C, Peruch P, Lacour M (2008) Vestibular syndrome: a change in internal spatial representation. *Neurophysiol Clin* 38:375-389.
- Borel L, Harlay F, Magnan J, Chays A, Lacour M (2002) Deficits and recovery of head and trunk orientation and stabilization after unilateral vestibular loss. *Brain* 125:880-894.
- Borta A, Hoglinger GU (2007) Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem* 100:587-595.
- Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M, Vinay L (2010) Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* 16:302-307.
- Bovetti S, Hsieh YC, Bovolin P, Perroteau I, Kazunori T, Puche AC (2007) Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27:5976-5980.
- Bowen KK, Dempsey RJ, Vemuganti R (2011) Adult interleukin-6 knockout mice show compromised neurogenesis. *Neuroreport* 22:126-130.
- Bradley PB, Dray A (1976) Observations on the pharmacology of cholinceptive neurones in the rat brain stem. *Br J Pharmacol* 57:599-602.
- Brandt T, Schautzer F, Hamilton DA, Bruning R, Markowitsch HJ, Kalla R, Darlington C, Smith P, Strupp M (2005) Vestibular loss causes hippocampal atrophy and impaired spatial memory in humans. *Brain* 128:2732-2741.
- Bredy TW, Grant RJ, Champagne DL, Meaney MJ (2003) Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *Eur J Neurosci* 18:2903-2909.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157:115-118.
- Brezun JM, Daszuta A (1999) Serotonin depletion in the adult rat produces differential changes in highly polysialylated form of neural cell adhesion molecule and tenascin-C immunoreactivity. *J Neurosci Res* 55:54-70.
- Brezun JM, Daszuta A (2000) Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons. *Eur J Neurosci* 12:391-396.
- Brill MS, Snapyan M, Wohlfrom H, Ninkovic J, Jawerka M, Mastick GS, Ashery-Padan R, Saghatelian A, Berninger B, Gotz M (2008) A *dlx2*- and *pax6*-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 28:6439-6452.
- Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascon S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Gotz M (2009) Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci* 12:1524-1533.
- Brockes JP (1997) Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science* 276:81-87.
- Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG (2003) Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 17:2042-2046.
- Bruijnzeel AW, Bauzo RM, Munikoti V, Rodrick GB, Yamada H, Fornal CA, Ormerod BK, Jacobs BL (2011) Tobacco smoke diminishes neurogenesis and promotes gliogenesis in the dentate gyrus of adolescent rats. *Brain Res* 1413:32-42.
- Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Gotz M (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3581-3586.
- Burd GD, Nottebohm F (1985) Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *J Comp Neurol* 240:143-152.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31:149-160.
- Buttner U, Henn V, Oswald HP (1977) Vestibular-related neuronal activity in the thalamus of the alert monkey during sinusoidal rotation in the dark. *Exp Brain Res* 30:435-444.

Butz M, Lehmann K, Dammasch IE, Teuchert-Noodt G (2006) A theoretical network model to analyse neurogenesis and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Neural Netw* 19:1490-1505.

## C

Cameron HA, McKay RD (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2:894-897.

Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435:406-417.

Cameron HA, Dayer AG (2008) New interneurons in the adult neocortex: small, sparse, but significant? *Biol Psychiatry* 63:650-655.

Cameron HA, McEwen BS, Gould E (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 15:4687-4692.

Cameron HA, Tanapat P, Gould E (1998) Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience* 82:349-354.

Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.

Cameron SA, Dutia MB (1999) Lesion-induced plasticity in rat vestibular nucleus neurones dependent on glucocorticoid receptor activation. *J Physiol* 518 ( Pt 1):151-158.

Campos-Torres A, Touret M, Vidal PP, Barnum S, de Waele C (2005) The differential response of astrocytes within the vestibular and cochlear nuclei following unilateral labyrinthectomy or vestibular afferent activity blockade by transtympanic tetrodotoxin injection in the rat. *Neuroscience* 130:853-865.

Campos Torres A, Vidal PP, de Waele C (1999) Evidence for a microglial reaction within the vestibular and cochlear nuclei following inner ear lesion in the rat. *Neuroscience* 92:1475-1490.

Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ (2004) VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet* 36:827-835.

Capela A, Temple S (2002) LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35:865-875.

Capocchi G, Della Torre G, Grassi S, Pettorossi VE, Zampolini M (1992) NMDA receptor-mediated long term modulation of electrically evoked field potentials in the rat medial vestibular nuclei. *Exp Brain Res* 90:546-550.

Carlen M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisen J (2002) Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol* 12:606-608.

Carlen M, Meletis K, Goritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabe-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisen J (2009) Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* 12:259-267.

Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507-518.

Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I (2000) Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* 20:2926-2933.

Cass SP, Goshgarian HG (1990) Increased glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in astrocytes within the lateral vestibular nucleus of the cat following labyrinthectomy and vestibular neurectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99:221-227.

Cass SP, Davidson P, Goshgarian H (1989) Survival of the vestibular nerve after labyrinthectomy in the cat. *Otolaryngol Head Neck Surg* 101:459-465.

Castren E, Voikar V, Rantamaki T (2007) Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol* 7:18-21.

- Catena-Dell'Osso M, Bellantuono C, Consoli G, Baroni S, Rotella F, Marazziti D (2011) Inflammatory and neurodegenerative pathways in depression: a new avenue for antidepressant development? *Curr Med Chem* 18:245-255.
- Cayre M, Canoll P, Goldman JE (2009) Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol* 88:41-63.
- Cayre M, Malaterre J, Scotto-Lomassese S, Strambi C, Strambi A (2002) The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 132:1-15.
- Cayre M, Bancila M, Virard I, Borges A, Durbec P (2006) Migrating and myelinating potential of subventricular zone neural progenitor cells in white matter tracts of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 31:748-758.
- Cayre M, Scotto-Lomassese S, Malaterre J, Strambi C, Strambi A (2007) Understanding the regulation and function of adult neurogenesis: contribution from an insect model, the house cricket. *Chem Senses* 32:385-395.
- Cayre M, Strambi C, Charpin P, Augier R, Meyer MR, Edwards JS, Strambi A (1996) Neurogenesis in adult insect mushroom bodies. *J Comp Neurol* 371:300-310.
- Chabbert C, Sans A, Lehouelleur J (1996) What mechanisms are involved in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in hair cells? *Ann N Y Acad Sci* 779:397-399.
- Chambers RA, Conroy SK (2007) Network modeling of adult neurogenesis: shifting rates of neuronal turnover optimally gears network learning according to novelty gradient. *J Cogn Neurosci* 19:1-12.
- Chapouton P, Webb KJ, Stigloher C, Alunni A, Adolf B, Hesi B, Topp S, Kremmer E, Bally-Cuif L (2011) Expression of hairy/enhancer of split genes in neural progenitors and neurogenesis domains of the adult zebrafish brain. *J Comp Neurol* 519:1748-1769.
- Charrier C, Coronas V, Fombonne J, Roger M, Jean A, Krantic S, Moyse E (2006) Characterization of neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat by in vivo proliferation labeling and in vitro neurosphere assay. *Neuroscience* 138:5-16.
- Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50:260-265.
- Chen J, Magavi SS, Macklis JD (2004) Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16357-16362.
- Chen L, Gong S, Shan LD, Xu WP, Zhang YJ, Guo SY, Hisamitsu T, Yin QZ, Jiang XH (2006) Effects of exercise on neurogenesis in the dentate gyrus and ability of learning and memory after hippocampus lesion in adult rats. *Neurosci Bull* 22:1-6.
- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D (1999) Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 19:4462-4471.
- Chmielnicki E, Benraiss A, Economides AN, Goldman SA (2004) Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone. *J Neurosci* 24:2133-2142.
- Cho SR, Benraiss A, Chmielnicki E, Samdani A, Economides A, Goldman SA (2007) Induction of neostriatal neurogenesis slows disease progression in a transgenic murine model of Huntington disease. *J Clin Invest* 117:2889-2902.
- Christensen JR, Larsen KB, Lisanby SH, Scalia J, Arango V, Dwork AJ, Pakkenberg B (2007) Neocortical and hippocampal neuron and glial cell numbers in the rhesus monkey. *Anat Rec (Hoboken)* 290:330-340.
- Cirelli C, Pompeiano M, D'Ascanio P, Arrighi P, Pompeiano O (1996) c-fos Expression in the rat brain after unilateral labyrinthectomy and its relation to the uncompensated and compensated stages. *Neuroscience* 70:515-546.
- Clark PJ, Bhattacharya TK, Miller DS, Rhodes JS (2011) Induction of c-Fos, Zif268, and Arc from acute bouts of voluntary wheel running in new and pre-existing adult mouse hippocampal granule neurons. *Neuroscience* 184:16-27.

- Coe CL, Kramer M, Czeh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, Fuchs E (2003) Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biol Psychiatry* 54:1025-1034.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325:201-204.
- Conrad CD (2006) What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? *Behav Cogn Neurosci Rev* 5:41-60.
- Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Kuhn HG (2004) Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res* 77:155-165.
- Coronas V, Bantubungi K, Fombonne J, Krantic S, Schiffmann SN, Roger M (2004) Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *J Neurochem* 91:1292-1301.
- 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.
- Costa DA, Cracchiolo JR, Bachstetter AD, Hughes TF, Bales KR, Paul SM, Mervis RF, Arendash GW, Potter H (2007) Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiol Aging* 28:831-844.
- Cotman CW, Nieto-Sampedro M, Harris EW (1981) Synapse replacement in the nervous system of adult vertebrates. *Physiol Rev* 61:684-784.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA (2007) Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 30:464-472.
- 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. *J Neurosci* 16:2649-2658.
- Crews FT, Nixon K (2009) Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol* 44:115-127.
- Cummings DM, Knab BR, Brunjes PC (1997) Effects of unilateral olfactory deprivation in the developing opossum, *Monodelphis domestica*. *J Neurobiol* 33:429-438.
- Curthoys IS, Smith PF, Darlington CL (1988) Postural compensation in the guinea pig following unilateral labyrinthectomy. *Prog Brain Res* 76:375-384.
- Czeh B, Lucassen PJ (2007) What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:250-260.
- Czeh B, Muller-Keuker JI, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C, Domenici E, Fuchs E (2007) Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 32:1490-1503.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12796-12801.

## D

- Darlington CL, Smith PF (1996) The recovery of static vestibular function following peripheral vestibular lesions in mammals: the intrinsic mechanism hypothesis. *J Vestib Res* 6:185-201.
- Darlington CL, Smith PF (2000) Molecular mechanisms of recovery from vestibular damage in mammals: recent advances. *Prog Neurobiol* 62:313-325.
- Das S, Basu A (2008) Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. *J Neurosci Res* 86:1199-1208.

- Davenne M, Custody C, Charneau P, Lledo PM (2005) In vivo imaging of migrating neurons in the mammalian forebrain. *Chem Senses* 30 Suppl 1:i115-116.
- David DJ, Wang J, Samuels BA, Rainer Q, David I, Gardier AM, Hen R (2010) Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *Neuroscientist* 16:578-591.
- Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA (2005) New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol* 168:415-427.
- de Chevigny A, Cooper O, Vinuela A, Reske-Nielsen C, Lagace DC, Eisch AJ, Isacson O (2008) Fate mapping and lineage analyses demonstrate the production of a large number of striatal neuroblasts after transforming growth factor alpha and noggin striatal infusions into the dopamine-depleted striatum. *Stem Cells* 26:2349-2360.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.
- De Marchis S, Fasolo A, Shipley M, Puche A (2001) Unique neuronal tracers show migration and differentiation of SVZ progenitors in organotypic slices. *J Neurobiol* 49:326-338.
- de Waele C, Muhlethaler M, Vidal PP (1995) Neurochemistry of the central vestibular pathways. *Brain Res Brain Res Rev* 20:24-46.
- Deak A, Bacskai T, Gaal B, Racz E, Matesz K (2012) Effect of unilateral labyrinthectomy on the molecular composition of perineuronal nets in the lateral vestibular nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 513:1-5.
- Diaz J, Ridray S, Mignon V, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P (1997) Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *J Neurosci* 17:4282-4292.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999a) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11619-11624.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999b) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- 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.
- Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ (2006) Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 495:70-83.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14385-14390.
- Driscoll I, Howard SR, Stone JC, Monfils MH, Tomanek B, Brooks WM, Sutherland RJ (2006) The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience* 139:1173-1185.
- Duan W, Mattson MP (1999) Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 57:195-206.
- Duan W, Lee J, Guo Z, Mattson MP (2001) Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. *J Mol Neurosci* 16:1-12.
- Duensing F, Schaefer KP (1958) [The activity of single neurons in the region of vestibular nuclei in horizontal acceleration, with special reference to vestibular nystagmus]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr* 198:225-252.
- Duensing F, Schaefer KP (1959) [On the convergence of various labyrinthine afferent nerves toward individual neurons of the vestibular nuclear area]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr* 199:345-371.

- Duffy MT, Liebich DR, Garner LK, Hawrych A, Simpson SB, Jr., Davis BM (1992) Axonal sprouting and frank regeneration in the lizard tail spinal cord: correlation between changes in synaptic circuitry and axonal growth. *J Comp Neurol* 316:363-374.
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116-1127.
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3:e1959.
- Dupret D, Fabre A, Dobrossy MD, Panatier A, Rodriguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Oliet SH, Piazza PV, Abrous DN (2007) Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol* 5:e214.
- Dutheil S, Lacour M, Tighilet B (2011a) [Discovering a new functional neurogenic zone: the vestibular nuclei of the brainstem]. *Med Sci (Paris)* 27:605-613.
- Dutheil S, Lacour M, Tighilet B (2011b) Neurogenic potential of the vestibular nuclei and behavioural recovery time course in the adult cat are governed by the nature of the vestibular damage. *PLoS One* 6:e22262.
- Dutheil S, Brezun JM, Leonard J, Lacour M, Tighilet B (2009) Neurogenesis and astrogenesis contribution to recovery of vestibular functions in the adult cat following unilateral vestibular neurectomy: cellular and behavioral evidence. *Neuroscience* 164:1444-1456.
- Dutia MB (2010) Mechanisms of vestibular compensation: recent advances. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 18:420-424.
- Dutia MB, Johnston AR, McQueen DS (1992) Tonic activity of rat medial vestibular nucleus neurones in vitro and its inhibition by GABA. *Exp Brain Res* 88:466-472.
- Duveau V, Laustela S, Barth L, Gianolini F, Vogt KE, Keist R, Chandra D, Homanics GE, Rudolph U, Fritschy JM (2012) Spatiotemporal specificity of GABAA receptor-mediated regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 34:362-373.

## E

- Ehrenberger K, Felix D (1996) Receptorpharmacological models for the therapy of labyrinthine vertigo. *Acta Otolaryngol* 116:189-191.
- Ehrenberger K, Benkoe E, Felix D (1982) Suppressive action of picrotoxin, a GABA antagonist, on labyrinthine spontaneous nystagmus and vertigo in man. *Acta Otolaryngol* 93:269-273.
- Eichmann A, Makinen T, Alitalo K (2005) Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes Dev* 19:1013-1021.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13632-13637.
- Eleore L, Vassias I, Bernat I, Vidal PP, de Waele C (2005) An in situ hybridization and immunofluorescence study of GABA(A) and GABA(B) receptors in the vestibular nuclei of the intact and unilaterally labyrinthectomized rat. *Exp Brain Res* 160:166-179.
- Elsner RJ (2001) Odor threshold, recognition, discrimination and identification in centenarians. *Arch Gerontol Geriatr* 33:81-94.
- Emsley JG, Hagg T (2003) Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp Neurol* 183:298-310.
- Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD (2005) Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 75:321-341.
- Engelhardt M, Wachs FP, Couillard-Despres S, Aigner L (2004) The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina in vitro. *Exp Eye Res* 78:1025-1036.

- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004) Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24:8354-8365.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Ernfors P, Van De Water T, Loring J, Jaenisch R (1995) Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron* 14:1153-1164.
- Estes MS, Blanks RH, Markham CH (1975) Physiologic characteristics of vestibular first-order canal neurons in the cat. I. Response plane determination and resting discharge characteristics. *J Neurophysiol* 38:1232-1249.

## F

- 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. *Front Neurosci* 3:50.
- Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD (2003) VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18:2803-2812.
- Fahrbach SE, Strande JL, Robinson GE (1995) Neurogenesis is absent in the brains of adult honey bees and does not explain behavioral neuroplasticity. *Neurosci Lett* 197:145-148.
- Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindefors N (1992) Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* 138:153-156.
- Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Kim SH, Langdon RB, Sisodia SS, Tsien JZ (2001) Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* 32:911-926.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5837-5842.
- Ferretti P (2011) Is there a relationship between adult neurogenesis and neuron generation following injury across evolution? *Eur J Neurosci* 34:951-962.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23:373-382.
- Fiore M, Triaca V, Amendola T, Tirassa P, Aloe L (2002) Brain NGF and EGF administration improves passive avoidance response and stimulates brain precursor cells in aged male mice. *Physiol Behav* 77:437-443.
- Fischer AJ (1991) Histamine in the treatment of vertigo. *Acta Otolaryngol Suppl* 479:24-28.
- Fizman ML, Borodinsky LN, Neale JH (1999) GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 115:1-8.
- Flanary BE, Sammons NW, Nguyen C, Walker D, Streit WJ (2007) Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence. *Rejuvenation Res* 10:61-74.
- Flohr H, Abeln W, Luneburg U (1985) Neurotransmitter and neuromodulator systems involved in vestibular compensation. *Rev Oculomot Res* 1:269-277.
- Foley AG, Prendergast A, Barry C, Scully D, Upton N, Medhurst AD, Regan CM (2009) H3 receptor antagonism enhances NCAM PSA-mediated plasticity and improves memory consolidation in odor discrimination and delayed match-to-position paradigms. *Neuropsychopharmacology* 34:2585-2600.
- Folmer RL, Griest SE, Meikle MB, Martin WH (1999) Tinnitus severity, loudness, and depression. *Otolaryngol Head Neck Surg* 121:48-51.
- Fowler CD, Johnson F, Wang Z (2005) Estrogen regulation of cell proliferation and distribution of estrogen receptor-alpha in the brains of adult female prairie and meadow voles. *J Comp Neurol* 489:166-179.

- Fowler CD, Liu Y, Wang Z (2008) Estrogen and adult neurogenesis in the amygdala and hypothalamus. *Brain Res Rev* 57:342-351.
- Fowler CD, Liu Y, Ouimet C, Wang Z (2002) The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *J Neurobiol* 51:115-128.
- Fox RA, Roth TC, 2nd, LaDage LD, Pravosudov VV (2010) No effect of social group composition or size on hippocampal formation morphology and neurogenesis in mountain chickadees (*Poecile gambeli*). *Dev Neurobiol* 70:538-547.
- Friedman WJ, Black IB, Kaplan DR (1998) Distribution of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the postnatal rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience* 84:101-114.
- Frielingdorf H, Schwarz K, Brundin P, Mohapel P (2004) No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10177-10182.
- Fuchs E, Czeh B, Kole MH, Michaelis T, Lucassen PJ (2004) Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *Eur Neuropsychopharmacol* 14 Suppl 5:S481-490.
- Furuya N, Koizumi T (1998) Neurotransmitters of vestibular commissural inhibition in the cat. *Acta Otolaryngol* 118:64-69.
- Furuya N, Yabe T, Koizumi T (1991) Neurotransmitters regulating vestibular commissural inhibition in the cat. *Acta Otolaryngol Suppl* 481:205-208.

## G

- Gacek RR (1969) The course and central termination of first order neurons supplying vestibular endorgans in the cat. *Acta Otolaryngol Suppl* 254:1-66.
- Gacek RR, Khetarpal U (1998) Neurotrophin 3, not brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin 4, knockout mice have delay in vestibular compensation after unilateral labyrinthectomy. *Laryngoscope* 108:671-678.
- Gacek RR, Lyon MJ, Schoonmaker J (1988) Ultrastructural changes in vestibulo-ocular neurons following vestibular neurectomy in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 97:42-51.
- Gacek RR, Lyon MJ, Schoonmaker JE (1989) Morphologic correlates of vestibular compensation in the cat. *Acta Otolaryngol Suppl* 462:1-16.
- Gajera CR, Emich H, Lioubinski O, Christ A, Beckervordersandforth-Bonk R, Yoshikawa K, Bachmann S, Christensen EI, Gotz M, Kempermann G, Peterson AS, Willnow TE, Hammes A (2010) LRP2 in ependymal cells regulates BMP signaling in the adult neurogenic niche. *J Cell Sci* 123:1922-1930.
- Gama Sosa MA, Wen PH, De Gasperi R, Perez GM, Senturk E, Friedrich VL, Jr., Elder GA (2004) Entorhinal cortex lesioning promotes neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neuroscience* 127:881-891.
- Gascon E, Dayer AG, Sauvain MO, Potter G, Jenny B, De Roo M, Zraggen E, Demareux N, Muller D, Kiss JZ (2006) GABA regulates dendritic growth by stabilizing lamellipodia in newly generated interneurons of the olfactory bulb. *J Neurosci* 26:12956-12966.
- Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H (2007) GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci* 30:1-8.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589-593.
- Gernandt B (1949) Response of mammalian vestibular neurons to horizontal rotation and caloric stimulation. *J Neurophysiol* 12:173-184.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1823-1828.
- Gliddon CM, Smith PF, Darlington CL (2003a) Interaction between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and behavioural compensation following unilateral vestibular deafferentation. *Acta Otolaryngol* 123:1013-1021.

- Gliddon CM, Darlington CL, Smith PF (2003b) Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis following vestibular deafferentation in pigmented guinea pig. *Brain Res* 964:306-310.
- Gliddon CM, Darlington CL, Smith PF (2005a) GABAergic systems in the vestibular nucleus and their contribution to vestibular compensation. *Prog Neurobiol* 75:53-81.
- Gliddon CM, Darlington CL, Smith PF (2005b) Effects of chronic infusion of a GABAA receptor agonist or antagonist into the vestibular nuclear complex on vestibular compensation in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1126-1135.
- Goble TJ, Moller AR, Thompson LT (2009) Acute high-intensity sound exposure alters responses of place cells in hippocampus. *Hear Res* 253:52-59.
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2390-2394.
- Goldman SA, Kirschenbaum B, Harrison-Restelli C, Thaler HT (1997) Neuronal precursors of the adult rat subependymal zone persist into senescence, with no decline in spatial extent or response to BDNF. *J Neurobiol* 32:554-566.
- Gomez-Pinilla F, Dao L, So V (1997) Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Res* 764:1-8.
- Gonzalo-Gobernado R, Reimers D, Herranz AS, Diaz-Gil JJ, Osuna C, Asensio MJ, Baena S, Rodriguez-Serrano M, Bazan E (2009) Mobilization of neural stem cells and generation of new neurons in 6-OHDA-lesioned rats by intracerebroventricular infusion of liver growth factor. *J Histochem Cytochem* 57:491-502.
- Gould E, Cameron HA, McEwen BS (1994) Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 340:551-565.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999a) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286:548-552.
- Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG (2001) Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10910-10917.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17:2492-2498.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999b) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2:260-265.
- Grassi S, Frondaroli A, Dieni C, Dutia MB, Pettorossi VE (2007) Neurosteroid modulation of neuronal excitability and synaptic transmission in the rat medial vestibular nuclei. *Eur J Neurosci* 26:23-32.
- Gratzner HG (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474-475.
- Greene J, Banasr M, Lee B, Warner-Schmidt J, Duman RS (2009) Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: pharmacological and cellular characterization. *Neuropsychopharmacology* 34:2459-2468.
- Guidetti G, Monzani D, Trebbi M, Rovatti V (2008) Impaired navigation skills in patients with psychological distress and chronic peripheral vestibular hypofunction without vertigo. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 28:21-25.
- Gulley RL, Wenthold RJ, Neises GR (1978) Changes in the synapses of spiral ganglion cells in the rostral anteroventral cochlear nucleus of the waltzing guinea pig following hair cell loss. *Brain Res* 158:279-294.
- Gustave Dit Duflo S, Gestreau C, Lacour M (2000) Fos expression in the rat brain after exposure to gravito-inertial force changes. *Brain Res* 861:333-344.
- Gustave Dit Duflo S, Gestreau C, Tighilet B, Lacour M (1999) Fos expression in the cat brainstem after unilateral vestibular neurectomy. *Brain Res* 824:1-17.
- Guzman-Marin R, Suntsova N, Bashir T, Szymusiak R, McGinty D (2007) Cell proliferation in the dentate gyrus of the adult rat fluctuates with the light-dark cycle. *Neurosci Lett* 422:198-201.
- Guzman-Marin R, Suntsova N, Methippara M, Greiffenstein R, Szymusiak R, McGinty D (2005) Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 22:2111-2116.

Guzman-Marin R, Ying Z, Suntsova N, Methippara M, Bashir T, Szymusiak R, Gomez-Pinilla F, McGinty D (2006) Suppression of hippocampal plasticity-related gene expression by sleep deprivation in rats. *J Physiol* 575:807-819.

## H

- Habib KE, Gold PW, Chrousos GP (2001) Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30:695-728; vii-viii.
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Gotz M (2005) Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 8:865-872.
- Haddad GM, Friendlich AR, Robinson DA (1977) Compensation of nystagmus after VIIIth nerve lesions in vestibulo-cerebellectomized cats. *Brain Res* 135:192-196.
- Hajszan T, Dow A, Warner-Schmidt JL, Szigeti-Buck K, Sallam NL, Parducz A, Leranath C, Duman RS (2009) Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. *Biol Psychiatry* 65:392-400.
- Halford JB, Anderson SD (1991) Anxiety and depression in tinnitus sufferers. *J Psychosom Res* 35:383-390.
- Hamilton A (1901) The division of differentiated cells in the central nervous system of the white rat. *J Comp Neurol* 11:297.
- Hanley J, Rastegarlar G, Nathwani AC (2010) An introduction to induced pluripotent stem cells. *Br J Haematol* 151:16-24.
- Hartlage-Rubsamen M, Zeitschel U, Apelt J, Gartner U, Franke H, Stahl T, Gunther A, Schliebs R, Penkowa M, Bigl V, Rossner S (2003) Astrocytic expression of the Alzheimer's disease beta-secretase (BACE1) is stimulus-dependent. *Glia* 41:169-179.
- Hattiangady B, Shetty AK (2008) Aging does not alter the number or phenotype of putative stem/progenitor cells in the neurogenic region of the hippocampus. *Neurobiol Aging* 29:129-147.
- Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP (2002) Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 83:1509-1524.
- Hayashi M, Mistunaga F, Ohira K, Shimizu K (2001) Changes in BDNF-immunoreactive structures in the hippocampal formation of the aged macaque monkey. *Brain Res* 918:191-196.
- Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* 20:5764-5774.
- Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185-193.
- Heck N, Kilb W, Reiprich P, Kubota H, Furukawa T, Fukuda A, Luhmann HJ (2007) GABA-A receptors regulate neocortical neuronal migration in vitro and in vivo. *Cereb Cortex* 17:138-148.
- Heinrich C, Blum R, Gascon S, Masserdotti G, Tripathi P, Sanchez R, Tiedt S, Schroeder T, Gotz M, Berninger B (2010) Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol* 8:e1000373.
- Heishman SJ (1999) Behavioral and cognitive effects of smoking: relationship to nicotine addiction. *Nicotine Tob Res* 1 Suppl 2:S143-147; discussion S165-146.
- Helfer JL, Goodlett CR, Greenough WT, Klintsova AY (2009) The effects of exercise on adolescent hippocampal neurogenesis in a rat model of binge alcohol exposure during the brain growth spurt. *Brain Res* 1294:1-11.
- Hernandez-Rabaza V, Llorens-Martin M, Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Arcusa A, Gumus HG, Gomez-Pinedo U, Perez-Villalba A, Rosello J, Trejo JL, Barcia JA, Canales JJ (2009) Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but spares spatial working memory, long-term conditional rule retention and spatial reversal. *Neuroscience* 159:59-68.
- Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol* 46:867-877.

- Hicks AU, Hewlett K, Windle V, Chernenko G, Ploughman M, Jolkkonen J, Weiss S, Corbett D (2007) Enriched environment enhances transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke. *Neuroscience* 146:31-40.
- Ho NF, Han SP, Dawe GS (2009) Effect of voluntary running on adult hippocampal neurogenesis in cholinergic lesioned mice. *BMC Neurosci* 10:57.
- Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U (2000) Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol* 57:846-851.
- Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:726-735.
- 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 Dev* 19:462-471.
- Honegger P, Pardo B, Monnet-Tschudi F (1998) Muscimol-induced death of GABAergic neurons in rat brain aggregating cell cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 105:219-225.
- Horii A, Russell NA, Smith PF, Darlington CL, Bilkey DK (2004) Vestibular influences on CA1 neurons in the rat hippocampus: an electrophysiological study in vivo. *Exp Brain Res* 155:245-250.
- Horii A, Kitahara T, Smith PF, Darlington CL, Masumura C, Kubo T (2003) Effects of unilateral labyrinthectomy on GAD, GAT1 and GABA receptor gene expression in the rat vestibular nucleus. *Neuroreport* 14:2359-2363.
- Horky LL, Galimi F, Gage FH, Horner PJ (2006) Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *J Comp Neurol* 498:525-538.
- Horner KC, Cazals Y (2005) Stress hormones in Meniere's disease and acoustic neuroma. *Brain Res Bull* 66:1-8.
- Horner PJ, Palmer TD (2003) New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte'. *La vida local! Trends Neurosci* 26:597-603.
- Hoshino T, Nagashima T, Cho KG, Davis RL, Donegan J, Slusarz M, Wilson CB (1989) Variability in the proliferative potential of human gliomas. *J Neurooncol* 7:137-143.
- Houser CR (1990) Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 535:195-204.
- Howard CV, Reed MG (2005) *Unbiased Stereology*. In, p 277. Abingdon, UK: Garland Bios Scientific Publishers.
- Huang L, DeVries GJ, Bittman EL (1998) Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J Neurobiol* 36:410-420.
- Hufner K, Binetti C, Hamilton DA, Stephan T, Flanagan VL, Linn J, Labudda K, Markowitsch H, Glasauer S, Jahn K, Strupp M, Brandt T (2011) Structural and functional plasticity of the hippocampal formation in professional dancers and slackliners. *Hippocampus* 21:855-865.
- Igarashi M, Ishikawa K (1985) Post-labyrinthectomy balance compensation with preplacement of cerebellar vermis lesion. *Acta Otolaryngol* 99:452-458.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Kageyama R (2009) Continuous neurogenesis in the adult brain. *Dev Growth Differ* 51:379-386.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153-1161.
- Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, Frenkel D, Li J, Sidman RL, Walsh CA, Snyder EY, Khoury SJ (2004) Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:18117-18122.
- Inestrosa NC, Arenas E (2010) Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci* 11:77-86.

- Issa AM, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ (1990) Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* 10:3247-3254.
- Ito K, Hotta Y (1992) Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 149:134-148.

## J

- Jacobs JS, Miller MW (2001) Proliferation and death of cultured fetal neocortical neurons: effects of ethanol on the dynamics of cell growth. *J Neurocytol* 30:391-401.
- Jagasia R, Song H, Gage FH, Lie DC (2006) New regulators in adult neurogenesis and their potential role for repair. *Trends Mol Med* 12:400-405.
- Jaholkowski P, Kiryk A, Jedynak P, Ben Abdallah NM, Knapska E, Kowalczyk A, Piechal A, Blecharz-Klin K, Figiel I, Liudyno V, Widy-Tyszkiewicz E, Wilczynski GM, Lipp HP, Kaczmarek L, Filipkowski RK (2009) New hippocampal neurons are not obligatory for memory formation; cyclin D2 knockout mice with no adult brain neurogenesis show learning. *Learn Mem* 16:439-451.
- Jakubs K, Bonde S, Iosif RE, Ekdahl CT, Kokaia Z, Kokaia M, Lindvall O (2008) Inflammation regulates functional integration of neurons born in adult brain. *J Neurosci* 28:12477-12488.
- Janssen U, Richter-Landsberg C, Flohr H (1992) Vestibular compensation affects endogenous phosphorylation of frog brain proteins. *J Neurochem* 58:65-71.
- Jessberger S, Zhao C, Toni N, Clemenson GD, Jr., Li Y, Gage FH (2007) Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *J Neurosci* 27:9400-9407.
- Jhaveri DJ, Mackay EW, Hamlin AS, Marathe SV, Nandam LS, Vaidya VA, Bartlett PF (2010) Norepinephrine directly activates adult hippocampal precursors via beta3-adrenergic receptors. *J Neurosci* 30:2795-2806.
- Jian BJ, Acernese AW, Lorenzo J, Card JP, Yates BJ (2005) Afferent pathways to the region of the vestibular nuclei that participates in cardiovascular and respiratory control. *Brain Res* 1044:241-250.
- 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 J, Jing H, Choi G, Oh MS, Ryu JH, Jeong JW, Huh Y, Park C (2008) Voluntary exercise increases the new cell formation in the hippocampus of ovariectomized mice. *Neurosci Lett* 439:260-263.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11946-11950.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:343-347.
- Joels M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ (2007) Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol* 28:72-96.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.
- Johnston AR, Seckl JR, Dutia MB (2002) Role of the flocculus in mediating vestibular nucleus neuron plasticity during vestibular compensation in the rat. *J Physiol* 545:903-911.
- Jones NC, Kumar G, O'Brien TJ, Morris MJ, Rees SM, Salzberg MR (2009) Anxiolytic effects of rapid amygdala kindling, and the influence of early life experience in rats. *Behav Brain Res* 203:81-87.
- Joo JY, Kim BW, Lee JS, Park JY, Kim S, Yun YJ, Lee SH, Rhim H, Son H (2007) Activation of NMDA receptors increases proliferation and differentiation of hippocampal neural progenitor cells. *J Cell Sci* 120:1358-1370.
- Jung KH, Chu K, Kim M, Jeong SW, Song YM, Lee ST, Kim JY, Lee SK, Roh JK (2004) Continuous cytosine-b-D-arabinofuranoside infusion reduces ectopic granule cells in adult rat hippocampus with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Eur J Neurosci* 19:3219-3226.

## K

- Kalueff AV, Ishikawa K, Griffith AJ (2008) Anxiety and otovestibular disorders: linking behavioral phenotypes in men and mice. *Behav Brain Res* 186:1-11.
- Kaneko N, Okano H, Sawamoto K (2006) Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes Cells* 11:1145-1159.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Karl MO, Hayes S, Nelson BR, Tan K, Buckingham B, Reh TA (2008) Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19508-19513.
- Karten YJ, Jones MA, Jeurling SI, Cameron HA (2006) GABAergic signaling in young granule cells in the adult rat and mouse dentate gyrus. *Hippocampus* 16:312-320.
- Kaufman GD, Anderson JH, Beitz AJ (1992) Brainstem Fos expression following acute unilateral labyrinthectomy in the rat. *Neuroreport* 3:829-832.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW (2007) Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci* 10:355-362.
- Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, Foo WC, Masel J, Yenari MA, Weissman IL, Uchida N, Palmer T, Steinberg GK (2004) Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11839-11844.
- Kempermann G (2011a) In: *Adult Neurogenesis 2, Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain*, p 6: Oxford University Press, USA.
- Kempermann G (2011b) *Adult Hippocampal Neurogenesis*. In: *Adult Neurogenesis 2, Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain* pp 201-202: Oxford University Press, USA
- Kempermann G (2011c) Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33:1018-1024.
- Kempermann G, Gage FH (1998) Closer to neurogenesis in adult humans. *Nat Med* 4:555-557.
- Kempermann G, Gage FH (1999) Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus* 9:321-332.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997a) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997b) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10409-10414.
- Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002) Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 52:135-143.
- Kempermann G, Chesler EJ, Lu L, Williams RW, Gage FH (2006) Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:780-785.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156:837-841.
- Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, Wittchen HU, Kendler KS (1994) Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 51:8-19.
- Khaindrava V, Salin P, Melon C, Ugrumov M, Kerkerian-Le-Goff L, Daszuta A (2011) High frequency stimulation of the subthalamic nucleus impacts adult neurogenesis in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 42:284-291.
- Kippin TE, Kapur S, van der Kooy D (2005) Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *J Neurosci* 25:5815-5823.
- Kirschenbaum B, Goldman SA (1995) Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:210-214.

- Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, Murayama A, Niibori Y, Ageta H, Sekiguchi M, Sugiyama H, Inokuchi K (2009) Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell* 139:814-827.
- Klintonsova AY, Helfer JL, Calizo LH, Dong WK, Goodlett CR, Greenough WT (2007) Persistent impairment of hippocampal neurogenesis in young adult rats following early postnatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 31:2073-2082.
- Knobloch M, Jessberger S (2011) Perspectives on adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33:1013-1017.
- Koehl M, Abrous DN (2011) A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33:1101-1114.
- Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A (2005) Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:6997-7003.
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* 10:719-726.
- Kokaia Z, Thored P, Arvidsson A, Lindvall O (2006) Regulation of stroke-induced neurogenesis in adult brain--recent scientific progress. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1:i162-167.
- Koketsu D, Mikami A, Miyamoto Y, Hisatsune T (2003) Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys. *J Neurosci* 23:937-942.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310:679-683.
- Kornack DR, Rakic P (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5768-5773.
- Kornack DR, Rakic P (2001) The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4752-4757.
- Kozorovitskiy Y, Gould E (2004) Dominance hierarchy influences adult neurogenesis in the dentate gyrus. *J Neurosci* 24:6755-6759.
- Kraev IV, Godukhin OV, Patrushev IV, Davies HA, Popov VI, Stewart MG (2009) Partial kindling induces neurogenesis, activates astrocytes and alters synaptic morphology in the dentate gyrus of freely moving adult rats. *Neuroscience* 162:254-267.
- Kraus KS, Mitra S, Jimenez Z, Hinduja S, Ding D, Jiang H, Gray L, Lobarinas E, Sun W, Salvi RJ (2010) Noise trauma impairs neurogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience* 167:1216-1226.
- Kronenberg G, Bick-Sander A, Bunk E, Wolf C, Ehninger D, Kempermann G (2006) Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging* 27:1505-1513.
- Kuan CY, Schloemer AJ, Lu A, Burns KA, Weng WL, Williams MT, Strauss KI, Vorhees CV, Flavell RA, Davis RJ, Sharp FR, Rakic P (2004) Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J Neurosci* 24:10763-10772.
- Kumar G, Jones NC, Morris MJ, Rees S, O'Brien TJ, Salzberg MR (2011) Early life stress enhancement of limbic epileptogenesis in adult rats: mechanistic insights. *PLoS One* 6:e24033.
- Kumar S, Parkash J, Kataria H, Kaur G (2009) Interactive effect of excitotoxic injury and dietary restriction on neurogenesis and neurotrophic factors in adult male rat brain. *Neurosci Res* 65:367-374.
- Kuruba R, Hattiangady B, Shetty AK (2009) Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 14 Suppl 1:65-73.

## L

- Labrakakis C, Patt S, Hartmann J, Kettenmann H (1998) Functional GABA(A) receptors on human glioma cells. *Eur J Neurosci* 10:231-238.

- Lacefield CO, Itskov V, Reardon T, Hen R, Gordon JA (2012) Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. *Hippocampus* 22:106-116.
- Lacour M (2006) Restoration of vestibular function: basic aspects and practical advances for rehabilitation. *Curr Med Res Opin* 22:1651-1659.
- Lacour M, Borel L (1993) Vestibular control of posture and gait. *Arch Ital Biol* 131:81-104.
- Lacour M, Sterkers O (2001) Histamine and betahistine in the treatment of vertigo: elucidation of mechanisms of action. *CNS Drugs* 15:853-870.
- Lacour M, Tighilet B (2010) Plastic events in the vestibular nuclei during vestibular compensation: the brain orchestration of a "deafferentation" code. *Restor Neurol Neurosci* 28:19-35.
- Lacour M, Roll JP, Appaix M (1976) Modifications and development of spinal reflexes in the alert baboon (*Papio papio*) following an unilateral vestibular neurotomy. *Brain Res* 113:255-269.
- Lacour M, Vidal PP, Xerri C (1981) Visual influences on vestibulospinal reflexes during vertical linear motion in normal and hemilabyrinthectomized monkeys. *Exp Brain Res* 43:383-394.
- Lacour M, Dutheil S, Tighilet B, Lopez C, Borel L (2009) Tell me your vestibular deficit, and I'll tell you how you'll compensate. *Ann N Y Acad Sci* 1164:268-278.
- LaDage LD, Roth TC, 2nd, Pravosudov VV (2011) Hippocampal neurogenesis is associated with migratory behaviour in adult but not juvenile sparrows (*Zonotrichia leucophrys* ssp.). *Proc Biol Sci* 278:138-143.
- Lang B, Liu HL, Liu R, Feng GD, Jiao XY, Ju G (2004) Astrocytes in injured adult rat spinal cord may acquire the potential of neural stem cells. *Neuroscience* 128:775-783.
- Lapchak PA, Araujo DM, Beck KD, Finch CE, Johnson SA, Hefti F (1993) BDNF and trkB mRNA expression in the hippocampal formation of aging rats. *Neurobiol Aging* 14:121-126.
- Laplagne DA, Kamienkowski JE, Esposito MS, Piatti VC, Zhao C, Gage FH, Schinder AF (2007) Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 25:2973-2981.
- Larsen CM, Grattan DR (2010) Prolactin-induced mitogenesis in the subventricular zone of the maternal brain during early pregnancy is essential for normal postpartum behavioral responses in the mother. *Endocrinology* 151:3805-3814.
- Larsson A, Wilhelmsson U, Pekna M, Pekny M (2004) Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP(-/-) Vim(-/-) mice. *Neurochem Res* 29:2069-2073.
- Lau BW, Yau SY, So KF (2011) Reproduction: a new venue for studying function of adult neurogenesis? *Cell Transplant* 20:21-35.
- Lau WM, Qiu G, Helmeeste DM, Lee TM, Tang SW, So KF (2007) Corticosteroid decreases subventricular zone cell proliferation, which could be reversed by paroxetine. *Restor Neurol Neurosci* 25:17-23.
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA (2000) Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13883-13888.
- Lee J, Seroogy KB, Mattson MP (2002) Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 80:539-547.
- Lee J, Duan W, Long JM, Ingram DK, Mattson MP (2000) Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *J Mol Neurosci* 15:99-108.
- Lee M, Schwab C, McGeer PL (2011) Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia* 59:152-165.
- Lee SW, Clemenson GD, Gage FH (2012) New neurons in an aged brain. *Behav Brain Res* 227:497-507.
- Lemaire V, Tronel S, Montaron MF, Fabre A, Dugast E, Abrous DN (2012) Long-lasting plasticity of hippocampal adult-born neurons. *J Neurosci* 32:3101-3108.
- Leuner B, Gould E (2010) Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol* 61:111-140, C111-113.
- Leuner B, Caponiti JM, Gould E (2012) Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids. *Hippocampus* 22:861-868.

- Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA (1999) Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci* 13:450-464.
- Li AJ, Suzuki S, Suzuki M, Mizukoshi E, Imamura T (2002) Fibroblast growth factor-2 increases functional excitatory synapses on hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 16:1313-1324.
- Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2008) Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:78-84.
- Liberge M, Manrique C, Bernard-Demanze L, Lacour M (2010) Changes in TNFalpha, NFkappaB and MnSOD protein in the vestibular nuclei after unilateral vestibular deafferentation. *J Neuroinflammation* 7:91.
- Lie DC, Dziewczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH (2002) The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22:6639-6649.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A (1999) Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7526-7531.
- 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.
- Lindsay L, Liu P, Gliddon C, Zheng Y, Smith PF, Darlington CL (2005) Cytosolic glucocorticoid receptor expression in the rat vestibular nucleus and hippocampus following unilateral vestibular deafferentation. *Exp Brain Res* 162:309-314.
- Liu S, Wang J, Zhu D, Fu Y, Lukowiak K, Lu YM (2003) Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 23:732-736.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8:1179-1187.
- Liu X, Bolteus AJ, Balkin DM, Henschel O, Bordey A (2006) GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia* 54:394-410.
- Liu Y, Curtis JT, Fowler CD, Meredith M, Wang ZX (2007) Chemosensory cues affect adult neurogenesis in the amygdala of prairie voles in a sex-specific manner. In: *Soc Behav. Neuroendocrin. Pacific Grove, CA*.
- Lobie PE, Garcia-Aragon J, Lincoln DT, Barnard R, Wilcox JN, Waters MJ (1993) Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 74:225-233.
- Lodi D, Iannitti T, Palmieri B (2011) Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res* 30:9.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lopez-Toledano MA, Shelanski ML (2007) Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP(Sw, Ind). *J Alzheimers Dis* 12:229-240.
- Lopez C, Blanke O (2011) The thalamocortical vestibular system in animals and humans. *Brain Res Rev* 67:119-146.
- LoTurco JJ (2000) Neural circuits in the 21st century: synaptic networks of neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8196-8197.
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15:1287-1298.
- Louissaint A, Jr., Rao S, Leventhal C, Goldman SA (2002) Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* 34:945-960.
- Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E, Oomen CA, Czeh B (2010) Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:1-17.
- Luccarini P, Gahery Y, Blanchet G, Pompeiano O (1992) GABA receptors in Deiters nucleus modulate posturokinetic responses to cortical stimulation in the cat. *Arch Ital Biol* 130:127-154.
- Lund RD (1978) Development and Plasticity of the Brain. An introduction. In: *New York: Oxford Univ. Press*.

- Lupien S, Lecours AR, Lussier I, Schwartz G, Nair NP, Meaney MJ (1994) Basal cortisol levels and cognitive deficits in human aging. *J Neurosci* 14:2893-2903.
- Luzzati F, De Marchis S, Fasolo A, Peretto P (2006) Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. *J Neurosci* 26:609-621.
- Lyons DM, Buckmaster PS, Lee AG, Wu C, Mitra R, Duffey LM, Buckmaster CL, Her S, Patel PD, Schatzberg AF (2010) Stress coping stimulates hippocampal neurogenesis in adult monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14823-14827.

## M

- MacLennan KM, Smith PF, Darlington CL (1998) Adrenalectomy-induced neuronal degeneration. *Prog Neurobiol* 54:481-498.
- MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, Macdonald K, Amano S, Joffe RT, Nahmias C, Young LT (2003) Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1387-1392.
- Maeda Y, Matsumoto M, Hori O, Kuwabara K, Ogawa S, Yan SD, Ohtsuki T, Kinoshita T, Kamada T, Stern DM (1994) Hypoxia/reoxygenation-mediated induction of astrocyte interleukin 6: a paracrine mechanism potentially enhancing neuron survival. *J Exp Med* 180:2297-2308.
- Maes M, Bosmans E, Meltzer HY, Scharpe S, Suy E (1993) Interleukin-1 beta: a putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression? *Am J Psychiatry* 150:1189-1193.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951-955.
- Mainen ZF, Sejnowski TJ (1996) Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* 382:363-366.
- Mak GK, Weiss S (2010) Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons. *Nat Neurosci* 13:753-758.
- 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. *Nat Neurosci* 10:1003-1011.
- Malaterre J, Strambi C, Aouane A, Strambi A, Rougon G, Cayre M (2003) Effect of hormones and growth factors on the proliferation of adult cricket neural progenitor cells in vitro. *J Neurobiol* 56:387-397.
- Malberg JE, Duman RS (2003) Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28:1562-1571.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:9104-9110.
- Manassis K, Bradley S, Goldberg S, Hood J, Swinson RP (1994) Attachment in mothers with anxiety disorders and their children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 33:1106-1113.
- Margotta V, Caronti B (2005) PCNA-negativity in the telencephalon of adult female songbirds (*Serinus serinus*): absence of signs of normal proliferation. *Ital J Anat Embryol* 110:237-245.
- Markakis EA, Palmer TD, Randolph-Moore L, Rakic P, Gage FH (2004) Novel neuronal phenotypes from neural progenitor cells. *J Neurosci* 24:2886-2897.
- Markham CH, Yagi T (1984) Brainstem changes in vestibular compensation. *Acta Otolaryngol Suppl* 406:83-86.
- Markia B, Kovacs ZI, Palkovits M (2008) Projections from the vestibular nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus: morphological evidence for the existence of a vestibular stress pathway in the rat brain. *Brain Struct Funct* 213:239-245.
- Markwardt SJ, Dieni CV, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche L (2011) Ivy/neurogliaform interneurons coordinate activity in the neurogenic niche. *Nat Neurosci* 14:1407-1409.

- Martens DJ, Seaberg RM, van der Kooy D (2002) In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur J Neurosci* 16:1045-1057.
- Martin B, Mattson MP, Maudsley S (2006) Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res Rev* 5:332-353.
- Marty A, Llano I (2005) Excitatory effects of GABA in established brain networks. *Trends Neurosci* 28:284-289.
- Marz P, Heese K, Dimitriadis-Schmutz B, Rose-John S, Otten U (1999) Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression. *Glia* 26:191-200.
- Mashaly A, Winkler M, Frambach I, Gras H, Schurmann FW (2008) Sprouting interneurons in mushroom bodies of adult cricket brains. *J Comp Neurol* 508:153-174.
- Mason HA, Ito S, Corfas G (2001) Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J Neurosci* 21:7654-7663.
- Massouh M, Saghatelian A (2010) De-routing neuronal precursors in the adult brain to sites of injury: role of the vasculature. *Neuropharmacology* 58:877-883.
- Masuda T, Nakagawa S, Boku S, Nishikawa H, Takamura N, Kato A, Inoue T, Koyama T (2012) Noradrenaline increases neural precursor cells derived from adult rat dentate gyrus through beta2 receptor. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 36:44-51.
- Matthews BL, Ryu JH, Bockanek C (1989) Vestibular contribution to spatial orientation. Evidence of vestibular navigation in an animal model. *Acta Otolaryngol Suppl* 468:149-154.
- Mazzucco CA, Lieblich SE, Bingham BI, Williamson MA, Viau V, Galea LA (2006) Both estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Neuroscience* 141:1793-1800.
- McCabe BF, Sekitani T, Ryu JH (1973) Drug effects on postlabyrinthectomy nystagmus. *Arch Otolaryngol* 98:310-313.
- McCall AA, Yates BJ (2011) Compensation following bilateral vestibular damage. *Front Neurol* 2:88.
- McEwen BS (2006) Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: Allostasis and allostatic load. *Metabolism* 55:S20-23.
- McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66-71.
- McKinley PA, Peterson BW (1985) Voluntary modulation of the vestibuloocular reflex in humans and its relation to smooth pursuit. *Exp Brain Res* 60:454-464.
- McLenachan S, Lum MG, Waters MJ, Turnley AM (2009) Growth hormone promotes proliferation of adult neurosphere cultures. *Growth Horm IGF Res* 19:212-218.
- Mechawar N, Saghatelian A, Grailhe R, Scoriels L, Gheusi G, Gabellec MM, Lledo PM, Changeux JP (2004) Nicotinic receptors regulate the survival of newborn neurons in the adult olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9822-9826.
- Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-435.
- Meerlo P, Sgoifo A, Suchecki D (2008) Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Med Rev* 12:197-210.
- Meerlo P, Mistlberger RE, Jacobs BL, Heller HC, McGinty D (2009) New neurons in the adult brain: the role of sleep and consequences of sleep loss. *Sleep Med Rev* 13:187-194.
- Meletis K, Barnabe-Heider F, Carlen M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisen J (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6:e182.
- Mellough CB, Cui Q, Spalding KL, Symons NA, Pollett MA, Snyder EY, Macklis JD, Harvey AR (2004) Fate of multipotent neural precursor cells transplanted into mouse retina selectively depleted of retinal ganglion cells. *Exp Neurol* 186:6-19.
- Menu dit Huart L, Lorentz O, Goureau O, Leveillard T, Sahel JA (2004) DNA repair in the degenerating mouse retina. *Mol Cell Neurosci* 26:441-449.

- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A (2007) Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317:381-384.
- Merz K, Herold S, Lie DC (2011) CREB in adult neurogenesis--master and partner in the development of adult-born neurons? *Eur J Neurosci* 33:1078-1086.
- Michaelidis TM, Lie DC (2008) Wnt signaling and neural stem cells: caught in the Wnt web. *Cell Tissue Res* 331:193-210.
- Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M (2002) Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36:121-137.
- Mirescu C, Peters JD, Gould E (2004) Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 7:841-846.
- Mirescu C, Peters JD, Noiman L, Gould E (2006) Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19170-19175.
- Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H, Yamanaka S (2009) Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27:743-745.
- Mochizuki N, Takagi N, Kurokawa K, Kawai T, Besshoh S, Tanonaka K, Takeo S (2007) Effect of NMDA receptor antagonist on proliferation of neurospheres from embryonic brain. *Neurosci Lett* 417:143-148.
- Mohajeri MH, Leuba G (2009) Prevention of age-associated dementia. *Brain Res Bull* 80:315-325.
- Molina-Hernandez A, Velasco I (2008) Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors. *J Neurochem* 106:706-717.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760-1765.
- Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Aourousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2006) Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol Aging* 27:645-654.
- Morgenstern NA, Lombardi G, Schinder AF (2008) Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. *J Physiol* 586:3751-3757.
- Mori T, Buffo A, Gotz M (2005) The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 69:67-99.
- Morrens J, Van Den Broeck W, Kempermann G (2012) Glial cells in adult neurogenesis. *Glia* 60:159-174.
- Morris SA, Eaves DW, Smith AR, Nixon K (2010) Alcohol inhibition of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. *Hippocampus* 20:596-607.
- Morrison SJ, Spradling AC (2008) Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132:598-611.
- Morshead CM, Garcia AD, Sofroniew MV, van Der Kooy D (2003) The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *Eur J Neurosci* 18:76-84.
- Morshead 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.
- Mouret A, Lepousez G, Gras J, Gabellec MM, Lledo PM (2009) Turnover of newborn olfactory bulb neurons optimizes olfaction. *J Neurosci* 29:12302-12314.
- Moyse E, Segura S, Liard O, Mahaut S, Mechawar N (2008) Microenvironmental determinants of adult neural stem cell proliferation and lineage commitment in the healthy and injured central nervous system. *Curr Stem Cell Res Ther* 3:163-184.
- Moyse E, Bauer S, Charrier C, Coronas V, Krantic S, Jean A (2006) Neurogenesis and neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat brain: new vistas about autonomic regulations--a review. *Auton Neurosci* 126-127:50-58.

- Muller CM, Singer W (1989) Acetylcholine-induced inhibition in the cat visual cortex is mediated by a GABAergic mechanism. *Brain Res* 487:335-342.
- Murakami DM, Erkman L, Hermanson O, Rosenfeld MG, Fuller CA (2002) Evidence for vestibular regulation of autonomic functions in a mouse genetic model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17078-17082.

## N

- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH (2009) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 15:331-337.
- Nakajima K, Tohyama Y, Maeda S, Kohsaka S, Kurihara T (2007) Neuronal regulation by which microglia enhance the production of neurotrophic factors for GABAergic, catecholaminergic, and cholinergic neurons. *Neurochem Int* 50:807-820.
- Nakamichi N, Takarada T, Yoneda Y (2009) Neurogenesis mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate signaling. *J Pharmacol Sci* 110:133-149.
- 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.
- Napoli I, Neumann H (2009) Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158:1030-1038.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.
- New KC, Rabkin SD (1998) GABA synthesis in astrocytes after infection with defective herpes simplex virus vectors expressing glutamic acid decarboxylase 65 or 67. *J Neurochem* 71:2304-2312.
- Nguyen L, Malgrange B, Breuskin I, Bettendorff L, Moonen G, Belachew S, Rigo JM (2003) Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J Neurosci* 23:3278-3294.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- Nixon K, Crews FT (2002) Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem* 83:1087-1093.
- Nordeen EJ, Nordeen KW (1989) Estrogen stimulates the incorporation of new neurons into avian song nuclei during adolescence. *Brain Res Dev Brain Res* 49:27-32.
- Nottebohm F (1981) A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. *Science* 214:1368-1370.
- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 18:311-318.

## O

- O'Keefe GC, Barker RA, Caldwell MA (2009a) Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle* 8:2888-2894.
- O'Keefe GC, Tyers P, Aarsland D, Dalley JW, Barker RA, Caldwell MA (2009b) Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8754-8759.

- Ohab JJ, Carmichael ST (2008) Poststroke neurogenesis: emerging principles of migration and localization of immature neurons. *Neuroscientist* 14:369-380.
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST (2006) A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26:13007-13016.
- Ohira K, Miyakawa T (2011) Chronic treatment with fluoxetine for more than 6 weeks decreases neurogenesis in the subventricular zone of adult mice. *Mol Brain* 4:10.
- Ohira K, Furuta T, Hioki H, Nakamura KC, Kuramoto E, Tanaka Y, Funatsu N, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M, Miyakawa T, Kaneko T, Nakamura S (2010) Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nat Neurosci* 13:173-179.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54:403-414.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453-501.
- Ossenkopp KP, Hargreaves EL (1993) Spatial learning in an enclosed eight-arm radial maze in rats with sodium arsenite-induced labyrinthectomies. *Behav Neural Biol* 59:253-257.
- Otten U, Gadiant RA (1995) Neurotrophins and cytokines--intermediaries between the immune and nervous systems. *Int J Dev Neurosci* 13:147-151.
- Overstreet-Wadiche LS, Bensen AL, Westbrook GL (2006) Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci* 26:2326-2334.
- Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715-727.

## P

- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132:335-344.
- Palmer TD, Ray J, Gage FH (1995) FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 6:474-486.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-494.
- Parent JM, Jessberger S, Gage FH, Gong C (2007) Is neurogenesis reparative after status epilepticus? *Epilepsia* 48 Suppl 8:69-71.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM (2002) Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52:802-813.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17:3727-3738.
- Parihar VK, Hattiangady B, Kuruba R, Shuai B, Shetty AK (2011) Predictable chronic mild stress improves mood, hippocampal neurogenesis and memory. *Mol Psychiatry* 16:171-183.
- Paterson JM, Short D, Flatman PW, Seckl JR, Aitken A, Dutia MB (2006) Changes in protein expression in the rat medial vestibular nuclei during vestibular compensation. *J Physiol* 575:777-788.
- Pathipati P, Gorba T, Scheepens A, Goffin V, Sun Y, Fraser M (2011) Growth hormone and prolactin regulate human neural stem cell regenerative activity. *Neuroscience* 190:409-427.
- Paton JA, Nottebohm FN (1984) Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225:1046-1048.
- Pekcec A, Loscher W, Potschka H (2006) Neurogenesis in the adult rat piriform cortex. *Neuroreport* 17:571-574.
- Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427-434.

- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21:6706-6717.
- Peng H, Huang Y, Rose J, Erichsen D, Herek S, Fujii N, Tamamura H, Zheng J (2004) Stromal cell-derived factor 1-mediated CXCR4 signaling in rat and human cortical neural progenitor cells. *J Neurosci Res* 76:35-50.
- Peppard SB (1986) Effect of drug therapy on compensation from vestibular injury. *Laryngoscope* 96:878-898.
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-431.
- Perera TD, Dwork AJ, Keegan KA, Thirumangalakudi L, Lipira CM, Joyce N, Lange C, Higley JD, Rosoklija G, Hen R, Sackeim HA, Coplan JD (2011) Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates. *PLoS One* 6:e17600.
- Perry VH, Andersson PB, Gordon S (1993) Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci* 16:268-273.
- Peterson BW (1970) Distribution of neural responses to tilting within vestibular nuclei of the cat. *J Neurophysiol* 33:750-767.
- Petryniak MA, Potter GB, Rowitch DH, Rubenstein JL (2007) Dlx1 and Dlx2 control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain. *Neuron* 55:417-433.
- Pettorossi VE, Dutia M, Frondaroli A, Dieni C, Grassi S (2003) Long-term potentiation and depression after unilateral labyrinthectomy in the medial vestibular nucleus of rats. *Acta Otolaryngol* 123:182-186.
- Pettorossi VE, Della Torre G, Grassi S, Zampolini M, Capocchi G, Errico P (1992) Role of NMDA receptors in the compensation of ocular nystagmus induced by hemilabyrinthectomy in the guinea pig. *Arch Ital Biol* 130:303-313.
- Phelan KD, Gallagher JP (1992) Direct muscarinic and nicotinic receptor-mediated excitation of rat medial vestibular nucleus neurons in vitro. *Synapse* 10:349-358.
- Phelan KD, Nakamura J, Gallagher JP (1990) Histamine depolarizes rat medial vestibular nucleus neurons recorded intracellularly in vitro. *Neurosci Lett* 109:287-292.
- Phillips W, Morton AJ, Barker RA (2005) Abnormalities of neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease are attributable to the in vivo microenvironment. *J Neurosci* 25:11564-11576.
- Platel JC, Dave KA, Bordey A (2008) Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain. *J Physiol* 586:3739-3743.
- Platel JC, Stamboulian S, Nguyen I, Bordey A (2010) Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Res Rev* 63:60-71.
- Pollard H, Moreau J, Arrang JM, Schwartz JC (1993) A detailed autoradiographic mapping of histamine H3 receptors in rat brain areas. *Neuroscience* 52:169-189.
- Pompeiano O, Xerri C, Gianni S, Manzoni D (1984) Central compensation of vestibular deficits. II. Influences of roll tilt on different-size lateral vestibular neurons after ipsilateral labyrinth deafferentation. *J Neurophysiol* 52:18-38.
- Pompeiano O, Luccarini P, Gahery Y, Blanchet G (1993) Somatotopical effects of local microinjection of GABAergic agents in Deiters nucleus on the posturokinetic responses to cortical stimulation. *J Vestib Res* 3:391-407.
- Porcher C, Hatchett C, Longbottom RE, McAinch K, Sihra TS, Moss SJ, Thomson AM, Jovanovic JN (2011) Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. *J Biol Chem* 286:21667-21677.
- Poucet B, Benhamou S (1997) The neuropsychology of spatial cognition in the rat. *Crit Rev Neurobiol* 11:101-120.
- Precht W, Shimazu H, Markham CH (1966) A mechanism of central compensation of vestibular function following hemilabyrinthectomy. *J Neurophysiol* 29:996-1010.
- Precht W, Schwindt PC, Baker R (1973) Removal of vestibular commissural inhibition by antagonists of GABA and glycine. *Brain Res* 62:222-226.

## Q

Qiu G, Liu S, So KF (2010) Dietary restriction and brain health. *Neurosci Bull* 26:55-65.

## R

- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105.
- Rajkowska G (2000) Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry* 48:766-777.
- Rakic P (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227:1054-1056.
- Rakic P (2002) Neurogenesis in adult primates. *Prog Brain Res* 138:3-14.
- Rasika S, Nottebohm F, Alvarez-Buylla A (1994) Testosterone increases the recruitment and/or survival of new high vocal center neurons in adult female canaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7854-7858.
- Raymond J, Ez-Zaher L, Dememes D, Lacour M (1991) Quantification of synaptic density changes in the medial vestibular nucleus of the cat following vestibular neurectomy. *Restor Neurol Neurosci* 3:197-203.
- Represa A, Ben-Ari Y (2005) Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 28:278-283.
- Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza PV, Abrous DN (2009) Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry* 14:959-967.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Rietze R, Poulin P, Weiss S (2000) Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 424:397-408.
- Ris L, de Waele C, Serafin M, Vidal PP, Godaux E (1995) Neuronal activity in the ipsilateral vestibular nucleus following unilateral labyrinthectomy in the alert guinea pig. *J Neurophysiol* 74:2087-2099.
- Robel S, Berninger B, Gotz M (2011) The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci* 12:88-104.
- Robertson HA (1992) Immediate-early genes, neuronal plasticity, and memory. *Biochem Cell Biol* 70:729-737.
- Rocheffort 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. *J Neurosci* 22:2679-2689.
- Rodriguez JJ, Verkhratsky A (2011) Neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Anat* 219:78-89.
- Rohe M, Carlo AS, Breyhan H, Sporbert A, Militz D, Schmidt V, Wozny C, Harmeier A, Erdmann B, Bales KR, Wolf S, Kempermann G, Paul SM, Schmitz D, Bayer TA, Willnow TE, Andersen OM (2008) Sortilin-related receptor with A-type repeats (SORLA) affects the amyloid precursor protein-dependent stimulation of ERK signaling and adult neurogenesis. *J Biol Chem* 283:14826-14834.
- Roitbak T, Thomas K, Martin A, Allan A, Cunningham LA (2011) Moderate fetal alcohol exposure impairs neurogenic capacity of murine neural stem cells isolated from the adult subventricular zone. *Exp Neurol* 229:522-525.
- Roman V, Van der Borght K, Leemburg SA, Van der Zee EA, Meerlo P (2005) Sleep restriction by forced activity reduces hippocampal cell proliferation. *Brain Res* 1065:53-59.
- Romero-Aleman MM, Monzon-Mayor M, Yanes C, Lang D (2004) Radial glial cells, proliferating periventricular cells, and microglia might contribute to successful structural repair in the cerebral cortex of the lizard *Gallotia galloti*. *Exp Neurol* 188:74-85.
- Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Zolman JF (1962) Variation in environmental complexity and brain measures. *J Comp Physiol Psychol* 55:1092-1095.

- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M (2006) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 24:1850-1856.
- Rudge JS, Alderson RF, Pasnikowski E, McClain J, Ip NY, Lindsay RM (1992) Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. *Eur J Neurosci* 4:459-471.
- Russell JW, Windebank AJ, Schenone A, Feldman EL (1998) Insulin-like growth factor-I prevents apoptosis in neurons after nerve growth factor withdrawal. *J Neurobiol* 36:455-467.
- Russell NA, Horii A, Smith PF, Darlington CL, Bilkey DK (2003) Long-term effects of permanent vestibular lesions on hippocampal spatial firing. *J Neurosci* 23:6490-6498.
- Russo-Neustadt AA, Alejandre H, Garcia C, Ivy AS, Chen MJ (2004) Hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression following treatment with reboxetine, citalopram, and physical exercise. *Neuropsychopharmacology* 29:2189-2199.

## S

- Saghatelian A (2009) Role of blood vessels in the neuronal migration. *Semin Cell Dev Biol* 20:744-750.
- Sahay A, Hen R (2007) Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci* 10:1110-1115.
- Sakkas PN, Soldatos CR, Bergiannaki JD, Paparrigopoulos TJ, Stefanis CN (1998) Growth hormone secretion during sleep in male depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22:467-483.
- Saljo A, Bao F, Jingshan S, Hamberger A, Hansson HA, Haglid KG (2002) Exposure to short-lasting impulse noise causes neuronal c-Jun expression and induction of apoptosis in the adult rat brain. *J Neurotrauma* 19:985-991.
- Salzberg M, Kumar G, Supit L, Jones NC, Morris MJ, Rees S, O'Brien TJ (2007) Early postnatal stress confers enduring vulnerability to limbic epileptogenesis. *Epilepsia* 48:2079-2085.
- 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.
- Sapolsky RM (1992) *Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death*. Cambridge, MA: MIT Press.
- 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.
- Sayin U, Osting S, Hagen J, Rutecki P, Sutula T (2003) Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axosomatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. *J Neurosci* 23:2759-2768.
- Scerri C, Stewart CA, Breen KC, Balfour DJ (2006) The effects of chronic nicotine on spatial learning and bromodeoxyuridine incorporation into the dentate gyrus of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 184:540-546.
- Schaefer KP, Meyer DL, Wilhelms G (1979) Somatosensory and cerebellar influences on compensation of labyrinthine lesions. *Prog Brain Res* 50:591-598.
- Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, Winkler J, Aigner L, Plate KH, Kuhn HG (2004) Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 14:237-248.
- Scharff C, Kirn JR, Grossman M, Macklis JD, Nottebohm F (2000) Targeted neuronal death affects neuronal replacement and vocal behavior in adult songbirds. *Neuron* 25:481-492.
- Scharfman HE (2005) Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy--a missing link? *Epilepsy Curr* 5:83-88.
- Schautzer F, Hamilton D, Kalla R, Strupp M, Brandt T (2003) Spatial memory deficits in patients with chronic bilateral vestibular failure. *Ann N Y Acad Sci* 1004:316-324.

- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184-187.
- Schmidt M (1997) Continuous neurogenesis in the olfactory brain of adult shore crabs, *Carcinus maenas*. *Brain Res* 762:131-143.
- Schmidt M (2007) The olfactory pathway of decapod crustaceans--an invertebrate model for life-long neurogenesis. *Chem Senses* 32:365-384.
- Schnapp E, Kragl M, Rubin L, Tanaka EM (2005) Hedgehog signaling controls dorsoventral patterning, blastema cell proliferation and cartilage induction during axolotl tail regeneration. *Development* 132:3243-3253.
- Schuknecht HF (1982) Behavior of the vestibular nerve following labyrinthectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 97:16-32.
- Seemungal BM, Gresty MA, Bronstein AM (2001) The endocrine system, vertigo and balance. *Curr Opin Neurol* 14:27-34.
- Segovia G, del Arco A, Mora F (2009) Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *J Neural Transm* 116:1007-1016.
- Semenov LV, Bures J (1989) Vestibular stimulation disrupts acquisition of place navigation in the Morris water tank task. *Behav Neural Biol* 51:346-363.
- Serafin M, Khateb A, Vibert N, Vidal PP, Muhlethaler M (1993) Medial vestibular nucleus in the guinea-pig: histaminergic receptors. I. An in vitro study. *Exp Brain Res* 93:242-248.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359-378.
- Sernagor E, Chabrol F, Bony G, Cancedda L (2010) GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems. *Front Cell Neurosci* 4:11.
- Shapiro LA, Ng K, Zhou QY, Ribak CE (2009) Subventricular zone-derived, newly generated neurons populate several olfactory and limbic forebrain regions. *Epilepsy Behav* 14 Suppl 1:74-80.
- Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC (2003) Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* 160:1516-1518.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3:289-300.
- Shen W, Da Silva JS, He H, Cline HT (2009) Type A GABA-receptor-dependent synaptic transmission sculpts dendritic arbor structure in *Xenopus* tadpoles in vivo. *J Neurosci* 29:5032-5043.
- Sherry DF, Hoshoooley JS (2010) Seasonal hippocampal plasticity in food-storing birds. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:933-943.
- Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH (2000) Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20:8727-8735.
- Shimazu H, Precht W (1966) Inhibition of central vestibular neurons from the contralateral labyrinth and its mediating pathway. *J Neurophysiol* 29:467-492.
- Shingo AS, Kito S (2005) Effects of nicotine on neurogenesis and plasticity of hippocampal neurons. *J Neural Transm* 112:1475-1478.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S (2003) Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299:117-120.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12:578-584.
- Sidman RL, Miale IL, Feder N (1959) Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp Neurol* 1:322-333.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maticic-Savatic M (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7:483-495.

- Simmons AM, Horowitz SS, Brown RA (2008) Cell proliferation in the forebrain and midbrain of the adult bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Brain Behav Evol* 71:41-53.
- Siuciak JA, Boylan C, Fritsche M, Altar CA, Lindsay RM (1996) BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Brain Res* 710:11-20.
- Skilbeck KJ, Johnston GA, Hinton T (2010) Stress and GABA receptors. *J Neurochem* 112:1115-1130.
- Smart TG, Hosie AM, Miller PS (2004) Zn<sup>2+</sup> ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist* 10:432-442.
- Smith MT, Pencea V, Wang Z, Luskin MB, Insel TR (2001) Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. *Horm Behav* 39:11-21.
- Smith PF (1997) Vestibular-hippocampal interactions. *Hippocampus* 7:465-471.
- Smith PF, Darlington CL (1988) The NMDA antagonists MK801 and CPP disrupt compensation for unilateral labyrinthectomy in the guinea pig. *Neurosci Lett* 94:309-313.
- Smith PF, Curthoys IS (1988a) Neuronal activity in the ipsilateral medial vestibular nucleus of the guinea pig following unilateral labyrinthectomy. *Brain Res* 444:308-319.
- Smith PF, Curthoys IS (1988b) Neuronal activity in the contralateral medial vestibular nucleus of the guinea pig following unilateral labyrinthectomy. *Brain Res* 444:295-307.
- Smith PF, Darlington CL (1991) Neurochemical mechanisms of recovery from peripheral vestibular lesions (vestibular compensation). *Brain Res Brain Res Rev* 16:117-133.
- Smith PF, Darlington CL, Zheng Y (2010a) Move it or lose it--is stimulation of the vestibular system necessary for normal spatial memory? *Hippocampus* 20:36-43.
- Smith PF, Darlington CL, Yan Q, Dragunow M (1998) Unilateral vestibular deafferentation induces brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein expression in the guinea pig lateral but not medial vestibular nuclei. *J Vestib Res* 8:443-447.
- Smith PF, Geddes LH, Baek JH, Darlington CL, Zheng Y (2010b) Modulation of memory by vestibular lesions and galvanic vestibular stimulation. *Front Neurol* 1:141.
- Snapyan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Gotz M, Barker PA, Parent A, Saghatelian A (2009) Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 29:4172-4188.
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130:843-852.
- Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638-647.
- Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44.
- Soumier A, Banasr M, Lortet S, Masméjean F, Bernard N, Kerkerian-Le-Goff L, Gabriel C, Millan MJ, Mocaer E, Daszuta A (2009) Mechanisms contributing to the phase-dependent regulation of neurogenesis by the novel antidepressant, agomelatine, in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 34:2390-2403.
- Spritzer MD, Galea LA (2007) Testosterone and dihydrotestosterone, but not estradiol, enhance survival of new hippocampal neurons in adult male rats. *Dev Neurobiol* 67:1321-1333.
- Stackman RW, Taube JS (1997) Firing properties of head direction cells in the rat anterior thalamic nucleus: dependence on vestibular input. *J Neurosci* 17:4349-4358.
- Stackman RW, Clark AS, Taube JS (2002) Hippocampal spatial representations require vestibular input. *Hippocampus* 12:291-303.
- Stanfield BB, Trice JE (1988) Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res* 72:399-406.

- Stewart J, Mitchell J, Kalant N (1989) The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. *Neurobiol Aging* 10:669-675.
- Stewart RR, Hoge GJ, Zigova T, Luskin MB (2002) Neural progenitor cells of the neonatal rat anterior subventricular zone express functional GABA(A) receptors. *J Neurobiol* 50:305-322.
- Straka H, Vibert N, Vidal PP, Moore LE, Dutia MB (2005) Intrinsic membrane properties of vertebrate vestibular neurons: function, development and plasticity. *Prog Neurobiol* 76:349-392.
- Straube A, Kurzan R, Buttner U (1991) Differential effects of bicuculline and muscimol microinjections into the vestibular nuclei on simian eye movements. *Exp Brain Res* 86:347-358.
- Suh H, Deng W, Gage FH (2009) Signaling in adult neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:253-275.
- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH (1996) Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-627.
- Sundermann EE, Maki PM, Bishop JR (2010) A review of estrogen receptor alpha gene (ESR1) polymorphisms, mood, and cognition. *Menopause* 17:874-886.
- Szczaurska K, Mazurkiewicz M, Opolski A (2003) [The role of GABA-ergic system in carcinogenesis]. *Postepy Hig Med Dosw* 57:485-500.
- Szele FG, Chesselet MF (1996) Cortical lesions induce an increase in cell number and PSA-NCAM expression in the subventricular zone of adult rats. *J Comp Neurol* 368:439-454.

## T

- Takadera T, Matsuda I, Ohyashiki T (1999) Apoptotic cell death and caspase-3 activation induced by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and their prevention by insulin-like growth factor I. *J Neurochem* 73:548-556.
- Takagi Y, Takahashi J (2005) Primate embryonic stem cells as a source of dopaminergic neurons: A novel transplantation for Parkinson's disease. *Discov Med* 5:219-223.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1998) Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci* 12:340-348.
- Takemura NU (2005) Evidence for neurogenesis within the white matter beneath the temporal neocortex of the adult rat brain. *Neuroscience* 134:121-132.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19:5792-5801.
- Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E (2001) Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437:496-504.
- Tao Y, Black IB, DiCicco-Bloom E (1997) In vivo neurogenesis is inhibited by neutralizing antibodies to basic fibroblast growth factor. *J Neurobiol* 33:289-296.
- Tashiro A, Makino H, Gage FH (2007) Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci* 27:3252-3259.
- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH (2006) NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442:929-933.
- Tateno M, Ukai W, Yamamoto M, Hashimoto E, Ikeda H, Saito T (2005) The effect of ethanol on cell fate determination of neural stem cells. *Alcohol Clin Exp Res* 29:225S-229S.
- Tattersfield AS, Croon RJ, Liu YW, Kells AP, Faull RL, Connor B (2004) Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience* 127:319-332.
- Taupin P (2007) BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 53:198-214.

- Thompson GC, Igarashi M, Cortez AM (1986) GABA imbalance in squirrel monkey after unilateral vestibular end-organ ablation. *Brain Res* 370:182-185.
- Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O (2007) Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38:3032-3039.
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2006) Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24:739-747.
- Tian DS, Dong Q, Pan DJ, He Y, Yu ZY, Xie MJ, Wang W (2007a) Attenuation of astrogliosis by suppressing of microglial proliferation with the cell cycle inhibitor olomoucine in rat spinal cord injury model. *Brain Res* 1154:206-214.
- Tian DS, Xie MJ, Yu ZY, Zhang Q, Wang YH, Chen B, Chen C, Wang W (2007b) Cell cycle inhibition attenuates microglia induced inflammatory response and alleviates neuronal cell death after spinal cord injury in rats. *Brain Res* 1135:177-185.
- Tighilet B, Lacour M (1995) Pharmacological activity of the Ginkgo biloba extract (EGb 761) on equilibrium function recovery in the unilateral vestibular neurectomized cat. *J Vestib Res* 5:187-200.
- Tighilet B, Lacour M (1996) Distribution of histaminergic axonal fibres in the vestibular nuclei of the cat. *Neuroreport* 7:873-878.
- Tighilet B, Lacour M (1997) Histamine immunoreactivity changes in vestibular-lesioned and histaminergic-treated cats. *Eur J Pharmacol* 330:65-77.
- Tighilet B, Lacour M (1998) Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. *Eur J Neurosci* 10:3115-3126.
- Tighilet B, Lacour M (2001) Gamma amino butyric acid (GABA) immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. *Eur J Neurosci* 13:2255-2267.
- Tighilet B, Trottier S, Lacour M (2005) Dose- and duration-dependent effects of betahistine dihydrochloride treatment on histamine turnover in the cat. *Eur J Pharmacol* 523:54-63.
- Tighilet B, Manrique C, Lacour M (2009) Stress axis plasticity during vestibular compensation in the adult cat. *Neuroscience* 160:716-730.
- Tighilet B, Gustave Dit Duflou S, Gaubert C, Lacour M (1994) Role of the neurotrophins in vestibular compensation in the cat. In: Abstracts in the Barany Society XXIII International Congress, pp 95-303. Paris, France: J Vestib Res.
- Tighilet B, Trottier S, Mourre C, Lacour M (2006) Changes in the histaminergic system during vestibular compensation in the cat. *J Physiol* 573:723-739.
- Tighilet B, Brezun JM, Sylvie GD, Gaubert C, Lacour M (2007) New neurons in the vestibular nuclei complex after unilateral vestibular neurectomy in the adult cat. *Eur J Neurosci* 25:47-58.
- Torroglosa A, Murillo-Carretero M, Romero-Grimaldi C, Matarredona ER, Campos-Caro A, Estrada C (2007) Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *Stem Cells* 25:88-97.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47:803-815.
- Tronel S, Fabre A, Charrier V, Olier SH, Gage FH, Abrous DN (2010) Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7963-7968.

## U

- Uchida Y, Nakano S, Gomi F, Takahashi H (2007) Differential regulation of basic helix-loop-helix factors Mash1 and Olig2 by beta-amyloid accelerates both differentiation and death of cultured neural stem/progenitor cells. *J Biol Chem* 282:19700-19709.

Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291:657-661.

## V

van Crujisen N, Dullaart RP, Wit HP, Albers FW (2005) Analysis of cortisol and other stress-related hormones in patients with Meniere's disease. *Otol Neurotol* 26:1214-1219.

van der Kooy D, Weiss S (2000) Why stem cells? *Science* 287:1439-1441.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191-198.

van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680-8685.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.

Vesce S, Rossi D, Brambilla L, Volterra A (2007) Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol* 82:57-71.

Vibert N, Serafin M, Vidal PP, Muhlethaler M (1995) Direct and indirect effects of muscimol on medial vestibular nucleus neurones in guinea-pig brainstem slices. *Exp Brain Res* 104:351-356.

Villeda SA et al. (2011) The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477:90-94.

Vitte E, Derosier C, Caritu Y, Berthoz A, Hasboun D, Soulie D (1996) Activation of the hippocampal formation by vestibular stimulation: a functional magnetic resonance imaging study. *Exp Brain Res* 112:523-526.

Vollmayr B, Mahlstedt MM, Henn FA (2007) Neurogenesis and depression: what animal models tell us about the link. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:300-303.

Voloboueva LA, Giffard RG (2011) Inflammation, mitochondria, and the inhibition of adult neurogenesis. *J Neurosci Res* 89:1989-1996.

Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.

## W

Wager-Smith K, Markou A (2011) Depression: a repair response to stress-induced neuronal microdamage that can grade into a chronic neuroinflammatory condition? *Neurosci Biobehav Rev* 35:742-764.

Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhauser C (2004) Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* 48:36-43.

Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP, 2nd, Scheffler B, Steindler DA (2006) Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54:815-825.

Walton RM (2011) Postnatal neurogenesis: of mice, men, and macaques. *Vet Pathol* 49:155-165.

Walzlein JH, Synowitz M, Engels B, Markovic DS, Gabrusiewicz K, Nikolaev E, Yoshikawa K, Kaminska B, Kempermann G, Uckert W, Kaczmarek L, Kettenmann H, Glass R (2008) The antitumorigenic response of neural precursors depends on subventricular proliferation and age. *Stem Cells* 26:2945-2954.

Wang DD, Kriegstein AR (2009) Defining the role of GABA in cortical development. *J Physiol* 587:1873-1879.

Wang J, McFadden SL, Caspary D, Salvi R (2002) Gamma-aminobutyric acid circuits shape response properties of auditory cortex neurons. *Brain Res* 944:219-231.

Wang JJ, Dutia MB (1995) Effects of histamine and betahistidine on rat medial vestibular nucleus neurones: possible mechanism of action of anti-histaminergic drugs in vertigo and motion sickness. *Exp Brain Res* 105:18-24.

- Wang W, Redecker C, Yu ZY, Xie MJ, Tian DS, Zhang L, Bu BT, Witte OW (2008) Rat focal cerebral ischemia induced astrocyte proliferation and delayed neuronal death are attenuated by cyclin-dependent kinase inhibition. *J Clin Neurosci* 15:278-285.
- Wang X, Fu S, Wang Y, Yu P, Hu J, Gu W, Xu XM, Lu P (2007) Interleukin-1beta mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells through the activation of SAPK/JNK pathway. *Mol Cell Neurosci* 36:343-354.
- Warfvinge K, Kamme C, Englund U, Victorin K (2001) Retinal integration of grafts of brain-derived precursor cell lines implanted subretinally into adult, normal rats. *Exp Neurol* 169:1-12.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS (2006) Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16:239-249.
- West MJ (1993) New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 14:275-285.
- West MJ (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci* 22:51-61.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482-497.
- Whitman MC, Greer CA (2009) Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol* 89:162-175.
- Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC (2009) Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 108:1343-1359.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18:779-791.
- Wilson VJ, Melvill Jones G (1979) *Mammalian vestibular physiology*. New York: London: Plenum.
- Wilson VJ, Zarzecki P, Schor RH, Isu N, Rose PK, Sato H, Thomson DB, Umezaki T (1999) Cortical influences on the vestibular nuclei of the cat. *Exp Brain Res* 125:1-13.
- Wiltrout C, Lang B, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R (2007) Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis. *Neurochem Int* 50:1028-1041.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681-1689.
- Winner B, Geyer M, Couillard-Despres S, Aigner R, Bogdahn U, Aigner L, Kuhn G, Winkler J (2006) Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Exp Neurol* 197:113-121.
- Witte AV, Fobker M, Gellner R, Knecht S, Floel A (2009) Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1255-1260.
- Wolf SA, Steiner B, Akpinarli A, Kammertoens T, Nassenstein C, Braun A, Blankenstein T, Kempermann G (2009) CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *J Immunol* 182:3979-3984.
- Wong G, Goldshmit Y, Turnley AM (2004) Interferon-gamma but not TNF alpha promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells. *Exp Neurol* 187:171-177.
- World Health Organisation (2009) In.

## X

- Xerri C, Lacour M (1980) Compensation deficits in posture and kinetics following unilateral vestibular neurectomy in cats. The role of sensorimotor activity. *Acta Otolaryngol* 90:414-424.
- 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. *Exp Neurol* 192:251-264.

## Y

- Yabe T, de Waele C, Serafin M, Vibert N, Arrang JM, Muhlethaler M, Vidal PP (1993) Medial vestibular nucleus in the guinea-pig: histaminergic receptors. II. An in vivo study. *Exp Brain Res* 93:249-258.
- Yamamoto T, Yamanaka T, Matsunaga T (2000) The effect of stress application on vestibular compensation. *Acta Otolaryngol* 120:504-507.
- Yamanaka T, Him A, Cameron SA, Dutia MB (2000) Rapid compensatory changes in GABA receptor efficacy in rat vestibular neurones after unilateral labyrinthectomy. *J Physiol* 523 Pt 2:413-424.
- Yamanaka T, Sasa M, Amano T, Miyahara H, Matsunaga T (1995) Role of glucocorticoid in vestibular compensation in relation to activation of vestibular nucleus neurons. *Acta Otolaryngol Suppl* 519:168-172.
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K (2006) Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26:6627-6636.
- Yang F, Liu ZR, Chen J, Zhang SJ, Quan QY, Huang YG, Jiang W (2010) Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats. *J Neurosci Res* 88:519-529.
- Yates BJ (1992) Vestibular influences on the sympathetic nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 17:51-59.
- Yoshinaga T, Hashimoto E, Ukai W, Toki S, Saito S, Saito T (2007) Neural stem cell transplantation in a model of fetal alcohol effects. *J Neural Transm Suppl*:331-337.
- Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 5:448-453.
- Young SZ, Bordey A (2009) GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches. *Physiology (Bethesda)* 24:171-185.
- Young SZ, Taylor MM, Bordey A (2011) Neurotransmitters couple brain activity to subventricular zone neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33:1123-1132.
- Young SZ, Platel JC, Nielsen JV, Jensen NA, Bordey A (2010) GABA(A) Increases Calcium in Subventricular Zone Astrocyte-Like Cells Through L- and T-Type Voltage-Gated Calcium Channels. *Front Cell Neurosci* 4:8.
- Yuan TF (2008) GABA effects on neurogenesis: an arsenal of regulation. *Sci Signal* 1:jc1.

## Z

- Zennou-Azogui Y, Xerri C, Harlay F (1994) Visual sensory substitution in vestibular compensation: neuronal substrates in the alert cat. *Exp Brain Res* 98:457-473.
- Zennou-Azogui Y, Xerri C, Leonard J, Tighilet B (1996) Vestibular compensation: role of visual motion cues in the recovery of posturo-kinetic functions in the cat. *Behav Brain Res* 74:65-77.
- Zennou-Azogui Y, Borel L, Lacour M, Ez-Zaher L, Ouaknine M (1993) Recovery of head postural control following unilateral vestibular neurectomy in the cat. Neck muscle activity and neuronal correlates in Deiters' nuclei. *Acta Otolaryngol Suppl* 509:1-19.
- Zhang C, McNeil E, Dressler L, Siman R (2007) Long-lasting impairment in hippocampal neurogenesis associated with amyloid deposition in a knock-in mouse model of familial Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 204:77-87.
- Zhang FX, Lai CH, Lai SK, Yung KK, Shum DK, Chan YS (2003) Neurotrophin receptor immunostaining in the vestibular nuclei of rats. *Neuroreport* 14:851-855.
- Zhang R, Smith PF, Darlington CL (2005) Immunocytochemical and stereological study of glucocorticoid receptors in rat medial vestibular nucleus neurons and the effects of unilateral vestibular deafferentation. *Acta Otolaryngol* 125:1258-1264.
- Zhao CS, Overstreet-Wadiche L (2008) Integration of adult generated neurons during epileptogenesis. *Epilepsia* 49 Suppl 5:3-12.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7925-7930.

- Zheng Y, Darlington CL, Smith PF (2006) Impairment and recovery on a food foraging task following unilateral vestibular deafferentation in rats. *Hippocampus* 16:368-378.
- Zheng Y, Masumura C, Chung P, Darlington CL, Smith PF (2010a) Cell proliferation and survival in the vestibular nucleus following bilateral vestibular deafferentation in the adult rat. *Neurosci Lett* 468:85-88.
- Zheng Y, Begum S, Zhang C, Fleming K, Masumura C, Zhang M, Smith P, Darlington C (2010b) Increased BrdU incorporation reflecting DNA repair, neuronal de-differentiation or possible neurogenesis in the adult cochlear nucleus following bilateral cochlear lesions in the rat. *Exp Brain Res* 210:477-487.
- Zheng Y, Balabhadrapatruni S, Baek JH, Chung P, Gliddon C, Zhang M, Darlington CL, Napper R, Strupp M, Brandt T, Smith PF (2012) The effects of bilateral vestibular loss on hippocampal volume, neuronal number, and cell proliferation in rats. *Front Neurol* 3:20.
- Zhu H, Guo Q, Mattson MP (1999) Dietary restriction protects hippocampal neurons against the death-promoting action of a presenilin-1 mutation. *Brain Res* 842:224-229.
- Zingler VC, Weintz E, Jahn K, Mike A, Huppert D, Rettinger N, Brandt T, Strupp M (2008) Follow-up of vestibular function in bilateral vestibulopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:284-288.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9:268-275.

---

## **Une Nouvelle Zone de Neurogenèse Réactionnelle et Fonctionnelle chez le Mammifère Adulte : les Noyaux Vestibulaires - Mise en évidence et implication fonctionnelle dans différents modèles de déafférentation vestibulaire**

---

**Résumé :** Seules deux structures du système nerveux central adulte, la zone sous-granulaire et la zone sous-ventriculaire, produisent continuellement de nouveaux neurones et sont considérées comme neurogènes. En dehors de ces zones délimitées, le tissu nerveux ne possède pas de telles facultés. Leurs influences anti-neurogènes peuvent cependant être mises entre parenthèses dans certaines conditions. Cela se produit après neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) chez le chat adulte ; en effet, des études immunohistochimiques et comportementales nous ont permis de découvrir l'existence d'une neurogenèse réactionnelle de type GABAergique dans les noyaux vestibulaires désafférentés situés dans le tronc cérébral. Nos résultats témoignent de l'implication fonctionnelle de cette prolifération cellulaire dans la restauration des fonctions posturo-locomotrices suite à une NVU.

Nous avons également mis en évidence que les caractéristiques et l'intensité de la désafférentation vestibulaire déterminent, non seulement, le déroulement temporel de la restauration des fonctions vestibulaires, mais aussi les différents mécanismes cellulaires post-lésionnels et le potentiel neurogène des noyaux vestibulaires.

En outre, nous avons démontré que l'activation ou le blocage des récepteurs GABA de type A influence d'une part, les différentes étapes de la neurogenèse réactionnelle dans les noyaux vestibulaires, et détermine d'autre part le déroulement de la récupération comportementale des animaux. Ainsi, le système GABAergique joue-t-il un rôle important dans la régulation de la neurogenèse induite après NVU et de sa fonctionnalité.

Enfin, les résultats d'une dernière étude témoignent des relations vestibulo-hippocampiques et de l'impact du stress sur la neurogenèse adulte, aussi bien dans les noyaux vestibulaires que dans le gyrus dentelé du chat adulte après une lésion vestibulaire.

---

## **Discovering a new functional neurogenic zone in the adult mammal: the vestibular nuclei of the brainstem – Cellular and functional implications after different kinds of vestibular deafferentation**

---

**Summary:** Only two structures of the adult central nervous system: the subgranular zone and the subventricular zone, produce continuously new neurons and are considered as neurogenic. Outside these two delimited areas, nervous tissue does not have such faculties. The anti-neurogenic influences can however be removed under specific conditions. That is what happens after unilateral vestibular neurectomy (UVN) in the adult cat: behavioral and immunohistochemical studies have demonstrated the existence of a reactive GABAergic neurogenesis in the deafferented vestibular nuclei located in the brainstem. Our results demonstrate the functional role of the vestibular cell proliferation in the postural locomotor function recovery after UVN.

We also demonstrated that characteristics and intensity of the vestibular lesion, not only determine the time course of recovery of vestibular function, but also the post-lesional cellular mechanisms and the neurogenic potential occurring in the vestibular nuclei.

In addition, we showed that activation or blockade of GABA type A receptors influences the different steps of neurogenesis in the vestibular nuclei, and also determines the time course of behavioral recovery. Thus, the GABAergic system influences reactive neurogenesis that is beneficial for vestibular compensation process.

Finally, the results of a recent study demonstrated that vestibular-hippocampal relations exist, and that stress induced by vestibular deafferentation can modulate adult neurogenesis in both the vestibular nuclei and the dentate gyrus in the adult cat.

---

**Discipline :** Neurosciences

---

**Mots clés :** Neurogenèse, système vestibulaire, plasticité post-lésionnelle, GABA, astrocytes, stress, compensation vestibulaire, CRF, hippocampe, neurectomie vestibulaire, prolifération cellulaire, récepteurs GABA<sub>A</sub>, antimitotique, AraC, labyrinthectomie, tétrdotoxine, posture, nystagmus, chat

---

**Laboratoire :** Laboratoire de Neurosciences Intégratives et Adaptatives, UMR 7260

SFR - Comportement, Cerveau, Cognition

Université d'Aix-Marseille - CNRS

Centre Saint-Charles, Case B

3 Place Victor Hugo 13331 Marseille cedex 03, France