



HAL
open science

Rôle de la signalisation de la polarité cellulaire planaire dans les processus mnésiques

Benjamin Robert

► **To cite this version:**

Benjamin Robert. Rôle de la signalisation de la polarité cellulaire planaire dans les processus mnésiques. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0780 . tel-02422391

HAL Id: tel-02422391

<https://theses.hal.science/tel-02422391>

Submitted on 22 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Année 2017

Thèse n°93868

Thèse

Pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Mention : Sciences, technologies, Santé

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement

Le 4 Décembre 2017

Par **Benjamin ROBERT**

Né le 28 Mai 1990 à Chambray-lès-Tours (37)

Rôle de la signalisation de la polarité cellulaire planaire dans les processus mnésiques

Membres du jury :

Dr. Bruno BONTEMPI

Université de Bordeaux

Président

Dr. Claire RAMPON

Université de Toulouse

Rapportrice

Dr. Fadel TISSIR

Université de Louvain (Belgique)

Rapporteur

Dr. Valérie CREPEL

Université de Marseille

Examinatrice

Dr. Pierre TRIFILIEFF

Université de Bordeaux

Examineur

Dr. Nathalie SANS

Université de Bordeaux

Directrice de thèse

Abstract

Planar cell polarity (PCP) signaling is an evolutionary conserved pathway known to play a crucial role in the establishment of tissue polarity *via* a regulation of cytoskeleton dynamics. PCP signaling is essential during critical developmental stages, such as gastrulation or neurulation, to shape tissues and organs, and disruption of core PCP genes in mammals leads to severe malformations and neonatal death. *Van Gogh-like 2 (vangl2)* is one of the core PCP genes coding for a transmembrane protein, and its mutation leads to a failure of the neural tube closure in mammals, including humans. It has also been suggested that Vangl2 plays a role in axonal guidance, dendritic arborization of hippocampal neurons and dendritic spine density.

I showed that Vangl2 protein is enriched in the hippocampus in the adult stage, precisely in the dentate gyrus (DG) and CA3 *stratum lucidum* subregions. These subregions have been proposed to sustain two cognitive processes involved in memory functions: pattern separation and pattern completion. Pattern separation allows the encoding of similar or overlapping inputs in distinct neuronal representations, allowing formation of new memory without interference of a previous similar encountered event. Pattern completion is described as the ability to guide the recall of an entire memory using partial sensory cues. Recent studies suggest a critical role for the maturation of adult-born granule neurons of the DG in the balance that may exist between pattern completion and pattern separation. Although the mechanisms of both cognitive processes are still debated, the connectivity between DG and CA3 appears to be essential.

I thereby tested the hypothesis that in absence of Vangl2 in the brain, these two processes would be affected. I generated several conditional mutant mice in order to excise *vangl2* gene in specific areas of the hippocampus, and tested them in behavioral paradigms requiring pattern separation or pattern completion processes. My data support my hypothesis that Vangl2 in the DG is essential for a balance between pattern separation and pattern completion, through the regulation of the maturation of DG neurons.

Résumé

La polarité cellulaire planaire (PCP) est une voie de signalisation conservée au fil de l'évolution et qui joue un rôle crucial dans l'établissement de la polarité des cellules et tissus en régulant la dynamique du cytosquelette. De nombreuses études ont démontré l'implication de la PCP dans les mécanismes développementaux importants comme la gastrulation ou la neurulation chez les mammifères, et la mutation des gènes centraux qui composent la PCP mène à de sévères malformations de nombreux organes, et par conséquent une mort néonatale. *Van Gogh-like 2* (*vangl2*) est un des gènes centraux de la PCP et code pour une protéine transmembranaire de la voie de la PCP, et sa mutation conduit à une absence de fermeture de la gouttière neurale et à la mort à la naissance chez les mammifères, y compris l'Homme. Certaines études suggèrent que Vangl2 jouerait un rôle dans le guidage axonal, mais aussi l'arborisation dendritique des neurones de l'hippocampe et le nombre des épines dendritiques.

Dans ce travail, je montre que Vangl2 est enrichi dans l'hippocampe adulte de souris, et plus précisément dans le gyrus denté (DG) et le *stratum lucidum* du CA3. De nombreuses études suggèrent que le réseau formé par ces sous-structures sous-tend des processus cognitifs spécifiques impliqués dans l'encodage et le rappel de la mémoire : le pattern separation et le pattern completion. Le pattern separation est un processus d'encodage d'informations similaires en représentations différentes, permettant la formation de souvenirs distincts malgré les similitudes entre les événements. Le processus de pattern completion permet, à partir de stimuli partiels, de se remémorer un souvenir dans son intégralité. De récentes études suggèrent que la maturation des nouveaux neurones issus de la neurogenèse adulte dans le DG joue un rôle critique dans le maintien d'une balance qui existerait entre ces deux processus cognitifs. Bien que les mécanismes qui sous-tendent les deux processus soient encore mal compris, la connectivité du DG et du CA3 semble essentielle.

J'ai ainsi formulé et testé l'hypothèse selon laquelle l'absence d'expression de Vangl2 affecterait ces processus mnésiques. Pour ceci, j'ai généré plusieurs mutants murins n'exprimant pas le gène *vangl2* dans différentes régions du cerveau, que j'ai ensuite testé dans des paradigmes comportementaux requérant l'utilisation des processus de pattern separation et de pattern completion. Mes résultats suggèrent que Vangl2 dans le DG est essentiel dans le maintien d'une balance existante entre les deux processus, en régulant la maturation des neurones du DG.

Publications et Communications

Publications

[Robert BJA](#), Dos Santos Carvalho S, Quiedeville A, Barthet G, Moreau MM, Carta M, Garret M, Atchama B, Rumi-Masante J, Fièvre S, Peyroutou R, Guette C, Brayda-Bruno L, Racca C, Henderson DJ, Desmedt A, Mulle C, Marighetto A, Montcouquiol M, Sans N. Vangl2 fine-tunes hippocampal-dependent context discrimination and spatial completion.

Moreau M, Pietropaolo S*, Ezan J*, [Robert BJA](#), Miraux S, Maître M, Cho Y, Crusio W, Montcouquiol M* & Sans N*. Blockage of the ERK-Mnk1 dependent pathway improves social communication in a mice model of neurodevelopmental disorder. En révision.

Dos-Santos Carvalho S*, Quiedeville A*, Moreau MM*, Stockton J, Al-Abed S, Decroo M, Peyroutou R, [Robert BJA](#), Racca C, Marighetto A, Sans N, Montcouquiol M. Vangl2 controls the morphofunctional development of the DG-CA3 network of the hippocampus. En préparation.

Communications orales

[Robert BJA](#) "Disruption of Planar Cell Polarity signaling affects hippocampus dependent processes". Annual symposium of the Neurocentre Magendie. Bordeaux, France April 2017

[Robert BJA](#) "The Planar cell polarity protein Vangl2 controls the DG-CA3 hippocampal network". 15th Annual Synapse Day. Bordeaux, France. March 2017

Posters

[Robert BJA](#) *et al.*, "The Planar Cell Polarity pathway regulates the balance between Pattern Completion and Pattern Separation" Neurofrance 2017. Bordeaux, France. May 2017

[Robert BJA](#) *et al.*, "The Planar Cell Polarity pathway regulates the balance between Pattern Completion and Pattern Separation" SfN 46th annual meeting. San Diego, CA, USA. November 2016

[Robert BJA](#) *et al.*, "The Planar Cell Polarity pathway regulates the balance between Pattern Completion and Pattern Separation" GDR colloque GDR "Memoire", Lacanau, France, May 2016.

[Robert BJA](#) *et al.*, "Vangl2 in right amount required for a balanced memory?" Symposium du neurocentre Magendie 2015, Bordeaux, France, November 2015

[Robert BJA](#) *et al.*, "Planar Cell Polarity signaling controls hippocampus-dependent cognitive processes" 12eme colloque de la Société de Neurosciences, Montpellier, France, May 2015.

[Robert BJA](#) *et al.*, "Planar Cell Polarity signaling controls hippocampus-dependent cognitive processes" Journée Bordeaux Neurocampus/BRAIN 2015, France, May 2015

Remerciements

Avant tout, je remercie les membres du jury, les Dr. Bruno Bontempi, Dr. Claire Rampon, Dr. Fadel Tissir, Dr. Valérie Crepel et Dr. Pierre Trifilieff pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et pour être présents à ma soutenance.

Je remercie également la région Aquitaine, le LabEX Brain, la Fondation pour la Recherche Médicale, l'Agence Nationale de la Recherche pour avoir permis le financement de mon projet de thèse.

Je remercie chaleureusement le Dr. Nathalie Sans, ma directrice de thèse, qui m'a accueilli dans le laboratoire en tant que petit stagiaire de M2 sans réel objectif, et qui m'a fait suffisamment confiance pour me confier cet ambitieux projet de thèse. Malgré son emploi de temps de ministre, Nathalie a toujours été présente à chaque étape de la thèse et elle m'a permis de réaliser tous les projets dans les meilleures conditions. Même si nos avis divergeaient parfois, nous avons toujours su trouver une entente, et cela m'a certainement appris à mieux argumenter pour convaincre.

Je remercie sincèrement ma deuxième chef, le Dr. Mireille Montcouquiol, pour m'avoir également accepté au sein de leur équipe. Mireille a toujours su insuffler sa passion pour la science dans toutes nos discussions, et m'a ouvert les yeux dans de nombreux domaines. Grâce à sa rigueur et sa pertinence scientifique, j'ai appris énormément à ses côtés et ce fut un réel plaisir de discuter avec elle, des résultats, de la recherche et des futures directions.

Lors de mon arrivée en tant que stagiaire dans l'équipe, j'ai eu la chance d'être encadré par Maïté, qui m'a quasiment appris tout ce que je sais faire, et qui m'a transmis sa passion pour son travail. Même si elle ne m'a pas choisi, j'ose espérer que je n'étais pas un si lourd fardeau pour elle, et qu'elle est fière de ce que son ancien stagiaire est devenu. Pour ma part, c'est un honneur d'avoir eu son soutien indéfectible pendant la toute la durée de ma thèse. Merci Maïté !

Evidemment je tiens à remercier mon équipe, ma famille du quotidien, pour l'aide qu'ils m'ont apporté mais aussi, et surtout pour l'ambiance chaleureuse qu'ils dégagent. Je remercie Steve, qui a été le premier à me faire découvrir la vie bordelaise pendant mon

stage, qui m'a aidé dans de nombreuses situations, que ce soit au niveau professionnel comme personnel, et qui a su maintenir une ambiance joviale même dans les moments de stress les plus intenses (que ferait son Tic sans son Tac ?). Je remercie Anne pour m'avoir aidé avec l'acquisition et l'analyse au confocal, et aussi pour les discussions éclairées sur le comportement animal que nous avons eu ensemble. Je remercie Chantal pour son soutien logistique tout au long de la thèse, et pour avoir participé à l'initiation du projet FoxO. Je remercie Ronan, d'avoir été mon expert virus toutes ces années, et aussi mon coach sportif☺. Je remercie l'encyclopédie vivante, Jérôme, pour ses nombreux conseils avisés. Je remercie ma partenaire des tâches communes, Stéphanie, avec qui nous formions le meilleur binôme de l'équipe (désolé pour les autres, mais c'est vrai), même si Stéphanie est celle qui faisait quasiment tout le boulot. Son amour inconditionnel pour Céline Dion nous a permis avec Ana et Jennifer de réaliser que nous avons une détermination sans faille lorsqu'il s'agissait de se moquer de la petite Stéphanie. Merci à Ana et Jennifer pour ce moment « Céline » que je n'oublierais jamais. Je remercie évidemment tous les autres membres, dont certains restent, d'autres partent ou sont partis, et d'autres qui arrivent : Nico, Camille, Esther, Jean-Mi, Nathalie, Mehdi, Léa L., Yann, Vera, Maureen, Léa C., Sophie, Aysegul et Tamrat. Je n'oublie pas mes stagiaires qui ont permis de faire avancer ce projet, Bénédicte, Emma et Arnaldo. Ce fut un réel plaisir et un honneur de travailler avec cette équipe, et je souhaite le meilleur à tous pour l'avenir.

Je remercie tous les membres de l'institut Magendie qui permettent au quotidien de faire de la recherche dans les meilleures conditions. Je ne peux malheureusement pas citer tout le monde mais quelques mentions spéciales pour le personnel de l'animalerie, sans qui notre travail serait bien plus fastidieux, notamment Philippe, Florian, Anne-Laure et Melyssa ; à la plateforme de génotypage ; et à l'administration, notamment Dania qui a géré toutes les choses que je suis incapable de faire.

Je remercie nos collaborateurs, l'équipe d'Aline Marighetto, notamment Aline Desmedt, Laurent et Christelle, pour leur expertise dans le fear conditioning, et Shaam et Aline M. pour le labyrinthe radiaire. Je remercie l'équipe de Christophe Mulle pour l'expertise en électrophysiologie, notamment Mario Carta pour les expériences dans le CA3, Julie Rumi, pour m'avoir appris les bases de la stéréotaxie, et Gaël Barthet, pour nous avoir fourni son précieux lentivirus et pour avoir eu la patience d'enseigner à un novice comme moi, l'art

du patch-clamp, de la pratique à la théorie. Je remercie également nos collaborateurs de Newcastle, Claudia Racca et Deborah Henderson.

Mon parcours avant la thèse était loin d'être planifié et la rencontre avec plusieurs personnes ont été déterminantes dans mon orientation. J'aimerais remercier le Dr. Samuel Leman de l'Université de Tours. Ses cours captivants, son incroyable pédagogie et ses conseils m'ont orienté vers les neurosciences à une époque où je ne savais pas encore vers quel domaine de la biologie je voulais me spécialiser. J'aimerais également remercier le Dr. Claire Rampon, qui en plus d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse, m'avait auparavant accueilli en tant que stagiaire dans son équipe. Je remercie Alice et Kevin pour m'avoir encadré pendant ce stage, et qui m'ont permis d'initier mes premières expériences.

La vie de laboratoire ne serait pas envisageable sans le soutien de mes amis. Je remercie mon meilleur ami de toujours, Julien, présent dans les moments les plus heureux, comme les moments difficiles. Par nos parcours fondamentalement différents et nos points de vue divergents, il me permet de prendre du recul sur la vie. Il a été le soutien quasiment quotidien, souvent porté par les parties endiablées sur R6. La vie bordelaise m'a permis de faire de nombreuses rencontres, et je remercie ceux avec qui je partage les meilleurs moments au quotidien, comme au gré de certaines soirées. Je remercie ThoMarie, qui ont toujours été là, surtout quand j'en ai eu le plus besoin. Thomas pour partager ses délires que l'on tente souvent de comprendre, sans pour autant y arriver. Toujours présent pour faire la fête jusqu'au bout de la nuit, pour finalement s'endormir dans les endroits les plus improbables. Marie pour son humour particulier #DernierTubeDeMorris, son insatiabilité pour les parties de Carcassonne et pour ses goûts musicaux proches de la perfection (de façon purement subjective). Thomas et Marie ont été un pilier dans ma santé mentale et sans eux, la thèse n'aurait pas eu la même saveur. Les quitter va être une déchirure. Je remercie le plus réquistanais de mes amis, Geoffrey la crapule, pour son soutien lors de mes balbutiements en électrophysiologie. Même si notre amour fût impossible (sur le plan électrophy), je le remercie d'avoir pris le temps de m'aider. Je le remercie aussi pour son esprit tordu et sadique, dévoué à déclencher des épisodes traumatiques chez Eva, pour notre plus grand plaisir (tout aussi sadique). Ce qui m'amène à remercier Eva, le loup blanc, pour nos longues discussions sur le stress post-traumatiques (pas seulement celui

déclenché par Geoffrey). Si tous les chercheurs avaient la même synergie que nos interactions, le monde serait soigné de tous les maux (en toute modestie). Je la remercie pour toujours prendre soin de nous (sauf à Garorock, où elle a été capable de m'abandonner en moins de deux minutes), malgré son bizutage perpétuel perpétré par nous tous (surtout par Geoffrey). Son masochisme et son autodérision sans faille, m'a permis de relativiser la souffrance de la vie de doctorant et d'un certain côté de l'apprécier. Je remercie Saucisse, Cédric, Sarah, Mélissa, Thibaut, Hélène (la princesse) et Dylan pour tous les moments passés ensemble à profiter des bières (avec modération, parfois). Je n'oublie pas la découverte bretonne de mes dernières années, entretenu régulièrement par R6 et BF1, je parle bien évidemment de Malo, qui a un cœur immense et une sincérité inégalée. Je remercie mes amis de promo N2P2 et associés, Charlotte, Arnaud, Magali, Alban, Constant, Bertrand, Christelle, et Jean, qui m'ont accueilli dans leur cercle d'ami à mon arrivée à Bordeaux. Même si nos chemins se sont pour certains éloignés par nos différentes obligations, je vous remercie pour tous les bons moments (notamment la montagne et Chizé city). Je remercie Alison qui a été un soutien psychologique essentiel pendant ma phase d'apprentissage de l'électrophysiologie. Je remercie Alice, amie d'enfance retrouvée à Bordeaux, les premières années, avec qui Homeland n'a jamais aussi bien rimé avec McDo. Je remercie les NutriNeurogéna et associées, Fabien, Charlotte (dédicace à la thèse qu'on aura soutenu en même temps), Roman, Quentin, Camille (et son double maléfique), JL, Mel, Julien (même s'il est à Magendie, il sera toujours un Nutri dans son cœur), Essi et Clément pour toutes les soirées complètement dingues qu'on a partagé, souvent au café des Moines. Je remercie Cathy, qui tous les midis depuis bientôt deux ans, prépare de bons petits plats avec le sourire, à une époque où cuisiner est une activité optionnelle pour moi.

Evidemment je ne serais pas arrivé là sans ma famille, qui a toujours été présente malgré la distance. Je remercie chaleureusement, Maman, Papa, Catherine et Rémi pour m'avoir soutenu dans tout ce que j'ai entrepris. Même si vous avez perdu le fil de ce que je faisais, vous avez toujours cru en moi et m'avez toujours aidé pour atteindre mes objectifs. Je remercie aussi ma sœur et sa petite famille, que je ne vois pas aussi souvent que je le voudrais. Je remercie également ma belle-famille, Hélène, Hervé, Héloïse, Hector et Henri pour m'avoir accepté dans leur famille et avoir pris de mes nouvelles régulièrement dans les périodes les plus sombres de l'écriture de thèse.

Enfin, je remercie Hortense, ma chérie, ou comme elle aime se faire appeler, mon canard en sucre d'orge, qui m'a supporté (dans les deux sens du terme) pendant ces quatre dernières années. Elle est probablement celle qui me connaît le mieux, peut-être mieux que moi-même, et qui malgré tout, continue de m'aimer. Je l'aime et je la remercie d'être à mes côtés malgré la grande distance qui nous a séparés cette dernière année, et j'espère être un aussi bon soutien quand la fin de sa thèse approchera.

Table des matières

Abstract	1
Résumé	2
Publications et Communications	3
Remerciements	4
Table des matières	9
Abréviations	13
Chapitre I: Introduction	18
1. Polarité planaire cellulaire	19
1.1. La polarité au sein du monde animal.....	19
1.2. La polarité planaire cellulaire chez les invertébrés.....	20
1.2.1. <i>Les trichomes de l'aile de drosophile, autonomie et non-autonomie cellulaire</i>	22
1.2.2. <i>Régulation du cytosquelette</i>	23
1.2.3. <i>Les ommatidies de drosophile</i>	25
1.3. La polarité planaire cellulaire chez les vertébrés et mammifères.....	26
1.3.1. <i>Extension Convergente</i>	28
1.3.2. <i>L'oreille interne</i>	30
1.3.3. <i>L'épiderme</i>	31
1.4. Pathologies humaines liées aux altérations de la voie de la PCP	31
1.5. La polarité planaire cellulaire dans le système nerveux central.....	33
1.5.1. <i>PCP et migration neuronale</i>	34
1.5.2. <i>PCP et guidage axonal</i>	34
1.5.3. <i>PCP et l'arborisation dendritique</i>	35
1.5.4. <i>PCP dans la connectivité et les fonctions de l'hippocampe</i>	36
2. L'hippocampe	38
2.1 Anatomie.....	38
2.1.1. <i>Complexe subiculaire et cortex entorhinal</i>	38
2.1.2. <i>La corne d'Ammon (Cornus Ammonis)</i>	40
2.1.3. <i>Le gyrus denté</i>	43
2.1.4. <i>Réseau hippocampique, la boucle trisynaptique</i>	44
2.2. La neurogenèse adulte.....	45
2.2.1 <i>Prolifération cellulaire</i>	46
2.2.2. <i>Différentiation et maturation neuronale</i>	46
2.2.3. <i>Nouvelles cellules granulaires matures</i>	47

2.3.	Fonctions de l'hippocampe	48
2.3.1.	<i>Une mémoire, des mémoires</i>	48
2.3.2.	<i>La consolidation de la mémoire</i>	51
2.3.3.	<i>Le GPS de notre cerveau</i>	52
3.	Pattern Separation & Pattern Completion	55
3.1.	De la computation au comportement	55
3.2.	Le pattern separation.....	56
3.2.1.	<i>Réseau du gyrus denté et pattern separation</i>	56
3.2.2.	<i>Pattern separation et neurogenèse</i>	60
3.2.3.	<i>Etudes comportementales du pattern separation</i>	61
3.3.	Le pattern completion.....	65
3.3.1.	<i>Réseau autoassociatif du CA3 et pattern completion</i>	65
3.3.2.	<i>Etudes comportementales du pattern completion</i>	67
3.4.	Pattern separation et pattern completion, deux faces d'une même pièce ?.....	69
4.	Van Gogh like-2.....	71
4.1.	Van Gogh, une protéine conservée à travers l'évolution	71
4.2.	Interactions avec Vangl2	72
4.3.	La mutation Looptail de vangl2.....	74
4.4.	Vangl dans les neurones	76
4.4.1.	<i>Vangl2 et la différenciation neuronale</i>	77
4.4.2.	<i>Vangl2 et la migration neuronale</i>	77
4.4.3.	<i>Vangl2 et le guidage axonal</i>	78
4.4.4.	<i>Vangl2 dans l'hippocampe</i>	79
5.	Introduction des résultats	81
	Projet principal :.....	82
	<i>Vangl2 fine-tunes hippocampal-dependent context discrimination and spatial completion</i> 82	
	Projets complémentaires :	83
	<i>Late deletion of Vangl2 in the dentate gyrus leads to improvement of context discrimination and impairment of spatial completion</i>	83
	<i>Electrophysiological properties of dentate gyrus granule cells in CaMK-vangl2 model</i>	84
	<i>Role of Vangl2 in the CA3 autoassociative cognitive functions</i>	84
Chapitre II :	Résultats.....	86
	Vangl2 fine-tunes hippocampal-dependent context discrimination and spatial completion	87
	Abstract	88

Highlights	88
Introduction	89
Results	91
<i>Vangl2 is enriched in adult DG</i>	91
<i>Granule cell maturation deficits in adult CaMK-vangl2 cKO mice</i>	92
<i>Early postnatal deletion of vangl2 leads to better pattern discrimination</i>	95
<i>Early postnatal deletion of vangl2 does not prevent spatial learning but impairs memory recall</i>	97
<i>Mossy fiber synaptic transmission is normal in CaMK-vangl2 cKOs</i>	99
<i>Spatial Completion is normal when Vangl2 is re-expressed in the DG of CaMK-vangl2 cKO mice</i>	101
<i>Late and DG-specific deletion of vangl2 also leads to impaired pattern completion and improved pattern separation processes</i>	103
Discussion	106
<i>The core PCP protein Vangl2 affects hippocampus maturation and connectivity</i>	106
<i>New role for Vangl2 in hippocampal cognitive functions</i>	107
Methods	110
<i>Conditional knock-out mice generation</i>	110
<i>C1ql2 Plasmids, lentivirus and AAV virus generation and stereotaxic injection</i>	110
<i>Immunohistochemistry</i>	111
<i>Tissue extracts, SDS-PAGE and immunoblot analysis</i>	113
<i>Golgi impregnation method</i>	113
<i>Timm's staining</i>	113
<i>Quantification of dendritic spines</i>	114
<i>Slice preparation</i>	114
<i>Electrophysiological recordings</i>	115
<i>Drugs</i>	116
<i>Data acquisition and analysis</i>	116
<i>Behavioral testing</i>	116
Acknowledgements	120
Funding	121
Author Contributions	121
References	122
Extended data	127
Expériences complémentaires	130

Late deletion of Vangl2 in the dentate gyrus leads to improvement of context discrimination and impairment of spatial completion.....	131
PomC-vangl2 mice as a specific model of <i>vangl2</i> deletion in the DG exhibit similar behavioral phenotypes than CaMK-vangl2 and C1ql2-vangl2 mice models	131
Methods	135
<i>Conditional knock-out mice generation</i>	135
<i>Behavioral testing</i>	135
Electrophysiological properties of DG granule cells in CaMK-vangl2 model	138
Granular cells synaptic transmission in CaMK-vangl2 cKOs	138
Methods	139
<i>Slice preparation</i>	139
<i>Electrophysiological recordings</i>	140
Role of Vangl2 in the CA3 autoassociative cognitive functions	142
Vangl2 in the CA3	142
Methods	144
<i>AAV virus generation and stereotaxic injection</i>	144
<i>Immunohistochemistry</i>	144
<i>Behavioral testing</i>	145
Discussion générale	147
PCP: une voie de signalisation conservée	148
Les modèles d'étude de Vangl2 dans le système nerveux de mammifère.....	148
Vangl2 est nécessaire à la maturation de réseau dépendant de l'hippocampe.....	149
Vangl2 n'intervient pas dans toutes les fonctions dépendantes de l'hippocampe....	151
Vangl2 joue un rôle spécifique dans les fonctions du DG.....	153
Vangl2 et le réseau autoassociatif du CA3.....	154
Vangl2 et les pathologies	154
Vangl2 est-il essentiel dans tous les processus cognitifs reposant sur le pattern separation et le pattern completion ?	156
Existe-t-il une balance entre pattern separation et pattern completion ?	156
Conclusion	159
Références Générales	160

Abréviations

A/P	Antéro-postérieur
aa	acide aminé
aCSF	artificial Cerebrospinal Fluid – Liquide céphalorachidien artificiel
ASD	Autism Spectrum Disorder – Trouble du Spectre Autistique
BrdU	bromodéoxyuridine
C.g.	Couche granulaire
C.m.	Couche moléculaire
CA (1, 2 et 3)	Corne d'Ammon
CalB	Calbindine
CalR	Calrétinine
Crc	Circletail
D/V	Dorso-ventral
DCX	Doublecortine
DG	Dentate Gyrus – Gyrus denté
Dgo/Ankrd6	Diego
Dia	Diaphanous
DRF	Diaphanous-related formin
DRok	Rho kinase
Dsh/Dvl	Dishevelled
EC	Entorhinal Cortex – Cortex entorhinal
EPSC	Excitatory Post-Synaptic current – Courant excitateur post-synaptique
EQ	Equateur

FBMNs	Facial Branchiomotor Neurons – Neurones faciaux branchiomoteurs
Fmi/Celsr	Flamingo/Starry Night
FP	Floor plate
Fz	Frizzled
G/D	Gauche-droite
GABA	γ -Aminobutyric Acid – Acide γ -aminobutyrique
GDB:FH3	GTP-ase-binding domain : formin-homology 3
GFAP	Glial fibrillary acidic protein – Protéine acide fibrillaire gliale
GIPC1	GAIP C-terminus interacting protein-1
Grhl3	Grainy head-like 3
H.M.	Patient « Henri Molaison »
INT.	Interneurone
LEC	Lateral Entorhinal Cortex – Cortex entorhinal lateral
Lp	Looptail
LTP	Long Term Potentiation – Potentialisation à long terme
MEC	Median Entorhinal Cortex – Cortex entorhinal médian
Mf	Mossy fibers – Fibres moussues
MMP14	métalloprotéinase matricielle-14
MPP/LPP	Median/Lateral Perforant Path – Voie perforante Médiale et latérale
Mwh	Multiple-Wing-Hairs
NMDAR	Récepteur au N-méthyl-D-aspartate

NTD	Neural Tube Defect – Déficit de la fermeture de la gouttière neurale
ParaSb	Parasubiculum
PCP	Polarité Cellulaire Planaire
PDZ-BDM	PSD-95, DLG, ZO1 - Binding Domain Motif
Pins	Partner of inscuteable
Pk	Prickle
PreSb	Presubiculum
PSA-NCAM	Polysialylated Neuronal Cell Adhesion Molecule
PSD	Post-Synaptic Density – Densité post-synaptique
Rc	Recurrent collaterales
<i>S.l.</i>	<i>Stratum lucidum</i>
<i>S.l.m.</i>	<i>Stratum lacunosum-moleculare</i>
<i>S.o.</i>	<i>Stratum oriens</i>
<i>S.p.</i>	<i>Stratum pyramidale</i>
<i>S.r.</i>	<i>Stratum radiatum</i>
Sb	Subiculum
Sc	Schaffer collaterales – Collatérales de Schaffer
SC	Stimulus conditionnel
shRNA	Short hairpin RNA
SI	Stimulus Inconditionnel
SN	Stimulus Neutre
SNC	Système Nerveux Central
SVZ	Subventricular Zone – Zone sous ventriculaire

TA	Temporo-Ammonic path – Voie temporo-ammonique
Vangl	Van Gogh-like
Vang-Stbm	Van Gogh/Strabismus
Wnt	Wingless

Nani gigantum humeris insidentes

Chapitre I: Introduction

1. Polarité planaire cellulaire

1.1. La polarité au sein du monde animal

La plupart des organismes vivants pluricellulaires acquièrent une polarité pendant leur développement qui définit un ou plusieurs axes de symétrie permettant d'acquérir différentes capacités pour survivre au sein de leur environnement. Par exemple, dans le règne animal, on retrouve des espèces à un seul axe de symétrie, comme les étoiles de mer ou les méduses, qui ont deux pôles distincts, une partie haute et une partie basse avec des fonctions différentes. On parle ici de symétrie radiaire. Cependant la majorité des organismes animaux ont une symétrie bilatérale, c'est-à-dire qu'un seul plan divise l'animal en deux moitiés approximativement symétriques (Fig. 1A). Cette symétrie est définie selon au moins deux axes de polarité, l'axe antéro-postérieur (A/P) et l'axe dorso-ventral (D/V). Il existe une troisième polarité pour la plupart des animaux, gauche-droite (G/D) qui permet notamment aux organes internes d'être localisés de façon asymétrique, comme pour le cœur ou le foie (Fig. 1B).

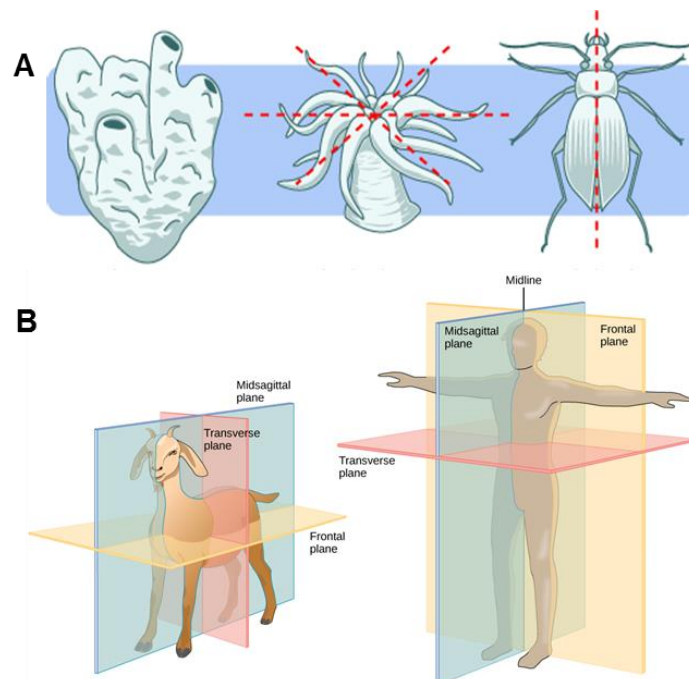


Figure 1 : La polarité au sein du monde animal.

(A) Différents exemples de symétrie animale : l'éponge dite asymétrique, l'hydre possédant deux pôles distincts (symétrie radiaire) et le coléoptère possédant un seul plan de symétrie (dite bilatérale). D'après evolution.berkeley.edu. **(B)** Visualisation des trois plans de symétrie pour un animal quadrupède et bipède : transversal (rouge), frontal (jaune) et sagittal (bleu) qui définissent les trois axes de polarité de la symétrie bilatérale, antéro-postérieur (A/P), dorso-ventral (D/V) et gauche-droite (G/D) respectivement. D'après Biology.LibresTexts.org

Ces différentes symétries se mettent en place très tôt pendant le développement de l'organisme, et elles nécessitent une organisation très précise des cellules entre elles pour être fonctionnelles. La plupart des cellules composant un organe ou un tissu sont capables de s'orienter car elles possèdent elles-mêmes un ou plusieurs axes de polarité. La polarité des cellules dépend de nombreux mécanismes moléculaires, comme la répartition asymétrique de certaines protéines cytoplasmiques ou membranaires, ainsi que des réorganisations du cytosquelette.

Les cellules épithéliales sont organisées selon une polarisation coordonnée nommée la polarité cellulaire dans le plan (PCP). Elle régit l'orientation de certaines structures cellulaires mais permet aussi la polarisation coordonnée de ces cellules entre elles, au sein d'un tissu. Cet axe de polarité est perpendiculaire à la polarité apico-basale et est essentiel pour le développement et le bon fonctionnement des tissus épithéliaux et des organes. La PCP est régie par un ensemble de gènes principaux et secondaires qui codent pour des protéines interagissant au sein d'une voie de signalisation permettant, entre autres, la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. La voie de la PCP est une voie de régulation très conservée au cours de l'évolution, des invertébrés aux mammifères, et on la retrouve dans de nombreux tissus. Une dérégulation de la voie de la PCP a des conséquences dramatiques dans le développement de l'organisme. Ces dérégulations sont souvent incompatibles avec la vie et une meilleure compréhension de ces mécanismes est une priorité.

1.2. La polarité planaire cellulaire chez les invertébrés

La PCP a été initialement observée chez la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*, où les mutations des gènes essentiels à la PCP ont mis en évidence le rôle de cette voie dans la coordination de l'orientation des poils, les trichomes, couvrant les épithéliums des ailes de la mouche (Gubb & Garcia-Bellido, 1982). Six gènes fondamentaux de la PCP ont été identifiés chez la drosophile. Trois des protéines codées par ces gènes sont transmembranaires : Van Gogh/Strasbismus (Vang-Stbm), Frizzled (Fz) et Starry Night/Flamingo (Fmi) ; et trois sont cytoplasmiques, Dishevelled (Dsh), Prickle (Pk) et Diego (Dgo). Ces protéines de la polarité planaire interagissent physiquement et forment des complexes protéiques répartis de façon asymétrique dans le plan de l'épithélium,

notamment au niveau des jonctions cellules-cellules. Vang et Pk s'accumulent dans la partie proximale de la cellule alors que Fz, Dsh et Diego se répartissent dans la partie distale. Fmi est présent des deux côtés de la cellule et participe à la stabilisation de Vang et Fz à la membrane (Usui *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 2001). Toutes les cellules d'un tissu épithélial expriment l'ARNm des 6 protéines principales de la PCP. C'est grâce à un système de régulation intra- et intercellulaire que les protéines sont réparties de façon asymétrique (Peng & Axelrod, 2012 ; Zallen, 2007 ; Fig. 2A). La ségrégation des complexes Fz-Dsh-Dgo-Fmi et Vang-Pk-Fmi de chaque côté opposé de la cellule dépend de leurs exclusions intracellulaires mutuelles, et de leurs liaisons préférentielles intercellulaires avec le complexe opposé des cellules voisines, aux jonctions cellulaires (Bastock *et al.*, 2003 ; Das *et al.*, 2004 ; Jenny *et al.*, 2003 ; Tree *et al.*, 2002 ; Strutt & Strutt, 2009 ; Zallen, 2007 ; Fig. 2B).

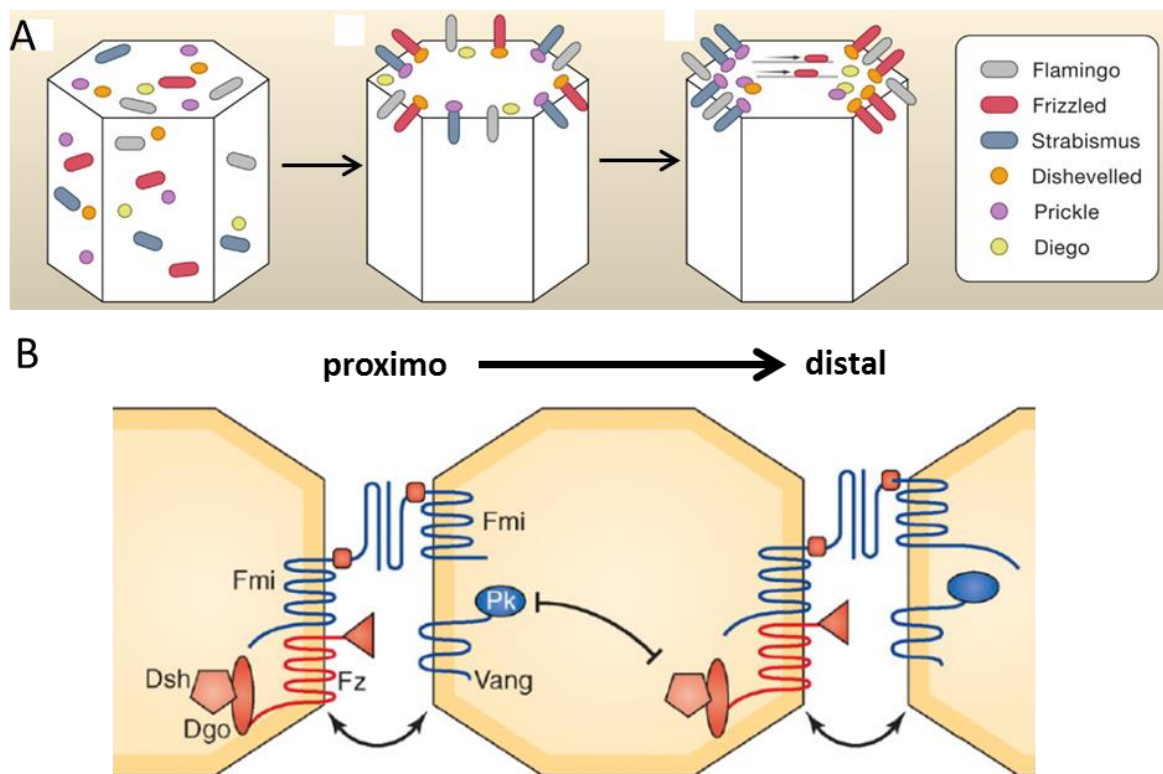


Figure 2: Localisation asymétrique des composants de la PCP.

(A) L'asymétrie de la PCP se développe progressivement à partir d'une distribution initiale uniforme des protéines centrales de la PCP dans le cytoplasme. Fz (rouge) et Stbm/Vang (bleu), sont recrutées à la surface par Fmi (gris) et recrutent, respectivement, Dsh (orange) et Pk (violet). Les protéines de la PCP vont alors se répartir asymétriquement dans l'axe proximo-distal. Fz, Dsh et Dgo sont localisés du côté distal des cellules, alors que Stbm/Vang et Pk sont localisées du côté proximal. Fmi est localisée des deux côtés formant des homodimères. D'après Zallen, 2007. (B) Un complexe distal Fz-Dsh-Dgo-Fmi interagit préférentiellement avec un complexe proximal Vang-Pk-Fmi d'une cellule voisine, qu'avec un complexe Vang-Pk-Fmi de la même cellule, participant au maintien de l'asymétrie moléculaire. D'après Devenport, 2014.

1.2.1. Les trichomes de l'aile de drosophile, autonomie et non-autonomie cellulaire

Chez la drosophile, l'épithélium qui constitue l'aile est recouvert de trichomes (Fig. 3A). Les trichomes sont des extensions cytoplasmiques constituées d'actine, présentes sur la surface apicale des cellules épithéliales et tous orientés de façon uniforme vers le pôle distal (Fig. 3B). L'orientation organisée de ces trichomes est contrôlée par les mécanismes de la PCP (Strutt, 2002 ; Adler, 2002). La répartition asymétrique des protéines de la PCP entraîne une concentration asymétrique des éléments du cytosquelette vers le pôle distal, menant à la formation des trichomes de façon uniforme entre les cellules épithéliales de l'aile (Fig. 3D-F). Chez les drosophiles mutantes pour les gènes centraux de la PCP, l'orientation des trichomes est perturbée (Fig. 3C).

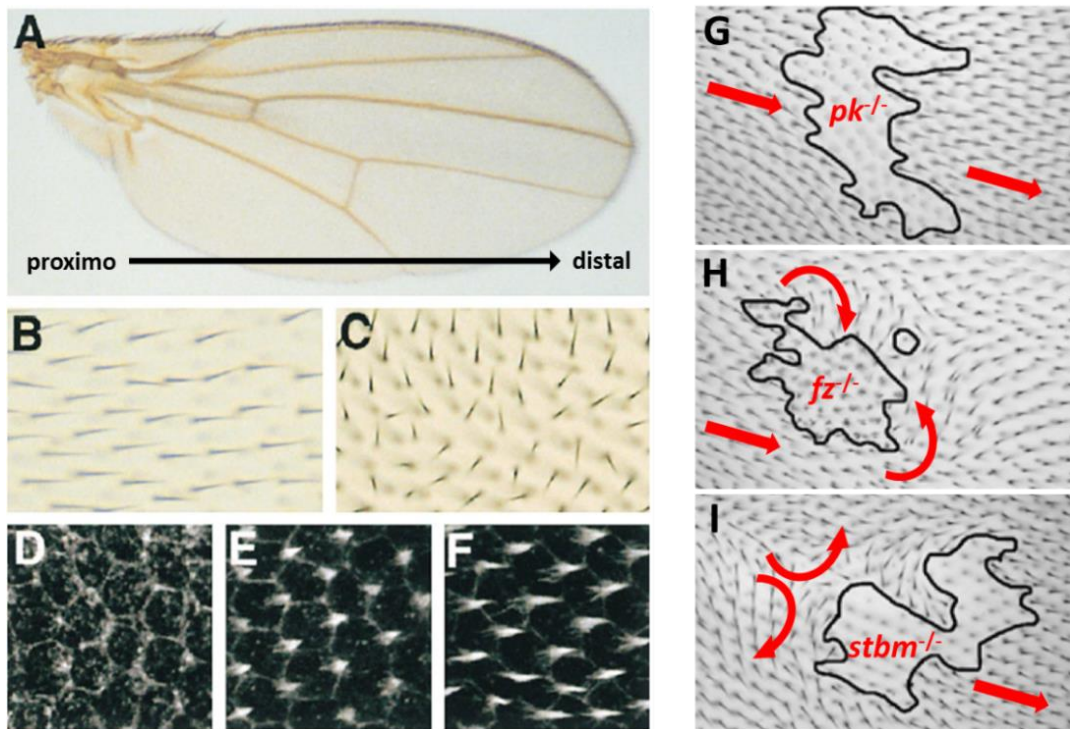


Figure 3 : Rôle de la PCP dans l'orientation organisée des trichomes de l'aile de drosophile.

(A) Surface dorsale d'une aile de drosophile adulte sauvage. La partie proximale est à gauche et la partie distale à droite. (B) Grossissement d'une région d'aile de drosophile adulte sauvage, avec des poils orientés de la partie proximale vers la partie distale, et (C) d'une aile de drosophile mutante pour *fz*, avec une orientation perturbée. (D-F) Sections confocales de la région apicale des cellules d'aile de drosophile sauvage à différents stades développementaux, marquées pour la distribution d'actine avec de la phalloïdine. Un trichome d'actine (blanc) émerge de chaque cellule du côté distal avec une polarité bien définie. D'après Strutt & Strutt, 2009. (G-I) Rôles d'autonomie cellulaire et de non-autonomie cellulaire de la PCP, chez des drosophiles chimériques. (G) L'orientation proximo-distale des cellules sauvages n'est pas affectée par les clones mutants pour *pk*, on parle de rôle d'autonomie cellulaire. (H) La mutation de *fz* dans les clones mutants réoriente les trichomes des cellules sauvages distales vers les clones, sans affecter les trichomes des cellules proximales, alors que (I) la mutation *stbm/vang* réoriente dans la direction opposée les trichomes des cellules sauvages proximales, mais pas des cellules distales. On parle de non-autonomie cellulaire. D'après Zallen, 2007.

En 1993, Wong & Adler supprimèrent l'expression de Fz, Dsh ou Pk dans des drosophiles mutantes et démontrèrent que cela entraînait une perturbation de l'orientation des trichomes dans les cellules épithéliales des ailes. Ils définirent ainsi un rôle d'autonomie cellulaire de la PCP, qui régule la polarité des trichomes des cellules (Fig. 3C). Le rôle de non-autonomie cellulaire a été mis en évidence par l'utilisation de drosophiles chimériques (Zallen, 2007 ; Fig. 3G-I). Les clones de cellules épithéliales d'aile de drosophile portant une mutation dans les gènes *fz* ou *stbm/vang* (respectivement *fz*^{-/-} ou *stbm*^{-/-}) présentaient des altérations d'orientation des trichomes, mais de façon surprenante, altéraient l'orientation des trichomes des cellules sauvages voisines, contrairement aux mutations *pk* et *dsh* qui n'affectent que l'orientation des clones, mais pas des cellules sauvages voisines (Vinson & Adler, 1987 ; Taylor *et al.*, 1998 ; Zallen 2007). Le rôle de non-autonomie cellulaire ne concerne pas tous les gènes de la PCP, et il semblerait que son effet soit directionnel. Les trichomes des cellules sauvages ont tendance à pointer vers les cellules mutantes pour *fz* (Fig. 3H). A l'inverse, les trichomes des cellules sauvages ont tendance à pointer à l'opposé des cellules mutantes pour *stbm/vang* (Fig.3I). Ces travaux suggèrent un effet opposé et complémentaire de Fz et de Vang dans le rôle de non-autonomie cellulaire. En effet, chez les mutants *fz*^{-/-}, le rôle de non-autonomie cellulaire de *vang* est perdu (Taylor *et al.*, 1998). D'un autre côté, le rôle de non-autonomie cellulaire de *fz* chez des mutants *vang* est aussi perdu (Adler & Lee, 2001). Enfin, le rôle de non-autonomie cellulaire dépend aussi du gène de la PCP *fmi* qui, lorsqu'il est muté, affecte l'effet de transmission intercellulaire de la polarité (Chae *et al.*, 1999). Une étude de Wu & Mlodzik en 2008 a démontré *in vitro* que la partie extracellulaire de Fz peut lier Vang, suggérant ainsi que l'interaction extracellulaire entre les deux protéines peut contribuer à la mise en place de l'asymétrie et à la transmission de la polarité vers les cellules voisines. La PCP joue donc deux rôles distincts. D'un côté, Fz, Dsh ou Pk sont impliqués dans la mise en place de l'asymétrie au sein de la cellule (rôle d'autonomie cellulaire), mais n'interviennent pas dans la propagation d'un signal vers les cellules voisines. Ce rôle est attribué à Fz, Vang et Fmi qui, *via* leurs interactions extracellulaires, participent à une harmonisation de la polarité du tissu.

1.2.2. Régulation du cytosquelette

La perturbation de l'asymétrie des protéines de la PCP affecte donc la polarité des trichomes de la cellule, mais de façon intéressante n'affecte pas directement sa formation

elle-même (Wong & Adler, 1993). La localisation des trichomes de drosophile étant affectée au sein de la cellule par la position distale du complexe Fz/Dsh/Fmi, il est suggéré que les principales protéines de la PCP régulent la distribution ou l'activation asymétrique des régulateurs du cytosquelette d'actine (Strutt & Warrington, 2008).

Du côté proximal de la cellule, Vang recrute les protéines qui régulent négativement la formation des poils d'actine telles que Inturned, Fuzzy et Fritz (Adler *et al.*, 2004 ; Strutt & Warrington, 2008). Ces trois protéines régulent Multiple-Wing-Hairs (Mwh), une protéine possédant un domaine GBD:FH3 (GTP-ase-binding domain : formin-homology 3), décrite comme répresseur de la polymérisation d'actine. La perte de Mwh entraîne une formation de plusieurs groupements d'actine sur la surface de l'aile, formant ainsi des cellules à plusieurs trichomes, sans affecter la localisation asymétrique des protéines de la PCP (Wong et Adler, 1993), phénotype retrouvé chez un autre régulateur de l'actine, la Rho kinase (DRok) (Winter *et al.*, 2001). D'autres régulateurs de l'actine, tels que RhoA et la formine Diaphanous (Dia), ont été identifiés comme effecteurs de la PCP.

RhoA est impliquée dans la polarité des poils de l'aile de drosophile ainsi que la détermination de leur nombre. Les cellules sauvages entourant les clones mutants pour RhoA ont un phénotype normal, démontrant un rôle d'autonomie cellulaire pour ce gène. De plus, la PCP est aussi affectée dans l'œil de drosophile, suggérant un rôle d'effecteur de la polarité planaire dans toutes les structures épithéliales (Strutt *et al.*, 1997). Il a été suggéré que RhoA active Mwh par interaction directe avec le domaine GBD:FH3, mais qu'il a aussi un rôle indépendant de Mwh sur la distribution asymétrique de la protéine Fz (Yan *et al.*, 2009).

Les formines sont des régulateurs clés de la nucléation et de l'élongation de l'actine. Les DRF (Diaphanous-related formins), une des sous-classes de formines, sont activées par Rho (Goode & Eck, 2007). Dans les cellules d'aile de drosophile, la perte de fonction ou l'expression d'une forme active de Dia mènent à une mauvaise orientation des poils ainsi que leur surnombre, suggérant que les formines sont des effecteurs de Rho (Lu & Adler, 2015). De plus, il apparaît que les fonctions de localisation et de polymérisation d'actine de Dia soient antagonistes à Mwh, et qu'ils sont tous deux capables d'interagir physiquement.

La PCP joue donc un rôle de régulation du cytosquelette d'actine. Du côté distal, le complexe Fz/Dsh/Fmi régule l'orientation des trichomes au sein des cellules et permet la coordination de cette polarité avec les cellules voisines. Du côté proximal, le complexe Vang-Pk-Fmi permet la réception du message du complexe Fz/Dsh/Fmi des cellules voisines, et permet d'empêcher la formation de trichome dans la partie proximale de la cellule, *via* les différents régulateurs de l'actine que sont Mwh, DRok ou encore les formines.

1.2.3. Les ommatidies de drosophile

Les mutants pour les gènes centraux de la PCP montrent aussi d'autres phénotypes comme des déficits de rotation des ommatidies dans l'œil et des déficits d'orientation des poils mécanosensoriels présents sur la tête et le thorax de la drosophile (Adler, 2002 ; Strutt, 2003 ; Klein & Mlodzik, 2005). Les yeux des drosophiles, comme ceux de tous les insectes, sont dit « composés » ou « à facette » car ils sont composés de plusieurs cônes (environ 800) sensibles à la lumière, appelés ommatidies, elles-mêmes composées de plusieurs photorécepteurs (Fig. 4A). Les ommatidies sont arrangées en miroir de part et d'autre d'un axe dorso-ventral, nommé équateur. Cette polarisation est visible par l'asymétrie de deux photorécepteurs, R3 et R4, donnant une chiralité de part et d'autre de l'équateur (Fig. 4C et E). La polarité planaire de l'œil s'établit grâce à la rotation des ommatidies pendant le développement de l'œil. Chez les mutants de la PCP pour *stbm/vang*, le sens et la vitesse de rotation des ommatidies sont perturbées, entraînant la perte de l'arrangement en miroir des ommatidies (Wolff & Rubin, 1998 ; Fig. 4B, D et F). On retrouve un phénotype similaire chez d'autres mutants de la PCP tels que *dsh* ou *fz* (Singh & Mlodzik, 2012).

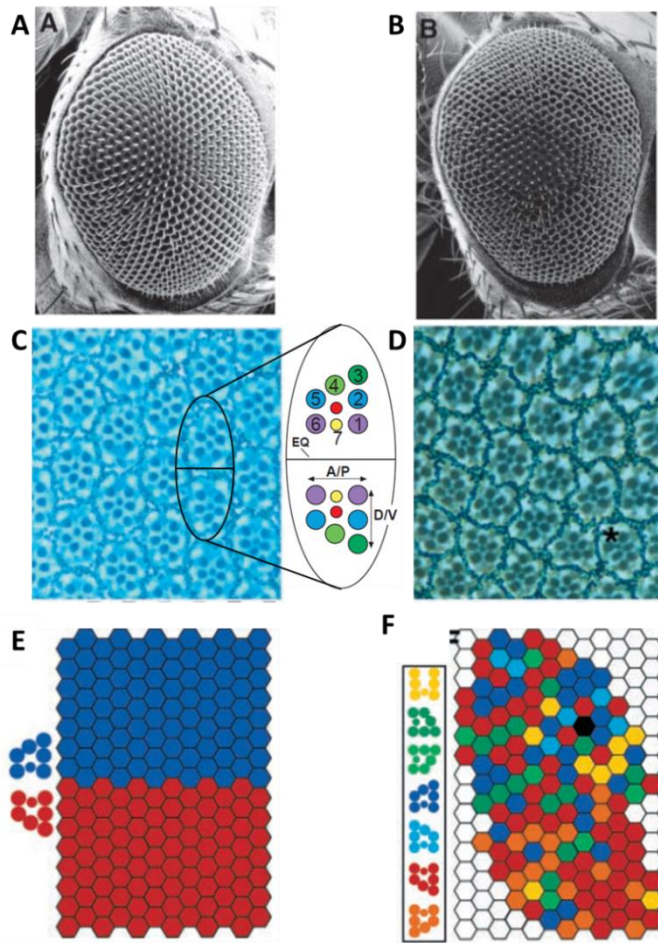


Figure 4 : La PCP dans d'autres tissus chez la drosophile.

(A) Image en microscopie électronique d'œil de drosophile sauvage et (B) d'un œil de drosophile mutant pour *stm/vang*. Chaque œil contient environ 800 unités hexagonales, les ommatidies, qui sont composées d'un groupe de 20 cellules, 8 cellules photoréceptrices et 12 cellules de soutien. Les ommatidies sont mal orientées chez le mutant *stm/vang*, lui donnant un aspect plus rugueux, comparé à la forme sauvage. (C) Section d'un œil de drosophile sauvage et schéma de deux cellules photoréceptrices sauvages, polarisées de façon chirale de part et d'autre de l'équateur (EQ), visible grâce aux photorécepteurs R3 et R4 (verts). (D) Section d'un œil mutant pour *stm/vang*. (E) Représentation schématique d'une section d'œil sauvage avec les deux formes chirales normales (rouge et bleu) et (F) section d'œil mutant avec les rotations anormales représentées par les autres couleurs. Adapté de Wolff et Rubin, 1998.

1.3. La polarité planaire cellulaire chez les vertébrés et mammifères

La voie de signalisation de la PCP est très conservée au cours de l'évolution et de nombreux homologues aux gènes de la Drosophile ont été identifiés chez les vertébrés et chez les mammifères. Il existe deux orthologues pour *vang* (*van gogh-like 1-2*), trois pour *fmi* (*celsr1-3*), plusieurs pour *fz* (variable en fonction des espèces), trois pour *dsh* (*dvl1-3*), quatre pour *pk* (*pk1-4*) et un pour *dgo* (*ankrd6*). Les protéines codées par ces gènes sont interdépendantes pour leur distribution asymétrique au sein des cellules et des tissus et leur principal rôle est de réguler la dynamique du cytosquelette (Babayeva *et al.*, 2011 ; Fig. 5a). Ces orthologues remplissent de nombreuses fonctions au cours du développement de l'organisme, et certaines pathologies développementales ont été identifiées chez des patients portant la mutation d'un ou plusieurs de ces gènes. Au cours de l'évolution, de nouveaux régulateurs de la voie de la PCP sont apparus (Fig. 5b). Identifiés par l'apparition de déficits de la fermeture de la gouttière neurale (NTDs, pour « neural tube defects ») chez certains mutants, puis validés par des déficits de polarité dans l'oreille interne, la

mutation de ces gènes associés à la PCP mène à des phénotypes moins dramatiques que la mutation des gènes centraux (Ezan & Montcouquiol, 2013 ; Fig 5b). Ainsi, la protéine Scribble1 a été associée à la voie de la PCP. En plus de l'interaction entre Scribble1 et Vangl2, la mutation du gène Scribble1^{Crc/+} entraîne l'apparition de *craniorachischisis* et des déficits d'orientation de la touffe ciliaire dans la cochlée (Montcouquiol *et al.*, 2003). D'autres protéines, comme la formine Daam-1 qui interagit avec Dvl et Rho, régulent la voie de la PCP et la dynamique du cytosquelette d'actine (Liu *et al.*, 2008), ou encore Ror2 qui forme un complexe protéique avec Fz et dont la mutation mène à des déficits de polarité dans l'oreille interne (Yamamoto *et al.*, 2008). L'ensemble des gènes de la voie de la PCP régule, entre autres, la dynamique du cytosquelette d'actine, et va être impliqué dans des mécanismes essentiels au développement de nombreux tissus, ainsi que celui du système nerveux.

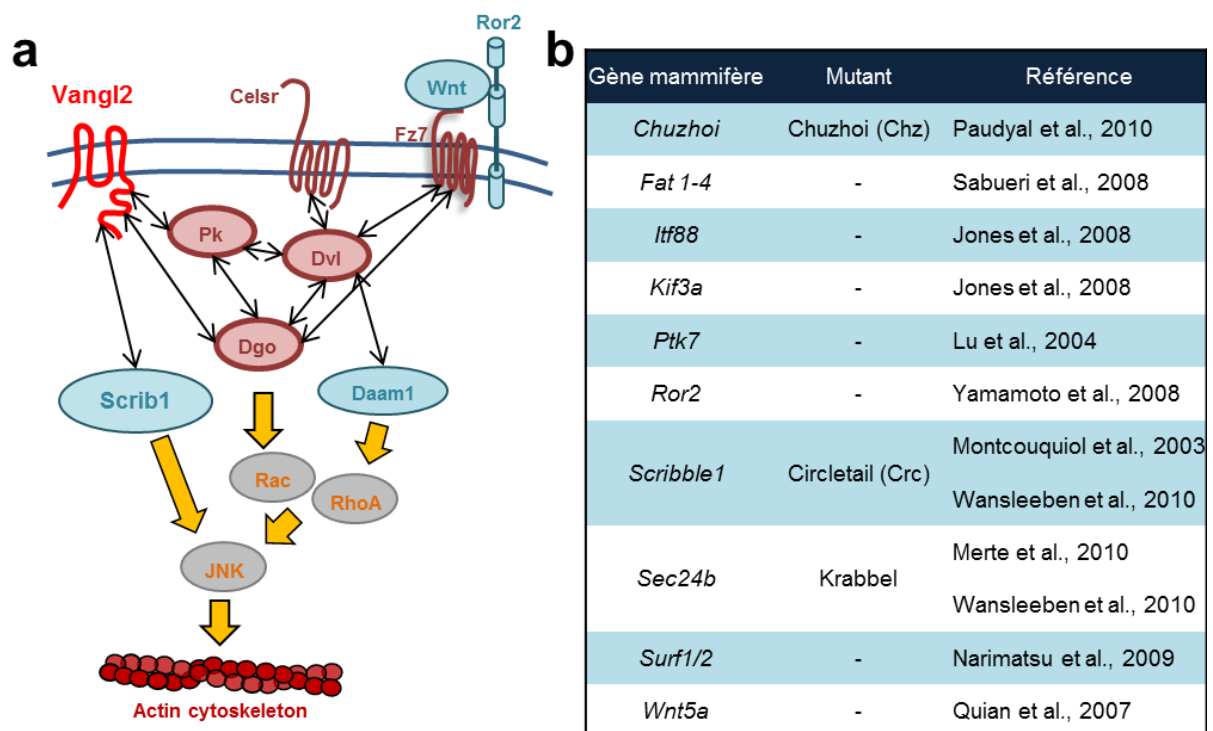


Figure 5 : La voie de la signalisation de la PCP.

(a) La voie de la PCP est constituée de nombreuses interactions entre les protéines centrales de la PCP (rouge) et les protéines associées à la PCP (bleu) qui régulent l'activation de nombreux effecteurs (gris) afin de moduler la dynamique du cytosquelette. **(b)** Tableau des gènes identifiés comme associés à la voie de la PCP. L'absence de ces gènes entraîne des phénotypes similaires, mais moins dramatiques, à ceux observés chez les mutants des gènes centraux de la PCP.

1.3.1. Extension Convergente

Chez les vertébrés, on peut décrire la PCP comme un mécanisme qui contrôle la polarité des cellules au sein d'un plan épithélial et qui est perturbé lorsqu'au moins un des gènes centraux de la PCP est muté ou supprimé. Chez les espèces *Danio rerio* (poisson-zèbre) et *Xenopus laevis* (Xénope), deux modèles de vertébrés inférieurs, un des mécanismes développementaux qui remplit les critères de cette définition est connu sous le nom d'extension convergente. L'extension convergente est un mécanisme qui intervient principalement dans deux phases essentielles du développement, la gastrulation et la neurulation.

La gastrulation est un réarrangement coordonné de cellules embryonnaires permettant de former trois feuilletts cellulaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Pendant la gastrulation, les cellules mésodermes se polarisent pour devenir bipolaires dans l'axe médiolatéral. Les cellules envoient des protrusions riches en actine, les lamellipodes, s'attacher aux cellules voisines dans l'axe médiolatéral (Fig.6A). Les lamellipodes exercent ensuite une traction qui mène à une convergence médiolatérale. Les cellules s'intercalent dans ce même axe, ce qui entraîne un allongement du tissu perpendiculairement à l'axe médiolatéral, donc une extension antéro-postérieure, en absence de prolifération cellulaire (revue dans Strutt, 2003 ; Fig. 6A). Les lamellipodes étant des structures riches en actine, la dynamique du cytosquelette est essentielle à leur formation, stabilisation et traction. Dans les années 1990, deux études montrèrent pour la première fois que la PCP était impliquée dans l'organisation des tissus des vertébrés, plus précisément, les orthologues de xénope de *Dvl2* et *Fz8* contrôlent spécifiquement l'extension convergente (Sokol, 1996 ; Deardoff *et al.*, 1998). Plusieurs études d'imagerie cellulaire suivirent et démontrèrent que la manipulation de la majorité des protéines de la PCP avait des conséquences dramatiques sur le comportement individuel des cellules lors de l'extension convergente (revue dans Wallingford, 2012). La perturbation des fonctions de la PCP entraîne des déficits de polarité et stabilité des lamellipodes, un mauvais alignement médiolatéral des corps cellulaires, et un échec de l'intercalation polarisée des cellules. De nombreuses protéines associées à la PCP, essentielles dans l'extension convergente chez les vertébrés, ne sont pas requises dans les mécanismes de PCP chez la drosophile. Parmi elles, les orthologues des vertébrés du gène de drosophile *Wingless*, *Wnt5a* et *Wnt11* jouent un rôle essentiel dans l'extension convergente. Leur mutation, suppression ou encore surexpression

entraînent un raccourcissement du corps de l'animal (Wallingford, 2012). La perturbation de l'extension convergente a également été observée chez le poisson-zèbre en mutant différents gènes de la PCP comme *vang* (*trilobite* chez le poisson-zèbre), *wnt11* (*silberblick* chez le poisson-zèbre) ou encore *pk* (Jessen *et al.*, 2002 ; Heisenberg *et al.*, 2000 ; Veeman *et al.*, 2003).

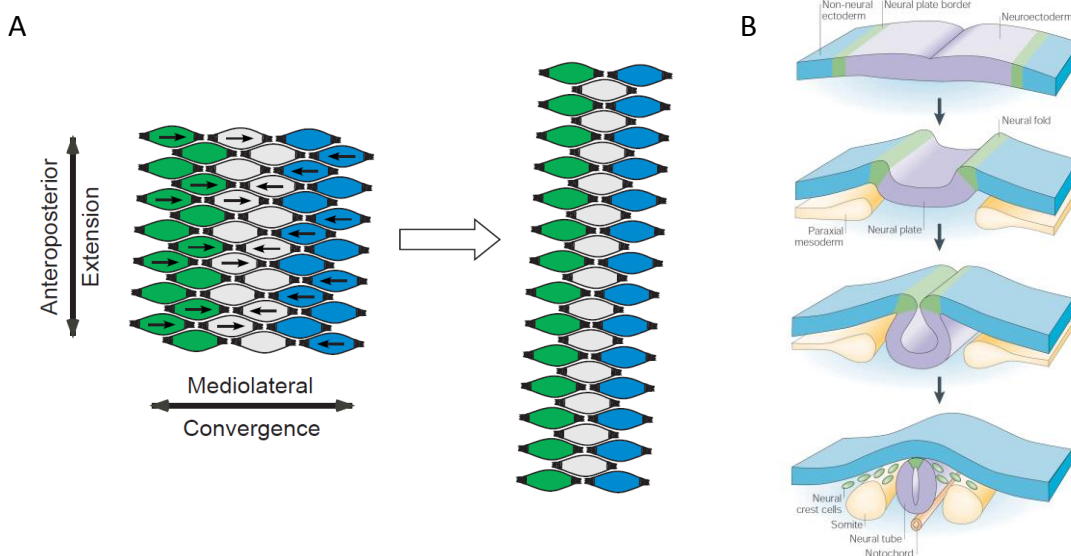


Figure 6: Extension convergente et fermeture de la gouttière neurale.

(A) Schéma simplifié de l'extension convergente dans le mésoderme du xénope pendant la gastrulation. Les cellules acquièrent une polarité bipolaire dans l'axe mediolatéral et s'intercalent, de façon à ce que la convergence mediolatérale entraîne une extension antéropostérieure du tissu. D'après Strutt, 2003. (B) Schéma de la fermeture de la gouttière neurale pendant la neurulation. Les mouvements des bordures de la plaque neurale (vert) sont induits par le neuro-ectoderme (violet) et l'ectoderme (bleu), ainsi que par le mésoderme sous-jacent (jaune). Les bordures vont s'élever et former les crêtes neurales, menant à la formation d'une gouttière neuro-ectodermale. Les crêtes se rejoignent afin de former le tube neural. D'après Gammil & Bronner-Fraser, 2003.

La neurulation permet de former la plaque neurale à partir de l'ectoderme, puis d'invaginer cette plaque pour former la gouttière neurale, qui se referme sur elle-même pour former le tube neural, futur système nerveux (Fig. 6B). L'extension convergente étant aussi impliquée dans les mouvements cellulaires pendant la neurulation, il semble logique que la perturbation de la voie de signalisation de la PCP entraîne des perturbations de la neurulation. Des malformations héréditaires du tube neural (NTDs pour Neural Tube Defects) avaient été précédemment décrites chez les souris mutantes Loop-tail homozygotes (Strong & Hollander, 1949). Ces NTDs ont été retrouvés chez de nombreux mutants pour des gènes de la PCP, notamment pour *celsr1* (Curtin *et al.*, 2003), *fz3/fz6* (Wang Y. *et al.*, 2006), *dvl1-3* (Wang J. *et al.*, 2006 ; Etheridge *et al.*, 2008) et *vangl1* (Torban *et al.*, 2008).

1.3.2. L'oreille interne

L'oreille interne est composée de l'organe auditif, la cochlée, et de l'organe de l'équilibre, le système vestibulaire. Les cellules sensorielles de l'oreille interne possèdent des stéréocils riches en actine qui, au cours de la maturation des cellules, vont former une touffe ciliaire. La touffe ciliaire des cellules de l'oreille interne est une structure fortement polarisée dans le plan épithélial, permettant de traduire les signaux mécaniques engendrés par le son dans la cochlée par un signal électrique qui sera envoyé et interprété par le cerveau (Ezan & Montcouquiol, 2013). En 2003, deux études parallèles démontrèrent que les gènes de la PCP sont essentiels à la polarisation de la touffe ciliaire. Chez les souris mutantes Loop-tail pour le gène *vangl2* (*vangl2^{Lp/Lp}*), la forme mutée de Vangl2 entraîne une perturbation de l'orientation des stéréocils qui composent la touffe ciliaire des cellules de la cochlée (Montcouquiol *et al.*, 2003 ; Fig.7).

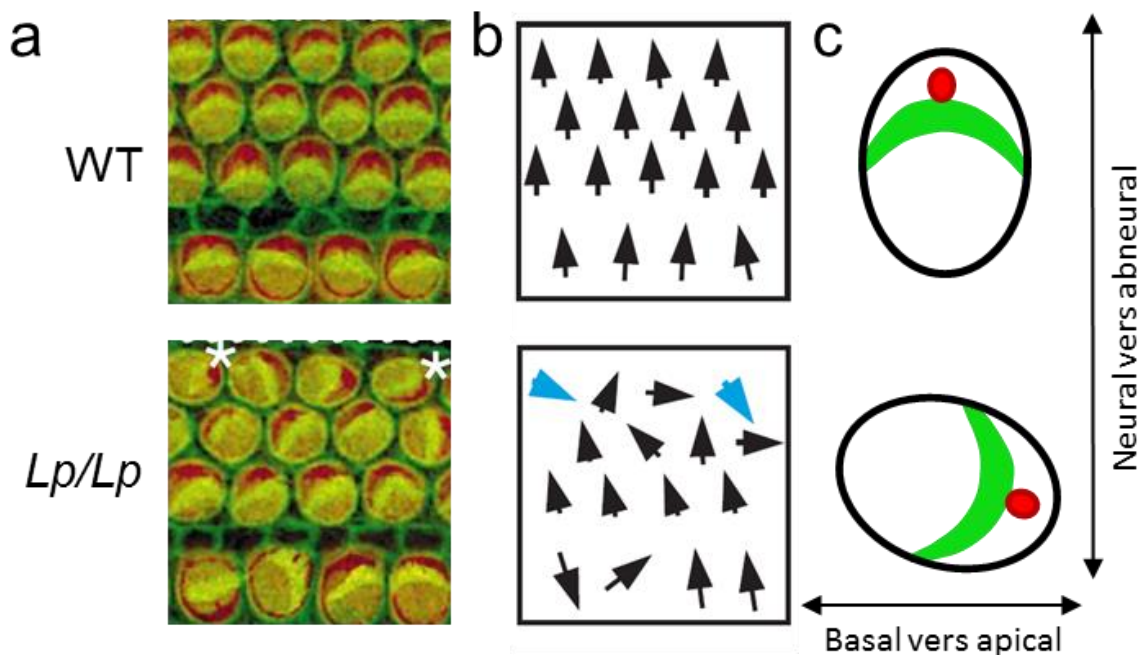


Figure 7 : L'orientation de la touffe ciliaire est perturbée chez les mutants Looptail.

(a) Surface de l'organe de Corti de la cochlée embryonnaire de souris sauvage WT (haut) et mutante Looptail *Lp/Lp* (bas). (b) Représentation de l'orientation des touffes ciliaires pour chaque cellule ciliée. L'orientation normale va du côté neural vers le côté abneural. Chez les souris Looptail, cette orientation est perturbée. (c) Schéma d'une cellule ciliée avec la touffe ciliaire d'actine en forme de V (vert) et le cil de tubuline (rouge). Adapté de Montcouquiol *et al.*, 2003.

Chez les souris mutantes pour *Celsr1* (un orthologue de *Fmi*), un phénotype similaire aux Loop-tail a été observé (Curtin *et al.*, 2003). Plusieurs études ultérieures démontrèrent des

phénotypes similaires chez des souris portant des mutations des autres gènes centraux de la PCP comme *fz3/6*, *dvl1/2/3* ou encore des gènes associés à la PCP comme *scribble* et *ptk7* (revue dans Ezan & Montcouquiol, 2013 ; May-Simera & Kelley, 2012). Les degrés de mauvaise orientation de la touffe ciliaire ainsi que les types de cellules ciliées affectées sont variables en fonction des différentes mutations, suggérant des rôles différents et des mécanismes de compensation entre les différents acteurs de la PCP (May-Simera & Kelley, 2012).

1.3.3. L'épiderme

Etant donné le rôle central de la PCP dans l'organisation des trichomes de l'épithélium des ailes de *Drosophile*, il a été proposé que la PCP puisse également réguler l'orientation des poils des cellules épithéliales de l'épiderme des mammifères. L'utilisation du mutant murin pour *fz6* (un des homologues de *frizzled*), a démontré que l'orientation des poils, et par conséquent l'organisation du pelage, était contrôlée par ce gène (Guo *et al.*, 2004). Un autre processus requérant le mouvement coordonné des cellules dans le plan épithélial est la réparation des blessures. Ce mécanisme dépend du réarrangement du cytosquelette d'actine régulé par les petites Rho GTPases, connues pour jouer un rôle essentiel dans la signalisation de la PCP, chez les invertébrés et les vertébrés. Une étude a suggéré qu'un membre de la famille des facteurs de transcription développementaux *Grainy head-like 3* (*Grhl3*), connu pour être impliqué dans la formation du tube neural et l'intégrité épidermale chez les mammifères (Ting *et al.*, 2003 Nat. Med. ; Ting *et al.*, 2005), était un composant de la voie de la PCP, et que la voie de la PCP régule, *via Grhl3*, la réparation des blessures embryonnaires précoces et tardives (Caddy *et al.*, 2010).

1.4. Pathologies humaines liées aux altérations de la voie de la PCP

Les délétions et mutations des gènes de la PCP affectent le développement de nombreux tissus et organes chez les mammifères, comme la trachée (Vladar *et al.*, 2012), les poumons (Yates *et al.*, 2010a), les reins (Yates *et al.*, 2010b), le squelette thoracique (Stein & Mackensen, 1957), le cœur (Henderson *et al.*, 2001), l'oreille interne (Montcouquiol *et al.*, 2003), ou encore la gouttière neurale (Strong & Hollander, 1949). Dans ce cas, les mutations peuvent mener à des *craniorachischisis* ou des *spina bifida* caractérisés par des

fermetures incomplètes de la colonne vertébrale et des malformations cérébrales. Pour autant, le lien entre les protéines de la PCP et des déficits cognitifs, comme des troubles de l'apprentissage ou de sociabilité que l'on peut retrouver chez des patients ASD (« Autism Spectrum Disorders » ; Troubles du spectre autistiques), est bien plus récent (revue dans Sans *et al.*, 2016).

La délétion ou mutation du gène *FZ3* chez l'Homme est positionnée dans la région chromosomique 8p [8p21.1], une région candidate pour certains troubles neurodéveloppementaux tels que la schizophrénie et l'ASD (Tabares-Seisdedos *et al.*, 2009). Des mutations d'un seul nucléotide dans le gène *FZ3* sont fortement corrélées avec des cas de schizophrénie dans les populations japonaises et chinoises (Katsu *et al.*, 2003 ; Kang *et al.*, 2011). La mutation de ce gène a également été retrouvée chez des patients atteints d'agénésie du corps calleux, de retards développementaux ainsi que de troubles intellectuels (Sajan *et al.*, 2013). Le gène *FZ4* est associé à la vitréorétinopathie exsudative familiale (arrêt prématuré de la vascularisation de la rétine) (Robitaille *et al.*, 2002). La délétion de la région génomique où est inséré *FZ4* a aussi été reliée à des perturbations de croissance, des anomalies crâniofaciales, de voûte palatine, et de déficience intellectuelle (Li *et al.*, 2006 ; Nallathambi *et al.*, 2006). La mutation de la région du gène *FZ5* a été identifiée chez des patients présentant des perturbations développementales et des troubles ASD (Roberts *et al.*, 2014 ; Brandau *et al.*, 2008). Le gène *FZ9* est quant à lui associé au syndrome de Williams-Beuren (Wang *et al.*, 1997 ; Merla *et al.*, 2010). Les enfants atteints de ce syndrome présentent dans la plupart des cas des retards psychomoteurs, une dysmorphie faciale, des problèmes cardiaques, ainsi que des troubles de l'apprentissage et de l'attention (Martens *et al.*, 2008).

Les mutations des gènes *VANGL1* et *VANGL2* provoquent des NTDs chez l'Homme (Kibar *et al.*, 2009 ; Ilescu *et al.*, 2014 ; Lei *et al.*, 2010) et sont tous les deux impliqués dans le développement du cancer (Ryu *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2011 ; Yoon *et al.*, 2013 ; Piazzini *et al.*, 2010). Les gènes *DVL* ont également un rôle développemental. La délétion de la région chromosomique où *DVL1* est inséré, est impliquée dans des dysmorphies crâniofaciales, des troubles intellectuels, des épilepsies, des troubles de la communication et des troubles auditifs et visuels (Battaglia *et al.*, 2008). Des mutations *de novo* entraînant un décalage du cadre de lecture du gène *DVL1* ont également été identifiées chez des patients atteints du

syndrome de Robinow (raccourcissement des membres, défauts de segmentation vertébrales, dysmorphies faciales) (Bunn *et al.*, 2015 ; White *et al.*, 2015). La délétion de la région chromosomique du gène *DVL2* a été également trouvée chez des patients atteints de dysmorphies, de retard développemental, et de déficits intellectuels (Zeesman *et al.*, 2012). Une étude a été capable de relier de rares mutations *de novo* de variant de *DVL2* avec des symptômes autistiques (Gilman *et al.*, 2011). *DVL2* a également été relié au lymphome (Hegazy *et al.*, 2013). *PK1* est impliqué dans l'épilepsie (Bassuk *et al.*, 2008 ; Criscuolo *et al.*, 2010 ; Tao *et al.*, 2011), les NTDs (Bosoi *et al.*, 2011) et, par une analyse fonctionnelle *in vitro* et *in vivo*, est défini maintenant comme un gène de l'ASD (Paemka *et al.*, 2015). Les mutations de *PK2* sont liées à des *spina bifida* (Wen *et al.*, 2010), l'épilepsie et l'autisme avec des dysfonctions synaptiques de l'hippocampe (Sowers *et al.*, 2013).

Toutes ces études suggèrent l'implication de la voie de la PCP dans des pathologies humaines et plus spécifiquement au niveau neuronal et comportemental. Pourtant les mécanismes de la PCP dans le système nerveux central sont encore très mal compris.

1.5. La polarité planaire cellulaire dans le système nerveux central

Le cerveau est un des organes les plus complexes, impliqué dans la plupart des fonctions de l'organisme. Il est constitué de plusieurs structures cérébrales interconnectées, ayant chacune différents rôles. Le cerveau humain est composé d'environ 170 milliards de cellules dont la moitié est dédiée à la communication entre les différentes parties du cerveau et de l'organisme, les neurones. Les neurones sont des cellules extrêmement polarisées, composées classiquement de trois parties principales : le corps cellulaire, l'arbre dendritique et un axone. Les neurones communiquent entre eux *via* des synapses, qui connectent la partie terminale de l'axone aux dendrites des autres neurones. La polarité des neurones, le développement de l'arbre dendritique ou encore la migration neuronale sont des mécanismes essentiels au bon établissement et fonctionnement du réseau neuronal, et ils dépendent tous de la dynamique et de l'organisation du cytosquelette. Comme décrit précédemment, la PCP joue un rôle capital dans le contrôle du cytosquelette d'actine, par conséquent le rôle de la PCP dans le développement neuronal est de plus en plus étudié. En effet, tous les gènes de la PCP sont exprimés dans le système nerveux central (SNC) de mammifères (Tissir & Goffinet, 2006).

1.5.1. PCP et migration neuronale

Au cours du développement cérébral, de nombreux neurones sont amenés à migrer de leurs zones prolifératives pour atteindre la localisation de leurs fonctions spécifiques. Un modèle d'étude très utilisé est la migration antéro-postérieure des neurones faciaux branchimoteurs (FBMN) du tronc cérébral. Initialement décrite chez le poisson-zèbre (Chandrasekhar *et al.*, 1997), elle est conservée jusqu'aux mammifères (Gilland & Baker, 2005). La première indication que la PCP est impliquée dans la migration des FBMN provient d'études sur le poisson-zèbre, qui montrèrent que *vangl2*, *fz3a*, *celsr2*, *pk1a* et *pk1b* contrôlaient cette migration de manière autonome cellulaire et non-autonome (revue dans Wallingford, 2012 et Tissir & Goffinet, 2013). Ces études ont été étendues chez la souris, dans laquelle le rôle de *Vangl2*, *Scribble1*, *Celsr1*, *Celsr2*, et *Fz3* dans la migration des FBMN a été démontré (Vivancos *et al.*, 2009 ; Qu *et al.*, 2010 ; Chevalier *et al.*, 2017).

1.5.2. PCP et guidage axonal

Une fonction conservée des gènes de la PCP, des invertébrés aux mammifères, est leur rôle dans le guidage axonal des neurones. Plusieurs études chez la drosophile démontrèrent l'implication de *Fmi* dans le développement axonal du système visuel (Senti *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2003b) et dans la croissance axonale des neurones sensoriels (Steinel & Whittington, 2009) et ceci en interagissant avec une autre protéine centrale de la PCP, *Pk* (Mrkusich *et al.*, 2011). Dans le modèle *C. elegans*, *Fmi* joue un rôle similaire dans la direction et la croissance axonale (Steimel *et al.*, 2010 ; Ackley, 2014). Chez les mammifères, les gènes centraux de la PCP ont des fonctions conservées dans le SNC. Plusieurs études démontrent l'implication de *Fz3* et *Celsr3* dans le guidage axonal (Wang *et al.*, 2006 ; Zhou *et al.*, 2008 ; Fenstermaker *et al.*, 2010). L'inactivation de ces gènes mène à de sévères déficits de guidage des axones monoaminergiques le long de l'axe antéro-postérieur. D'autres études démontrèrent des phénotypes similaires sur d'autres modèles de guidage axonal tels que la migration des axones commissuraux dans la moelle épinière (Lyuksyutova *et al.*, 2003; Avilés & Stoeckli, 2016) et la migration des axones des neurones des systèmes nerveux périphérique, sympathique et entérique (Armstrong *et al.*, 2011; Chai *et al.*, 2014; Hua *et al.*, 2013; Sasselli *et al.*, 2013). De plus, *fz3*, *celsr3* mais aussi *vangl2* sont essentiels pour l'organisation antéro-postérieure des axones monoaminergiques dans le tronc cérébral et vers la moelle épinière de souris (Wang & Nathans, 2007; Price *et al.*,

2006; Lyuksyutova et al, 2003; Shafer *et al.*, 2011). Dans ce modèle, les 3 gènes sont impliqués dans cette migration, mais les phénotypes associés à leurs mutations respectives ne sont pas toujours identiques (Fig. 8).

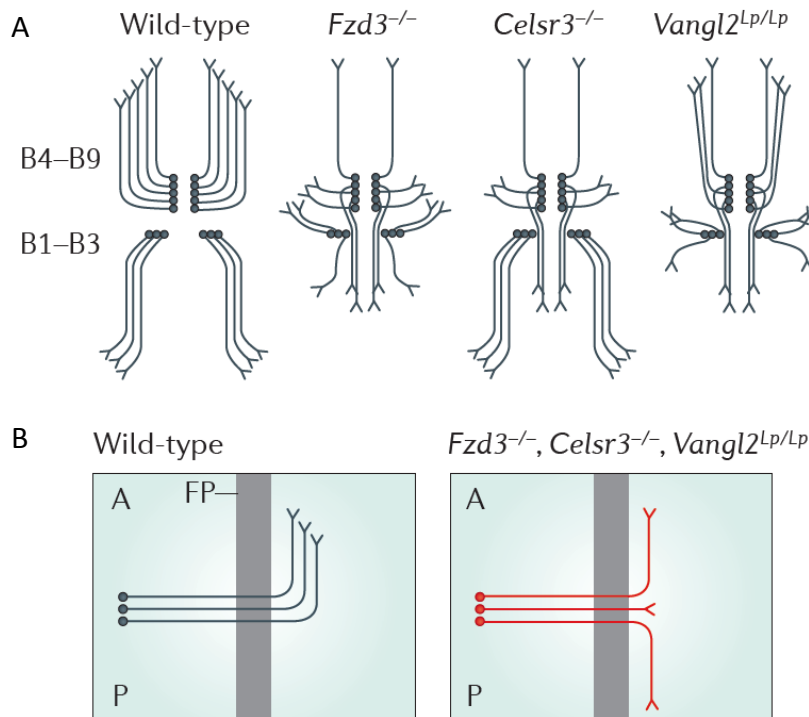


Figure 8 : Rôle de la PCP dans la migration axonale du système nerveux.

(A) Chez la souris sauvage, les neurones sérotoninergiques ascendants (B4-B9) projettent leurs axones antérieurement alors que les neurones descendants (B1-B3) les projettent postérieurement. Dans le modèle KO pour *Fz3* (*Fz3*^{-/-}) et la souris portant la mutation looptail (*Lp*) de la protéine *Vangl2* (*Vangl2*^{Lp/Lp}), les axones des neurones ascendants projettent postérieurement et latéralement et les descendants projettent antérieurement. Les souris *Celsr3*^{-/-} montrent principalement un déficit dans les projections des axones ascendants. Les projections descendantes des *Vangl2*^{Lp/Lp} sont 'hyperfasciculées', un phénotype non-observé chez les souris *Fz3*^{-/-} ou les souris *Celsr3*^{-/-}. **(B)** Dans la moëlle épinière de souris sauvage, les axones commissuraux tournent antérieurement après avoir traversé la *floor plate* (FP), mais leur direction est aléatoire chez les mutants *Fz3*^{-/-}, *Celsr3*^{-/-} et *Vangl2*^{Lp/Lp}. D'après Tissir & Goffinet, 2013.

1.5.3. PCP et l'arborisation dendritique

En 2002, une étude a montré que les homologues de *Fmi* (*Celsr1*, 2 et 3) ont des patterns d'expression en fonction du stade de développement et des structures (Shima *et al.*, 2002). En 2004, la même équipe a démontré que *Celsr2* (homologue de *Fmi*) est requis pour le maintien de l'arborisation dendritique et que sa perte de fonction par ARNi (ARN interférent) entraîne une diminution de la longueur dendritique ainsi qu'une baisse de la complexité de l'arborisation des neurones pyramidaux corticaux et les neurones de Purkinje (Shima *et al.*, 2004). Ils montrent plus tard que les homologues *Celsr2* et *Celsr3* ont des rôles opposés dans la croissance des neurites (Shima *et al.*, 2007). *Pk2* joue

également un rôle dans le développement dendritique (Sowers *et al.*, 2013). Les auteurs démontrent que la perte de Pk2 mène à une réduction de l'arborisation dendritique, du nombre de synapses et de la taille des densités post-synaptiques (PSD) dans les neurones d'hippocampe de souris.

En 2010, notre laboratoire a démontré que la mutation *circletail* de *scribble*, un gène associé de la PCP, entraîne une augmentation de la longueur totale et le nombre d'intersection de l'arbre dendritique basal de neurones pyramidaux du CA1 de l'hippocampe (Moreau *et al.*, 2010). De plus, l'organisation de l'arbre dendritique apical de ces neurones est modifiée. Le nombre d'intersection proche du corps cellulaire est réduit alors que dans la partie distale il est augmenté. Un nombre réduit de synapses mais de taille plus importante a également été observé associé à une augmentation de la taille des PSD et d'une diminution des synapses perforées. Notre laboratoire a également démontré que la protéine Scribble était localisée dans les épines dendritiques et qu'elle influençait la morphologie du cytosquelette d'actine des épines, ainsi que le trafic des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR), un des principaux récepteurs du glutamate (Moreau *et al.*, 2010 ; Piguel *et al.*, 2014).

1.5.4. PCP dans la connectivité et les fonctions de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure cérébrale souvent décrite comme le support principal de la mémoire (voir 2. L'hippocampe). De récentes études ont démontré l'importance de la voie de la PCP dans le bon fonctionnement de l'hippocampe. En 2013, Sowers et collaborateurs démontrent que l'absence de Pk2 mène à une réduction de l'arborisation dendritique, du nombre de synapses et de la taille des densités post-synaptiques (PSD) dans les neurones d'hippocampe de souris. Ces altérations sont corrélées à des troubles comportementaux tels que des problèmes d'interaction sociale, des anomalies d'apprentissage et des déficits de flexibilité. Ces phénotypes morphologiques et comportementaux sont similaires à des phénotypes observés chez les modèles murins du trouble du spectre autistique (ASD). Ils démontrèrent que des variants pour Pk2, trouvés chez des patients humains ASD et transfectés dans des neurones hippocampiques de souris, entraînaient des altérations d'arborisation dendritique et de transmission synaptique (Sowers *et al.*, 2013). En utilisant des mutants conditionnels, Feng et collaborateurs ont montré que l'absence de *Celsr3* altère l'architecture des neurones de

l'hippocampe, perturbe leur transmission synaptique et impacte l'apprentissage et la mémoire des souris, suggérant un rôle dans le développement, la connectivité et la fonction de l'hippocampe (Feng *et al.*, 2012).

En 2010, notre laboratoire a démontré que la mutation *circletail* de *scribble*, un gène associé à la PCP, entraîne chez la souris hétérozygote des déficits de sociabilité associés à des capacités d'apprentissage et de mémoire améliorées, phénotypes similaires à l'ASD (Moreau *et al.*, 2010). De plus, Scribble est requis pour l'apprentissage et la consolidation mnésique et pour la plasticité synaptique dépendant des NMDAR (Hilal *et al.*, 2016).

Une étude récente a démontré que les protéines de la PCP jouent un rôle important dans la régulation des multiples étapes de la neurogenèse dans l'hippocampe adulte (voir 2.2. Neurogenèse adulte) (Schafer *et al.*, 2015). En utilisant des shRNA (« Short hairpin RNA », interfèrent de l'ARN) pour diminuer l'expression de Fz3 et Celsr1-3 dans les cellules prolifératives de l'hippocampe, ils montrèrent de sévères troubles de maturation des nouveaux neurones, sans pour autant changer la différenciation cellulaire des neuroblastes. De plus, ils déterminèrent que Celsr1 régule la direction du site d'initiation dendritique et que Celsr2 et Celsr3 contrôlent la migration radiaire et l'organisation dendritique (Schafer *et al.*, 2015). Cette étude caractérisa pour la première fois le rôle de la PCP dans la maturation morphologique des neuroblastes différenciés de l'hippocampe.

La voie de la PCP est donc une cascade de signalisation très conservée au cours de l'évolution qui est essentielle pour le développement de nombreux tissus et organes. De nombreuses études ont montré que la PCP joue également un rôle dans le développement du système nerveux central et périphérique et qu'il participe au bon fonctionnement de certaines structures cérébrales, notamment l'hippocampe.

2. L'hippocampe

2.1 Anatomie

L'hippocampe est une structure cérébrale dont le nom provient de sa ressemblance avec le poisson, suite aux observations en 1597 de l'anatomiste Julius Aranzi. L'hippocampe est une structure bilatérale située dans le lobe médian temporal du cerveau. Bien qu'aucun consensus n'existe, le terme formation hippocampique fait souvent référence à l'hippocampe à proprement parler et aux structures cérébrales directement reliées, telles que le gyrus denté (DG), le complexe subiculaire et le cortex entorhinal (EC). L'hippocampe, nommé *Cornus Ammonis* ou corne d'Ammon, est sous-divisé en trois zones, CA1, CA2, et CA3. Chez le rongeur, les deux hippocampes sont reliés entre eux, à leur extrémité, par la commissure hippocampale, située sous le corps calleux qui relie les deux hémisphères. Au-delà des différentes sous-structures, l'hippocampe est également asymétrique selon deux axes principaux : dorso-ventral et proximo-distal, qui confèrent, au sein d'une même sous-structure, différentes connectivités et fonctions (Geiller *et al.*, 2017). Les différentes parties de la formation hippocampique sont interconnectées et forment la boucle trisynaptique (Fig. 9) qui joue un rôle essentiel dans la mémoire, faisant de l'hippocampe une des structures cérébrales les plus étudiées (Deng *et al.*, 2010).

2.1.1. Complexe subiculaire et cortex entorhinal

Le complexe subiculaire est constitué des prosubiculum, subiculum, présubiculum, postsubiculum et parasubiculum. Il est situé dans le prolongement de la corne d'Ammon et reçoit ses principales afférences du cortex entorhinal (EC) et des cellules pyramidales du CA1 (Ding, 2013 ; Fig. 9A). Sa position au sein de la formation hippocampique lui confère un rôle, encore mal compris, d'interface entre l'hippocampe et les autres structures. Bien qu'il soit peu étudié, par rapport aux autres structures de la formation hippocampique, il a été suggéré qu'il jouait un rôle de pivot dans l'intégration de l'information liée à l'espace, les mouvements et la mémoire, ainsi qu'un rôle majeur de la régulation de l'inhibition de l'axe hypothalamo-pituitaire (O'Mara, 2005).

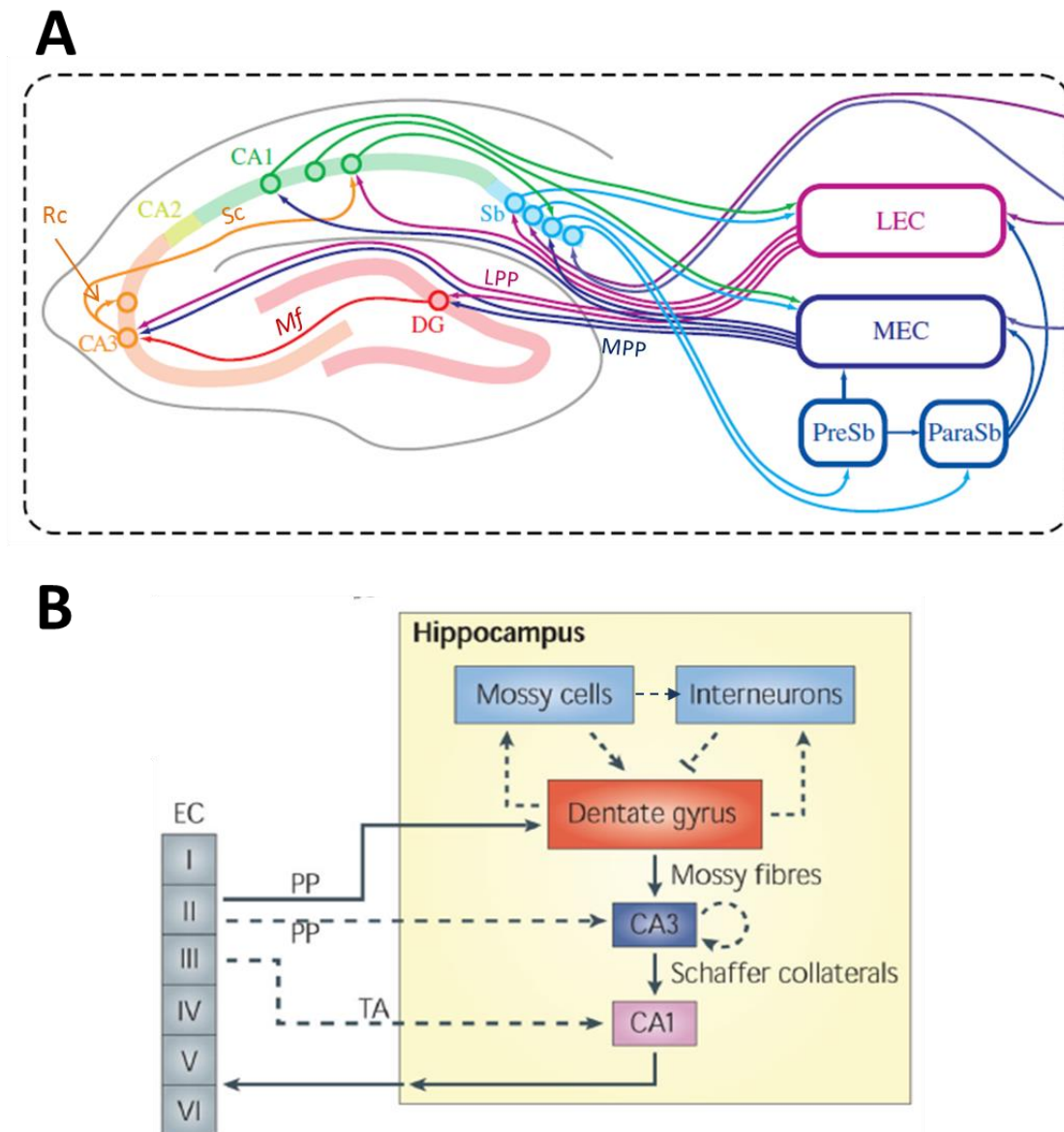


Figure 9 : Représentations schématiques du réseau de la formation hippocampique.

(A) Schéma anatomique des fibres parcourant le réseau hippocampique. Les neurones du cortex entorhinal médian (MEC) et latéral (LEC) projettent leurs axones *via* la voie perforante médiale ou latérale (MPP, bleu foncé et LPP, violet). Ces axones connectent les dendrites des cellules granulaires du gyrus denté (DG, rouge). Les cellules granulaires du DG projettent leurs axones, les fibres moussues (Mf, rouges), vers les dendrites des neurones pyramidaux du CA3 (orange), localisés dans le *stratum lucidum*. Les neurones du CA3 connectent le CA1 *via* les collatérales de Schaffer (Sc). Le CA1 envoie alors ses projections vers le subiculum (Sb, bleu clair) et vers l'EC. PreSb : Presubiculum ; ParaSub : Parasubiculum ; Rc : Collatérales récurrentes. D'après Hartley *et al.*, 2017. **(B)** Représentation des interactions entre les différentes structures qui composent la boucle trisynaptique. Il existe des connexions parallèles à la boucle trisynaptique au sein de l'hippocampe (flèches pointillées). L'EC connecte directement le CA3 *via* la voie perforante, ainsi que le CA1 *via* la voie temporo-ammonique (TA). Les collatérales récurrentes du CA3 connectent d'autres neurones du CA3 pour former un réseau autoassociatif. Les axones des cellules granulaires du DG connectent les cellules du hile, les cellules moussues (mossy cells) et les interneurons, qui projettent à leur tour vers les cellules granulaires du DG. D'après Deng *et al.*, 2010.

L'EC est la principale structure afférente et efférente de l'hippocampe, formant le point nodal dans le circuit reliant cortex et hippocampe. Il est sous-divisé en deux principales aires, le cortex entorhinal latéral et médian (LEC et MEC), ayant une cytoarchitecture divisée en 6 couches et des projections vers l'hippocampe différentes, corrélées avec des fonctions différentes (Fig. 9A et B). Le MEC possède des connexions avec le subiculum, le cortex retrosplénial et le cortex postrhinal, considérées comme appartenant au domaine du traitement de l'information spatiale. Le LEC est quant à lui principalement connecté avec les aires olfactives, les aires cortico-frontales et le cortex périrhinal, plutôt impliquées dans le traitement de l'information des objets, de l'attention et de la motivation (revue dans Witter *et al.*, 2017). En 2005, l'équipe de May-Britt Moser et Edvard Moser démontra que l'EC encode les informations spatiales en créant une carte spatiale de l'environnement en forme de grille (Hafting *et al.*, 2005), faisant écho avec l'étude de John O'Keefe de 1971 découvrant l'existence de cellules de lieu dans l'hippocampe (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Ces deux découvertes furent à l'origine d'une explosion de projets visant à comprendre les mécanismes de la navigation spatiale dans le circuit EC/hippocampe, et furent récompensées par le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 2014.

2.1.2. La corne d'Ammon (*Cornus Ammonis*)

Le terme *Cornus Ammonis* ou corne d'Ammon a été proposé par le chirurgien de Garengot en 1742 en référence au dieu égyptien Ammon parfois représenté avec des cornes de bélier, forme semblable à l'hippocampe. La corne d'Ammon peut-être divisée en trois sous régions : CA1, CA2, CA3. Les trois sous-régions ont une organisation laminaire assez similaire. La couche des cellules pyramidales, qui contient les principaux neurones de l'hippocampe, est très dense en neurones dans le CA1 et plus dispersée dans le CA2 et CA3. La couche infrapyramidale contient très peu de cellules et est appelée *stratum oriens*. Cette couche contient les dendrites basales des cellules pyramidales et plusieurs types d'interneurones. Dans le CA3 exclusivement, une couche acellulaire assez fine contient les fibres moussues, qui sont les prolongements axonaux des cellules granulaires du DG. Cette couche est appelée *stratum lucidum*, et elle est le lieu d'une connectivité particulière entre les fibres moussues et les dendrites des cellules pyramidales CA3, qui forment des synapses complexes où les compartiments pré- et post-synaptiques s'invaginent pour former un gros bouton synaptique. La fin de la région du *stratum lucidum* marque la

bordure CA3/CA2. Au-dessus du *stratum lucidum* pour le CA3, et juste au-dessus de la couche pyramidale pour le CA2 et le CA1, se trouve le *stratum radiatum*, où l'on trouve les dendrites apicales des neurones pyramidaux. C'est dans cette couche que l'on trouve les connexions entre les sous-structures de l'hippocampe, telles que les collatérales récurrentes du CA3 sur lui-même, et les connexions du CA3 vers le CA1, appelées collatérales de Schaffer. La couche la plus superficielle de l'hippocampe est le *stratum lacunosum-moleculare* où les axones provenant des autres structures du cerveau, principalement de l'EC, connectent l'hippocampe (Fig. 10).

Le CA1 est considéré comme une aire d'intégration de l'information, où une computation importante a lieu afin d'achever les processus cognitifs de l'hippocampe (Geiller *et al.*, 2017). C'est dans cette région de l'hippocampe que John O'Keefe identifia pour la première fois les cellules de lieu, posant les bases cellulaires de l'étude de la navigation spatiale dans l'hippocampe (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Il reçoit la majorité de ses afférences du CA3, et les neurones pyramidaux qui le composent projettent leurs axones principalement vers le subiculum et la couche V de l'EC. Le *stratum pyramidale* est constitué de 5 à 8 rangées de neurones pyramidaux qui projettent leurs dendrites apicales dans les couches suprapyramidale, le *stratum radiatum*, où se forment les connexions avec les collatérales de Schaffer, et le *stratum lacunosum-moleculare*, où se forment les connexions avec les axones de l'EC. Les neurones pyramidaux du CA1 projettent leurs dendrites basales ainsi que leurs axones dans la couche profonde, le *stratum oriens* afin d'aller connecter le subiculum et l'EC (Fig. 10).

Le CA2 est une petite zone de l'hippocampe qui a longtemps été ignorée par les études sur l'hippocampe, et souvent exclue des représentations du circuit hippocampique. Pourtant de récentes études ont montré que le CA2 reçoit directement des afférences des collatérales de Schaffer, et connecte à son tour le CA1 dans les *stratums oriens* et *radiatum*, apportant une voie parallèle aux connexions CA3-CA1. Plusieurs études supportent l'idée que le CA2 joue un rôle dans certaines formes de mémoire telles que la reconnaissance sociale (Hitti & Siegelbaum, 2014), la reconnaissance d'objet et la mémoire d'ordre temporel. De plus, les nombreuses afférences provenant du noyau supramammillaire de l'hypothalamus pourraient influencer les formes de mémoires liées au stress (revue dans Caruana *et al.*, 2012).

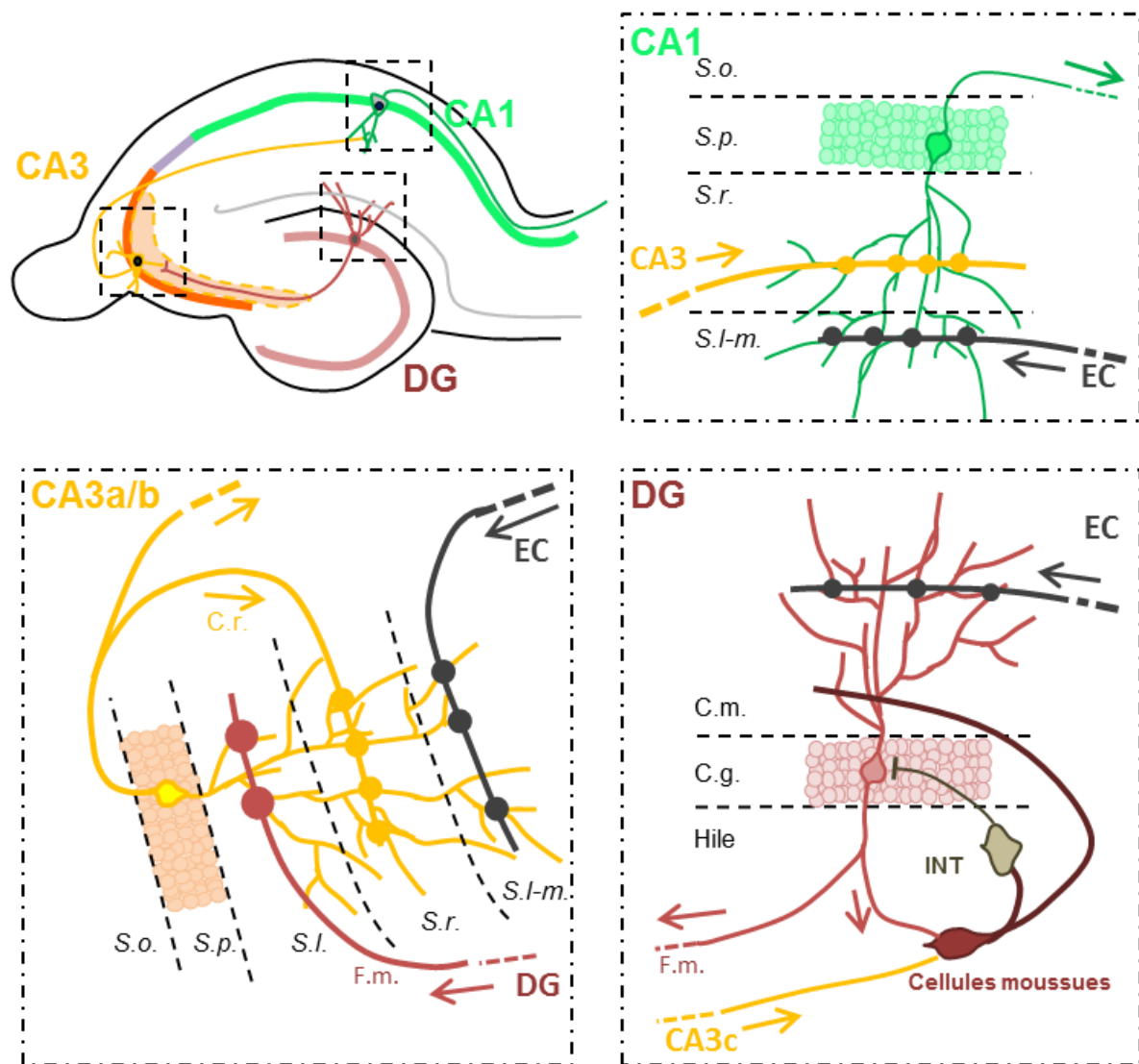


Figure 10 : Réseau des sous-régions de l'hippocampe.

Représentation schématique des sous-structures du CA1, CA3 et DG. Le CA1 reçoit ses principales afférences du CA3 via les collatérales de Schaeffer (jaune) dans le *stratum radiatum*, et de l'EC (gris) dans le *stratum lacunosum-moleculare*. Les neurones projettent leurs axones dans le *stratum oriens* pour aller connecter le subiculum et l'EC. Le CA3 reçoit ses principales afférences du DG via les fibres moussues (F.m. ; rouge) dans le *stratum lucidum*, des collatérales récurrentes du CA3 (C.r. ; jaune) dans le *stratum radiatum*, et de l'EC via la voie perforante (gris) dans le *stratum lacunosum-moleculare*. Le DG reçoit ses principales afférences de l'EC (gris) via la voie perforante dans la couche moléculaire. Les cellules granulaires, via les fibres moussues, connectent les cellules pyramidales du CA3, mais aussi les cellules moussues dans le hile. Les cellules moussues du hile jouent un rôle de rétrocontrôle positif direct sur les cellules granulaires et négatif indirect via les interneurons. De plus, les cellules du CA3c connectent les cellules moussues. S.o. *Stratum oriens* ; S.p. *Stratum pyramidale* ; S.r. *Stratum radiatum* ; S.l-m. *Stratum lacunosum-moleculare* ; S.l. *Stratum lucidum* ; C.m. Couche moléculaire ; C.g. Couche granulaire ; INT. Interneurone.

Le CA3 est une sous-région particulière car elle possède un réseau auto-associatif, formé de fibres collatérales récurrentes, permettant un rétrocontrôle (Treves & Rolls, 1994 ; voir 3.3.1. Réseau autoassociatif du CA3 et pattern completion). Le CA3 reçoit également des

afférences du MEC et du LEC *via* la voie perforante, et du DG *via* les fibres moussues. Les neurones pyramidaux du CA3 projettent donc leurs axones vers les dendrites du CA3 (réseau auto-associatif), mais aussi vers le *stratum radiatum* du CA1 (collatérales de Schaffer) et directement hors de l'hippocampe, vers le noyau septal médian et latéral ainsi que vers la bande diagonale de Broca qui, à son tour, envoie des projections cholinergiques et GABAergiques vers l'hippocampe. Le CA3 peut à son tour être divisé en 3 zones, CA3a, CA3b et CA3c. Il a été proposé que les neurones pyramidaux du CA3c exercent un rétrocontrôle indirect sur le DG, en connectant les cellules moussues du hile du DG (Fig. 10). Ces cellules moussues projettent leurs axones vers les dendrites du DG ou vers les interneurons présents dans le hile du DG, qui vont à leur tour connecter les neurones granulaire du DG. Les neurones du CA3c ont aussi des projections directes vers le CA1 mais, contrairement aux zones CA3a et CA3b, n'ont pas de fibres collatérales récurrentes (revue dans Kesner, 2013).

2.1.3. Le gyrus denté

Le DG est la structure de la formation hippocampique considérée comme la première étape du traitement de l'information par l'hippocampe. Le DG, comme la plupart des structures hippocampiques, a une forme particulière de banane qui s'étend dans les 3 axes principaux du cerveau (AP, ML, DV). Le DG a une structure assez similaire en fonction du plan dans lequel on l'observe et il n'a donc pas de sous-régions comme le CA3, cependant les fonctions du DG varient en fonction des axes AP et DV (Fanselow & Dong, 2010). Le DG est composé de trois couches. La couche superficielle supragranulaire, nommée couche moléculaire, qui contient peu de cellules, dont des interneurons (Li *et al.*, 2013) et majoritairement les dendrites des cellules granulaires du DG et les fibres de la voie perforante provenant de l'EC (Fig. 10). En dessous se situe la couche granulaire, principale couche cellulaire du DG qui est densément peuplée de neurones, les cellules granulaires, organisées en rangées de quatre à huit neurones. La couche granulaire est principalement constituée de cellules granulaires et, dans la zone sous-granulaire, de progéniteurs neuronaux en prolifération. Dans la dernière couche, nommée couche polymorphique ou hile, on observe la présence de plusieurs types cellulaires, dont les plus représentés sont ceux des cellules moussues et des interneurons, beaucoup plus dispersés que dans la couche granulaire. C'est dans le hile que les axones du DG, les fibres moussues, projettent

pour aller connecter les cellules pyramidales du CA3 dans le *stratum lucidum* (Amaral *et al.*, 2007).

2.1.4. Réseau hippocampique, la boucle trisynaptique

Les sous-structures de l'hippocampe sont connectées entre elles. Le réseau était initialement admis comme étant unidirectionnel, où l'EC transmet le signal au DG *via* la voie perforante, et le DG projette ses axones, les fibres moussues, vers les cellules pyramidales du CA3 (Fig. 9-10). Le CA3 va alors connecter le CA1 *via* les collatérales de Schaffer, et les neurones pyramidaux du CA1 vont retransmettre l'information vers l'EC, formant la boucle trisynaptique (Andersen *et al.*, 1971). L'auteur suggérait qu'au vu de l'organisation lamellaire des fibres moussues du DG, des portions d'hippocampe pouvaient fonctionner de manière indépendante bien que des connexions transverses excitatrices ou inhibitrices puissent moduler les lamelles voisines entre elles. Cette théorie lamellaire a vite été contestée par les observations des autres projections de l'hippocampe, telles que celles des neurones pyramidaux du CA3, des cellules moussues, ou encore des neurones de l'EC, qui projettent leurs axones de façon translamellaire (Amaral & Witter, 1989). Bien que ces observations semblent mener à la conclusion que cette théorie d'organisation anatomique lamellaire est obsolète, Sloviter & Lømo suggèrent que ce n'est pas la présence des axones transversaux qui importe mais leur fonction. Au vu des avancées dans la recherche sur l'hippocampe, ils reconsidèrent la théorie lamellaire comme étant plutôt physiologique qu'anatomique (Sloviter & Lømo, 2012).

Les nombreuses études sur l'hippocampe ont également montré que la boucle trisynaptique n'était pas l'unique voie de l'information (Fig. 9B-10). Comme décrit précédemment, les neurones pyramidaux du CA3 projettent de nombreux axones sur les autres neurones du CA3 afin de former un réseau auto-associatif permettant un rétrocontrôle. Le CA2 n'est pas non plus pris en compte dans ce réseau, bien qu'il reçoive directement des afférences du CA3 et qu'il projette ses axones sur le CA1. Les neurones de l'EC ne projettent pas leurs axones exclusivement vers les cellules granulaires du DG mais connectent directement le CA3, le CA2 et le CA1. Le CA1 projette par ailleurs vers le subiculum qui projette ensuite vers l'EC. De plus, au sein de chaque structure hippocampique, de nombreux autres types cellulaires, notamment les interneurones, prennent part à la transmission de l'information de façon lamellaire et translamellaire.

Enfin, l'hippocampe est une structure bilatérale où les deux côtés sont interconnectés par la commissure hippocampale et qui se prolongent dans l'axe rostro-caudal, et dorso-ventral. De nombreuses études, chez l'Homme et le primate non-humain, suggèrent que l'hippocampe dorsal et l'hippocampe ventral reçoivent différentes afférences, et soutiennent des processus cognitifs différents. Par exemple, l'hippocampe dorsal est impliqué dans les processus d'apprentissage et de mémoire associés à la navigation et à l'exploration alors que l'hippocampe ventral joue un rôle dans les comportements motivationnels et émotionnels (Fanselow & Dong, 2010).

2.2. La neurogenèse adulte

La neurogenèse est définie comme le processus de génération de nouveaux neurones à partir de cellules souches neurales progénitrices. La neurogenèse embryonnaire est essentielle à la formation du système nerveux. Selon l'hypothèse de Ramon y Cajal (Ramon y Cajal, 1928), il a longtemps été admis chez l'Homme, qu'à l'âge adulte, le cerveau ne crée plus de nouveaux neurones, et que la neurogenèse est un phénomène exclusivement développemental. Dans les années 1960, l'utilisation de la thymidine tritiée ([H3]-thymidine), qui s'intègre dans l'ADN en réplication, a permis d'identifier des cellules en phase mitotique dans le cerveau de jeunes souris adultes (Messier *et al.*, 1958). Les études d'Altman qui suivirent suggérèrent l'existence de la formation de nouveaux neurones chez le cochon d'Inde (Altman & Das, 1967). C'est à partir des années 1990, avec l'arrivée de la microscopie électronique et de l'utilisation de la bromodéoxyuridine (BrdU), que de nombreuses études s'accordèrent sur l'existence de la neurogenèse adulte dans toutes les espèces mammifères étudiées jusqu'à maintenant, dans au moins deux aires cérébrales, la zone sous ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux, et la zone sous-granulaire du DG (Lieberwirth *et al.*, 2016). Depuis, des preuves de neurogenèse adulte dans des structures telles que le néocortex, l'amygdale ou le cortex piriforme (Fig.11), semblent indiquer que la SVZ et le DG ne sont pas les seuls foyers neurogéniques à l'âge adulte, mais ces données restent controversées (revue dans Gould, 2007).

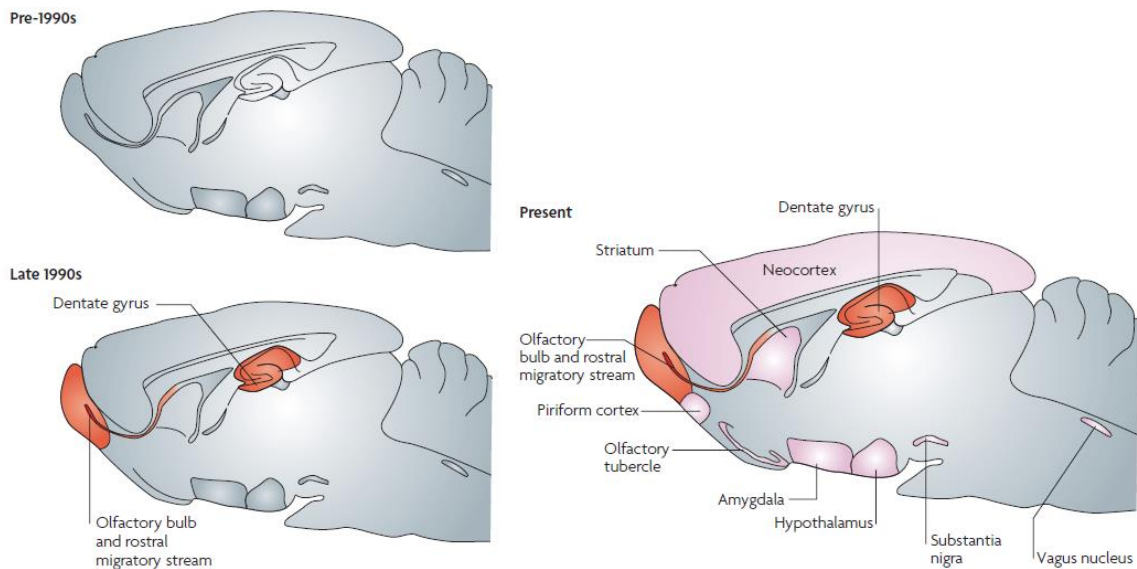


Figure 11 : Evolution de la vision de la neurogenèse dans le cerveau des mammifères depuis les années 1990. Avant les années 1990, toutes les régions cérébrales étaient considérées comme ‘non-neurogéniques’ (gris). Vers la fin des années 1990, le gyrus denté, le bulbe olfactif et la zone sous-ventriculaire sont décrites comme étant les seules zones neurogéniques (rouges). De nos jours, des études controversées suggèrent que d’autres aires cérébrales sont aussi neurogénique (rose). D’après Gould, 2007.

2.2.1 Prolifération cellulaire

Dans l’hippocampe, la neurogenèse adulte se déroule en plusieurs phases. Dans un premier temps, une phase de prolifération cellulaire se déroule dans la zone sous-granulaire du DG (Fig. 12). Les cellules souches neurales de type I, exprimant la nestine et la GFAP, se divisent afin de générer des cellules progénitrices neurales de type IIa ou type IIb qui expriment ou non, respectivement, la doublecortin (DCX), et qui perdent tous deux l’expression de la GFAP mais continuent d’exprimer la nestine. C’est après cette phase initiale que les cellules entrent dans la voie de différenciation neuronale. Les progéniteurs de type II vont se différencier en progéniteurs de type III, ou neuroblastes, qui expriment la molécule d’adhésion PSA-NCAM (Duan *et al.*, 2008).

2.2.2. Différenciation et maturation neuronale

Environ 3 jours après la division initiale, les cellules vont alors entrer dans une phase postmitotique de maturation et de migration tangentielle au sein de la couche granulaire, où elles expriment Prox-1, un marqueur spécifique des cellules granulaires du DG (Fig. 12). Au bout d’une semaine, les neurones immatures commencent à émettre des prolongements dendritiques dans la couche moléculaire, et axoniques vers le *stratum lucidum* du CA3. Ils continuent leur phase de migration et commencent à exprimer le

marqueur neuronal NeuN. Pendant environ quatre jours, les neurones immatures entrent dans une phase de sélection compétitive, qui fait dramatiquement chuter le nombre de nouveaux neurones, et qui devient stable après des mois, voire des années. La survie des jeunes neurones pendant cette phase de sélection dépend de l'expression de la sous-unité NR1 des NMDAR (Tashiro *et al.*, 2006). Pendant cette phase précoce de maturation, les neurones immatures vont exprimer transitoirement une protéine de liaison à l'ion calcium Ca^{2+} , la calrétinine (CalR), qui sera progressivement remplacée par l'expression d'une autre protéine de liaison à l'ion Ca^{2+} , la calbindine (CalB), dans les neurones matures (Brandt *et al.*, 2003). Parallèlement, les jeunes neurones expriment fortement un transporteur d'ion NKCC1, permettant d'importer les ions chlorures Cl^- . Les hauts taux de chlore intracellulaire font du GABA (acide- γ -aminobutyrique), normalement principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau adulte, un activateur tonique des neurones immatures. Au cours de la maturation, l'expression de NKCC1 diminue au profit de l'expression de KCC2, qui exporte Cl^- . Le GABA passe d'un rôle dépolarisant à un rôle hyperpolarisant. Il a été démontré que le GABA, pendant cette période de maturation, était essentiel à l'intégration des nouveaux neurones dans le réseau (Ge *et al.*, 2007a). Pendant cette phase, après environ deux semaines, les épines dendritiques des jeunes neurones sont encore peu développées, mais les dendrites commencent à recevoir des contacts GABAergiques provenant des interneurones voisins. A partir de trois à quatre semaines, les neurones reçoivent leurs premières afférences synaptiques glutamatergiques et des afférences GABAergiques périsonomatiques (Esposito *et al.*, 2005 ; Ge *et al.*, 2007a).

2.2.3. Nouvelles cellules granulaires matures

Les neurones issus de la neurogenèse adulte sont considérés comme fonctionnellement matures à partir d'au moins quatre semaines. Ils expriment la calbindine et NeuN qui sont régulièrement utilisés comme des marqueurs de maturité neuronale. Pendant la période de maturation (environ 10 jours après la division initiale), les cellules granulaires ont projeté leurs axones, les fibres myélinisées, vers le *stratum lucidum* pour connecter les cellules pyramidales du CA3. L'arborisation dendritique s'est également graduellement ramifiée pendant cette période et il faut attendre plusieurs semaines, voire plusieurs mois, pour atteindre une morphologie complètement mature (Zhao *et al.*, 2006). De plus, les neurones issus de la neurogenèse entrent dans une période critique, entre un mois et un

mois et demi, pendant laquelle l'amplitude de la potentialisation à long terme (LTP) est augmentée, alors que son seuil de déclenchement est abaissé. Cette étape dépend de l'expression de la sous-unité NR2B du NMDA-R et pourrait jouer un rôle dans le paramétrage des réponses des cellules granulaires aux stimulations environnementales. Les cellules granulaires issues de la neurogenèse adulte acquièrent alors des caractéristiques morpho-fonctionnelles comparables à celles des neurones matures issus de l'embryogenèse (Ge *et al.*, 2007b ; Zhou *et al.*, 2008).

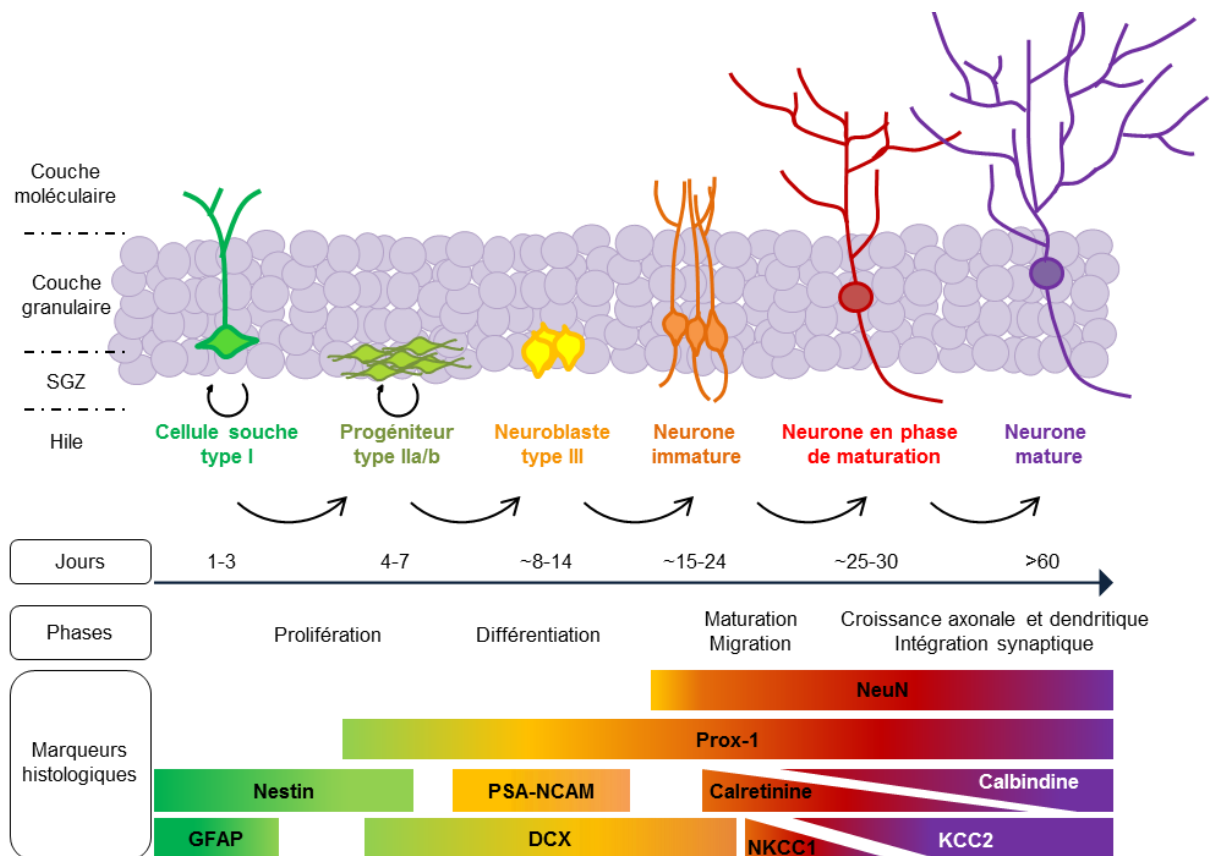


Figure 12: Les différentes phases de la neurogenèse adulte chez la souris.

Schéma des différentes étapes de la neurogenèse adulte dans le gyrus denté. Les nouveaux neurones expriment différents marqueurs en fonction de leur phase de maturation. Adapté de Aguilar-Arredondo, 2015 et de Brandt *et al.*, 2003.

2.3. Fonctions de l'hippocampe

2.3.1. Une mémoire, des mémoires...

En 1954, le célèbre patient Henri Molaison (H.M.) est opéré pour soigner de sévères crises d'épilepsies, autrement intraitables. Il subit une ablation bilatérale d'une portion du lobe temporal médian, qui comprend les deux hippocampes. La chirurgie soigna les épilepsies

du patient H.M., cependant elle eut des effets irréversibles sur ses capacités mnésiques, qui furent étudiées et détaillées par William Scoville et Brenda Milner en 1957. Bien que quelques cas précédents aient suggéré l'importance de l'hippocampe dans la mémorisation, l'étude des symptômes du patient H.M. eut un impact majeur dans le domaine des neurosciences appliqué à la mémoire.

Le patient H.M. souffrait d'une amnésie rétrograde partielle, il avait perdu tout souvenir des dernières années de sa vie précédant l'opération. En revanche, H.M. gardait encore des souvenirs intacts plus anciens, comme son enfance et sa jeunesse. Milner en conclut que le lobe temporal médian n'était pas le support permanent des souvenirs mais qu'il jouait cependant un rôle essentiel pour leur stockage en fonction du moment où ils ont été vécus. H.M. était également incapable de former de nouveaux souvenirs à partir du jour de l'opération, et ceci de façon irréversible, on parle alors d'amnésie antérograde totale. Pourtant H.M. était capable de retenir des informations pendant quelques minutes en faisant preuve d'une grande concentration, mais lorsque son attention était détournée, il était incapable de dire ce qu'il faisait précédemment. Ces observations indiquaient qu'il existait une distinction entre la mémoire à long terme et la mémoire immédiate, aussi appelée mémoire de travail. Milner pensa alors que H.M. était incapable d'apprendre de nouvelles informations sur le long terme. En 1962, Milner soumit H.M. au test du dessin dans le miroir, dans lequel le patient doit coordonner ses yeux et sa main pour dessiner une étoile mais seulement en regardant dans un miroir (Squire, 2009). H.M. améliora ses performances au fil des jours, pourtant il n'avait aucun souvenir d'avoir déjà réalisé cet exercice auparavant. H.M. était capable de former une mémoire inconsciente, liée à la capacité d'apprendre de nouveaux exercices sans pour autant s'en souvenir. A partir de ces observations, Milner proposa que la mémoire à long terme pouvait se décliner sous deux formes, une forme explicite (ou déclarative) dépendante du lobe temporal médian, et une forme implicite (ou non-déclarative) dépendante d'autres régions cérébrales (Fig. 13).

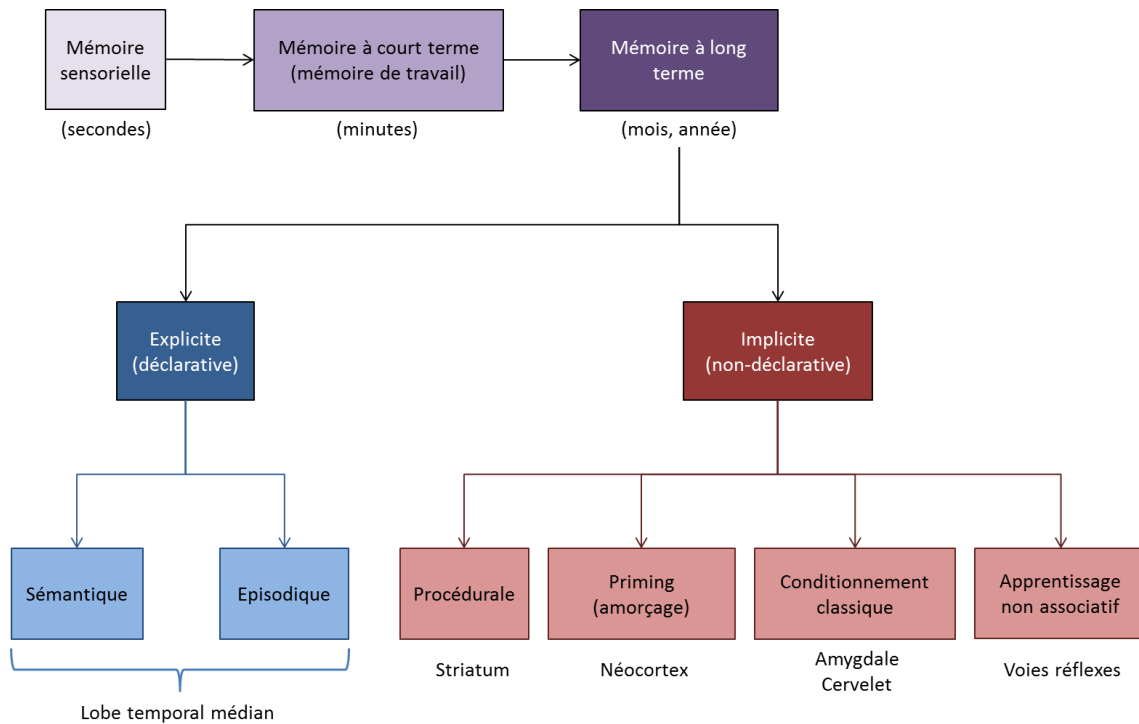


Figure 13 : Modèle de classification des différents types de mémoire humaine.

La mémoire peut être divisée en trois différentes catégories : la mémoire sensorielle encode et stocke (pas plus de quelques secondes) les informations sensorielles brutes afin de les mettre à disposition de la mémoire à court terme si les informations sont utiles. La mémoire à court terme permet de mémoriser des informations pendant plusieurs minutes, généralement parce qu'elles sont utilisées pour une tâche cognitive. Les informations peuvent être alors encodées et enregistrées en mémoire à long terme (qui n'a théoriquement pas de limite temporelle de stockage). La mémoire à long terme est sous-divisée en plusieurs formes selon leurs fonctions et les structures cérébrales principales qui les sous-tendent. L'ablation du lobe temporal médian chez le patient H.M. affecta sa mémoire à long terme explicite (bleu) sans affecter sa mémoire implicite (rouge) notamment dans la tâche du dessin en miroir, dépendante de la mémoire procédurale. Adapté de Cowan, 2008 ; Squire, 2004 ; du modèle d'Atkinson et Shiffrin (1968).

Un des paradigmes très utilisé en neurosciences chez le rongeur, qui rend compte de la complexité des deux formes de mémoire, est le conditionnement de peur classique ou pavlovien. Dans le conditionnement de peur classique, on présente aux rats un stimulus neutre (SN), comme un son, associé à un stimulus aversif inconditionnel (SI), comme un léger choc électrique, déclenchant alors une réponse inconditionnelle (RI) tel que le *freezing* (réflexe inné des rongeurs pendant lequel l'animal reste complètement immobile lorsqu'il a peur). Dans cette configuration, les rats vont associer le son (SN) au choc (SI) et lorsqu'ils sont réexposés au son (sans choc), ils vont avoir une réponse de peur spécifique au son. Cette réponse de peur n'étant pas déclenchée par le son avant l'association, on parle de stimulus conditionnel (SC), qui déclenche une réponse conditionnelle (Phillips & LeDoux, 1992). On peut retrouver cette réponse conditionnelle lorsqu'on replace un rat

dans un contexte dans lequel il a déjà subi un choc électrique sans association avec un son. Dans cette configuration, le rat associe le contexte au choc et on parle alors de conditionnement de peur au contexte. De nombreuses études ont montré l'implication de l'hippocampe et de l'amygdale dans le conditionnement classique de peur associée à un son ou au contexte (Phillips & LeDoux, 1992 ; Anagnostaras *et al.*, 1999 ; Kim & Fanselow, 1992 ; Maren *et al.*, 1997 ; Anagnostaras *et al.*, 2001 ; Davis, 1997). Une lésion de l'amygdale entraîne une perturbation de la peur conditionnée au son ou au contexte alors qu'une lésion de l'hippocampe entraîne une perturbation de la peur conditionnée au contexte seulement, suggérant que l'amygdale est essentielle à l'association d'un SI aversif aussi bien à des SC simples et individuels (comme le son) qu'à des SC complexes et composés (comme le contexte). En revanche, l'hippocampe ne semble être nécessaire qu'au conditionnement au contexte, suggérant un rôle d'intégrateur d'informations multimodales permettant d'associer l'expérience contextuelle vécue au stimulus aversif (Phillips & LeDoux, 1992 ; Anagnostaras *et al.*, 2001 ; Kim & Jung 2006).

2.3.2. La consolidation de la mémoire

Les différentes études réalisées chez des patients tels que H.M. ont donc permis d'identifier plusieurs rôles de l'hippocampe dans la mémoire. D'après la nature partielle des amnésies rétrogrades des patients, il a été suggéré que l'hippocampe jouait un rôle dans le stockage de l'information limité dans le temps (Scoville & Milner, 1957). Différentes études sur des patients amnésiques et chez l'animal ont mené à la conclusion qu'il existait une mémoire labile et temporaire, dépendante de l'hippocampe, qui se transformait graduellement en mémoire stabilisée et permanente (Anagnostaras *et al.*, 1999 ; Kim & Fanselow, 1992 ; Maren *et al.*, 1997 ; Squire & Alvarez, 1995 ; Nader *et al.*, 2000 ; Frankland & Bontempi, 2005). Ce processus, nommé consolidation de la mémoire, n'est pas immédiat. Il requiert une réorganisation synaptique rapide qui permet l'initiation de la stabilisation de la mémoire et une réorganisation structurelle (Fig. 14). Les informations sensorielles sont initialement encodées et distribuées dans différentes aires corticales. L'hippocampe intègre rapidement les informations provenant de ces aires corticales et les met en relation afin de former une mémoire cohérente. Les réactivations successives du réseau hippocampo-cortical permettent une consolidation de la mémoire par renforcement des connexions entre les différentes aires corticales. Le renforcement de

ces connexions, et la création de nouvelles entre les aires corticales, est un processus plus long mais qui permet l'émergence de nouveaux souvenirs, qui deviennent indépendants de l'hippocampe et qui peuvent être stockés pour une très longue durée (Frankland & Bontempi, 2005).

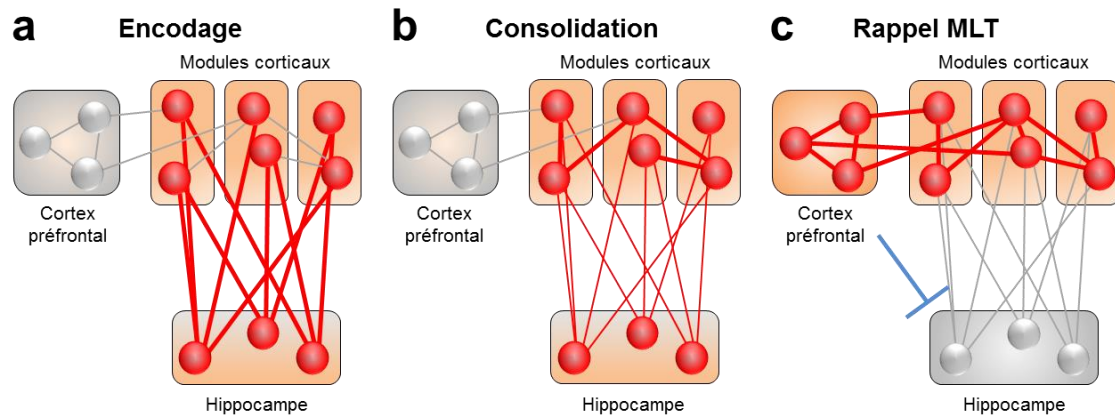


Figure 14 : Modèle standard de la consolidation et du rappel de la mémoire.

(a) Les différentes informations sensorielles sont initialement encodées dans différentes aires corticales. L'hippocampe intègre rapidement les informations des différentes aires corticales afin de former un souvenir cohérent, qu'il peut temporairement stocker pour pouvoir le réutiliser. **(b)** Les réactivations successives des connexions hippocampo-corticales renforcent les connexions déjà existantes entre les différents modules corticaux et en créent de nouvelles, entraînant la consolidation de la mémoire. **(c)** La consolidation peut mener le souvenir à reposer principalement sur la connexion des aires corticales, formant une mémoire à long terme (MLT) indépendante de l'hippocampe, expliquant pourquoi le patient H.M. pouvait se souvenir des épisodes de sa jeunesse. Lorsque la mémoire devient indépendante de l'hippocampe, le cortex préfrontal intègre les informations des aires corticales. L'hippocampe est toujours actif pendant l'encodage d'information d'un environnement extérieur, cependant lorsque les informations correspondent à la mémoire corticale, le cortex préfrontal inhibe l'hippocampe directement ou indirectement, pour éviter l'encodage d'informations redondantes. Adapté de Frankland & Bontempi, 2005.

2.3.3. Le GPS de notre cerveau

La navigation spatiale est notre capacité à utiliser les informations du monde extérieur pour adapter notre réponse motrice, dans le but d'atteindre notre objectif. En fonction du contexte et des informations sensorielles disponibles, plusieurs stratégies de navigation peuvent être utilisées (Fig. 15A). Lorsque notre objectif n'est pas directement visible ou indicé, ou que le chemin pour l'atteindre n'est pas indiqué, nous devons adopter d'autres stratégies (Arleo & Rondi-Reig, 2007). La stratégie de navigation basée sur une carte cognitive (*Map-based* ou *place navigation*) se distingue des autres stratégies car elle est la seule à utiliser un système référentiel allocentrique (Fig.15B). Elle repose sur la création d'une carte spatiale cognitive qui permet de s'orienter. Cette stratégie nécessite un

traitement complexe de l'information spatiale, mais qui apporte une plus grande flexibilité, permettant l'élaboration de trajets alternatifs, de raccourcis en cas d'obstacle sur la route prédéfinie, ou d'atteindre plusieurs objectifs avec l'itinéraire le plus court possible (O'Keefe & Burgess, 1996 ; Arleo & Rondi-Reig, 2007). Lorsque l'environnement est peu indicé, nous pouvons utiliser nos propres déplacements pour estimer les distances parcourues et les directions entre chaque repère afin de déterminer les chemins les plus courts à adopter par rapport à soi. On parle alors d'une stratégie égocentrique, qui permet la navigation en utilisant des composants tels que la vitesse de déplacement, le temps, ou la distance nécessaire pour atteindre un repère ou encore la position initiale de référence (McNaughton *et al.*, 2006 ; Arleo & Rondi-Reig, 2007 ; Buzsaki & Moser, 2013).

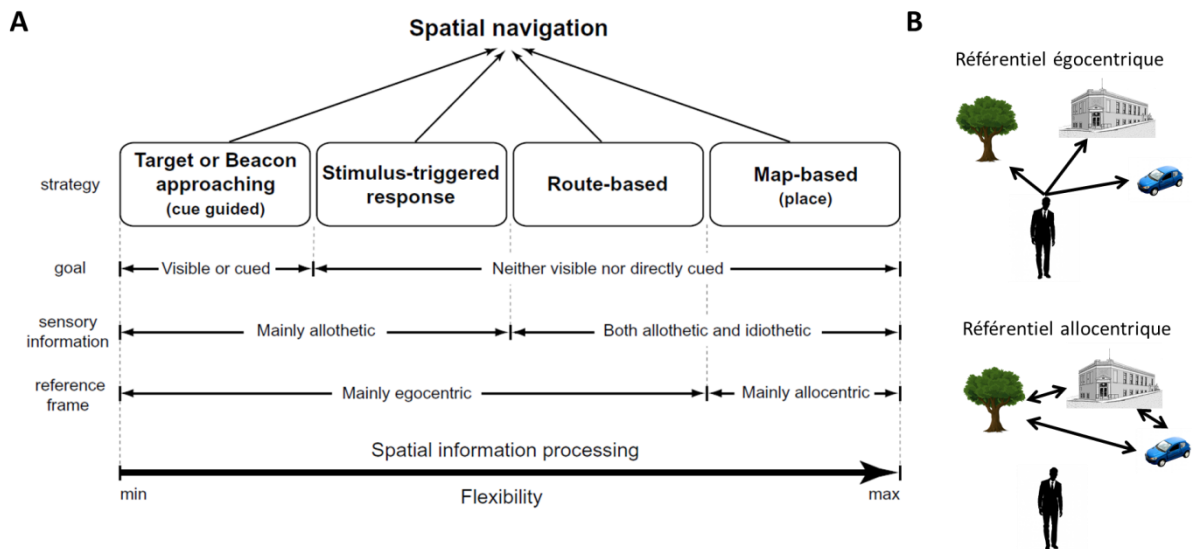


Figure 15 : Taxonomie des stratégies de navigation spatiale et cadres référentiels.

(A) La navigation spatiale est composée de plusieurs stratégies permettant de s'adapter aux indices disponibles pour atteindre son objectif. Lorsque l'objectif est visible ou directement indicé, la stratégie d'approche ciblée (Target or beacon approaching) est privilégiée, ne nécessitant aucune formation de carte spatiale. Lorsque l'objectif n'est pas directement visible, plusieurs stratégies peuvent être utilisées. La réponse déclenchée par stimulus (Stimulus-triggered response) est basée sur le chemin parcouru (route-based), et utilise principalement le référentiel égocentrique pour estimer les distances parcourues et les directions à prendre. La stratégie de carte spatiale cognitive est la seule à associer les indices de l'environnement pour déterminer l'orientation et la position de l'objectif et de soi-même. D'après Arleo & Rondi-Reig, 2007. **(B)** Le référentiel égocentrique permet de naviguer en estimant la position de chaque indice de l'environnement par rapport à soi, alors que le référentiel allocentrique crée des relations entre les éléments de l'environnement et permet de se repérer peu importe la position de départ.

Comme décrit précédemment, certaines cellules de l'hippocampe de souris, nommées cellules de lieu, ont une activité électrique intense lorsque l'animal se trouve dans un endroit particulier de l'arène dans laquelle il est testé (O'Keefe & Dostrovsky, 1971), suggérant que l'hippocampe est le support d'une carte cognitive permettant une navigation allocentrique (O'Keefe & Burgess, 1996). En 1982, Richard Morris démontra que des rats avec des lésions de l'hippocampe ne parvenaient pas à acquérir de mémoire spatiale dans la tâche de la piscine de Morris lorsque les points de départ changeaient à chaque essais (Morris *et al.*, 1982). En revanche lorsque que le point de départ était constant, les rats avec des lésions hippocampiques étaient capables de trouver la plateforme (Eichenbaum *et al.*, 1990). Ces résultats démontrèrent que l'hippocampe est nécessaire à la navigation spatiale seulement dans le cadre de la stratégie basée sur une carte cognitive. En 1988, une étude sur le patient H.M. permit de montrer l'importance de l'hippocampe dans la représentation spatiale chez l'Homme (Smith, 1988). Depuis la découverte de l'implication de l'hippocampe dans la navigation spatiale, de nombreuses études ont permis de mieux comprendre les relations entre les différentes structures cérébrales impliquées dans les stratégies de navigations, (revue dans Eichenbaum, 2017 ; Buzsaki & Moser, 2013) et de nombreuses cellules ont été identifiées comme encodant les paramètres spatiaux de l'environnement (revue dans Hartley *et al.*, 2014).

3. Pattern Separation & Pattern Completion

3.1. De la computation au comportement

L'hippocampe est une structure cérébrale essentielle à la mémoire et à l'apprentissage. Il permet de faciliter l'encodage, le stockage et le rappel de l'information. En 1971, David Marr propose une théorie mathématique pour expliquer comment l'hippocampe (qu'il nomme archicortex) permet l'encodage rapide de l'information, et tente d'expliquer avec son modèle comment l'activation d'un petit nombre de cellules permet la restitution d'une information dans son intégralité (Marr, 1971). D'après son modèle mathématique, l'hippocampe est capable d'encoder des informations sensorielles ou perceptuelles similaires, et de les séparer afin de les stocker de façon distincte. De plus, l'hippocampe serait capable grâce à un réseau autoassociatif (voir 3.3.1. Réseau autoassociatif du CA3 et pattern completion) de rapidement stocker ces informations. Ce réseau autoassociatif permettrait aussi le rappel rapide de l'intégralité d'une information précédemment encodée en ne stimulant que très peu de neurones. La compréhension anatomique de l'hippocampe a permis de faire progresser le modèle de Marr (Willshaw & Buckingham, 1990), qui posa les bases de la modélisation computationnelle de ces processus d'encodage et de rappel soutenus par l'hippocampe : 'le pattern separation' et le 'pattern completion' (McNaughton & Morris, 1987 ; O'Reilly & McClelland, 1994 ; Rolls & Treves, 1994 ; Hunsaker & Kesner, 2013). De nombreuses études électrophysiologiques, comportementales et neuropsychologiques ont ensuite évalué les conséquences de ces processus et ont confirmé l'implication de l'hippocampe, notamment du DG pour le pattern separation, et du réseau autoassociatif du CA3 pour le pattern completion (Leutgeb *et al.*, 2007 ; McHugh *et al.*, 2007 ; Clelland *et al.*, 2009 ; Bakker *et al.*, 2008 ; Kesner *et al.*, 2004 ; Brock Kirwan *et al.*, 2012 ; Rolls & Kesner, 2006 ; Leutgeb & Leutgeb, 2007 ; Hunsaker & Kesner, 2013). Ces études ont alors étendu la définition du terme de pattern separation et completion vers des processus cellulaires et comportementaux. Afin de mieux comprendre à quels processus mnésiques le pattern separation et le pattern completion contribuent, Johnston et collaborateurs (2016) délivrent un exemple du quotidien. D'un côté nous sommes capables de différencier des événements très similaires, comme le déjeuner d'aujourd'hui et de la veille. D'un autre côté, un simple stimulus familier, telle que la madeleine de Proust, est capable de nous projeter

mentalement dans le contexte original, reconstruisant une mémoire complète à partir d'une information partielle (Johnston *et al.*, 2016). Ces processus nous permettent de mettre en relation nos expériences présentes avec des mémoires passées sans les confondre. Il est alors important de bien distinguer les processus de pattern separation et completion, comme des processus purement computationnels, des processus comportementaux pouvant en découler. Bien que les termes de pattern separation et pattern completion soient régulièrement utilisés pour les processus comportementaux, certains auteurs préconisent l'utilisation des dénominations de discrimination comportementale ou de résolution mnésique pour le pattern separation (Santoro, 2013 ; Aimone *et al.*, 2011) et de généralisation ou attracteur mnésique, en fonction de la tâche comportementale pour le pattern completion (Hunsaker & Kesner, 2013 ; Kumaran & McClelland, 2012). Le pattern separation et le pattern completion, au sens computationnel du terme, ne sont pas spécifiques à l'hippocampe et peuvent sous-tendre plusieurs formes de réponses comportementales. Par exemple, le système olfactif est capable de soutenir une discrimination efficace d'odeurs similaires (Sahay *et al.*, 2011b), et le cortex piriforme possède un système de fibres collatérales récurrentes pouvant soutenir le pattern completion (Barkai & Hasselmo, 1997 ; Barnes *et al.*, 2008). Cependant l'hippocampe est nécessaire pour assurer la discrimination olfactive lorsqu'une composante temporelle ou contextuelle (mémoire épisodique) est ajoutée sans pour autant affecter la discrimination sensorielle (Kesner *et al.*, 2011 ; Weeden *et al.*, 2014). Ces études permettent alors de distinguer deux types de pattern separation et completion, perceptuel/sensoriel et mnémonique/mnésique (Hunsaker & Kesner, 2013). Nous allons maintenant voir comment le pattern separation et le pattern completion ont été décrits du niveau computationnel au niveau comportemental en nous focalisant sur l'hippocampe.

3.2. Le pattern separation

3.2.1. Réseau du gyrus denté et pattern separation

Le pattern separation, ou orthogonalisation, peut être défini comme le processus permettant d'encoder des informations similaires et de transmettre ces informations sous des formes distinctes en atténuant les chevauchements des caractéristiques similaires et/ou en accentuant les différences. Un exemple théorique donné par Rolls (1996) est de

considérer trois informations sensorielles A, B et AB (Fig. 16). AB est constitué de 50% de A et de 50% de B. A et B sont associés à une punition alors qu'AB est associé à une récompense. AB possédant des éléments similaires à A et à B, le cerveau doit dissocier la représentation d'AB de celles de A et de B pour éviter un rappel inapproprié en fonction de l'information présentée. Le pattern separation est donc le processus permettant d'encoder de façon distincte A, B et AB pour éviter, par exemple, le rappel d'AB en présence de A. Les modèles computationnels proposent que le pattern separation soit possible grâce à l'activité très éparsée du réseau neural du DG qui reçoit les informations de l'EC, et qui encode des patterns différents pour les transmettre au DG (McNaughton & Morris, 1987 ; O'Reilly & McClelland, 1994). Pour mieux visualiser comment des informations similaires provenant de l'EC peuvent être encodées distinctement par cette activation éparsée du DG, Abrous et Wojtowicz nous proposent d'imaginer un filet d'eau passant à travers une passoire, le filet d'eau représentant l'information provenant de l'EC, la passoire représentant le DG et les trous de la passoire les cellules granulaires. Bien que le filet d'eau qui passe par la passoire varie très peu, la dispersion des pores de la passoire permet de laisser passer l'eau d'une façon unique, formant un pattern sortant à chaque fois différent, bien que le pattern entrant soit très similaire (Abrous & Wojtowicz, 2015). Le DG encode alors des patterns différents, jouant un rôle de séparateur, et transmet l'information vers le réseau autoassociatif du CA3 pour stocker des représentations distinctes d'évènements similaires (Rolls, 2013).

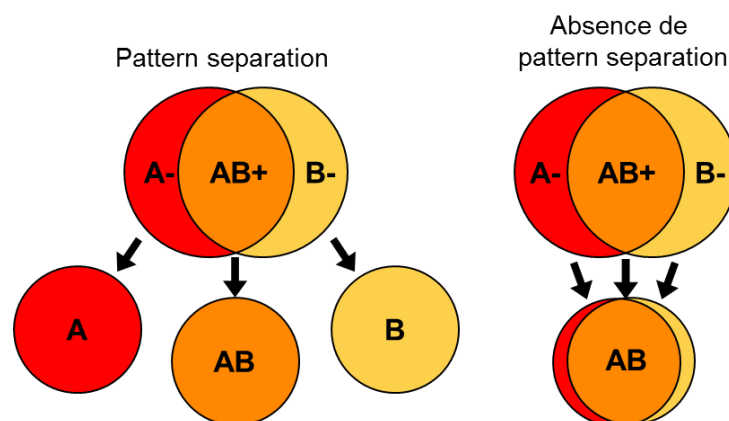


Figure 16 : Le pattern separation.

Le pattern separation permet, dans cet exemple, de discriminer les caractères similaires partagés entre A, B et AB. A et B étant associés à une punition (-) et AB à une récompense (+), il est important de pouvoir les encoder distinctement, afin d'adopter une réponse adaptée (fuite pour A et B, approche pour AB, par exemple). En absence de pattern separation, les caractères similaires entre A, B et AB ne sont pas discriminés, menant à une superposition des informations. Dans ce cas, la présentation d'A- peut amener à une réponse d'approche en l'associant à AB+. Adapté de Rolls, 1996 et de Yassa & Stark, 2011.

Les cellules granulaires du DG

L'anatomie du DG et les propriétés intrinsèques des cellules granulaires permettent au DG d'assurer ce type d'encodage vers le CA3. En effet, le grand nombre de cellules granulaires du DG comparé aux neurones pyramidaux du CA3 (Amaral *et al.*, 2007) offre de grandes possibilités d'encodage des informations provenant de l'EC. L'enregistrement *in vivo* de neurones pyramidaux du CA3 et des cellules granulaires du DG chez le rat, a permis de mettre en évidence que des changements subtils de l'environnement altéraient les décharges de lieu des cellules granulaires, et que l'exposition des rats à un environnement plus différent recrutait de nouvelles populations neuronales du CA3, mais pas du DG (Leutgeb *et al.*, 2007). En utilisant des souris transgéniques permettant l'expression inductible d'un fluorophore lors de l'activation neuronale, une étude a démontré que, contrairement aux neurones du CA1, des populations différentes de cellules granulaires étaient recrutées lors d'une exposition à un nouveau contexte (Deng *et al.*, 2013). De plus, ils démontrèrent que cette sélection d'une nouvelle population de cellules granulaires pouvait être déclenchée par de subtils changements des indices environnementaux, suggérant que l'encodage des différentes informations, même similaires, nécessite un recrutement de nouvelles cellules granulaires (Deng *et al.*, 2013). Ils démontrèrent également que lorsque les souris étaient exposées à un environnement familier, les populations cellulaires du DG qui avaient été recrutées pendant l'encodage ne l'étaient pas pendant le rappel, contrairement à celles du CA1 (Deng *et al.*, 2013). Ces résultats sont en accord avec les prédictions computationnelles qui définissent le pattern separation dans le DG comme un processus d'encodage mais pas de rappel de l'information (Marr, 1971 ; Hunsaker & Kesner, 2013).

Les cellules moussues du DG

Cependant l'activation des cellules granulaires doit rester éparse (les cellules granulaires ne doivent pas toutes décharger en même temps) pour permettre un processus de separation efficace. Grâce à la forte inhibition GABAergique fournie par les interneurones du DG (Marin-Burgin *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2012), les cellules granulaires sont recrutées en petite population par les stimulations provenant de l'EC, permettant l'amplification du pattern separation (O'Reilly & McClelland, 1994 ; Treves & Rolls, 1992 ; de Almeida *et al.*, 2009). De récentes études ont également démontré l'implication des cellules moussues du

hile du DG dans la modulation de l'activité des cellules granulaires et, par conséquent, du pattern separation (Jinde *et al.*, 2012 ; Danielson *et al.*, 2017 ; GoodSmith *et al.*, 2017 ; Senzai ad Buzsaki, 2017, discuté dans Nakazawa, 2017). Les cellules moussues sont des neurones glutamatergiques qui reçoivent leurs principales afférences des cellules granulaires du DG et des cellules pyramidales de la région CA3c (Fig.10), et projettent leurs axones vers les cellules granulaires distales ainsi que vers les interneurons du hile (Hunsaker & Kesner, 2013 ; Nakazawa, 2017). Dans la première étude, les auteurs ont exploré le rôle de ces cellules moussues en utilisant une souris transgénique permettant la dégénérescence rapide et inductible des cellules moussues (Jinde *et al.*, 2012). Ils démontrèrent que la perte des cellules moussues est suffisante pour augmenter l'excitabilité des cellules granulaires et que dans un paradigme de discrimination contextuelle, les souris mutante ont une augmentation de la réponse de peur dans un contexte différent associé à une augmentation générale de l'anxiété, suggérant un trouble de pattern separation, menant à une généralisation contextuelle (Jinde *et al.*, 2012). Bien que les auteurs ne le mentionnent pas, la généralisation de contexte, associée à une hyper-anxiété, est un symptôme que l'on retrouve dans certains modèles de troubles de stress post traumatique. En 2017, trois études parallèles ont enregistré des cellules granulaires et des cellules moussues chez des rats placés dans des environnements et contextes différents. Elles démontrèrent que la plupart des cellules granulaires déchargeaient dans un seul contexte, produisant une représentation différente pour chaque environnement contrairement aux cellules moussues qui sont actives dans la plupart des environnements (GoodSmith *et al.*, 2017). De plus, les cellules moussues ont une capacité de réencodage de la nouvelle information spatiale (« remapping ») beaucoup plus importante que les cellules granulaires (Danielson *et al.*, 2017 ; Senzai ad Buzsaki, 2017). Ces études suggèrent que la capacité des cellules moussues à réencoder les nouvelles informations spatiales contribue au processus de pattern separation. De plus, les connexions excitatrices des cellules moussues vers les cellules granulaires, et inhibitrices *via* les interneurons, pourraient être un régulateur de l'activité des cellules granulaires, participant à l'orthogonalisation des informations (Nakazawa, 2017).

Les fibres moussues et le CA3

L'orthogonalisation de l'information par le DG est transmise par les fibres moussues vers le CA3 (Amaral & Witter, 1989 ; Rolls, 1987). La faible activité des cellules granulaires, ainsi que le faible nombre de fibres moussues connectant un neurone pyramidal du CA3 (environ 46 fibres moussues par neurones), permet un effet de randomisation des représentations de l'information dans les neurones du CA3, et évite les interférences entre les différentes mémoires stockées dans le réseau autoassociatif du CA3 (Rolls, 2013). Ces terminaisons synaptiques (« thorny excrescences»), bien que très peu nombreuses par rapport aux afférences du réseau autoassociatif ou de l'EC, sont bien plus larges et positionnées plus proches du soma, agissant comme des synapses « détonatrices » permettant la transmission efficace de la représentation orthogonale encodée par le DG (McNaughton & Morris, 1987 ; O'Reilly & McClelland, 1994 ; Treves & Rolls, 1992). Ces connexions entre les fibres moussues et le CA3 s'avèrent essentielles dans l'encodage de nouvelles informations, notamment dans l'orthogonalisation de celles-ci, mais ne sont pas nécessaires pour la consolidation ou le rappel de souvenirs précédemment encodés (Lassalle *et al.*, 2010). Le rappel des souvenirs encodés et la consolidation dans le CA3 est possible *via* la voie perforante de l'EC qui connecte directement le CA3, permettant une activation du réseau autoassociatif du CA3 (Kesner & Lee, 2004 ; Rolls, 2013). Ces connexions parallèles favorisent le rappel rapide d'une mémoire complète à partir d'informations partielles ou associées (pattern completion et généralisation, voir 4.3. Pattern completion).

3.2.2. Pattern separation et neurogenèse

Le DG est connu pour être une des rares structures cérébrales capables de produire de nouveaux neurones à l'âge adulte (voir 2.2. Neurogenèse adulte). De nombreuses études ont démontré que la manipulation de la neurogenèse adulte dans l'hippocampe pouvait moduler l'apprentissage et la mémoire (Trouche *et al.*, 2009 ; Aimone *et al.*, 2006 ; Bruel-Jungerman *et al.*, 2007 ; Deng *et al.*, 2010 ; Abrous & Wojtowicz, 2015). En supprimant la neurogenèse dans le DG de souris adultes par des rayons X, ou en bloquant la voie de signalisation Wnt, Clelland et collaborateurs (2009) démontrèrent, dans un protocole en labyrinthe radiaire, que les souris n'étaient pas capables de différencier deux bras très proches mais toujours capables de différencier deux bras plus éloignés (voir 3.2.3. Etudes

comportementales du pattern separation pour protocole ; Fig. 17a). La diminution de la neurogenèse adulte entraîne des déficits de discrimination contextuelle par conditionnement de peur (Tronel *et al.*, 2012), et la perte de la sous-unité NR2B des NMDAR dans les neurones issus de la neurogenèse adulte entraîne un phénotype comportemental similaire (Kheirbek *et al.*, 2012) suggérant un rôle essentiel des nouveaux neurones du DG dans les processus cognitifs reliés au pattern separation. En augmentant la neurogenèse adulte par manipulation génétique (Sahay *et al.*, 2011a), ou par enrichissement de l'environnement (Clemenson *et al.*, 2015), les souris présentent de meilleures performances de discrimination contextuelle (Fig. 17b). Ces différentes études suggèrent que les neurones issus de la neurogenèse participent à la modulation des processus de pattern separation, cependant les mécanismes ne sont pas encore bien compris (Johnston *et al.*, 2016). Un modèle descriptif propose que les cellules granulaires immatures maintiennent l'activité éparse des cellules granulaires matures. De par leur nature hyperexcitable et leur faible nombre, ils seraient capables de répondre à des stimuli environnementaux similaires très faibles, et de réguler négativement l'activité des cellules granulaires matures, *via* les interneurons du hile, afin de maintenir une activité éparse permettant l'orthogonalisation (Sahay *et al.*, 2011b ; Johnston *et al.*, 2016). Une étude suggéra que les fonctions des cellules granulaires issues de la neurogenèse évoluaient au cours de leur maturation (Nakashiba *et al.*, 2012). Leurs résultats montrent que les jeunes neurones immatures participent à la médiation du pattern separation et que leur rôle change progressivement au cours de la maturation pour finalement faciliter le processus de pattern completion. Ces différentes études suggèrent un rôle complexe de l'encodage de l'information dans le DG qui est modulé par la neurogenèse adulte et la maturation des nouveaux neurones.

3.2.3. Etudes comportementales du pattern separation

Cheeseboard

Bien qu'il soit difficile d'isoler les processus de pattern separation des autres processus cognitifs, plusieurs études ont mis en place des paradigmes expérimentaux permettant de quantifier les conséquences comportementales associées au pattern separation suite à une perturbation dans le réseau du DG. Des rats avec des lésions du gyrus denté ont été

testés dans un paradigme comportemental (cheeseboard) où les rats doivent discriminer deux localisations spatiales, plus ou moins proches, pour obtenir une récompense (Gilbert *et al.*, 2001). Les rats sont entraînés à déplacer un objet sous lequel un puits est appâté avec de la nourriture. Les rats sont ensuite autorisés à choisir entre deux objets, un au-dessus du même puits précédemment exposé (choix correct) et un autre objet au-dessus d'un puits non appâté (choix incorrect). Les deux objets peuvent alors être séparés de distances plus ou moins élevées (de 15 à 105 cm) permettant d'ajuster la difficulté de la discrimination spatiale. Après avoir subi une lésion du DG, les rats avaient des difficultés à discriminer les deux objets lorsqu'ils étaient proches (de 15 à 60 cm), par rapport aux animaux contrôles, cependant ils réussissaient aussi bien que les contrôles lorsque les objets étaient éloignés (de 82.5 à 105 cm). Le déficit graduel de discrimination en fonction du rapprochement suggère que les processus de pattern separation sont affectés par la lésion du DG. En revanche une lésion du CA1 n'entraîne pas de déficit dans le même paradigme, suggérant un rôle spécifique du DG dans la discrimination spatiale (Gilbert *et al.*, 2001).

Labyrinthe radiaire

Dans la même étude (Gilbert *et al.*, 2001), ils testèrent les rats avec des lésions au DG ou au CA1 dans un paradigme de discrimination temporelle en labyrinthe radiaire à huit bras. Brièvement, les rats doivent visiter huit bras successivement afin d'y trouver une récompense pendant une phase d'exposition. Pendant la phase de test les rats doivent choisir, parmi deux bras, quel est le premier qu'ils ont rencontré pendant la phase d'exposition. Contrairement à l'expérience précédente, les rats avec des lésions du DG réussissent la tâche peu importe le temps écoulé entre les deux bras visités pendant la phase d'exposition, mais les rats avec des lésions du CA1 échouent lorsque cette durée est grande. Les auteurs suggèrent alors que le DG joue un rôle dans le pattern separation spatial et le CA1 joue un rôle dans le pattern separation temporel (Gilbert *et al.*, 2001).

Une variante du labyrinthe radiaire permet également de tester la mémoire dépendante du pattern separation spatial (Clelland *et al.*, 2009 ; Nakashiba *et al.*, 2012). Dans cette tâche, les souris sont soumises à une phase d'exposition pendant laquelle tous les bras sont bloqués à part le bras de départ et le bras de référence. Les souris doivent apprendre à atteindre le bout du bras de référence pour y trouver une récompense alimentaire. Les

souris sont ensuite exposées à une phase de test lors de laquelle le même bras de départ, le bras de référence (non-récompensé) et un nouveau bras (récompensé) sont ouverts. Elles doivent alors être capables de différencier les deux bras pour trouver la récompense. L'intérêt de cette tâche est de pouvoir faire varier la séparation entre les deux bras, augmentant la similitude contextuelle lorsque les bras sont peu séparés (Fig. 17a). Les souris ayant subi une altération de leur neurogenèse adulte, par irradiation ou manipulation génétique (voir 4.2.2. Pattern separation et neurogenèse ; Clelland *et al.*, 2009 ; Nakashiba *et al.*, 2012), ont des difficultés à choisir le bras récompensé lorsque celui-ci est proche du bras de référence, mais réussissent quand les deux bras sont éloignés (Fig. 17a) suggérant un déficit de pattern separation spatial en l'absence de neurogenèse adulte.

Discrimination contextuelle

Le pattern separation est un processus pouvant intervenir dans plusieurs types de mémoire. Les paradigmes présentés précédemment (Gilbert *et al.*, 2001, Clelland *et al.*, 2009 ; Nakashiba *et al.*, 2012) faisaient intervenir la navigation et la mémoire spatiale. Afin d'étudier le pattern separation dans une autre forme de mémoire, plusieurs études ont adapté le conditionnement de peur au contexte (voir 3.3.1. Une mémoire, des mémoires) afin de créer une tâche de discrimination de contexte (Desmedt *et al.*, 2003 ; McHugh *et al.*, 2007 ; Kheirbek *et al.*, 2012 ; Tronel *et al.*, 2012 ; Nakashiba *et al.*, 2012). Bien que ces études utilisent des protocoles aux paramètres plus ou moins différents, le paradigme général reste le même. Les souris sont exposées quotidiennement pendant plusieurs jours à deux contextes différents possédant des informations sensorielles/perceptuelles similaires. Dans un des deux contextes (contexte A) les souris subissent toujours un léger choc électrique alors que dans le contexte B elles n'en subissent jamais. Pendant les premiers jours de l'expérience, les souris développent une réponse de peur (mesurée en taux de *freezing*) aux deux contextes A et B, suggérant que les deux contextes sont très similaires car associés par les souris au choc électrique. Au cours de l'expérience les souris discriminent progressivement les deux contextes et vont avoir un taux de *freezing* supérieur dans le contexte A comparé au contexte B. Des lésions bilatérales de l'hippocampe (Desmedt *et al.*, 2003), des altérations de la neurogenèse adulte (McHugh *et al.*, 2007 ; Tronel *et al.*, 2012 ; Nakashiba *et al.*, 2012) ou la perte des sous-unités NR2B des

récepteurs NMDA dans le DG (Kheirbek *et al.*, 2012) entraînent des troubles de discrimination de contexte chez la souris. L'augmentation de la neurogenèse adulte par manipulation génétique ou enrichissement environnementale améliore la discrimination de contexte (Fig. 17b), suggérant que les nouveaux neurones du DG favorisent les processus sous-tendus par le pattern separation (Sahay *et al.*, 2011a ; Clemenson *et al.*, 2015).

Le pattern separation est un processus computationnel qui participe à l'encodage d'informations sensorielles/perceptuelles et mnémoniques. Bien que l'hippocampe joue un rôle essentiel dans le traitement complexe des informations, d'autres structures cérébrales telles que le bulbe olfactif peuvent participer à la séparation de stimuli similaires (Sahay *et al.*, 2011a). D'autres paradigmes expérimentaux ont été développés pour tenter d'évaluer les différentes sorties comportementales et d'isoler les différentes composantes du pattern separation, chez l'Homme et l'animal (Hunsaker & Kesner, 2013).

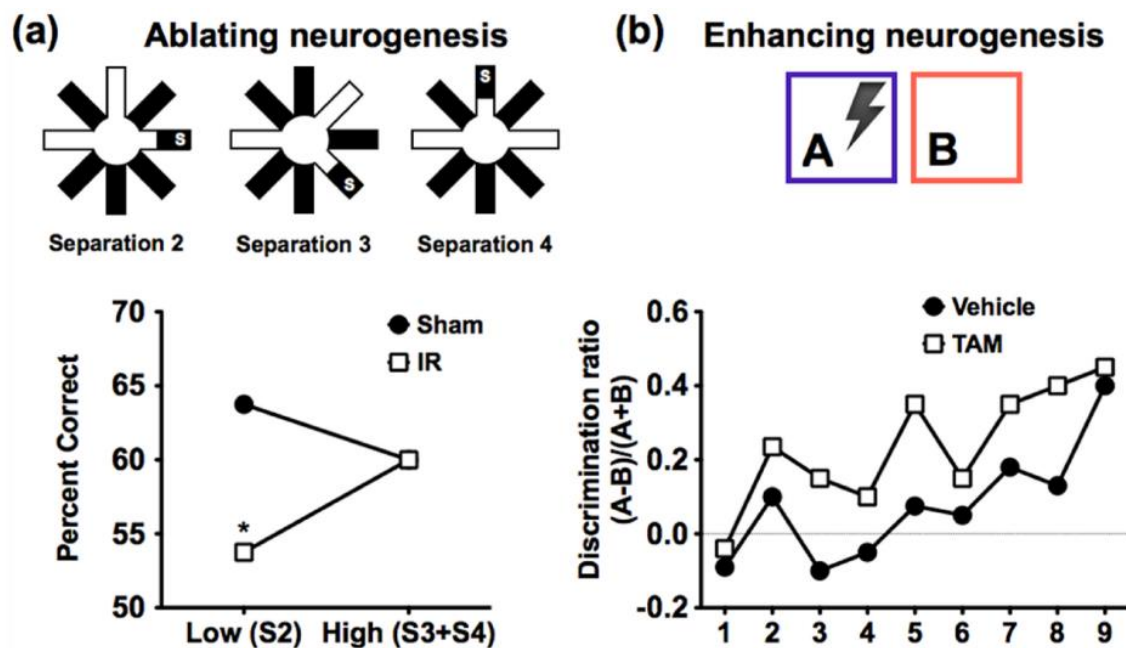


Figure 17 : Conséquences de la manipulation de la neurogenèse adulte dans différents paradigmes comportementaux associés au pattern separation.

(a) Paradigme en labyrinthe radiaire permettant de faire varier les similarités en fonction de la séparation des bras. Les souris doivent apprendre à discriminer le nouveau bras pour trouver une récompense. L'ablation de la neurogenèse adulte mène à des déficits de pattern separation spatial. **(b)** Paradigme en discrimination contextuelle de peur où les souris doivent apprendre à discriminer le contexte A aversif, d'un contexte B neutre qui possèdent des stimuli similaires. L'augmentation de la neurogenèse adulte améliore les performances de discrimination contextuelle. D'après Yassa & Stark, 2011.

3.3. Le pattern completion

3.3.1. Réseau autoassociatif du CA3 et pattern completion

Le pattern completion est à l'origine défini comme un processus computationnel qui permet à partir d'une information entrante appartenant à n'importe quel domaine cognitif, de guider le rappel d'un pattern précédemment appris en utilisant une version partielle ou dégradée du pattern original (Hunsaker & Kesner, 2013). Les premières modélisations mathématiques suggéraient que ce processus permet à l'hippocampe de faciliter le rappel rapide et précis de la mémoire grâce à l'existence d'un réseau autoassociatif (Marr, 1971 ; Willshaw & Buckingham, 1990). Un réseau autoassociatif fait référence à un réseau neuronal interconnecté possédant de nombreuses projections récurrentes (collatérales), qui permettent le stockage de plusieurs mémoires et le rappel total d'une information par l'activation partielle du réseau de neurones (Treves & Rolls, 1994). La principale sortie comportementale du processus de pattern completion est décrite comme permettant le rappel rapide de l'intégralité d'un souvenir précédemment vécu, à partir d'indices sensoriels partiels appartenant à ce souvenir (par exemple, la madeleine de Proust). D'un autre côté, le pattern completion favoriserait la capacité d'associer un stimulus sensoriel à une information similaire précédemment encodée, souvent lorsque le stimulus sensoriel est altéré par des interférences. Le pattern completion participerait alors comme un attracteur mnésique, associant des informations similaires. On utilisera préférentiellement le terme de généralisation, cependant la relation entre généralisation et completion est controversée (Treves & Rolls, 1998 ; Rolls 2013 ; Kumaran, 2012 ; Kumaran & McClelland, 2012). La généralisation pourrait être supportée par le pattern completion et le pattern association. Le pattern completion permet le rappel de l'intégralité d'un souvenir à partir de n'importe quel élément composant l'évènement original. Le pattern association ne permet pas d'associer tous les éléments à un souvenir. Par exemple, un stimulus visuel peut être associé à un goût. Plus tard, la présentation du stimulus visuel rappellerait le goût associé, cependant la présentation du stimulus gustatif ne rappellerait pas le souvenir du stimulus visuel (Rolls, 2013). La généralisation pourrait alors être sous-tendue par le pattern completion ou par le pattern association en fonction des conditions dans lesquelles les souvenirs ont été encodés et comment ils sont rappelés (Treves & Rolls, 1998 ; Rolls 2013 ; Kumaran, 2012 ; Kumaran & McClelland, 2012 ; Rolls, 2013).

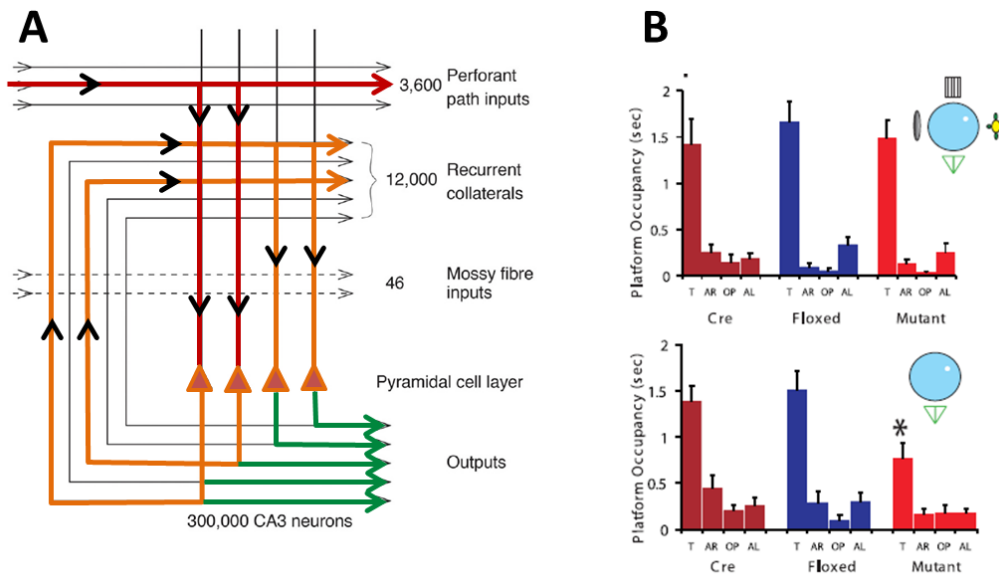


Figure 18 : Implication du réseau autoassociatif du CA3 dans les processus de pattern completion.

(A) Schéma des afférences du réseau autoassociatif du CA3. Les afférences provenant de l'EC *via* la voie perforante (rouge) stimulent une petite population de neurones pyramidaux du CA3. Les neurones projettent leurs axones, les collatérales récurrentes (orange), vers les autres cellules du CA3. Le grand nombre de connexions CA3-CA3 va recruter de nombreux neurones, permettant au CA3 de restituer une information plus complète que l'information du stimulus partiel fourni par l'EC. Cette information est ensuite transmise *via* les collatérales de Schaffer vers le CA1 (vert). Adapté de Rolls, 2013. **(B)** Résultats d'un paradigme expérimental permettant de tester le pattern completion spatial chez la souris en piscine de Morris. Les souris sont d'abord entraînées à localiser une plateforme pour s'échapper de l'eau en utilisant les indices spatiaux. Lorsque les performances sont stables, les souris sont soumises à un probe test, lors duquel la plateforme est enlevée. On mesure alors le temps passé dans la zone où la plateforme est habituellement localisée. Lorsque tous les indices sont présents les souris mutantes pour les NMDAR du CA3 ont les mêmes performances que les contrôles (haut). Lorsqu'une partie des indices est enlevée (bas), les mutants ont des difficultés à localiser la position de la plateforme, par rapport aux contrôles, suggérant un déficit de pattern completion spatial. D'après Nakazawa *et al.*, 2002.

En se basant sur les données anatomiques de l'hippocampe, les études computationnelles et les expériences comportementales, le CA3 de l'hippocampe a été proposé comme support du pattern completion, grâce à son réseau autoassociatif (Hunsaker & Kesner, 2013 ; Rolls, 2013 ; Kesner 2013). En effet, les collatérales récurrentes qui permettent de former le réseau autoassociatif forment le plus grand nombre de connexions sur le CA3 (Fig. 18A). La voie perforante provenant de l'EC connecte directement les dendrites du CA3 pour lui fournir une information directe non-orthogonalisée (non-traitée par le DG), qui va recruter une partie des neurones pyramidaux du CA3. Ces neurones vont alors réactiver les autres neurones du CA3 auxquels ils sont connectés, *via* les nombreuses collatérales récurrentes. L'information provenant d'un stimulus partiel va donc être capable de réactiver une population importante de neurones *via* le réseau autoassociatif, permettant

de transmettre une information plus complète que l'information entrante vers le CA1 *via* les collatérales de Schaffer. L'activation des fibres récurrentes du CA3 entre alors en compétition avec les informations orthogonalisées provenant des fibres moussues. Cette compétition du traitement de l'information par le CA3 oppose souvent les processus de pattern completion et de pattern separation, cependant cette compétition est plus complexe car elle joue un rôle complémentaire en fonction de la situation (voir 4.4. Pattern separation et pattern completion, deux faces d'une même pièce ?). Comme pour le pattern separation, le pattern completion est un processus qui peut être réalisé directement sur les stimuli sensoriels, en amont de l'hippocampe (Sahay *et al.*, 2011b, Barnes *et al.*, 2008 ; Wilson, 2009). Nous allons ici nous focaliser sur les processus comportementaux liés au pattern completion dépendants de l'hippocampe.

3.3.2. Etudes comportementales du pattern completion

Piscine de Morris

Le pattern completion est un processus permettant le rappel intégral d'une mémoire à partir d'indices partiels. Bien qu'il soit difficile d'isoler les processus de pattern completion des autres processus, de nombreuses études ont développé des paradigmes visant à évaluer l'impact du pattern completion sur le comportement. Chez l'Homme, la plupart des tests consistent à présenter différentes images aux caractéristiques similaires. Ce genre de paradigme oppose alors souvent pattern completion et pattern separation car il ajoute une composante d'interférence (Hunsaker & Kesner, 2013). Chez l'animal, de nombreuses études tentent d'évaluer le pattern completion en utilisant la composante spatiale de la mémoire. En utilisant des souris mutantes conditionnelles pour les NMDAR dans le CA3, l'équipe de Tonegawa a montré que les animaux n'étaient pas capables de réussir aussi bien que les contrôles, une tâche de completion spatiale en piscine de Morris (Fig. 18B ; Nakazawa *et al.*, 2002). Dans cette étude, les souris doivent apprendre à localiser une plateforme immergée dans une piscine circulaire en utilisant des repères visuo-spatiaux. Les souris mutantes dépourvues des NMDAR dans le CA3 mettent de moins en moins de temps à trouver la plateforme, suggérant qu'elles sont capables d'apprendre la localisation de la plateforme. Afin de tester leur mémoire spatiale, les auteurs soumettent les souris à un probe test, lors duquel ils enlèvent la plateforme, et mesurent le temps passé dans la zone où se trouve normalement la plateforme. Les souris mutantes

et les contrôles ont les mêmes performances, suggérant que la perte des NMDAR n'a pas d'impact sur la mémoire spatiale. Ils ont alors soumis les souris à un deuxième probe test dans lequel ils enlèvent $\frac{3}{4}$ des indices visuo-spatiaux. Contrairement au groupe contrôle, les souris mutantes n'arrivent pas bien à localiser la position de la plateforme, suggérant qu'ils ont des difficultés à reconstituer l'intégralité de la carte spatiale à partir des indices partiels présents lors du second probe test. Cette étude suggère que la fonctionnalité du réseau du CA3 est nécessaire pour assurer le pattern completion spatial (Nakazawa *et al.*, 2002). De manière similaire, une étude plus récente a montré que des souris mutantes pour la sous-unité GluK2 des récepteurs au kaïnate avaient des déficits de pattern completion spatial en piscine de Morris (Micheau *et al.*, 2014).

Cheeseboard

Une étude similaire utilisant le cheeseboard a permis de montrer que des rats avec des lésions du CA3 n'étaient pas capables de reconstruire la carte spatiale nécessaire à la localisation d'une récompense (Gold & Kesner, 2005). Brièvement, les rats sont entraînés à trouver une récompense dans une des cinq localisations possibles pendant une phase d'exposition. Les rats sont ensuite soumis au même test et ils doivent utiliser les indices visuo-spatiaux autour de la salle pour retrouver la position du puits qui contenait la récompense pendant la phase d'exposition. Lorsque les rats atteignent une performance stable, ils subissent une injection bilatérale de solution neurotoxique ou de solution contrôle dans le CA3, et sont soumis après une période de repos au même test comportemental. Les rats avec une ablation du CA3 sont moins performants que les contrôles lorsqu'une partie des indices est retirée, suggérant un déficit de pattern completion spatial. En utilisant un paradigme spatial similaire grâce à la réalité virtuelle chez l'Homme, Paleja & Spaniol ont montré que les participants les plus âgés (61-79 ans) avaient plus de difficulté à trouver la plateforme lorsque le nombre d'indices diminuait, contrairement aux sujets plus jeunes (17-25 ans). Cette étude suggère que le pattern completion spatial est une capacité cognitive qui décline avec l'âge (Paleja & Spaniol, 2013) comme pour le pattern separation (revue dans Holden & Gilbert, 2012). Cependant il avait été suggéré auparavant que le pattern separation était altéré au profit du pattern completion en fonction de l'âge (Wilson *et al.*, 2006 ; Yassa *et al.*, 2011b). Ces résultats

montrent que l'interdépendance et la compétition entre le pattern separation et le pattern completion sont encore mal comprises et controversées.

3.4. Pattern separation et pattern completion, deux faces d'une même pièce ?

Le pattern separation peut être considéré comme la capacité d'encoder séparément deux événements similaires afin de pouvoir s'en souvenir avec précision et distinctement l'un de l'autre. Le pattern completion favorise plutôt le rapprochement de caractéristiques similaires pour former un souvenir complet. Les conséquences comportementales de ces processus ont souvent opposé le pattern separation au pattern completion. De plus, de nombreux résultats suggèrent qu'il existe un équilibre entre les deux processus permettant de s'adapter aux différentes situations de la vie. Lorsque l'équilibre est rompu, un des deux processus est altéré et l'autre amélioré (Fig. 19). Pourtant de nombreux auteurs s'accordent à dire que pattern separation et pattern completion sont deux processus différents qui ne font pas partie du même continuum (Aimone *et al.*, 2011 ; Sahay *et al.*, 2011b ; Hunsaker & Kesner, 2013 ; Paleja & Spaniol, 2013).

Selon eux, les deux différences majeures qui rendent caduque l'idée d'une telle interaction entre les deux processus sont que le pattern separation et le pattern completion n'ont pas lieu dans les mêmes structures neuroanatomiques, bien qu'interconnectées, et que les deux processus n'interviennent pas dans les mêmes phases de la mémoire (Hunsaker & Kesner, 2013). En effet, le pattern separation est un processus qui module l'encodage de l'information alors que le pattern completion facilite le rappel rapide et complet d'un souvenir. Les résultats d'une étude récente (Neunuebel & Knierim, 2014), commentés par Newman et Hasselmo (2014) proposent une explication du fonctionnement complémentaire du DG et du CA3 qui permettent de soutenir le pattern separation et le pattern completion. Les auteurs ont enregistré simultanément des neurones du CA3 et du DG chez des rats pouvant se déplacer librement. Ces rats sont soumis à un test particulier dans lequel ils peuvent évoluer sur un anneau, composé d'indices spatiaux proximaux (odeur, texture de l'anneau) et distaux (indices sur les rideaux autour de l'anneau). Les neurones du DG et du CA3 déchargent alors en fonction de la position du rat sur l'anneau. Lorsque les rats sont familiarisés avec la configuration spatiale de l'anneau, les expérimentateurs vont alors effectuer une double rotation lors de laquelle ils vont

« décorrélérer » les indices proximaux des indices distaux. Les résultats indiquent que plus la distorsion entre les indices est grande, plus l'activité de la population des cellules granulaires change pour former une nouvelle représentation spatiale, suggérant un processus de pattern separation. Dans le CA3, la représentation spatiale reste relativement constante peu importe la distorsion des indices. Cette étude propose alors que lors de la même tâche, le DG et le CA3 sont capables de s'adapter dynamiquement à l'environnement et que les processus de pattern separation et pattern completion ont lieu en même temps. L'étude prédit alors que le pattern separation traite les décalages des différents indices dans le DG, et que le CA3 produit une représentation globale de l'environnement. Le CA3 adapte sa réponse entre le pattern separation et le pattern completion en fonction de la demande environnementale. « Le CA3 garde une vue d'ensemble pendant que le gyrus denté cherche la petite bête » (Newman & Hasselmo, 2014).

Bien que les mécanismes qui sous-tendent le pattern separation et le pattern completion restent encore mal compris, le bon fonctionnement du réseau formé entre le DG et le CA3 semblent être essentiels au maintien de l'équilibre qui existe entre les deux processus cognitifs qui en dépendent. Une perturbation des neurones de ce réseau pourrait mener à des difficultés pour l'hippocampe à sous-tendre ces processus cognitifs. Dans mon étude j'ai montré que Vangl2, une des protéines de la PCP, est enrichie dans le réseau DG/CA3 chez la souris adulte. Vu l'importance de la voie de la PCP dans le système nerveux, j'ai émis l'hypothèse selon laquelle Vangl2 joue un rôle dans le bon fonctionnement du réseau formé par le DG et le CA3 et intervient dans les processus qui en dépendent, le pattern separation et le pattern completion.

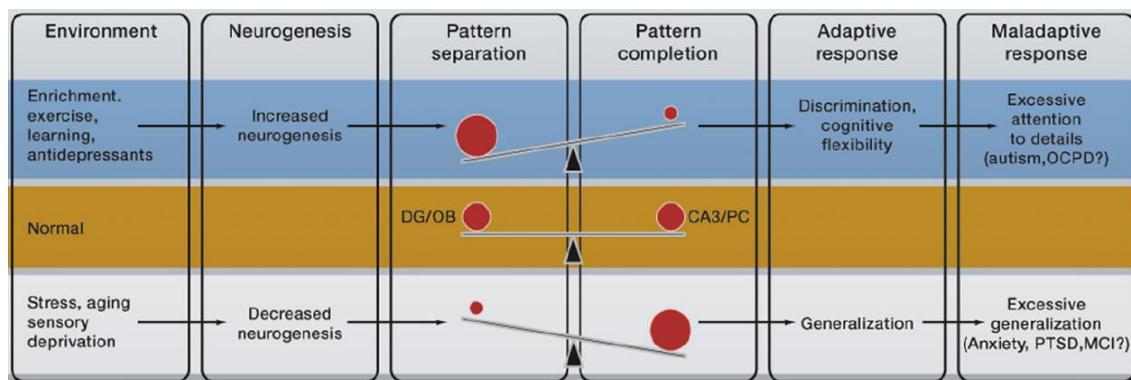


Figure 19 : Impacts théoriques de l'environnement sur les processus de pattern separation et de pattern completion. D'après Sahay *et al.*, 2011b.

4. Van Gogh like-2

4.1. Van Gogh, une protéine conservée à travers l'évolution

La souris mutante homozygote *Looptail* (*Lp*) présente de sévères NTDs (*craniorachischisis*) caractérisés par une ouverture complète du tube neural (Fig. 20A), du cerveau à la région la plus caudale (Strong & Hollander, 1949). La mutation *Lp* est causée par des mutations faux-sens dans le gène Van Gogh like-2 (*Vangl2*), précédemment dénommé *Ltap* pour *Loop-tail associated protein* (Kibar *et al.*, 2001a ; Kibar *et al.*, 2001b ; Kibar *et al.*, 2003). *Vangl2* est l'homologue d'un gène dont les mutations chez la drosophile entraînent des déficits de PCP pour différents tissus épithéliaux (Gubb & Garcia-Bellido, 1982). En 1998, il est identifié sous les noms de Van Gogh (*Vang*), pour le pattern formé par les poils des ailes chez les mutants, ressemblant aux peintures de l'artiste (Taylor *et al.* 1998), et de Strabismus (*Stbm*) pour les déficits de polarité planaire observés dans les ommatidies (Wolff & Rubin, 1998). Dans les années qui suivirent, de nombreuses études ont mis en évidence que le gène *vang* était conservé au cours de l'évolution avec des homologues chez le poisson (*trilobite/Vangl2*) (Jessen *et al.*, 2002), le xénope (*Xstbm*) (Darken *et al.*, 2002) et la souris (*Van Gogh like/Vangl*) (Kibar *et al.*, 2001a-b).

Chez les mammifères, la famille de *Vangl* comprend deux membres : *Vangl1* (*Stbm2*) et *Vangl2* (*Stbm1*). L'alignement de leurs séquences d'acides aminés (aa) est très similaire. *Vangl1* est une protéine tétraspanine (quatre domaines transmembranaires avec une extrémité N-Terminale courte et une C-Terminale longue, toutes deux intracellulaires) composée de 524 aa (Kato *et al.*, 2002), codée par le gène *vangl1*, positionné sur la région chromosomique *1p* [*1p13.1-p21*]. La protéine *Vangl1* partage environ 70% de similarité avec *Vangl2* (Torban *et al.*, 2008) qui est une protéine tétraspanine de 521 aa (Fig. 20B) (Kibar *et al.*, 2001 ; Torban *et al.*, 2004) codée par le gène *vangl2*, positionné dans la région *1q22* [*1q22-q23*]. Les deux protéines possèdent un domaine de liaison PSD-95, DLG, ZO1 - Binding Domain Motif (PDZ-BDM) dans l'extrémité C-Terminale et de multiple sites de phosphorylation.

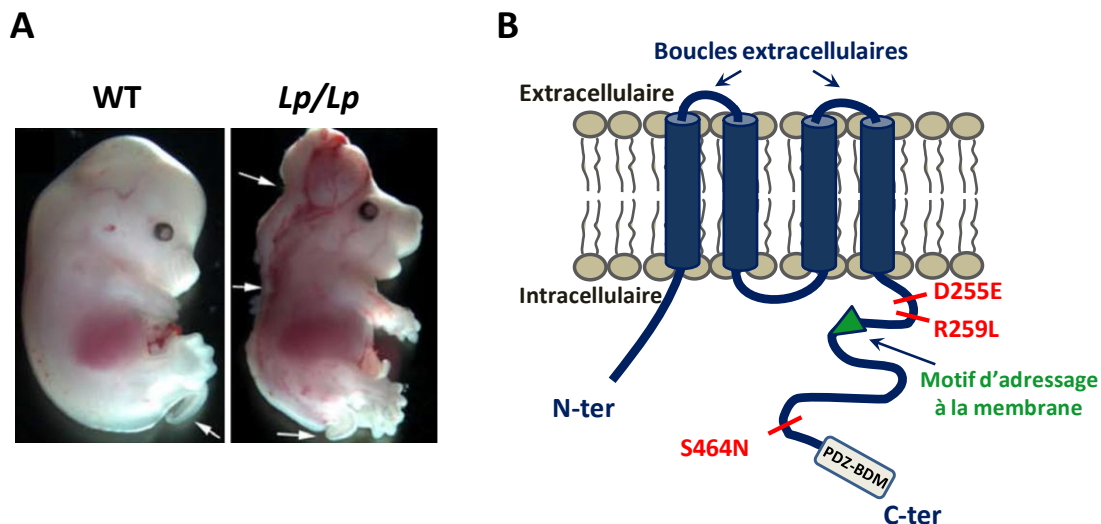


Figure 20 : Vangl2, protéine de la PCP essentielle dans le développement.

(A) Au stade E14.5, les embryons portant la mutation Looptail (*Lp/Lp*) sur le gène *vangl2* présentent de grosses anomalies physiques, telles que des problèmes de fermeture du tube neural, au niveau de l'encéphale, de la moelle épinière et de la queue. D'après Ramsbottom *et al.*, 2014. (B) Modèle topologique de l'homologue mammifère Vangl2. Vangl2 est une protéine de 521 aa (~60kD) avec quatre domaines transmembranaires, deux extrémités intracellulaires et deux boucles extracellulaires, qui interagissent avec le domaine extracellulaire de Fz (Wu & Mlodzik, 2008) et *wnt11* (Messéant *et al.*, 2017). La partie C-Terminale possède un motif de liaison au domaine PDZ (PDZ-BDM), un motif d'adressage à la membrane (Guo *et al.*, 2013), ainsi qu'un domaine conservé de liaison avec PK (aa 298-382), qui correspond au domaine d'interaction avec la N-Cadherin (Nagaoka *et al.*, 2014). La partie N-Terminale (aa 1-114) contient de nombreux sites de phosphorylation (Gao *et al.*, 2011). Plusieurs sites de mutations (rouge), nommés Loop-tail sont localisés sur la partie C-Ter. Adapté de Kibar *et al.*, 2001 et Hatakeyama *et al.*, 2014).

La forte homologie entre les deux protéines suggère une fonction redondante. Pendant le développement, l'ARNm et la protéine Vangl1 sont exprimés dans la partie la plus ventrale du tube neural (floor plate) et la notochorde de façon complémentaire à Vangl2 (Torban *et al.*, 2008). De nombreuses études ont permis de mettre en évidence que les mutations des deux gènes *vangl1* et *vangl2* chez l'Homme entraînent des NTDs et sont également impliquées dans le développement des cancers (revue dans Hatakeyama *et al.*, 2014 et Sans *et al.*, 2016).

4.2. Interactions avec Vangl2

Grâce à son PDZ-BDM, Vangl2 peut interagir avec de nombreuses protéines cytosoliques, notamment avec la protéine Scribble1 (Scrib1) associée à la voie de la PCP (Montcouquiol *et al.*, 2006). Scrib1 est une protéine contenant un domaine de répétitions riches en leucine (LRR) et quatre domaines PDZ. Les auteurs ont démontré que la mutation de Scrib1 perturbait la localisation de Vangl2 et que les domaines PDZ2, PDZ3 et PDZ4 de Scrib1

peuvent lier Vangl2 ce qui pourrait jouer un rôle dans l'accumulation asymétrique de Vangl2. De plus, la mutation *circletail* de Scrib1 chez la souris hétérozygote entraîne des phénotypes liés à l'ASD (Moreau *et al.*, 2010). Vangl2 est également capable, *via* son PDZ-BDM, d'interagir avec Rac1 et RhoA et de réguler les jonctions adhérentes dans le tube neural (Lindqvist *et al.*, 2010).

La sous-unité Sec24b, du complexe protéique cargo COPII, s'est révélée être essentielle au trafic et à l'adressage de Vangl2. La mutation du gène codant pour Sec24b entraîne une accumulation de la protéine Vangl2 dans le réticulum endoplasmique. Sec24b interagit directement avec Vangl2 et permet son transport, du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, dans les vésicules COPII (Merte *et al.*, 2010 ; Wansleben *et al.*, 2010). Le transport et la localisation asymétrique de Vangl2 de l'appareil de Golgi vers la membrane est quant à lui assuré par deux protéines : la protéine de liaison au GTP, Arfrp1, et l'adaptateur au complexe à clathrine, AP-1. Elles sont toutes deux requises pour l'adressage de Vangl2 à la membrane, mais pas de la protéine Fz6 (qui est localisée du côté opposé de Vangl2 dans les cellules épithéliales). Arfrp1 expose un site de liaison à AP-1 qui reconnaît le motif d'adressage de Vangl2 et qui le capture dans une vésicule afin de le transporter du côté proximal de la cellule épithéliale (Guo *et al.*, 2013).

Des travaux de notre laboratoire ont également mis en évidence un autre interacteur de Vangl2 qui permet de réguler son trafic à la membrane, GIPC1 (GAIP C-terminus interacting protein-1). *Via* son domaine PDZ, GIPC1 est capable de lier le domaine PDZ-BDM de Vangl2 et de réguler son trafic grâce au complexe formé entre GIPC1 et la myosinVI (Giese *et al.*, 2012). En 2003, une étude a démontré chez la drosophile que Vang était impliqué dans la formation de la membrane plasmique (Lee *et al.*, 2003a). Les embryons portant une mutation pour *dlg* ou pour *vang* présentaient des déficits de formation membranaire. De plus, la co-expression *in vitro* de *vang* et d'un homologue mammifère de *dlg* (SAP97) entraîne une formation excessive de membrane plasmique, qui dépend spécifiquement de l'interaction entre Vang et SAP97. Cette étude suggère que le complexe Vang-Dlg recrute des lipides et des protéines associées à la membrane interne, vers les sites de formation de nouvelles membranes plasmiques. Une étude plus récente montra que Vangl2 pouvait contrôler le remodelage de la matrice extracellulaire pendant la gastrulation des embryons de poisson-zèbre, en régulant l'endocytose de la métalloprotéinase matricielle-14

(MMP14) (Williams *et al.*, 2012). La perte de Vangl2 chez le mutant *trilobite* entraîne une augmentation des taux de MMP14 à la surface des cellules, une perturbation de remodelage de la matrice extracellulaire et des déficits d'extension convergente. Cette étude démontre également l'importance de Vangl2 dans l'intégration du contexte autour de la cellule afin de permettre la correcte migration de cette dernière à travers la matrice extracellulaire.

De nombreuses études de protéomiques et d'interactomiques ont montré que Vangl2 interagit avec de nombreuses autres protéines. Parmi ces protéines, Vangl2 interagit avec certaines de la PCP, telles que Celsr1 (Lei *et al.* 2014), les Dvl1/2/3 (Torban *et al.*, 2004b ; Suriben *et al.*, 2009 ; Huttlin *et al.*, 2017), les Fz3/4/7 (Montcouquiol *et al.*, 2006 ; Yao *et al.*, 2004 ; James *et al.*, 2013), Pk2 (Deans *et al.*, 2007 ; Yoshioka *et al.*, 2013) et son homologue Vangl1 (Yin *et al.*, 2012 ; Belotti *et al.*, 2012 ; Puvirajesinghe *et al.*, 2016). Vangl2 interagit avec des protéines d'échaffaudage telles que les Dact1/2/3 (Suriben *et al.*, 2009 ; Kivimäe *et al.*, 2011) et MAGI3 (Yao *et al.*, 2004). Vangl2 interagit aussi avec les sous-unités NR1 et NR2B des NMDAR (Yoshioka *et al.*, 2013 ; Huttlin *et al.*, 2017), et avec les canaux potassiques Kv1.5 et Kv 9.3 (Huttlin *et al.*, 2017).

4.3. La mutation Looptail de vangl2

Comme décrit précédemment, il existe une lignée de souris qui présente une mutation spontanée pour le gène *vangl2*, nommée Looptail (*Vangl2*^{Lp/Lp}). Les souris mutantes homozygotes *Lp* sont caractérisées par une mort prématurée *in utero*, avec de sévères formes de craniorachischisis (Strong & Hollander, 1949) provenant d'un échec de l'initiation de la fermeture de la gouttière neurale, qui laisse le tube neural intégralement ouvert de la jonction rhombencéphale/mésencéphale jusqu'à l'extrémité de la queue (Greene *et al.*, 1998). En plus des NTDs, les mutants *Lp* présentent une absence de fermeture des paupières, des déficits cardiaques, des troubles de polarité dans l'oreille interne ou encore de vagin malformé chez les femelles (Strong & Hollander, 1949 ; Henderson *et al.*, 2001 ; Montcouquiol *et al.*, 2003 ; Vandenberg & Sassoon, 2009).

Plusieurs mutations peuvent contribuer à des phénotypes Looptail. Trois d'entre elles résultent d'une substitution d'un acide aminé par un autre : la mutation naturelle *Lp*

(S464N) qui consiste en une substitution d'une sérine en asparagine à la position 464, puis les mutations induites chimiquement : Lp^{m1Jus} (D255E), substituant un aspartate par un acide glutamique ; Lp^{m2Jus} (R259L), une arginine par une leucine (Strong & Hollander, 1949 ; Kibar *et al.*, 2001a ; Murdoch *et al.*, 2001 ; Kibar *et al.*, 2001b). La mutation non-sens $Vangl2^{m1Yzcm}$ entraîne l'apparition d'un codon stop (Q449X), et d'une forme tronquée (Chen *et al.*, 2013). Toutes ces mutations sont semi-dominantes, menant à des phénotypes moins sévères chez les souris mutantes hétérozygotes ($Lp/+$) comparées aux homozygotes (Lp/Lp). En effet, les mutants hétérozygotes survivent à la naissance et peuvent se reproduire. Ils montrent cependant plusieurs troubles développementaux. Le plus visible est la queue en tire-bouchon, dont le nom des mutants Looptail provient. Ce caractère est héréditaire et ne se retrouve pas dans toute la portée, soulignant l'aspect semi-dominant de la mutation. De plus, le degré de contorsion de la queue varie entre les mutants hétérozygotes, parfois même au sein de la portée, allant de quelques courbures à une forme de « bretzel » (Strong & Hollander, 1949) suggérant que le fond génétique a une forte influence sur les phénotypes induits par la mutation Lp . De plus, les auteurs ont noté que les souris avec les queues les plus affectées par la mutation dodelinaient de la tête. Des études qui suivirent firent les mêmes observations et montrèrent que les Lp hétérozygotes avaient des élargissements et des déformations des ventricules latéraux cérébraux (vanAbeelen & Raven, 1968 ; Wilson & Center, 1977). Enfin, les souris $Lp/+$ ont également un retard de fermeture de la gouttière neurale au cours de l'embryogenèse, qui finalement se ferme complètement avant la naissance, suggérant le rôle de $Vangl2$ dans l'extension convergente chez les mammifères (Wang *et al.*, 2006).

Ces premières études ont suggéré que les phénotypes moins sévères chez les hétérozygotes ($Lp/+$) que chez les homozygotes (Lp/Lp), étaient dus à un caractère semi-dominant de la mutation (Kibar *et al.*, 2001 ; Montcouquiol *et al.*, 2006). Une étude plus récente a permis de mettre en évidence que les allèles Lp ($vangl2^{D255E}$, $vangl2^{S264N}$) menaient à des phénotypes plus sévères que pour le mutant knock-out pour $Vangl2$ (Yin *et al.*, 2012). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé une mutation ciblant l'exon 4 du gène, codant pour le domaine transmembranaire ($vangl2^{\Delta TM5}$). Il en résulte une perte quasiment totale de $Vangl2$, contrairement au mutant Lp . Les auteurs ont démontré, dans un système cellulaire hétérologue, que la mutation $vangl2^{S264N}$ entraînait des perturbations d'adressage à la membrane des protéines $Vangl2$ et $Vangl1$, provoquées par des

oligomères formés entre Vangl2^{S264N} et Vangl2, et Vangl2^{S264N} et Vangl1. Ils ont ainsi mis en évidence l'effet dominant négatif des mutations *Lp* et ont permis de confirmer l'interaction entre les protéines Vangl1 et Vangl2, déjà suggérée dans de précédentes études montrant l'interaction génétique entre *vangl1* et *vangl2* (Torban *et al.*, 2008 ; Song *et al.*, 2010).

4.4. Vangl dans les neurones

Nous avons déjà mentionné que la PCP joue un rôle essentiel dans le développement du SNC (1.3. *La polarité planaire cellulaire dans le système nerveux central*). Une étude chez *C. elegans* démontra que Vang1, Dsh1 et Prkl1 (orthologues de Vang, Dsh et Pk) sont requis pour réguler la formation des neurites dans les motoneurones (Sanchez-Alvarez *et al.*, 2011). Les expériences de perte de fonction pour ces gènes entraînent une formation de neurites surnuméraires qui se prolongent anormalement dans l'axe antéro-postérieur. En revanche, la surexpression de Pkl-1 entraîne une suppression de la formation des neurites et une réorientation de la polarité neuronale dépendante de Vang1 et Pk1. Dans le cerveau des mammifères, l'analyse du profil d'expression de Vangl1 et Vangl2 montre des différences et des chevauchements (Tissir & Goffinet, 2006 ; Torban *et al.*, 2008), suggérant un rôle à la fois redondant et complémentaire. Pendant le développement embryonnaire de la souris, l'expression de Vangl1 est plutôt restreinte à la plaque du plancher (*midline floor plate*) et à la notochorde, alors que l'expression de Vangl2 est plus largement distribuée dans tout le neuroépithélium, mais absent de la notochorde (Kibar *et al.*, 2011a ; Torban *et al.*, 2008). Dans des stades plus avancés de développement, Vangl2 est enrichi dans la rétine, le rhombencéphale et le mésencéphale, contrairement à Vangl1 (Tissir & Goffinet, 2006). En revanche, les protéines Vangl1 et Vangl2 colocalisent dans l'épithélium sensoriel de la cochlée, avec une localisation asymétrique caractéristique dans les cellules ciliées et les cellules de soutien (Song *et al.*, 2010 ; Giese *et al.*, 2012). Ces résultats permettent de montrer que les profils d'expression de Vangl2 et de Vangl1 peuvent être similaires ou différents en fonction des stades de développement et des tissus.

4.4.1. *Vangl2 et la différenciation neuronale*

En 2009, Lake & Sokol ont utilisé le mutant *Looptail* pour montrer que les embryons présentent une différenciation précoce des progéniteurs de neurones corticaux en *early-born neurons*, au détriment des *late-born neurons* et de la glie. Ils démontrent que les progéniteurs neuronaux se différencient prématurément et perdent leur distribution asymétrique de la protéine Pins (Partner of inscuteable), un régulateur de l'orientation des fuseaux mitotiques. Ces résultats ont permis aux auteurs de conclure que *Vangl2* permet de maintenir un pool de progéniteurs corticaux, et que la perturbation asymétrique des fuseaux mitotiques pendant la division par la perte de *Vangl2* perturbe la différenciation neuronale.

4.4.2. *Vangl2 et la migration neuronale*

Nous avons vu que la PCP intervient dans la migration neuronale des FBMNs (1.3.1. PCP et migration neuronale). Chez le poisson-zèbre, *Vangl2* régule la migration caudale des FBMNs (Sittaramane *et al.*, 2013). Une étude plus récente a montré chez le même modèle que *Vangl2* et *Frz3a* avaient des rôles opposés au sein même des FBMNs (rôle cellulaire non-autonome) et des cellules neuroépithéliales environnementales à travers lesquelles les FBMNs migrent (rôle cellulaire autonome) (Davey *et al.*, 2016). En utilisant de l'imagerie à haute-résolution, ils ont pu mettre en évidence qu'au sein des FBMNs, *Frz3a* stabilise les filopodes, essentiels à la migration, alors que *Vangl2* agit de façon opposée en les déstabilisant. Cependant, dans l'environnement migratoire (cellules neuroépithéliales), les rôles entre *Fz3a* et *Vangl2* sont inversés (Fig. 21). Ils démontrèrent ainsi le rôle de régulateur de la PCP dans la formation des protusions, et ceci dépendamment de l'environnement.

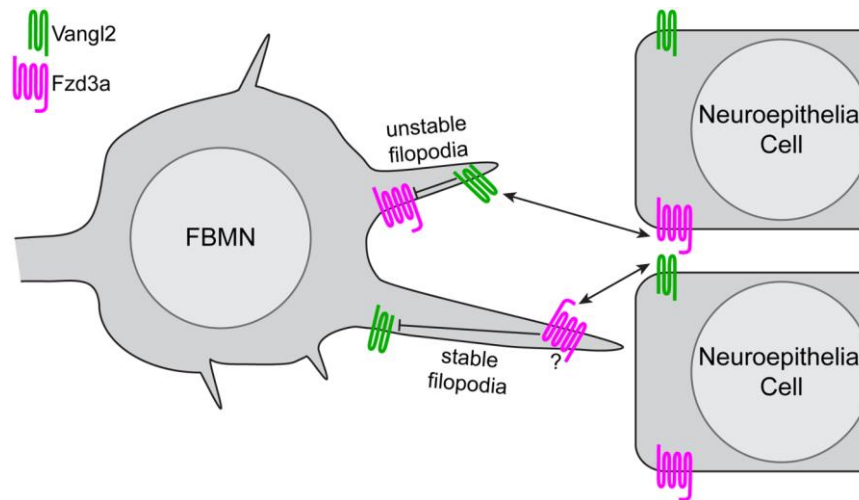


Figure 21: Modèle de régulation par la PCP de la migration neuronale dirigée.

Les interactions antagonistes entre Vangl2 et Fzd3a dans les FBMNs et dans les cellules neuroépithéliales environnantes permettent la migration neuronale dirigée. Au sein des FBMNs, Vangl2 (vert) est localisé dans les extrémités filopodiales et les déstabilisent alors que Fzd3a (magenta) a l'effet stabilisateur opposé. Dans les cellules neuroépithéliales polarisées de l'environnement migratoire, Vangl2 permet de stabiliser les filopodes alors que Fzd3a les déstabilisent. Les interactions intracellulaires entre Fzd3a et Vangl2 déstabilisent la formation des filopodes alors que les interactions intercellulaires à travers les membranes cellulaires les stabilisent. Ensemble, ces interactions pourraient donner aux FBMNs les indices directionnels nécessaires à sa migration. D'après Davey *et al.*, 2016.

4.4.3. Vangl2 et le guidage axonal

Dans un modèle de moelle épinière de souris, il a été observé que Vangl2 est enrichie dans les extrémités des filopodes des cônes de croissance des axones commissuraux (Shafer *et al.*, 2011). Dans le modèle Looptail, les auteurs ont mis en évidence qu'après avoir croisé la *floor plate*, la plupart des axones commissuraux ont des troubles de guidage. De plus, Vangl2 est capable de réduire la phosphorylation de Fz3 et de promouvoir son internalisation alors que Dvl1 exerce un effet opposé en hyperphosphorylant Fz3. Les auteurs concluent que Vangl2 et Dvl1 ont des fonctions antagonistes dans la régulation des taux de Fz3 à la membrane, au niveau des extrémités des filopodes, qui intervient dans le guidage axonal. Notre équipe a récemment montré que la délétion de *vangl2* accélère la motilité du cône de croissance, spécifiquement sur un substrat composé de N-cadhérine, et que le turnover de N-cadhérine à la membrane est réduit, suggérant que Vangl2 agit comme un « frein » moléculaire dans la migration axonale en participant à l'internalisation de la N-cadhérine (Dos-Santos Carvalho *et al.*, en préparation).

4.4.4. Vangl2 dans l'hippocampe

Une première étude prédisait que Vangl2 pouvait jouer un rôle au niveau des épines dendritiques en démontrant *in vitro*, dans des neurones d'hippocampe, l'interaction directe entre Vangl2 et PSD-95, une protéine de la densité post-synaptique (PSD) qui est localisée spécifiquement dans les épines dendritiques (Yoshioka *et al.*, 2013). La même étude suggère que Vangl2 lie directement PSD-95 *via* le PDZ-BDM localisé dans son extrémité C-terminale, et que cette liaison est requise pour la translocation de Vangl2 vers les épines. Cependant ces résultats vont être contredits deux ans plus tard par une étude montrant que le PDZ-BDM n'est pas obligatoirement requis pour la localisation de Vangl2 à la synapse (Nagaoka *et al.*, 2015). Ils démontrent que la localisation synaptique de Vangl2 pouvait être catégorisée de deux façons : une parfaite colocalisation avec PSD-95, et d'un autre côté, un pattern complémentaire de colocalisation avec PSD-95. Les résultats suggèrent que l'interaction avec PSD-95 est requise pour la translocation de Vangl2 à la membrane, dans le cadre d'une parfaite colocalisation entre les deux. En revanche, la colocalisation avec un pattern complémentaire est indépendante de PSD-95. La même équipe avait précédemment montré dans des neurones d'hippocampe en culture que Vangl2 et la N-cadhérine interagissent entre-elles, ce qui augmente l'internalisation de la N-cadhérine et peut faciliter la flexibilité de la formation des synapses (Nagaoka *et al.*, 2014). Ils suggèrent plus tard que cette interaction explique la translocation de Vangl2 dans la PSD dans le cadre des patterns complémentaires de colocalisation avec PSD-95 (Nagaoka *et al.*, 2015). Enfin, ils démontrent que l'interaction entre Vangl2 et la N-cadhérine est en compétition avec l'interaction de Vangl2 avec Pk2 au niveau de la PSD (Nagaoka *et al.*, 2015) et que Vangl2 participe la polarisation horizontale et la compartimentation postsynaptique (Nagaoka & Kishi, 2016). Le rôle de Vangl2 au niveau de la synapse est encore controversé. Alors que de récents résultats montrent que la suppression de Vangl2 par shRNA (Nagaoka *et al.*, 2014) ou par délétion génétique (Okerlund *et al.*, 2016) entraîne des déficits de formation des synapses dans des neurones d'hippocampe en culture, une autre étude suggère que Vangl2 inhibe la formation des synapses glutamatergiques dans les neurones du CA1 de l'hippocampe et permet, directement ou indirectement, l'élimination des épines dendritiques (Thakar *et al.*, 2017). Cette dernière étude montre que Celsr3 joue un rôle opposé à Vangl2 dans la formation des synapses glutamatergiques, et que la délétion de Celsr3 dans des mutants murins

conditionnels entraîne des déficits pour des tâches comportementales qui dépendent de l'hippocampe, mais les conséquences comportementales de la perte de Vangl2 n'ont pas été explorées.

Outre le rôle de Vangl2 dans la synaptogenèse, il a été montré que Vangl2 jouait un rôle dans la régulation de l'arborisation dendritique des neurones hippocampiques (Hagiwara *et al.*, 2014). En utilisant plusieurs formes tronquées de Vangl2, ils démontrent que la perte de la région N-terminale (Δ N-ter) entraîne une diminution de l'arborisation dendritique alors que la perte de la partie C-terminale ou du PDZ-BDM (Δ C-Ter ou Δ PDZ-PDM) l'augmente. Cette régulation bidirectionnelle de l'arborisation dendritique suggère que Vangl2 est une molécule pivot pour le développement neuronal. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de l'étude d'Okerlund et collaborateurs (2016), qui démontre que la perte de Vangl2, en plus de perturber la formation des synapses, diminue l'arborisation dendritique de neurones d'hippocampe en culture.

5. Introduction des résultats

Les gènes de la PCP jouent donc un rôle majeur dans le développement du système nerveux central et périphérique. Bien que l'expression de la plupart de ces gènes diminue progressivement à partir de la naissance dans le système nerveux, certains d'entre eux s'expriment fortement dans certaines régions cérébrales (Tissir & Goffinet, 2006). Cet enrichissement suggère que les protéines de la PCP jouent un rôle dans le fonctionnement de ces structures cérébrales, mais les phénotypes dramatiques liés au développement (NTDs), causés par les mutations spontanées des gènes de la PCP rendent difficiles les études sur le rôle de la PCP dans les fonctions cérébrales adultes. *Van Gogh-like 2 (vangl2)* est un des gènes centraux de la PCP qui code pour une protéine transmembranaire, dont la mutation conduit à une absence de fermeture de la gouttière neurale et de nombreuses malformations, suggérant un rôle essentiel au cours du développement. Outre son rôle développemental, Vangl2 est enrichie dans l'hippocampe (Tissir & Goffinet, 2006) et intervient dans l'arborisation dendritique des neurones et dans la compartimentation des épines dendritiques (Hagiwara *et al.*, 2014 ; Nagaoka *et al.*, 2014 ; Nagaoka *et al.*, 2015).

Montcouquiol et collaborateurs (2003) ont montré que la protéine Scrib1 était capable d'interagir, *via* ses domaines PDZ, avec Vangl2, et que la mutation *circletail* du gène *scribble1* affecte la localisation de Vangl2. En 2010, notre laboratoire a démontré que la mutation *circletail*, entraînait chez la souris hétérozygote des déficits de sociabilité, et des capacités d'apprentissage et de mémoire améliorées, phénotypes similaires à l'ASD (Moreau *et al.*, 2010). De plus, l'organisation de l'arbre dendritique des neurones pyramidaux du CA1 est altérée, et associée à un nombre réduit de synapses mais de tailles plus importantes. Notre laboratoire a également démontré que la protéine Scrib1 influence la morphologie du cytosquelette d'actine des épines, ainsi que le trafic des NMDAR (Moreau *et al.*, 2010 ; Piguel *et al.*, 2014), et qu'elle est requise pour la plasticité synaptique dépendant des NMDAR, affectant l'apprentissage et la consolidation mnésique (Hilal *et al.*, 2016). Ensemble ces résultats démontrent que Scrib1, une des protéines associées à la PCP, joue un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'hippocampe.

Au vu de l'interaction de Vangl2 avec Scrib1 (Montcouquiol et al, 2003) et l'expression de l'ARNm de Vangl2 dans l'hippocampe (Tissir & Goffinet, 2006), j'ai émis **l'hypothèse selon**

laquelle Vangl2, une des protéines centrales de la PCP, participe au bon fonctionnement de l'hippocampe. Les objectifs principaux de mon projet de thèse étaient de 1) confirmer l'expression de Vangl2 dans l'hippocampe à l'âge adulte, 2) générer plusieurs mutants conditionnels pour *vangl2* afin de s'affranchir des phénotypes développementaux de la mutation de Vangl2 pendant l'embryogenèse et de l'effet dominant-négatif de la mutation hétérozygotes *Looptail* (Yin *et al.*, 2012), 3) étudier l'impact de la délétion de Vangl2 dans la principale sous-structure où Vangl2 est normalement enrichie dans l'hippocampe, le DG, et 4) en étudier les conséquences comportementales spécifiques au DG à l'âge adulte.

Projet principal :

Vangl2 fine-tunes hippocampal-dependent context discrimination and spatial completion

Mon projet principal vise à comprendre le rôle de Vangl2 dans l'hippocampe adulte de modèles murins. Dans un premier temps, j'ai confirmé l'enrichissement de Vangl2 dans l'hippocampe en utilisant un anticorps créé par notre laboratoire. Ces premiers résultats ont permis de démontrer l'enrichissement spécifique de Vangl2 dans le DG et dans le *stratum lucidum*, où les fibres mossues du DG connectent les dendrites des cellules pyramidales du CA3. Nous avons ensuite généré un mutant conditionnel (CaMK-vangl2), issu du croisement d'une lignée CaMKII-Cre (Casanova *et al.*, 2001) avec une lignée *Vangl2^{flox/flox}* (Ramsbottom *et al.*, 2014), permettant de restreindre la délétion de *vangl2* dans les principaux neurones postmitotiques du cerveau après la naissance. J'ai montré par immunohistochimie que le nombre de cellules granulaires immatures dans le DG, exprimant la calrétinine (Brandt *et al.*, 2003), était augmenté chez les mutants, sans affecter la prolifération cellulaire. De plus, j'ai montré que la morphologie dendritique des cellules granulaires du DG, ainsi que la maturité des épines sont affectées par l'absence de Vangl2. Ces résultats ont suggéré que Vangl2 joue un rôle dans l'établissement du réseau au niveau du DG, après la naissance.

J'ai donc ensuite étudié les effets de l'absence de Vangl2 dans des processus cognitifs dépendant spécifiquement de la connectivité du DG et du CA3. J'ai testé les mutants conditionnels dans deux paradigmes expérimentaux de discrimination contextuelle, en labyrinthe radiaire et en conditionnement de peur, permettant de tester le pattern separation (Clelland *et al.*, 2009, Desmedt *et al.*, 2003; Nakashiba *et al.*, 2012), décrit

comme étant spécifique du DG. Mes résultats ont permis de montrer que l'absence de Vangl2 dans les principaux neurones du cerveau améliore les performances des souris dans ces deux paradigmes, suggérant une amélioration du pattern separation. Au vu du lien étroit qu'il existe entre le pattern separation et le pattern completion (Sahay *et al.*, 2011b ; Hunsaker & Kesner, 2013), j'ai ensuite testé les conséquences comportementales de l'absence de Vangl2 dans un paradigme permettant de tester le pattern completion spatial en piscine de Morris (Nakazawa *et al.*, 2002). Mes résultats ont montré que l'absence de Vangl2 dans les principaux neurones du cerveau n'empêche pas les souris d'apprendre à créer une carte spatiale pour localiser la position de la plateforme. Cependant lorsqu'une partie des indices est enlevée, les souris mutantes ne sont plus capables de localiser la plateforme, suggérant un problème de pattern completion spatial. Ensemble, ces résultats ont suggéré que la connectivité entre le DG et le CA3 était perturbée, pourtant les propriétés électrophysiologiques que nous avons mesurées entre les fibres moussues et les cellules pyramidales du CA3 n'ont pas permis de révéler de différence entre les mutants et le groupe contrôles. L'ensemble de ces résultats m'a mené à émettre l'hypothèse que la perturbation du réseau chez les mutants conditionnels était en amont de la connectivité DG/CA3. L'utilisation d'approches virales pour déléter ou réexprimer Vangl2 spécifiquement dans les cellules granulaires du DG m'ont permis de mettre en évidence l'implication de Vangl2, spécifiquement dans le DG, dans l'équilibre qu'il existe entre pattern separation et pattern completion. Mes résultats suggèrent que Vangl2 dans le DG participe à la maturation des cellules granulaires du DG, mécanisme essentiel au maintien de la balance entre les processus de pattern separation et pattern completion.

Projets complémentaires :

Late deletion of Vangl2 in the dentate gyrus leads to improvement of context discrimination and impairment of spatial completion

Mon projet principal a permis de mettre en évidence le rôle de Vangl2 dans les fonctions de l'hippocampe, notamment du DG, à l'âge adulte. Dans l'optique d'étudier la spécificité de Vangl2 dans les cellules granulaires du DG, nous avons généré un autre mutant conditionnel permettant de restreindre l'expression de Cre recombinase dans les jeunes cellules granulaires du DG, grâce au promoteur PomC (Overstreet *et al.*, 2004). Nous avons

étudié l'effet d'une délétion plus tardive (30 semaines), et partielle (environ 20% des cellules granulaires) de *vangl2* dans le DG, sur les processus comportementaux décrits précédemment, pattern separation et pattern completion. Similairement aux modèles étudiés dans le projet principal, l'absence de Vangl2 dans ce modèle entraîne une amélioration des performances des souris mutantes en discrimination contextuelle, et un déficit en pattern completion spatial. La perte partielle et tardive de Vangl2 dans le DG est donc suffisante pour perturber les processus cognitifs supportés par cette structure. Ces résultats supportent la conclusion de mon projet principal selon laquelle Vangl2 est impliqué dans la maturation des cellules granulaires du DG permettant le maintien de l'équilibre entre les processus de pattern separation et de pattern completion.

Electrophysiological properties of dentate gyrus granule cells in CaMK-vangl2 model

L'étude électrophysiologique dans la connectivité entre le DG et le CA3 du projet principal n'a pas révélé de perturbations liées à la mutation de *vangl2* dans le mutant conditionnel CaMK-vangl2. Cependant les phénotypes comportementaux, associés à l'altération morphologique de l'arborisation dendritique des cellules granulaires du DG, suggèrent que la connectivité du DG est perturbée. Afin de tester cette hypothèse, j'ai commencé à étudier les propriétés de transmission synaptique basales des cellules granulaires des souris CaMK-vangl2 sur tranches d'hippocampes. Les résultats préliminaires que j'ai obtenus n'ont pas révélé de différences majeures dans la transmission synaptique basale entre la voie perforante et les cellules granulaires du DG. Ces résultats sont consistents avec une précédente étude (McHugh *et al.*, 2007) dont les souris mutantes pour la sous-unité NR1 des NMDAR dans le DG avait des déficits de pattern separation, mais pas de différence de transmission synaptique basale. Seule la plasticité synaptique des cellules granulaires était affectée, ce qui oriente ce projet vers l'analyse des propriétés de plasticité synaptique entre la voie perforante et les cellules granulaires du DG chez les mutants CaMK-vangl2.

Role of Vangl2 in the CA3 autoassociative cognitive functions

Mon étude a permis de mettre en évidence le rôle de Vangl2 dans les cellules granulaires du DG. Cependant plusieurs études soutiennent l'hypothèse selon laquelle le pattern completion est un processus qui est supporté par le réseau auto-associatif du CA3 (Kesner, 2013 ; Rolls, 2013 ; Hunsaker & Kesner, 2013). Bien que j'ai montré un enrichissement de

Vangl2 dans le *stratum lucidum* (région de connectivité entre le DG et le CA3), les investigations de notre laboratoire non pas encore réussi à déterminer si Vangl2 était localisée en pré-, post-synaptique, ou les deux (Carvalho & Montcouquiol, en prép.). Afin de savoir si la délétion de *vangl2* dans les neurones pyramidaux du CA3 peut mener à des déficits de pattern completion spatial, j'ai développé un mutant conditionnel *via* une approche virale permettant l'expression de la Cre recombinase dans les cellules du CA3 de souris *Vangl2^{flox/flox}*. J'ai ensuite testé ces mutants conditionnels dans le paradigme en piscine de Morris permettant d'évaluer le pattern completion spatial. Les résultats suggèrent que Vangl2 dans le CA3 est aussi requis pour permettre au CA3 de supporter le pattern completion et que Vangl2 pourrait être essentiel au fonctionnement du réseau autoassociatif.

Chapitre II : Résultats

Manuscript in preparation

Vangl2 fine-tunes hippocampal-dependent context discrimination and spatial completion

Benjamin Robert^{1,2} | *et al.*

Aline Marighetto^{1,2} | Mireille Montcouquiol^{1,2*@} | Nathalie Sans^{1,2*@}

1. INSERM, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la plasticité neuronale, U1215, Bordeaux, France.
2. Univ. Bordeaux, Neurocentre Magendie, U1215, Bordeaux, France.

This work was done in collaboration with:

- Dr. Aline Marighetto and Dr. Aline Desmedt for the behavioral analysis (Neurocentre Magendie, Team: Pathophysiology of declarative memory).
- Dr. Christophe Mulle (CNRS, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, UMR 5297, Univ. Bordeaux, Bordeaux, France)
- Dr. Maurice Garret (CNRS, INCIA, University of Bordeaux, Bordeaux, France)
- Dr. Deborah Henderson (Institute of Genetic Medicine, Newcastle University, Centre for Life, Newcastle upon Tyne, United Kingdom)
- Dr. Claudia Racca (Institute of Neuroscience, Newcastle University) for the microscopy and 3D analysis)

Abstract

Vangl2 is a conserved transmembrane polarity protein that is part of the core planar cell polarity (PCP) pathway, a conserved developmental signaling pathway known to control the dynamic process of tissue morphogenesis in animal development. This process is critical for neuronal development as spontaneous mutations in *vangl2* lead to severe disruption of the nervous system incompatible with life. A yet unresolved, and particularly overlooked question is why PCP protein expression is maintained at the adult stage in the hippocampus and neuronal circuits critical for cognition and memory, suggesting a role in specific circuit properties related to hippocampal function. This is notably relevant in regards to increasing links between PCP genes and human neurologic and psychiatric pathologies. However, how PCP signaling controls memory processes remains unexplored. Here we show that Vangl2 is enriched in the dentate gyrus (DG) of the adult hippocampus, and participate in the maturation process of granular cells. We demonstrate that early and late postnatal conditional deletions of *vangl2* in specific area of the brain altered spatial pattern completion, but not spatial memory, while improving the mutant mice context discrimination threshold. We show that late and restricted deletion of *vangl2* in the DG has these same effects, emphasizing the role of the DG granular cells in these hippocampal computational processes. Thus, a specific Vangl2-dependent signaling plays an unexpected role in hippocampal-dependent computational processes in the DG.

Highlights

- **Vangl2 is enriched in granular cells of the immature and mature hippocampus**
- **Vangl2 participates in granular cell maturation and network integration**
- **Vangl2 loss has opposite functional effect on pattern completion/separation processes**

Running title: Vangl2 Regulates Context Discrimination

Keywords: Vangl2, planar cell polarity, plasticity, memory, pattern separation, pattern completion, LTP

Introduction

Planar cell polarity (PCP) refers to the coordinated alignment of cell polarity across the tissue plane, and comprises core PCP genes that are highly conserved throughout evolution. Initially identified in epithelia, core PCP genes are also involved in important mechanisms of neuronal development, including asymmetric cell division, neuronal migration, axonal guidance, dendritic morphology and synaptogenesis (Goodrich, 2008; Stoeckli & Zou, 2009; Tissir & Goffinet 2013; Sans *et al.*, 2016). In mammals, spontaneous mutations of core PCP genes lead to severe neural tube and brain morphogenesis defects, leading to perinatal death. The perinatal lethality prevents the study of an eventual role of these genes in adult cognitive function. In mammals, one of these core PCP genes, van Gogh-like 2 (*vangl2* also known as VANGL planar cell polarity protein 2 in human) is expressed in neural tissue from early stage of development up to adulthood, whereas its close homologue *vangl1* is barely expressed in the central nervous system (CNS) (Kibar *et al.*, 2001a; Torban *et al.*, 2008; Tissir & Goffinet, 2006). However, while the function of Vangl2 protein in adult stage in the brain still remains largely unexplored, the eventual cognitive consequences of its mutation are mostly unknown.

The clearest manifestations of core PCP genes mutations in humans are neural tube defects (NTDs), which encompass a broad range of distinct malformations of the CNS and the peripheral nervous system, and are one of the most common and most severely disabling congenital malformations. NTDs affecting the brain (e.g., anencephaly, craniorachischisis totalis) are lethal conditions, owing to prenatal neurodegeneration and severe anatomical dysmorphia. On the contrary, NTDs affecting the spinal cord (e.g., spina bifida aperta) are compatible with postnatal life but are associated with a wide range of neurologic disabilities. The associated handicaps are dependent on the level of the spinal lesion, the degree of damage to the exposed neural tissue, and the presence of Arnold-Chiari malformation, but are overall not compatible with evaluation of cognitive deficits. Rare mutations of *VANGL2* (MIM# 600533) have been shown to play critical roles in lethal human forms of NTDs (Ilescu *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2010), while another study has shown that rare-mutations in core PCP genes including *VANGL1* (MIM# 610132), *VANGL2*, *DVLs*, *CELSR*, *FZD6* have been detected in 15 percent of tested human NTD cases, thus justifying the potential use of screening patients for PCP as risk factors (Copp & Greene, 2013). *Celsr*

and *dishevelled* genes are continuously required for ependymal cell planar polarity and prevent hydrocephalus (Tissir *et al.*, 2010; Ohata *et al.*, 2014).

The hippocampus, which is known to play a crucial role in learning, acquisition and recall of memories (Squire & Alvarez, 1995), is a brain structure in which Vangl2 is still present in adult mice (Tissir & Goffinet, 2006). The hippocampus enables the encoding of daily episodes sharing similar elements in distinct mnemonic representations, by discriminating separate features of each particular event (called orthogonalisation or pattern separation). The hippocampus is composed of two main subregions known as dentate gyrus (DG) and *Cornus ammonis* (subdivided in CA1, CA2, and CA3). The granule cells (GCs) of the DG have been proposed to facilitate pattern separation by reducing the overlapping entorhinal cortex (EC) input, and producing sparse output to the CA3 region (O'Reilly & McClelland, 1994; Nakazawa *et al.*, 2002; Rolls, 2013; Hunsaker & Kesner, 2013; Neunuebel & Knierim, 2014; Kesner, 2013). On the other hand, 'pattern completion' is a memory recall process described as the ability to retrieve a previously encoded memory using partial or degraded sensory cues, that is mainly sustained by CA3 auto-associative network (O'Reilly & McClelland, 1994; Nakazawa *et al.*, 2002; Rolls, 2013; Hunsaker & Kesner, 2013; Neunuebel & Knierim, 2014). Although the importance of PCP signaling is not contested during development, its prominence for memory processes remains untested. To test this assumption directly, we sought to create new conditional mutant mice for the core PCP gene *vangl2*, and use them to test memory paradigms when *vangl2* gene is absent.

Here we found that the developmental core PCP protein Vangl2 is enriched in DG GCs of the developing and adult hippocampus. To evaluate the cognitive consequences of late *vangl2* deletion, we generated conditional mutants with late brain-specific deletion of *vangl2*, and tested two cognitive processes sustained by the hippocampus. Our study revealed opposite effects of the mutation on pattern completion and pattern separation processes. Namely, adult mutants were impaired in a Morris water maze 'pattern completion' task, which requires rebuilding a spatial map using partial cues. In contrast, mutants performed better than controls in a fear conditioning discrimination task, where mice have to distinguish two similar contexts. These results show that Vangl2 is required for optimal balance between pattern separation and pattern completion processes required for memory function.

Results

Vangl2 is enriched in adult DG

Vangl2 mRNAs are present in the developing brain structures, including the hippocampus (Tissir and Goffinet, 2006). To further understand the role of *Vangl2*, and validate the presence of the protein in adult hippocampus, we used a homemade antibody (Montcouquiol *et al.*, 2006). We observed an enrichment of *Vangl2* in the DG and CA3 subregions of the hippocampus in 10 week-old mice (**Fig. 1**). *Vangl2* is enriched in the inner and outer stratum moleculare of the DG where the dendrites of the GCs arborize (**Fig. 1a**, red squared brackets, respectively), as well as in the CA3 stratum lucidum in the mossy fibers (Mfs; the axons of the GCs) and/or the proximal apical dendrites of the CA3 pyramidal neurons (**Fig. 1a**, red arrowhead). *Vangl2* is also enriched in the DG subgranular zone (SGZ), the neurogenic zone of the DG, where it colocalizes with DCX-positive cells, a marker of young postmitotic GCs (**Fig. 1b-e**). In contrast, we detected weak *Vangl2* labelling in the DG granular layer, which contains the cell bodies of more mature GCs, and in the other region of the hippocampus (Fig. 1a and b) or the cortex (data not shown). Compared to immature GCs, *Vangl2* expression is weak in the cell body of mature GCs. Altogether these results are consistent with *Vangl2* enrichment in the cell body (and probably neurites) of young postmitotic GCs at the time of their maturation, and in mature GC dendrites and hippocampal Mfs, which connect GCs to mossy cells, GABAergic neurons and CA3 pyramidal cells.

To restrict the deletion of *vangl2* in postnatal neurons, we created conditional knockout mice by crossing mice carrying a conditional allele of the *vangl2* gene (*vangl2^{fl/fl}*) (Ramsbottom *et al.*, 2014) with mice carrying the CaMKII α -Cre-recombinase allele (Casanova *et al.*, 2001). These *vangl2^{fl/fl},CaMKII-cre* conditional knock-out mice are here referred to as CaMK-*vangl2^{-/-}* (See Methods, **Extended Data Fig. 1a**). The spatial pattern of Cre/loxP recombination in the CaMK-*vangl2^{-/-}* mouse line was examined by crossing this line with an Ai6 ZsGreen1 reporter mouse (Madisen *et al.*, 2010). At 10 weeks of age, strong green fluorescence certifying the recombination occurred in virtually all pyramidal cells in the hippocampus (**Extended Data Fig. 1b**). PCR, western blots and immunohistochemistry confirmed the loss of *vangl2* and *Vangl2* protein, respectively, in

the hippocampus (**Extended Data Fig. 1c-e**). CaMK-vangl2^{-/-} cKO mice exhibit neither gross abnormalities in brain size and morphology (**Extended Data Fig. 1f**), nor deficits in working memory in the Y-maze, locomotor activity, exploration or anxiety (**Extended Data Fig. 2**).

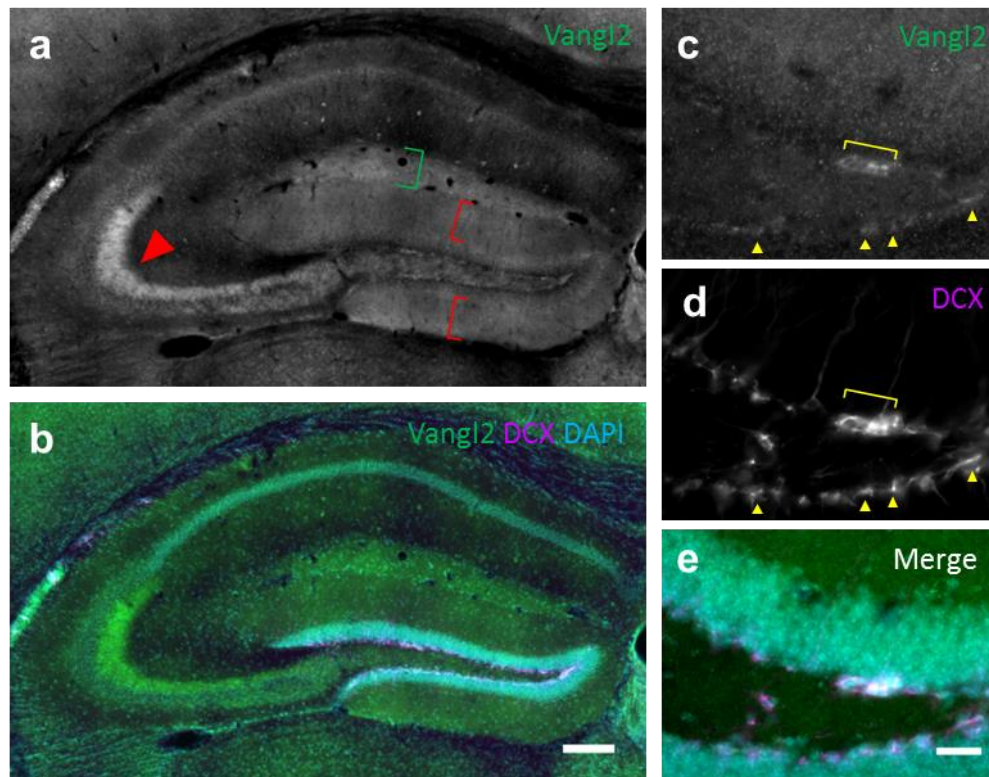


Figure 1: Endogenous expression of Vangl2 in the adult hippocampus mice.

(a-b) Composite of 20x magnification images of hippocampal sections from 10 week-old mouse immunostained with **(a)** anti-Vangl2, and **(b)** anti-Vangl2 (green), anti-DCX (magenta), DAPI (cyan). Vangl2 is enriched in the DG molecular layer (red bracket) and in the mossy fibers (red arrow) in CA3 stratum lucidum. Aspecific straining (present without primary antibody) is observed in the lacunosum moleculare (green bracket). **(c-e)** High magnifications of DG hilus reveal colocalisation of Vangl2 (c and e, green) and DCX (d and e, magenta) in some hotspots (yellow bracket and arrows). Scale bars 100 μm **(a,b)** and 50 μm **(c-e)**.

Granule cell maturation deficits in adult CaMK-vangl2 cKO mice

Adult-born young GCs and old GCs, or developmentally born GCs are thought to play distinct roles in the DG network connectivity and function (Nakashiba *et al.*, 2016). Because of Vangl2 enrichment in GCs and in the immature cells found in the SGZ, we tested whether vangl2 is involved in GCs maturation. First, we studied whether the absence of *vangl2* could affect DG maturation. We used calretinin (CaR) as a marker for immature GCs in controls and CaMK-vangl2 cKO mice. As expected, in controls, CaR labelling was found in sparse cells in the proliferative zone of the DG (**Fig. 2a**). In contrast, in CaMK-vangl2 cKO mice, we observed a statistically significant increase in the number of CaR-positive cells (Unpaired t-test: $t_{(123)} = 3.069$, $p = 0.0026^{**}$; **Fig. 2a**), but no differences in the number of

DCX-positive cells (Unpaired t-test: $t_{(277)} = 0.8303$, $p = 0.4071$) or Ki67-positive cells (Unpaired t-test, $t_{(55)} = 0.6093$, $p = 0.5614$; **Fig. 2b,c**), suggesting that the number of newly produced till immature GCs or cell proliferation were not affected. The latter being consistent with CaMKII α expression restricted to post-mitotic neurons (Casanova *et al.*, 2001; Arruda-Carvalho *et al.*, 2014). In a recent paper, Schinder and collaborators have shown that immature GCs lack functional perisomatic GABAergic inhibition (Esposito *et al.*, 2005; Marin-Burgin *et al.*, 2012). Thus, we immunostained brain slices from control and CaMK-vangl2 cKO mice with CaR antibodies to visualize immature neurons in the DG, the presynaptic vesicular GABA transporter (VGAT) and the postsynaptic cell adhesion protein Neuroligin-2 (NL2) to label inhibitory synapses. We quantified the number of VGAT and NL2 puncta onto the soma of CaR-positive cells and showed that there was no difference between the two genotypes, suggesting that these additional immature GCs share the same inhibition properties as control ones (Mann-Whitney U test: VGAT, $p = 0.8620$; Colocalisation VGAT/NL2, $p = 0.5024$; Unpaired t-test: NL2, $t_{(246)} = 1.39$, $p = 0.1657$; **Fig. 2d**). Altogether these results suggest that the absence of Vangl2 delays GC maturation, leading to supernumerary immature GCs in the adult DG, independently from proliferation.

The dendritic structural complexity along with the dendritic spine morphology or synapse number can be considered as a marker for maturation and functional integrity of GCs (Zhao *et al.*, 2006; Vadodaria & Jesseberger). As mentioned, Vangl2 is targeted to dendrites in mature GCs and thus is enriched in the molecular layers of the DG as seen in **Fig. 1**. Using Golgi stain to trace GC arborization, we observed a complex morphological defect in CaMK-vangl2 cKO compared to controls in the molecular layer. In CaMK-vangl2 cKO, GCs showed a reduction of the complexity of the proximal part of the dendritic tree, which mostly receives input from the axons of associational/commissural mossy cells. We also observed an increased arborization in the distal part of the dendritic tree, which mostly receive input from axons of layer II neurons of the entorhinal cortex *via* the lateral and medial perforant path from the medial and lateral entorhinal cortex, when compared with control group (**Fig. 2e**). Furthermore, the angle formed by the two most extreme branches of the dendritic tree was reduced in CaMK-vangl2 cKO GCs (**Fig. 2e**). Using an mYFP-expressing lentivirus to label the GC neurites, we also measured a significant decrease in the number of mushroom spines in the most distal outer molecular layer of the DG in CaMK-vangl2 cKO mice compared to controls (Mann-Whitney U test: $p=0.0053^{**}$).

This decrease was concomitant with an increase in thin and stubby spines in the more proximal middle and inner molecular layer, respectively (Unpaired t-test: $t_{(288)} = 2.194$, $p=0.029^*$; Mann-Whitney U test: $p=0.0018^{**}$) (Fig. 2f). Altogether, these results indicate that late *vangl2* deletion alters GC arborization, producing a morphological immaturity, most probably participating in abnormal connectivity of GCs and integration in the network.

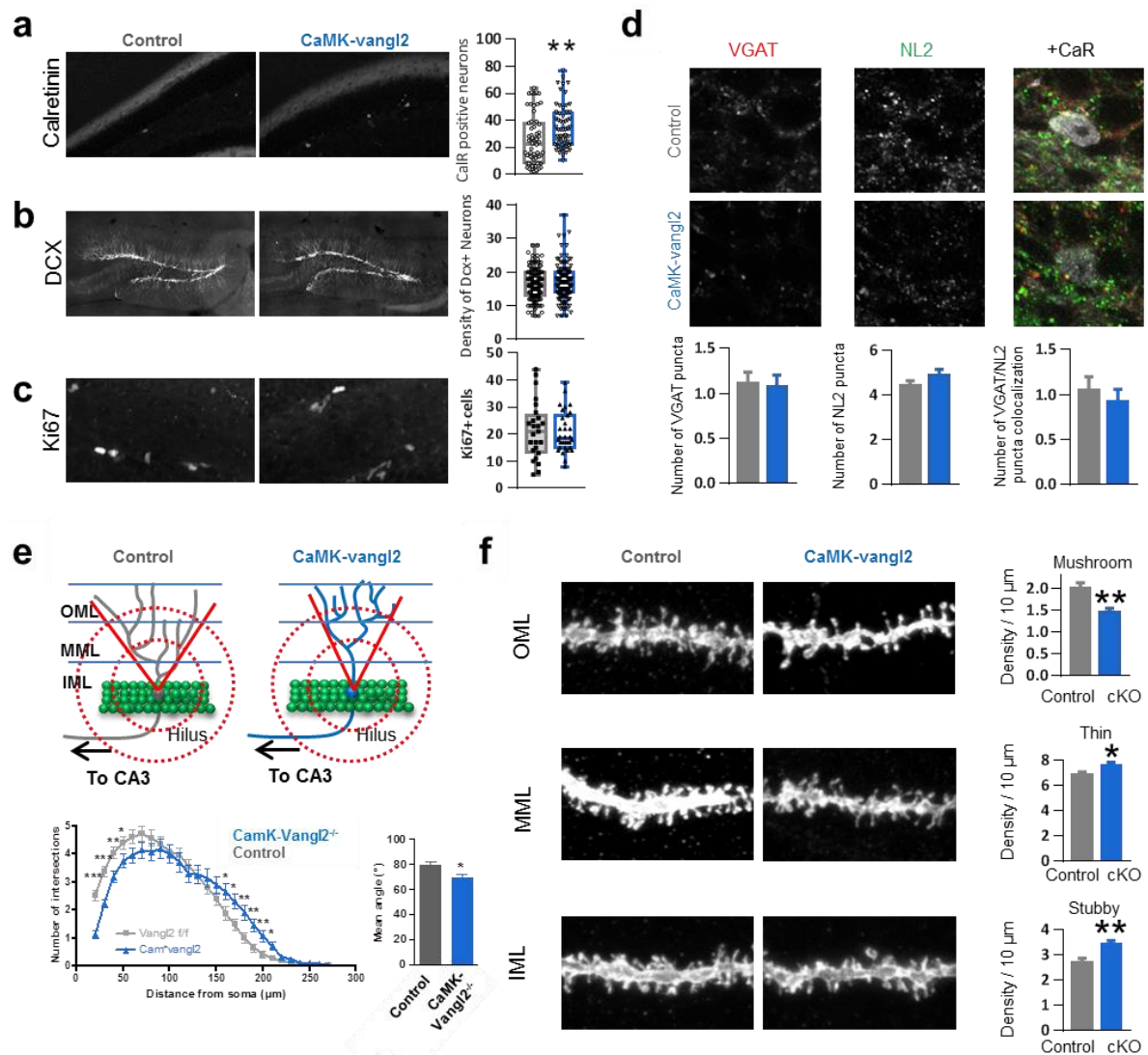


Figure 2. CaMK-vangl2 mice display immature features in the dentate gyrus

(a-c) Immunohistochemistry of hippocampal sections showing (a) an increased number of calretinin positive granular cell in the DG in CaMK-vangl2 mice compared to control, but (b) no differences in the number of DCX positive granular cells or (c) Ki67 positive cells, suggesting a delay in the transient phase of immaturity without affecting cell proliferation. (d) High magnification of calretinin positive granular cell with immunostaining for VGAT (top left, red) and NL2 (top middle, green) and quantification of perisomatic puncta and colocalisation of VGAT and NL2 perisomatic puncta (bottom). (e) Schematic representation of Golgi stained granular cells traced using NeuroLucida tracer software (top). Sholl analysis quantification (bottom left) and global angle of the dendritic arborization (bottom right). The organization of arborization is altered in CaMK-vangl2 granular cell, with a reduced number of proximal arborization, an increased

branching in the distal part, and a reduced angle of the dendritic tree. **(f)** 10 μm segments of dendrites of granular cells in outer (OML), medium (MML) and inner (IML) region of the molecular layer (left). Mice were injected with a lentivirus driving the expression of membrane YFP, allowing the quantification and classification of dendritic spines (right).

*Early postnatal deletion of *vangl2* leads to better pattern discrimination*

Many theoretical and experimental studies suggested that DG young GCs promote the ability to distinguish between similar events (Deng *et al.*, 2013; Hunsaker & Kesner, 2013, Santoro, 2013; McAvoy *et al.*, 2015). To test this hippocampal-dependent memory process, we used a radial maze discrimination task (Clelland *et al.*, 2009). Each trial comprises a sample phase (in which the mouse is exposed to one arm only) and a test-phase (in which the mouse is submitted to a choice between two arms, the one visited in the sample and a new one, containing the reward), (**Fig. 3a**; see methods). Separation between sample and new arms varied at each trial in a pseudo randomly fashion to test several difficulties of discrimination (1-4, Separation 1 being the more difficult, **Fig. 3b**). Both groups improved their performance during the task (**Fig. 3c**). During the first block of four days (**Fig. 3d**), both groups displayed the same ability to choose the rewarded arms, and separation 1 appears as the more difficult test for both groups, as expected. During the second block (**Fig. 3e**), CaMK-*vangl2* performed better in the task compared to control, regardless the separation (Two-way ANOVA, Separation x Genotype interaction: $F_{(2, 90)} = 0.02714$, $p = 0.9732$; Separation: $F_{(2, 90)} = 4.761$, $p = 0.0108$; Genotype: $F_{(1, 90)} = 7.35$, $p = 0.0080^{**}$). Since the improvement was not dependent of task difficulty, the results were inconclusive regarding potential effect of CaMK-*vangl2* on pattern separation. Therefore we used another test of pattern separation, namely a contextual fear discrimination paradigm (Desmedt *et al.*, 2003; Nakashiba *et al.*, 2012) shown to be sensitive to hippocampal lesion (Desmedt *et al.*, 2003). Mice were exposed every day to both a neutral and a conditioning contexts in a pseudo-randomly manner. These two similar contexts only physically differed in their background distal cues. In the conditioning context, mice are exposed to a tone spaced of 30 seconds from a mild foot-shock (trace conditioning), while in the neutral context (N), the mice never received any foot-shock (**Fig. 3f**). During block 1 (day 2 to 4), the CaMK-*vangl2* cKO mice exhibit a higher level of freezing in the conditioning context compared to the neutral context, while the control mice have the same level of freezing in the neutral and conditioning context (Two-way ANOVA, Context x Genotype interaction: $F_{(1, 122)} = 5.862$, $p = 0.0169$; Genotype: $F_{(1, 122)} = 11.59$, $p = 0.0009$; Bonferroni's multiple

comparisons test: Control: neutral vs. cond., $t_{(122)} = 0.8792$, $p > 0.05$; CaMK-vangl2: neutral vs. cond., $t_{(122)} = 2.507$, $p < 0.05^*$; Cond.: control vs. CaMK-vangl2, $t_{(122)} = 4.12$, $p < 0.001^{***}$ **Fig. 3g**).

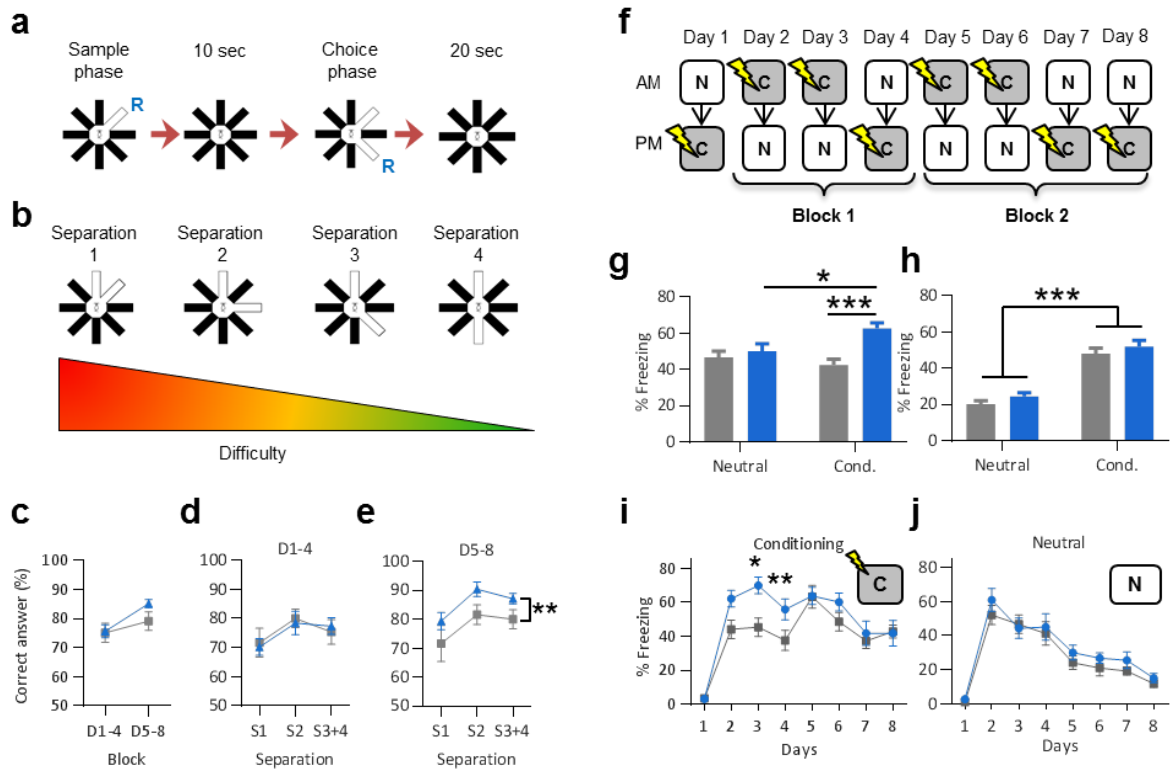


Figure 3. CaMK-vangl2 mice exhibit better performance in radial maze and contextual fear discrimination tasks requiring ‘pattern separation’

(a) Design of the radial maze task trial. Mice have to learn to go in the first arm to get the reward (R) during the sample phase. During the choice phase, mice have to learn to visit the new arm to get the reward. **(b)** During the choice phase, both arms were separated by 45°, 90°, 135° or 180° (Separation 1-4) involving more or less ‘pattern separation’ **(c)**. Percentage of correct answer during the training by 4 days-blocks. Both groups learned to choose the new arm to get the food. **(d-e)** Percentage of correct answer for each separation **(d)** for the first block of 4 days (1-4) and **(e)** for the second block of 4 days (5-8). No difference between both groups for the first block, the difficulty S1 seems to be more difficult than others. But CaMK-vangl2 cKO mice have performed better than Control mice during the last four days. **(f)** Design of the contextual fear discrimination experiment. Mice visit both the neutral context (N) and the conditioning context (C) every day in a pseudo randomly fashion, during 8 days. **(g-h)** Mean of freezing of both groups in neutral or conditioning context **(g)** during the first block, **(h)** during the second block of training. **(i-j)** Percentage of freezing during the 8 days, **(i)** in the conditioning context and, **(j)** in the neutral context. The deletion of Vangl2 leads to an improvement of the ‘pattern separation’ in a fear conditioning task.

This result shows that CaMK-vangl2 cKO mice discriminate more quickly the aversive context from the neutral one than the control group in the first days after the conditioning (Three-way ANOVA (day 1 to 4), Context x Genotype: $F_{(1, 3)} = 7,312$ $p = 0.0077$; Genotype: $F_{(1, 3)} = 11.81$, $p = 0.0008$). This better discrimination is mainly due to higher level of

conditioned fear to the aversive (conditioning) context in CaMK-vangl2 cKO mice than in controls (Two-way ANOVA RM, Genotype (day 1 to 4): $F_{(1, 18)} = 9.852$, $p < 0.0057$; Bonferroni's multiple comparisons test: day 3: control vs. CaMK-vangl2, $t_{(72)} = 2.69$, $p < 0.05^*$; day 4: $t_{(72)} = 3.186$, $p < 0.01^{**}$; **Fig. 3i**), while lower but similar levels of freezing are observed in both groups in the neutral context (Genotype (day 1 to 4): $F_{(1, 19)} = 0.2527$, $p > 0.05$; **Fig. 3j**). During block 2 (day 5 to 8), this difference disappears and both control and CaMK-vangl2 cKO mice have similar high levels of freezing in the conditioning context compared to the neutral context (Two-way ANOVA, Context x Genotype interaction: $F_{(1, 164)} = 0.00879$, $p = 0.9254$; Genotype: $F_{(1, 164)} = 11.59$, $p = 0.1278$; Context: $F_{(1, 164)} = 107.7$, $p < 0.0001^{***}$; **Fig. 3h**). These results show that CaMK-vangl2 cKO are able to discriminate both contexts earlier (from day 3) than control mice (from day 5), indicating an improvement of pattern separation processes in absence of *vangl2*.

Early postnatal deletion of vangl2 does not prevent spatial learning but impairs memory recall

According to theory, pattern separation must be tempered with pattern completion (McClelland and Goddard, 1996), suggesting some type of balance between the two processes. To evaluate whether an early deletion of *vangl2* could affect spatial pattern completion processes, we exposed CaMK-vangl2 cKO mice to a behavioral pattern completion test in the Morris water maze (**Fig. 4a**). First, we did not observe any difference between the CaMK-vangl2 cKO mice and the control group for the latency to reach the cued platform during visual learning (Two-way RM ANOVA, Training session x Genotype interaction: $F_{(3, 78)} = 0.3529$, $p = 0.7871$; Genotype: $F_{(3, 78)} = 0.8601$, $p = 0.3623$; Training session: $F_{(3, 78)} = 31.29$, $p < 0.0001$; **Fig. 4b, visual**) assessing their ability to swim, their willingness to escape the water and their visual acuity. Second, no statistical difference was observed during the spatial learning but a tendency of the CaMK-vangl2 cKO mice to reach more slowly the platform than control in the first part of the training (Two-way RM ANOVA, Training session x Genotype interaction: $F_{(14, 364)} = 0.8294$, $p = 0.6370$; Genotype: $F_{(1, 26)} = 3.869$, $p = 0.0599\#$; Training session: $F_{(14, 364)} = 14.43$, $p < 0.0001$). CaMK-vangl2 cKO mice finally reached the same performances than control at the end of the spatial learning (**Fig. 4b spatial**). The delay observed for the cKO group in the early phase of the test was correlated with a delay of that group to use more systematic strategies than spatial

strategies to reach the platform at the first part of the training (Fig. 4c). To test the spatial memory we performed a probe test at day 6. Both groups spent around 50% of the time in the phantom platform (PPF) compared to the others PF (less than 25% each), demonstrating that the absence of Vangl2 does not affect the hippocampal-dependent spatial learning (Two-way ANOVA, PPF x Genotype interaction: $F_{(3, 104)} = 1.756$, $p = 0.1601$; Genotype: $F_{(1, 104)} < 0.0001$, $p > 0.05$; PPF: $F_{(3, 104)} = 34.04$, $p < 0.0001$; Bonferroni's multiple comparisons: control and cKO target vs others, $p < 0.001^{***}$, respectively; Fig. 4d).

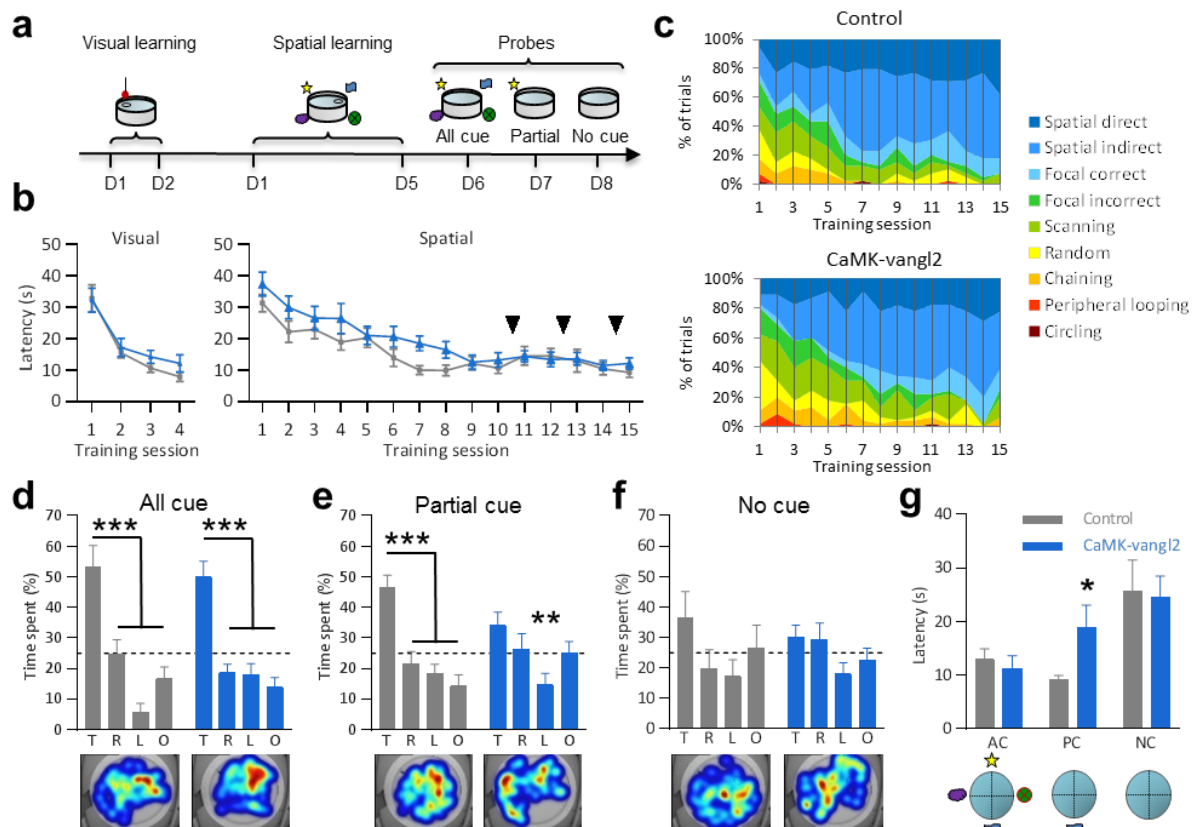


Figure 4. CaMK-vangl2 mice exhibit deficits in spatial pattern completion task

(a) Design of the Morris water maze task. Mice are trained during 5 days to find the platform using spatial cues around the maze. Spatial memory is tested in probe test with all cues. ‘Pattern completion’ is tested when cues are partially removed. (b) 10- to 13-week-old male CaMK-vangl2 mice (blue, $n = 15$) and their control littermates (grey, $n = 13$) did not differ significantly in the escape latency during the visual learning or the spatial learning, but a trend to a delay of learning can be observed for the CaMK-vangl2. Black arrows represent probe tests. (c) Strategy used by mice during the spatial learning. CaMK-vangl2 mice seem to use spatial strategy (in blue) later than the control mice corresponding to the delay observed in latency. (d-f) Bars show the percentage of time spent in each PPF (d) with all cues, both groups spent more time in the target PPF compared to others quadrants; (e) with partial cues, only control mice spend much more time in target compared to all others while CaMK-vangl2 spent the same time in all (except in left); (f) without any cue, both groups are lost in the water maze. (g) Representative heatmap showing the location of mice in the Morris water maze during probe tests. (h) Control and CaMK-vangl2 reach the phantom platform (PPF) in the same time with all cues and no cue conditions but not with partial cues. Dotted lines represent the chance. T: Target, R: Right, L: Left, O: Opposite.

Next, we removed some of the spatial cues and evaluated again the time spend in quadrants. When most of the cues were removed, CaMK-vangl2 cKO mice spent an equivalent amount of time in each PPF ($\approx 25\%$), while control mice continued to show preference for the target ($\approx 45\%$) (Two-way ANOVA, PPF x Genotype interaction: $F_{(3, 104)} = 3.011$, $p = 0.0335$; Genotype: $F_{(1, 104)} < 0.0001$, $p > 0.05$; PPF: $F_{(3, 104)} = 12.97$, $p < 0.0001$; Bonferroni's multiple comparisons: control target vs others, $p < 0.001^{***}$; cKO target vs left : $p < 0.01^{**}$, cKO target vs others: $p > 0.05$; **Fig. 4e**). Both groups were lost in the no cue condition, demonstrating the need of specific spatial cues to locate the platform (Two-way ANOVA, PPF x Genotype interaction: $F_{(3, 104)} = 0.7509$, $p > 0.05$; Genotype: $F_{(1, 104)} < 0.0001^{***}$, $p > 0.05$; PPF: $F_{(3, 104)} = 2.593$, $p > 0.05$; **Fig. 4f**). In addition, we measured the latency needed to reach the platform location for each probe tests (**Fig. 4g**) and observed a significant higher latency to reach the platform location for the CaMK-vangl2 cKO mice compared to the control in partial cue probe test (Unpaired t-test with Welch's correction: $t_{(14.91)} = 2.259$, $p = 0.0393^*$). These data show that CaMK-vangl2 cKO mice can form new spatial memories, but are impaired when they need to retrieve these memories from partial cues, indicative of pattern completion defect.

Mossy fiber synaptic transmission is normal in CaMK-vangl2 cKOs

We next addressed whether or not the loss of *vangl2* resulted in postsynaptic changes at excitatory inputs to CA3 pyramidal neurons. We prepared hippocampal sagittal slices from 10-13 week-old mice and standard slice electrophysiology investigation was performed. Recordings were done with the whole cell patch clamp techniques in voltage clamp mode (holding potential set at -70 mV) from CA3-PCs (CA3a and CA3b) identified using a DIC interface microscope. Mf input was stimulated by placing a monopolar glass electrode in the hilus in proximity of the granule cell layer (**Fig. 5a**). Mf responses in CA3-PC were characterized by sharp rise time, low probability of release associated with marked paired pulse ratio and frequency facilitation. During both the experiments and the analysis, the experimenter was blind to the genotype of the animal used. As summarized in Figure 5, we have found no major differences between genotypes in basic synaptic transmission and in two forms of short-term plasticity. In details we have found that the basal amplitude (stimulation frequency 0.1 Hz) of the pharmacological isolated Mf-CA3-PCs response was

not different between control and CaMK-vangl2 cKO mice (Control = 74.8 ± 10.0 pA, $n = 15$; CaMK-vangl2 cKO = 76.9 ± 7.6 pA, $n = 17$; **Fig. 5b**). Similarly, no difference was found in both paired pulse ratio (PPR 40 ms interval: Control = 2.4 ± 0.3 , $n = 9$; CaMK-vangl2 cKO = 3.0 ± 0.2 , $n = 7$; **Fig. 5c**) or in presynaptic form of LTP at mossy fiber synapse (30–40 min after the protocol; Control = $169.9 \% \pm 50\%$, $n = 10$; CaMK-vangl2 cKO = $137.1 \% \pm 14.1 \%$, $n = 16$; **Fig. 5d**). Altogether, despite the strong expression of Vangl2 in the mossy fiber track, we found no evidence for a change in the properties of synaptic transmission and plasticity at Mf-CA3-PCs synapses.

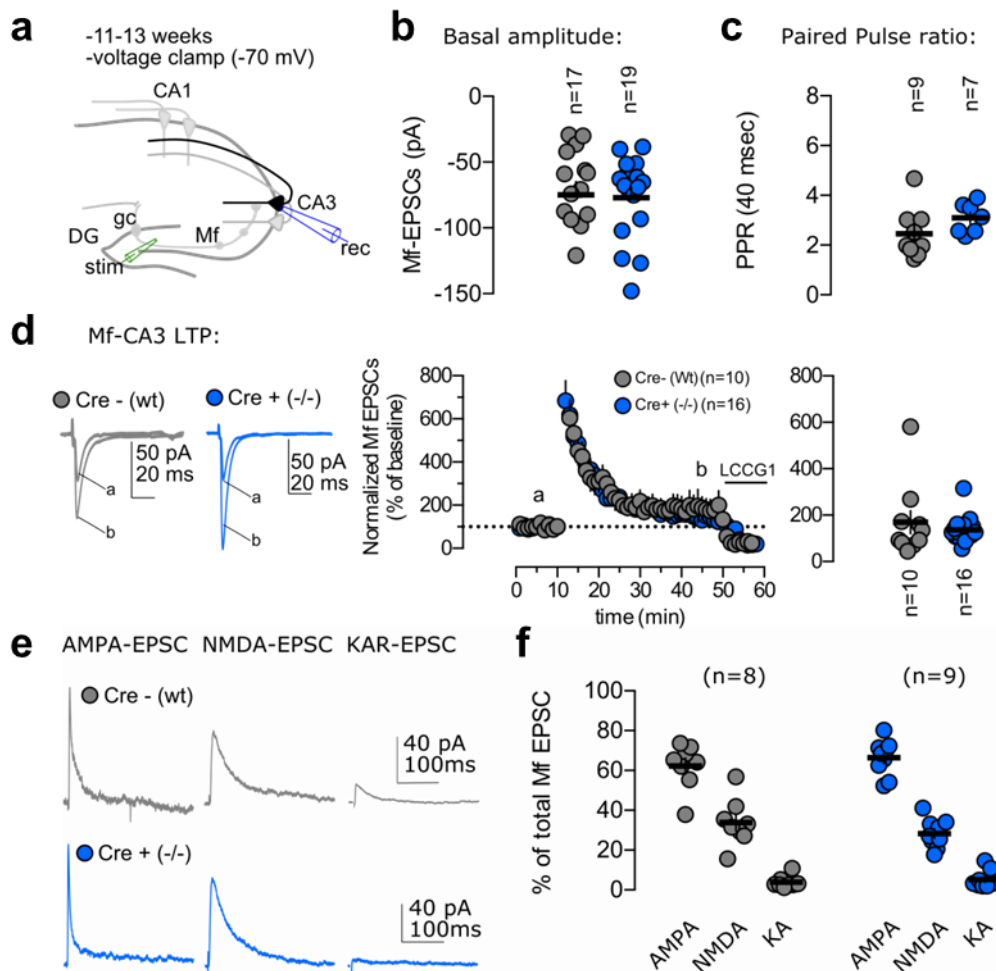


Figure 5. CaMK-vangl2 mice exhibit same electrophysiological properties than Control mice in DG/CA3

(a) Schematic representation of the hippocampal sagittal slice. Recording patch pipette are placed in the CA3 pyramidal cell layer (blue) and stimulation pipette are placed in the hilus of the DG, in proximity of the granule cell layer. **(b)** Histogram of the basal amplitude of the response after a 0.1 Hz stimulation. No differences were observed between control and CaMK-vangl2 mice. **(c)** Histogram of the Paired pulse ratio (40 ms interval) showing no difference in the post-synaptic facilitation between both groups **(d)** Representative trace of the presynaptic LTP formation in the mossy fiber synapses (left) and quantification (right) showing no alteration in the CaMK-vangl2 mice. **(e)** Representative traces of the successive isolation of the postsynaptic receptors responses (AMPA, NMDAR and KAR) using pharmacological antagonists. **(f)**

Histogram of the EPSC compared to baseline for each postsynaptic receptors. The equipment of the different types of receptor seems to be equivalent between control and CaMK-vangl2 mice.

We finally investigated whether removal of *vangl2* could affect the equipment of postsynaptic iGluRs (AMPA, KARs or NMDARs) of Mf-CA3 PC synapses. For this, we performed electrophysiological recordings of Mf-CA3 EPSCs in slices of 10-13 weeks old CaMK-vangl2 cKO mice and we isolated the three types of iGluRs with appropriated pharmacological tools. Mf-CA3 EPSCs were recorded at + 40 mV, and were successively blocked by the AMPAR antagonist LY303070 (25 μ M) and the NMDAR antagonist D-AP5 (50 μ M) (**Fig. 5e, f**). With this protocol, we did not observe any difference between the two genotypes, in the relative equipment of AMPARs, NMDARs and KARs at Mf-CA3 synapses (Control = AMPA-component 62.3 % \pm 4.0%, NMDA-component 33.8 % \pm 4.2 %; KA-component 3.8 % \pm 1.0%; n = 8; CaMK-vangl2 cKO = AMPA-component 66.4 % \pm 2.9%, NMDA-component 28.3 % \pm 2.4 %; KA-component 5.2 % \pm 1.4%; n = 9; **Fig. 5f**). These data show that CaMK-vangl2 cKOs have functional DG CG-CA3 synapses.

Spatial Completion is normal when Vangl2 is re-expressed in the DG of CaMK-vangl2 cKO mice

To further confirm the role of Vangl2 in pattern completion processes *via* GCs, we re-expressed *vangl2* and mCherry or just mCherry under the control of a CaMKII α promoter in five week-old CaMK-vangl2 cKO mice, using a stereotaxic injection of AAV2/9-CaMKII(0.4)-mCherry-2A-mVangl2-WPRE or AAV2/9-CaMKII(0.4)-mCherry as a control virus in the DG of control and CaMK-vangl2 mice (**Fig. 6a**). First, mice were tested in visual and spatial Morris water maze task (**Fig. 6b**). No statistical difference was observed in the visual task between the groups (Two-way RM ANOVA, Training session x Genotype interaction: $F_{(9, 285)} = 1.395$, $p = 0.1896$; Genotype: $F_{(3, 95)} = 1.215$, $p = 0.3086$; Training session: $F_{(3, 285)} = 62.63$, $p < 0.0001$) but interestingly during the spatial training, the CaMK-vangl2 cKO mice injected with mCherry-vangl2 virus (referred as CaMK-vangl2^{Resc}) are statistically significantly faster to reach the platform across the training session than the CaMK-vangl2 injected with control virus (Two-way RM ANOVA, Genotype: $F_{(3, 95)} = 4.198$, $p = 0.0078$; Tukey's multiple comparisons test: CaMK-vangl2 vs CaMK-vangl2^{Resc}, $p = 0.0066$). In the probe test between training 22 and 23, results showed that at the end of the training session, all the groups were able to locate the platform location in probe test with all the cues (Two-way ANOVA,

Quadrant x Genotype interaction: $F_{(9, 116)} = 1.408$, $p = 0.1927$; Genotype: $F_{(3, 116)} < 0.0001$, $p > 0.9999$; Quadrant : $F_{(3, 116)} = 54.99$, $p < 0.0001$; Tukey's multiple comparisons test: all groups, target vs. others, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$; **Fig. 6c**).

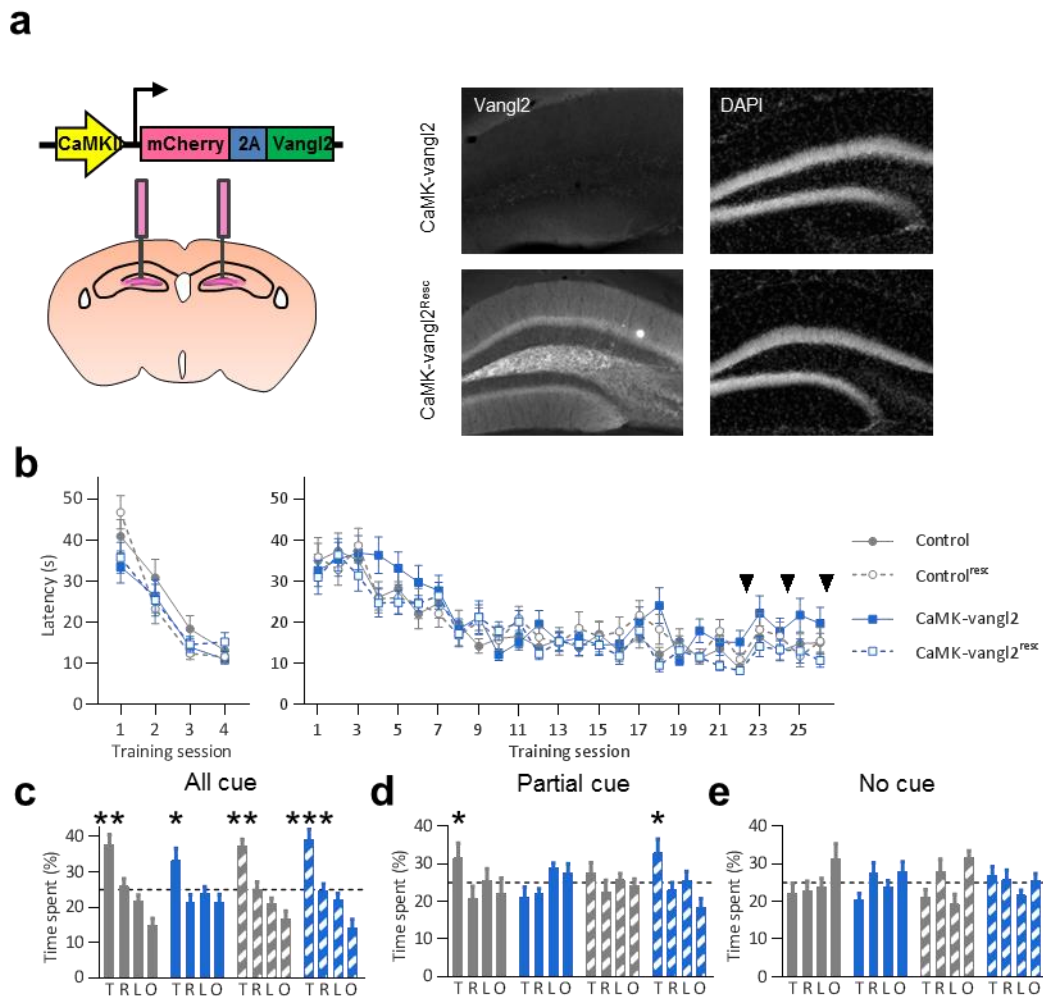


Figure 6. CaMK-vangl2 mice with Vangl2 repressed in DG granule cell exhibit a rescue in spatial pattern completion

(a) Schematic representation of the transgene carried by the AAV injected bilaterally in the dentate gyrus (left) and, (right) immunohistochemistry anti-Vangl2 on hippocampal slice of an injected mice after behavioral experiment. **(b)** 10- to 13-week-old male CaMK-vangl2 mice (blue, $n = 8$), control littermates (grey, $n = 8$) injected with control virus and CaMK-vangl2 rescued mice (blue dotted line, $n = 8$), control rescued (grey dotted line, $n = 8$) are trained in the visual learning and the spatial learning test. A significant difference is observed between CaMK-vangl2 and CaMK-vangl2 rescued during the spatial learning. Black arrows represent probe tests. **(c-e)** Bars show the percentage of time spent in each quadrant **(c)** with all cues, all groups spend much more time in the target PPF compared to others quadrants; **(d)** with partial cues, only control mice and CaMK-vangl2 rescued spend more time in target quadrant compared to CaMK-vangl2 and control rescued. **(e)** without any cue, both groups are lost in the water maze. Dotted lines represent the chance. T: Target, R: Right, L: Left, O: Opposite.

In partial cue condition (**Fig. 6d**), CaMK-vangl2 cKO performed poorly to locate the platform position as seen previously (**Fig. 4e**) compared to the control and compared to the CaMK-vangl2^{Resc} (Two-way ANOVA, Quadrant x Genotype interaction: $F_{(9, 116)} = 2.047$, $p = 0.0400$; Genotype: $F_{(3, 116)} < 0.0001$, $p > 0.9999$; Quadrant : $F_{(3, 116)} = 4.374$, $p = 0.0059$; Tukey's multiple comparisons test: Control vs CaMKII-vangl2, $p = 0.0499^*$; CaMKII-vangl2 vs CaMK-vangl2^{Resc}, $p = 0.0164^*$; **Fig. 6d**). Interestingly, the control mice injected with *vangl2* / mcherry performed poorly (**Fig. 6d**). This result is compatible with the observations that the core PCP pathway is highly gene-dosage-dependent (Torban *et al.*, 2008). In the no cue probe test (**Fig. 6e**), all the groups performed poorly (Two-way ANOVA, Quadrant x Genotype interaction: $F_{(9, 116)} = 1.586$, $p = 0.1331$; Genotype: $F_{(3, 116)} < 0.0001$, $p > 0.9999$; Quadrant : $F_{(3, 116)} = 6.966$, $p = 0.0002$). Altogether, these data show that a re-expression of Vangl2 in the DG granule cells of adult CaMKII-vangl2 cKO mice is sufficient to rescue the “normal” phenotype observed in spatial pattern completion.

Late and DG-specific deletion of vangl2 also leads to impaired pattern completion and improved pattern separation processes

The two memory processes we evaluated are both dependent on hippocampus, but the CaMK-vangl2 cKO we used so far delete *vangl2* in other regions of the brain, and as early as P3 (Casanova *et al.*, 2001). We then generated a new cKO model to restrict the deletion of *vangl2* in the DG of young adult mice using the C1ql2 minimal promoter driving the expression of the red fluorescent protein tomato and the Cre recombinase in GCs (Barthet *et al.*, submitted) (*see Methods*). A lentivirus expressing only CHIEF-Tomato (C1ql2-CHIEF-Tomato = C1ql2-vangl2 Ctl) or the CHIEF-Tomato-2A-CRE (C1ql2-vangl2^{Tomato/cre} = C1ql2-vangl2 cKO) was injected in the DG of 5 week-old *vangl2*^{fl/fl} mice (**Fig. 7a and Extended data Fig. 3**). Five weeks after infection, both the control and the C1ql2-vangl2 cKO mice display a strong expression of the tomato in the DG, along the rostro-causal axis (**Fig. 7a Extended data Fig. 3c**), with approximately 60% of GCs neurons expressing the Cre recombinase (**Extended data Fig.3e**, in white) and a 80% decrease of Vangl2 protein levels as compared to control group (**Extended data Fig. 3d**). Next, we tested C1ql2-vangl2 cKO mice in a contextual fear discrimination protocol as previously described (**Fig. 3a**). During block 1 (day 2 to 4), C1ql2-vangl2 cKO mice exhibit a higher level of freezing in the conditioning context compared to control mice (Two-way ANOVA, Context x Genotype interaction: $F_{(1, 110)} = 5.028$, $p = 0.0269$;

Genotype: $F_{(1, 110)} = 12.79$, $p = 0.0005$; Bonferroni's multiple comparisons test: Cond., control vs. C1ql2-vangl2, $p < 0.001$, **Fig. 7b**). This difference between C1ql2-vangl2 and controls persists during the block 2 (Two-way ANOVA, Context x Genotype: $F_{(1, 148)} = 3.971$, $p = 0.0481$; Genotype: $F_{(1, 148)} = 16.19$, $p < 0.0001$; Bonferroni's multiple comparisons test: Cond., control vs. CaMK-vangl2, $t_{(148)} = 4.254$, $p < 0.001^{***}$; **Fig. 7c**), even if control group has a higher level of freezing in conditioning context than in neutral context (Bonferroni's multiple comparisons test: Control, neutral vs. cond., $t_{(148)} = 4.254$, $p < 0.001$). Moreover, there is a global difference of the level of freezing in both contexts between C1ql2-vangl2 and controls across the 8 days of training (Three-way ANOVA (day 1 to 8), Genotype x context: $F_{(1, 7)} = 12.05$, $p = 0.0006$; Genotype: $F_{(1, 7)} = 29.21$, $p < 0.0001$; **Fig. 7d-e**), due to higher level of conditioned fear to the aversive context compared to neutral context in C1ql2-vangl2 cKO over the 8 days of test (Two-way ANOVA RM, Context (day 1 to 8): $F_{(1, 18)} = 14.68$, $p = 0.0012$), whereas control mice have a similar level of freezing in both contexts (Two-way ANOVA RM, Context (day 1 to 8): $F_{(1, 18)} = 1.685$, $p > 0.05$). Similarly to the CaMK-vangl2, C1ql2-vangl2 mice have higher level of conditioned fear to the aversive context compared to the control (Two-way ANOVA RM, Context (day 1 to 8): $F_{(1, 18)} = 13.95$, $p = 0.0015^{**}$; **Fig. 7d**), while lower but similar levels of freezing are observed in both groups in the neutral context (Two-way ANOVA RM, Context (day 1 to 8): $F_{(1, 18)} = 13.95$, $p > 0.05$; **Fig. 7e**).

We next tested 10 week-old control and C1ql2-vangl2 cKO mice in the Morris water using the protocol previously described (**Fig. 4a**). Both groups performed similarly in the visual and spatial learning task (**Fig. 7f**), and showed similar performances in the probe test all cue (Two-way ANOVA, Quadrant x Genotype interaction: $F_{(3, 108)} = 1.454$, $p = 0.2313$; Quadrant: $F_{(3, 108)} = 18.63$, $p < 0.0001$; Tukey's multiple comparison test: quadrant effect, target vs others, $p < 0.01$, **Fig. 7g**). On the other hand, when we removed spatial cues, C1ql2-vangl2 cKO mice were impaired in their ability to find the platform location, (Two-way ANOVA, Quadrant x Genotype interaction: $F_{(3, 108)} = 3.962$, $p = 0.0101$; Tukey's multiple comparison test: C1ql2-vangl2, target vs opposite, $p < 0.01^{**}$, target vs others, $p > 0.05$; Control, target vs opposite, $p < 0.0001^{***}$, target vs others, $p < 0.05^*$; **Fig. 7h**). Both groups were lost in the no cue condition (**Fig. 7i**). Altogether, these results show that the late and DG-specific loss of *vangl2* leads to an improvement of pattern separation and deficits in pattern completion.

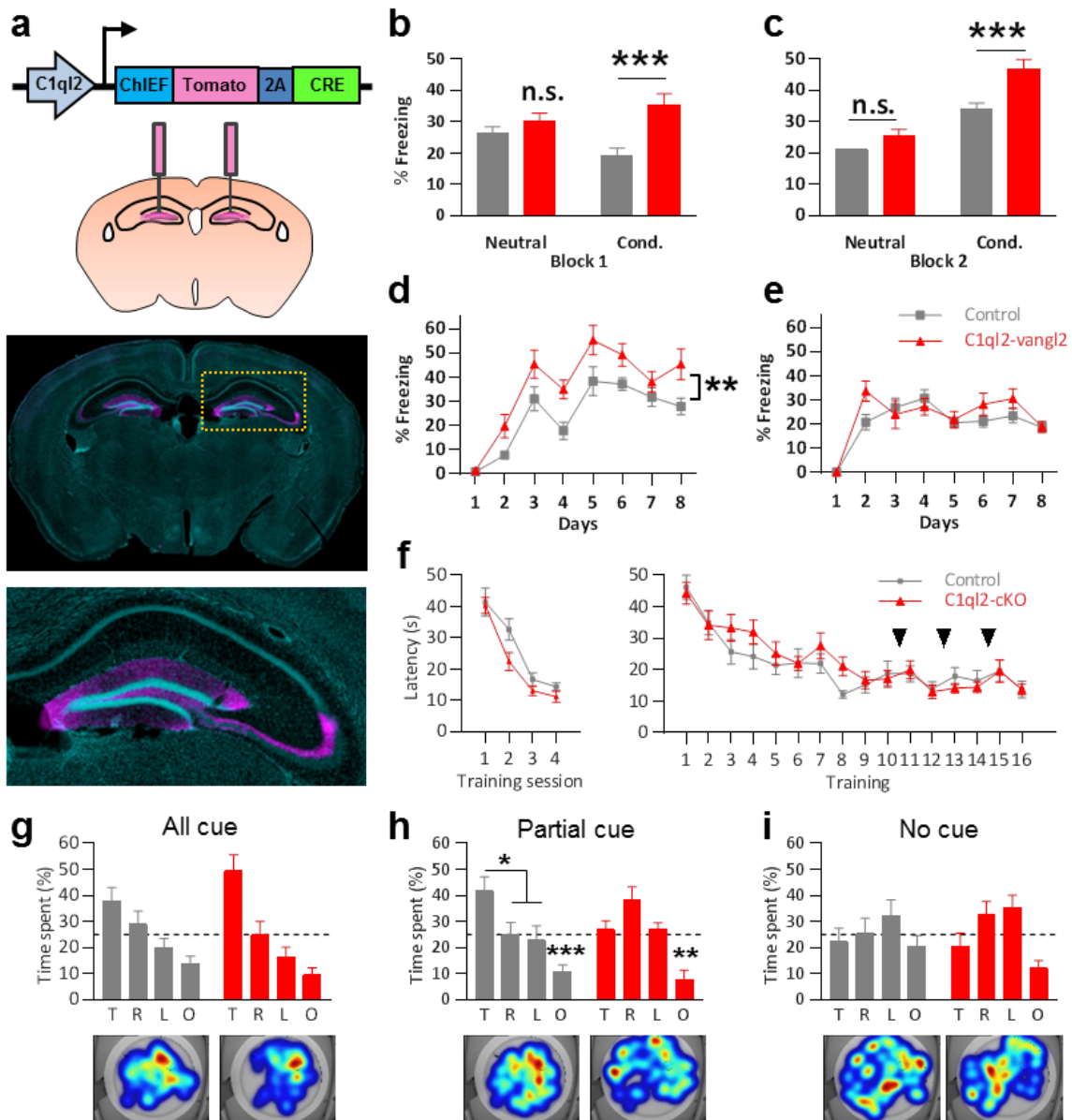


Figure 7. C1ql2-vangl2 cKO mice exhibit deficits in spatial pattern completion and exhibit better performance in contextual fear discrimination task requiring pattern separation

(a) Schematic representation of the transgene carried by the AAV injected bilaterally in the dentate gyrus (left) and, (right) brain slice of an injected mice after behavioral experiment (ChIEF-tomato in magenta). (b-c) Mean of freezing of both groups in neutral or conditioning context (b) during the first block, (c) during the second block of training. (d-e) Percentage of freezing during the 8 days, (d) in the neutral context (e) in the conditioning context. The deletion of Vangl2 leads to an improvement of the ‘pattern separation’ in a fear conditioning task. (f) C1ql2-vangl2 mice exhibit a normal visual and spatial learning during the training in water maze. Black arrows represent probe tests. (g-i) Bars show the percentage of time spent in each quadrant (g) with all cues, both groups spent much more time in the target PPF compared to others quadrants; (h) with partial cues, only control mice spent more time in target compared to all others while C1ql2-vangl2 spend the same time in all PPF); (i) without any cue, both groups are lost in the water maze. Dotted lines represent the 25% chance to spend time in a PPF randomly. T: Target, R: Right, L: Left, O: Opposite.

Discussion

In this study, we identify the core PCP protein Vangl2 as an important and specific regulator of hippocampus maturation and function. We demonstrate that early or late deletion of *vangl2*, while sparing abilities to learn hippocampus-dependent task, affect specific cognitive processes of memory that rely on the DG/CA3 network, namely 'pattern completion' and 'pattern separation'. Importantly, the absence of *vangl2* in the DG is sufficient to affect both processes suggesting that Vangl2 participates in a functional balance between these two processes in the mature brain.

The core PCP protein Vangl2 affects hippocampus maturation and connectivity

In the recent years, only a few studies used either conditional deletion of core PCP genes or shRNA to bypass the severe anatomical deficits and neonatal lethality consecutive to an absence of PCP signaling in mammals. The main target of core PCP signaling is a modulation of the cytoskeleton (Babayeva *et al.*, 2011). It is therefore expected that Vangl2 would regulate the branching of the dendritic tree and the density of spines in the brain.

Our *in vivo* results paint a complex picture of the absence of *vangl2* expression in the developing and adult hippocampus, both in the dendritic arborization complexity as well as in the density of spines between the various molecular layers of the DG. As a result, the connectivity of various networks can be affected, with diverse functional consequences. Contrasting with our results, recent papers reported that *in vitro* downregulation of *vangl2* via shRNA or using the Vangl2^{Lp} mutant leads to a global decrease in dendritic arborization and/or spine number in dissociated hippocampal or cortical neurons (Hagiwara *et al.*, 2014; Nagaoka *et al.*, 2014; Okerlund *et al.*, 2016), while Schafer *et al.*, (2015) reported a similar reduction in dendritic tree complexity of newborn granule cells after silencing Fz3 or Celsr2 & 3 (but not Celsr1) in the adult DG *in vivo*. On the other hand, Zou and colleagues reported an increase in excitatory synaptic density in the CA1 synaptic region in a postnatal conditional *vangl2* cKO (Thakar *et al.*, 2017), but restricted their analysis to the stratum radiatum.

We also report a dynamic distribution of the protein during the maturation of GCs, with an enrichment of Vangl2 in the cell body of immature postmitotic neurons and redistribution

in neurites in the mature GCs. This profile of expression seems to correlate with a dual functional impact as observed when *vangl2* is deleted: delayed maturation of immature GCs, and disruption of neuritogenesis in more mature GCs. Cautions should be used in the generalization of the role of PCP signaling in developing and adult brain in the absence of proper and convincing protein profile of expression of each core PCP member. Similarly, comparison between core PCP genes should be carefully done with respect to the evolution of function of these genes. One of the best examples is *flamingo*, the atypical large cadherin and most upstream core PCP protein that fulfil a "classical" core PCP function in epithelia, while controlling also axonal guidance in drosophila neurons (Lee *et al.*, 2003). In mammals however, these two functions appear to have been segregated, with *Celsr1* conserving a bone-fide core PCP function affecting the PCP of inner ear epithelia, while *Celsr3* has little impact on epithelial PCP but is important for axonal guidance (Montcouquiol, Tissir, unpublished data; Feng *et al.*, 2012). This multiplicity might explain the lack of expected phenotypes in shRNA experiments, with only one of the member downregulated (Schafer, 2015). A parsimonious view at this time is that PCP signaling participates in shaping the development of the brain but also participates in later functional circuitry, and we need to identify these circuits to understand the role of each core PCP gene in specific cognitive function and associated pathological deficits.

New role for Vangl2 in hippocampal cognitive functions

Classic computational theories of the mnemonic functions of the hippocampus suggest that the CA3 within the hippocampus mediates pattern completion while the dentate gyrus mediates pattern separation, with both processes competing to give an adaptive response based on environmental demand (Newman & Hasselmo, 2014). Recently, a study from Nakashiba *et al.* (2012) suggested that while young adult-born GCs play a crucial role in pattern separation, mature GCs are required for rapid pattern completion. Our results with the *vangl2* mutants suggest that Vangl2 protein is required in the DG, in developing and adult stages, to maintain a balance between pattern separation and pattern completion, notably by modulating GCs maturation. The observation of a putative balance between the two memory processes fits with a small but growing literature suggesting that spatial pattern completion becomes prevalent in human as a result of normal aging, and at the expense of pattern separation, possibly due to age-related changes in subregions of

the hippocampus and notably a decrease in neurogenesis in the DG (Stark *et al.*, 2010; Yassa *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2006; Holden & Gilbert 2012). But if adult neurogenesis appears to support pattern separation mechanism (Sahay *et al.*, 2011), our study demonstrates that by simply maintaining postnatal GCs in an immature state and/or shaping GCs neurite arborization, we can modulate both pattern completion and separation processes.

Even if *vangl2* mutation leads to pattern separation and pattern completion alteration, it did not affect all hippocampal-dependent processes. As such, the various *vangl2* cKO mice in our study do not exhibit “classic” spatial memory deficits in a Morris water maze. Moreover, we did not observe a disruption in Mf/CA3 synaptic transmission with the loss of Vangl2. These results suggest specific roles for the protein depending on the hippocampal-dependent network affected. Two recent studies using conditional mutant mice for *Celsr3* reported deficits in water-maze, Barnes maze and contextual fear-conditioning tests (Feng *et al.*, 2012; Thakar *et al.*, 2017). Both studies have however technical issues, as the water-maze in one of them is done on very young mice (P17-P21), while in the other one, an inducible SLICK-A-CreER line is used to delete *Celsr3*. This line is somewhat problematic for evaluating specific hippocampus function because of a leaky recombination in several cerebral structures even in the absence of tamoxifen injection (Heimer-McGinn & Young, 2011).

Vangl2 in pathological context

Vangl1 & 2 mutations have been reported in patients, with variability in terms of phenotypic consequences, including systematic forms of neural tube defects, and frequent hydrocephalus combined with Chiari II (Arnold-Chiari) malformation. The presence of hydrocephalus prevents accurate evaluation of specific cognitive disruption in these patients, but our model mutants suggest a role for *vangl2* in the context of a pathological brain. Emerging evidence suggests that maturation of GCs is a key factor for mental health. An “immature dentate gyrus” has been associated with several neuropsychiatric pathologies such as schizophrenia and bipolar disorders that could lead to pattern separation deficits (Tamminga *et al.*, 2012; Hagihara *et al.*, 2013). But in these studies, the number of immature cell in the DG is dramatically increased, much more so than in our mutants, while the number of mature neurons is highly decreased (Altar *et al.*, 2005; Ohira

et al., 2013; Walton *et al.*, 2012; Yamasaki *et al.*, 2008) leading the DG to transmit non-orthogonalized information to the CA3 and resulting an overgeneralization. Also, it is believed that discrimination processes are malfunctioning during posttraumatic stress disorder (PTSD), making overlapping informations even more overlapping thereby leading to memory confusion, and therefore to an overgeneralization (Kheirberg *et al.*, 2012). On the other hand, recent studies report that patients with emotional affects, such as anxiety or depression, and patients with autism spectrum disorder (ASD) and intellectual disabilities (ID) are more likely to overdiscriminate (Shelton & Kirwan, 2013; South *et al.*, 2015). Several PCP core genes were identified as susceptibility genes for ASD and ID syndromes (Sans *et al.*, 2016). Vangl2 and others PCP genes could participate to the development and support the functions related to the hippocampus, participating to the equilibrium of the balance it could exist between pattern separation and pattern completion, which are altered in ASD related pathologies.

Methods

Conditional knock-out mice generation.

Experiments were approved by the local ethical committee of the University of Bordeaux (approval numbers 5012046-A; 01932.01; 01932.02). Male C57BL/6N mice were purchased from Janvier (France). *vangl2*-flox mice, obtained from Dr. Deborah Henderson, had been crossed to C57BL/6 for at least 5 generations before being used for experiments (Ramsbottom et al, 2014). CamKII-Cre line (Casanova *et al.*, 2001) obtained from Prof. Dr. Günther Schütz and colleagues (Max Plank, Germany), were intercrossed with the *vangl2*-flox line and B6.Cg-Gt(Rosa)26Sortm6(CAG-ZsGreen1)Hze/J (Ai6) mice (Jackson Laboratory). Mice were genotyped using genomic DNA isolated from tails using primers: forward: CCGCTGGCTTTCCTGCTGCTG; reverse: TCCTCGCCATCCCACCCTCG. The PCR products of floxed (*Vangl2^{f/f}*) and recombined-floxed (*Vangl2^{Δf/f}*) allele of *vangl2* are 541 bp and 193 bp long, respectively (see Figure 1). The presence of Cre-expressing transgene was detected by PCR amplification of a 240 bp product for CaMKII-Cre. Beta-actin was used as a positive control for PCR amplification. All mice were maintained on the C57BL/6 background (Charles River). Mice were maintained under standard conditions (food and water ad libitum; 23 ± 1°C, 7 h–12 h light–dark cycle, light on at 7:00; experiments were performed between 9:00 and 17:00). Only male mice were used for behavioural experiments, and were housed collectively in groups of five to eight in polypropylene cages for biochemical experiments and in individual cages for behavioral experiments.

C1ql2 Plasmids, lentivirus and AAV virus generation and stereotaxic injection.

We used a lentiviral bicistronic construct developed recently (Barthet *et al.*, in preparation) to control the expression of both ChIEF (a variant of Chr2 see (Lin *et al.*, 2009)) fused to the red fluorescent protein tomato and the Cre recombinase. The expression of the transgenes was driven by a minimal promoter of *C1ql2*, a gene expressed specifically in the GCs of the hippocampus (Iijima *et al.*, 2010). The lentiviruses were produced by the TransBioMed viral vectors facility of Bordeaux. The lentiviruses used here are based on the pRRLsin-PGK-MCS-WPRE plasmid where PGK promoter has been exchanged with the *C1ql2* minimal promoter including a 3' region of the promoter rich in CpG islands and part of the 5' untranslated region of the mRNA sequence. This sequence was cloned from mouse genomic DNA using the following primers EcoRV/*C1ql2*-F:

ATATATGATATCagcaccacatagcagc; BamH1/C1ql2-R: ATATATGGATCCgctctggaactgatctg. The 1.3kb sequence was then inserted between EcoRV and BamH1 restriction sites of the lentiviral backbone. After the promoter, the following cDNA sequences were inserted in the 5' to 3' order: ChIEFtomato, 2A peptide from porcine teschovirus-1 (Szymczak-Workman *et al.*, 2012), finally the Cre recombinase or the eGFP. Plasmids were sequenced and transformed in E.coli Stbl3 (Thermo Fisher) then amplified with QIAGEN's Endofree Maxiprep Kit and eluted in Tris-EDTA buffer (Sigma).

We used an Adeno-associated virus (AAV2/9-CaMKII(0.4)-mCherry-2A-mVANGL2-WPRE) construct purchased from Vectors Biolabs (Malvern, PA 19355) to re-express *vangl2* in the DG GCs with a mCherry fluorescent reporter. *Vangl2* and mCherry transgenes were driven by a CaMKII (0.4 Kb) promoter, restricting the expression in the excitatory post-mitotic neurons, with a T2A peptide linker in between for self-cleavage co-expression. The virus titer was 5.9×10^{13} GC/ml in distilled PBS with 5% glycerol and was used at 1:30 in dPBS. As a control, we used a AAV2/9-CaMKII(0.4)-mCherry-WPRE with an original titer of 6.0×10^{13} GC/ml in dPBS with 5% glycerol diluted at 1:30 in dPBS.

Five-week old *vangl2*-flox mice were anesthetized with isoflurane and injected in IP with 10% Buprecare and locally with 50% Lurocaine. They received bilateral microinjections of lentivirus control or expressing the cre recombinase (300 nl per minute) in the DG region of hippocampus (anteroposterior [Y] -2 mm from bregma, mediolateral [X] \pm 2 mm, dorsoventral [Z] -2 mm).

Immunohistochemistry.

Vangl2/Dcx/CaR/Ki67/DsRed/Cre immunohistochemistry, animals were perfused transcardially with phosphate buffer (PB) followed by 4% paraformaldehyde (PFA), brains were removed and fixed in 4% PFA for 2 h at 4°C. Coronal vibratome sections (40 μ m) were obtained and incubated with primary antibody (see list) overnight (CaR, Ki67 and Cre) or 24 hours (Vangl2 and DCX) at 4°C, followed by Alexa secondary antibodies for 45 min at room temperature (RT). Images were acquired with a Leica DM6000 microscope and CoolSNAPHQ2 camera (PhotoMetrics) or a Zeiss AxioImager Z1 and an AxioCam MRm. For the quantification of CaR neurons in the DG subgranular layer, positive neurons were counted live on a Zeiss AxioImager Z1 and an AxioCam MRm, with Nanozoomer (Hamamatsu). For the quantification of Dcx neurons in the DG subgranular layer, pictures

were taken with the same exposure time for all genotypes on a Zeiss AxioImager Z1 and an AxioCam MRm. CaR and Dcx positive neurons were then counted and averaged per hippocampus per brain in 3 different mice for each genotype.

For Calretinin/Vgat/NL2 immunohistochemistry, animals were anaesthetized with ketamine/xylazine and perfused transcardially with ice-cold modified artificial cerebrospinal fluid (ACSF), equilibrated with 95% O₂–5% CO₂, and containing: 130 mM NaCl, 3 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.3 mM MgSO₄, 0.58 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, and 10 mM glucose. The brain were removed and a 5 mm thick-slice containing the hippocampus was dissected out, post-fixed in 4% PAF for 1 hour, and then cryoprotected overnight in 20% PBS-sucrose before being cut into 50-µm thick coronal sections using a cryostat (Leica) (Du *et al.*, 2016). Coronal sections were first incubated for 1 hour in blocking PBS solution containing 4% donkey serum and 0.3% Triton X-100 (Sigma, St. Quentin Fallavier, France). They were then incubated for 72 hours at 4°C with primary antibodies (see list) diluted with the blocking solution, followed by one hour in blocking solution containing a cocktail of secondary antibodies. Images were acquired with a BX51 Olympus Fluoview 500 confocal microscope using an oil-immersion 60 × objective and 1.4 NA. Calretinin labelling was used to draw the outline of identified cells and define regions of interest. Quantification of the number of receptor clusters on the cell periphery was performed using a custom-made macro in ImageJ software. Counts were carried out on brains obtained from four mice for each genotype.

Antibodies			
Mouse anti-Calretinin	1/2000	SySy	Ref 214 111
Rabbit anti-Calretinin	1/4000	Swant	Ref 7699/4
Guinea Pig anti-Doublecortin X	1/2000	Millipore	Ref AB2253
Guinea Pig anti-NL2	1/1000	SySy	Ref 129205
Mouse anti-Cre Recombinase	1/500	Merck Millipore	Ref MAB3120
Living Colors® DsRed Polyclonal Ab	1/1000	Clontech	Ref 632496
Goat VGAT	1/1000	Frontier Institute	Ref Af620
Chicken anti-GFP	1/600	Abcam	Ref Ab13970
Rabbit anti-vangl2	1/1000	Montcouquiol <i>et al.</i> , 2006	Ref 456
Rabbit anti-Dsred	1/1000	Living colors	Ref 632496
Goat anti-Rabbit Alexa 488	1/2000	Invitrogen	Ref A11034
Goat anti-Rabbit Alexa 546	1/1000	Invitrogen	Ref A11035
Goat anti-Guinea Pig Alexa 488	1/1000	Invitrogen	Ref A11073
Goat anti-Rabbit Cy3	1/1200	Jackson ImmunoResearch	Ref 111-165-144

Tissue extracts, SDS-PAGE and immunoblot analysis.

For each set of experiments, three or more hippocampi from 10 week-old mice of each genotype were processed as described (Sans *et al.*, 2000, 2001). Protein concentrations were measured using a BCA assay (Pierce, Rockford, IL) or a Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA), and equal amount of proteins were separated with SDS-PAGE (8 or 4–20% gradient gels) and transferred to Immobilon-P membranes. After chemiluminescence detection, films were scanned using a Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA) densitometer. The quantifications were performed as described previously (Wenthold *et al.*, 1996; Sans *et al.*, 2001).

Golgi impregnation method.

Ten week-old adult animals were perfused transcardially with 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.4. Vibratome brain sections of 100 μm were treated for 30 min with PB containing 1% osmium tetroxide, followed by an overnight incubation in 3.5% potassium dichromate, and a 2% silver nitrate solution for 6 h. After gradual dehydration in alcohol, sections were infiltrated with Entellan[®] and mounted. For morphological analysis, at least 10–20 CA1-pyramidal neurons of the dorsal hippocampus were analyzed for each animal using camera lucida at a magnification of 100 μm (DMLS Microscope, Leica). For each neuron, all branches of basal and apical dendritic trees were reconstructed. Dendritic length was measured by Sholl analysis with respect to growing distance from the cell body. Dendritic complexity was quantified by counting the number of intersections between virtual concentric rings of 10 μm and dendritic branches. For analysis of spine density and morphology, 10 μm dendritic segments were identified, and number of spines present and their head size were measured as described previously (Sans *et al.*, 2005).

Timm's staining.

The FD Rapid TimmStain Kit[™] of FD NeuroTechnologies, Inc. was used for this experiment. Ten week old adult animals were perfused transcardially for 10 minutes with the perfusate A and B freshly made, immediately followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.4 for 10 minutes (around 100 ml for each solution). After 24 hours postfixation in 4% PFA at 4°C vibratome sections of 50 μm of the brain were done and mounted on gelatin coated slides and dried for 48 hours at RT. Sections were incubated in the staining solution (made

freshly by mixing TimmStain Kit's solutions A, B, C and D) for 50 minutes at 30°C in the dark with a gentle shaking. After gently wash under running water of 30 minutes, sections were gradually dehydrated in alcohol, clear in xylene and mounted with Entellan.

Quantification of dendritic spines

Eight to nine-weeks old CaMKII-Cre/Vangl2f/f mice received unilateral stereotaxic microinjections of a lentivirus (1000nL at 300 nL per minute) expressing YFP under the control of the promoter HubC (FUGW_MyrPalmYFP_FUMPY, titer 2.18x10⁷ GC/mL) in the Dentate Gyrus region of hippocampus (anteroposterior [Y] -2 mm from bregma, mediolateral [X] ± 2 mm, dorsoventral [Z] -2 mm). Ten days after surgery, the animals were perfused transcardially with PB followed by 4% paraformaldehyde, the brains were removed and postfixed in 4% paraformaldehyde for 24h at 4°C. Free-floating vibratome coronal sections (50µm) were incubated with anti-GFP and anti-calretinine (rabbit) primary antibodies at 4°C overnight, followed by secondary antibodies for 1h at RT. Stacks of images were acquired with a confocal microscope (Leica SPE, oil objective x63, zoom 2.5) and the molecular layer of the DG was divided into 3 layers: Inner (IML, visualized with calretinine-positive staining), Middle (MML) and Outer (OML). The number of spines were counted and classified with the software NeuronStudio (Rodriguez et al, 2008). For each animal, 20 samples of 10µm of dendrites were analyzed per layer. Normality of distribution was assessed with a D'Agostino & Pearson normality test. When normal, the data were analyzed with an unpaired t-test, otherwise they were analyzed with a Mann-Whitney test.

Slice preparation

Parasagittal hippocampal slices (310-330 µm thick) were obtained in 10-13 week-old mice. Animals were anesthetized with intra-peritoneal ketamine/xylazine injection (75 and 10 mg per kg, respectively). After checking their reflexes, decapitation was performed. The brain was quickly removed and immersed in ice-cold cutting solution (the composition is given below). The hemispheres were separated by a sagittal cut in the corpus callosum and each one was glued and mounted on the vibratome (Leica VT 1200S, Leica Microsystems, Germany). Brain slices were made with by a razor blade with an angle of ~17° at 0.05 mm/s.

All the preparation was performed under oxygenation (95% O₂ and 5% CO₂), in an ice-cold cutting solution. For 10-13 weeks old mice the following solution was used (in mM): 87

NaCl, 25 NaHCO₃, 10 Glucose, 75 Sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, and 7 MgCl₂. Right after slicing, slices were then transferred into a bath at 35°C during 30 min for recovery, and were then placed at room temperature for the rest of the day.

Electrophysiological recordings

Slices were transferred to a recording chamber in which they were continuously superfused with an oxygenated extracellular medium (95% O₂ and 5% CO₂) containing (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2.3 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 glucose, pH 7.4. Bicuculline (10 μM) and CGP 55845 (3 μM) were present in all experiments in order to block GABA_A and GABA_B receptors respectively. Recordings were performed at room temperature in voltage-clamp or current clamp mode from CA3-PCs using borosilicate pipettes (Harvard apparatus 1.5 OD x 0.86 ID) pulled with micropipette puller (P97, Sutter Instruments, Novato, CA), which had resistances between 3 and 4.5 MΩ. The patch electrodes were filled with a solution containing (mM): 140 CsCH₃SO₃, 2 MgCl₂, 4 NaCl, 5 phospho-creatine, 2 Na₂ATP, 0.2 EGTA, 10 HEPES, 0.33 GTP, pH 7.3 adjusted with CsOH. In the experiments presented in figure x the EGTA concentration was raised to 20 mM.

Evoked EPSCs were recorded in CA3 PCs in the whole-cell patch clamp mode by stimulating with a glass pipette the dentate gyrus to activate Mfs. Mf-CA3 EPSCs were evoked by minimal intensity stimulation according to the protocol described previously (Marchal & Mulle, 2004; Sachidhanandam *et al.*, 2009). A glass microelectrode was placed in the hilus of the dentate gyrus to stimulate mf. While recording from a CA3 PC, the stimulating electrode was moved to a position where a sharp EPSC with fixed latency was evoked. Stimulation intensity was adjusted just above the sharp threshold for activation of a synaptic response. Using such low minimal stimulations, no prominent polysynaptic activation was observed. Mf stimulation was assessed by its large dynamic range of short-term facilitation (40 ms paired pulse ratio > 2 or 1 Hz/0.1 Hz ratio > 4). At the end of some of the experiments LCCG-I (10 μM), an mGluR2 agonist, was used to confirm the Mf origin of the EPSCs.

For estimation of the content of iGluRs at mf-CA3 synapse CA3-PCs were kept a +40 mV in the presence of bicuculline (10 μM) and CGP 55845 (3 μM). At first total-Mf-EPSCs were recorded by stimulating Mf-CA3 synapse every 10 seconds. Subsequently we added AMPAR antagonist LY303070 (25 μM) and then the NMDAR antagonist D-AP5 (50 μM).

After the application of each drug we have waited 10-15 minutes to ensure a maximal effect of the blocker. For each pharmacological condition 15-20 sweeps were averaged. AMPA-EPSC was obtained by the subtraction of the EPSC obtained after the application LY303070 from the total-EPSC. KAR-EPSC was determined by the residual current remained after the application of LY303070 and D-AP5. NMDAR-EPSC was estimated by the subtraction of the KAR-EPSC from the EPSC obtained after the application of LY303070. At the end the experiment AMPA/KAR antagonist NBQX (20 μ M) was added to ensure the total blockade of the synaptic current.

Drugs

All drugs were obtained from Tocris Cookson (Bristol, UK), Sigma (St. Louis, MO) or Ascent Scientific (Bristol, UK.).

Data acquisition and analysis

Recordings were made *via* Patchmaster 2.71 using an EPC10 amplifier (HEKA Elektronik, Lambrecht/ Pfalz, Germany), filtered at 0.5–1kHz, digitized at 5 kHz, and stored on a personal computer. Analysis was performed using Neuromatic (www.neuromatic.thinkrandom.com) written within the Igor Pro 6.0 environment (WaveMetrics, Lake Oswego, OR). Values are presented as mean \pm s.e.m. Either a paired or unpaired non-parametric tests were used to assess statistical differences between values using Prism 7. No statistical methods were used to predetermine sample sizes, but our sample sizes are similar to those generally employed in the field. No data point (outliers) was removed from the collected datasets. N mentioned in the paper represents a single measurement from a single cell. We considered biological replication each different cell. During both the experiments and the analysis the experimenter was blind to the genotype of the animal used.

Behavioral testing.

Behavioral experiments were conducted during the light phase of a 12 h light/dark cycle, under conditions of dim light and low noise. All animals had been weighed twice a week from 8 to 18 weeks of age. Mice were tested in activity cages for their locomotor activity, in open field test for their exploratory activity and anxiety-like behavior, and in Morris water maze for their spatial learning and memory performances.

Locomotor activity. Locomotor activity in response to daily activity rhythm was assessed in photocell-based individual Plexiglas chambers (18.2x12x22 cm) equipped with infrared sensors. Chambers were interconnected and linked to a computer using an electronic interface (Imetronic) where activity data were collected. Habituation to the apparatus during 180 min time course in which response to novelty in 5 min bouts was measured, and followed by 72 h of recording to measure circadian activities (in 1 h bouts). Repeated-measures ANOVA test was used to determine significance.

Y-Maze. The Y-maze is a behavioral test that assesses the exploration of mice in a new environment and the short term memory, based on measuring the spontaneous alternation. The apparatus is a Y shaped maze with 3 white plastic arms with a length of 30 cm, width of 8 cm and wall height of 12 cm. The mice are placed in the middle of the maze and allowed to freely explore each arms during 5 min. After the test, the mice are returned in their homecage. The percentage of alternation and the distance moved in each arm are measured.

Plus Maze. The elevated plus maze test allows a measure of anxiety-related behavior. The apparatus is a cross shaped maze with two open (30 x 5 cm) and two closed (30 x 5 x 20cm) opposed arms with a central platform in the center of the cross (5 x 5 cm). The walls of the closed arms are black, the floor of the maze is white and the maze is elevated 1 meter above the ground. The mice are placed in the central platform and allowed to freely explore each arms during 5 min. After the test, the mice are returned in their homecage. The time spent and the numbers of entries in open and closed arms are measured.

Open Field. The open field test evaluates the global locomotor activity and the exploration of a new environment. The open field is a square shaped arena (40x40cm) with wall height of 40cm. The mice are placed in the center of the arena and allowed to freely explore the environment during 10 min. After the test, the mice are returned in their homecage during 30 min. An object is set in the center of the arena and the mice are replaced in the open field during 10 min, with the object. The mice are finally returned in their homecage. The percentage of time spent and distance moved in the center of the arena are measured to assess the exploration of the new object in the known arena.

Light/dark box. The Light/dark box tests the anxiety-related behavior using the innate willingness of exploration and aversion of brightness in mice. The apparatus is a box (40x20cm) divided in two, a bright and a dark compartment separated by a wall with a hole that allows the mice to go freely from one compartment to the other. The mice are placed in the bright box and allowed to freely explore each compartment during 5 min. After the test, the mice are returned in their homecage. The time spent and distance moved in bright and dark boxes are measured.

Water Maze / Pattern completion. In this experiment, the water maze evaluates the ability of mice to orient them in space, using spatial cues to find a platform that allows them to escape the water. When mice have learned the spatial map to find this platform, some cues are removed. The mice have to find the platform with the remaining cues. We test here the ability of rebuilding the spatial map named “pattern completion”. The apparatus is a circular arena (\varnothing 150cm) filled with water (19-20°C) mixed with white nontoxic dye. A video camera fixed to the ceiling of the room was used to collect and transmit data to a computerized tracking system (Viewpoint) located in an adjacent room. The experiment have three phases, visual learning, spatial learning and probe tests. Visual learning: First, the mice are tested in their capability to swim, their willingness to escape the water and their visual acuity. The platform is cued and the mice are allowed to freely swim in the water mice during 1min. If the mice find the platform, they are returned in their homecage. Otherwise they are guided to the escape platform. The latency to reach the platform is measured to assess the visual learning. Spatial learning: Next, when the mice have learned how to find the platform, the cue is removed to allow the spatial learning. The mice have to use the external spatial cues placed around the water maze to localize the platform. They are put in the water with a different starting point and they are allowed to swim freely during 1min. The latency to reach the platform is measured to assess the spatial learning. Strategies to locate the platform were quantified manually and blindly regarding the genotype and classified adapting criteria from Brody & Holtzman, 2006). Probe tests: Three probe tests are used to confirm the spatial learning and the “pattern completion” during which platform is removed. The mice are placed in the water maze and allowed to swim freely during 1min. The latency to reach the phantom platform (PPF, means the platform location), the time spent and the distance moved in this PPF are measured. First, the probe test “all cues” evaluates the spatial learning of the mice. Next,

the probe test “partial cues” in which the most of the cues are removed assesses the “pattern completion”. Finally, the probe test “no cue” in which all the cues are removed allows to show the specificity of the previous spatial learning and “pattern completion” probe tests. Between each probe test, mice have a spatial training to avoid extinction.

Radial Maze / Pattern Separation. In this experiment, the radial maze allows us to evaluate the ability of the mice to discriminate similar informations before their storage named “pattern separation”. The apparatus is an elevated 8-arm maze with a central platform. At each end of arm, there is a dispenser of pellet of food. The opening and closure of each arm is automatic. The test uses the ability of mice to choose the non-visited arm to get the pellet. After have visited an arm, the mice have to choose between two arms, the previous one, already visited with no more food, and the new one with a pellet of food. The mice have to learn this rule to get the food, if they choose the new one it is a correct answer otherwise it is wrong. To assess the use of the “pattern separation”, the angle between the two arms is different for each trial. Bigger is the separation, higher is the difficulty of the test and more used is the “pattern separation”. The mice are placed in the center platform and can freely explore the opened arm to get the food. When the mice are back in the middle, the arm is closed. Then the previous arm and a new one (with the food) are opened. The mice have to choose one arm to get the food. Next the mice go back in the middle, the arms are closed and a new session begins, with new random arms. The training lasts 8 days during which corrects answers are measured.

Fear conditioning / Pattern Separation. Every day during 8 days, the mice are exposed to two similar contexts, in the morning and in the afternoon in a pseudo-random manner. These two contexts are similar in volume (10m^3) and brightness (80 lux), but differed by the experimental materials they contained and by the cues placed on their walls. Thus, these two contexts only differed in their background distal cues, proximal cues provided by the conditioning chamber remaining the same across testing. Moreover, in order to limit the possibility of a simple direct association between the US and one particular static contextual feature, an effort was made to prevent any of the distal cues to be more salient than the other ones.

In the conditioning context (C), mice are placed in a chamber during 2 minutes, then exposed to a 2 minutes tone (1000Hz – 63dB) spaced of 30 seconds from a mild foot-shock

(0,4 mA – 1s) (trace conditioning). The tone, being the most salient (phasic) cue present in both contexts is used in order to contrast with all the other (tonic) contextual cues, preventing thereby a “contextual” discrimination based on an elemental strategy: its saliency limits any potential simple association between a simple tonic contextual cue and the US. In the neutral context (N), mice never receive any foot-shock. We quantified the freezing behavioral response (blind analysis) defined as a complete immobility lasting more than one second (except for respiratory movements). In order to quantify the contextual discrimination, we measured the freezing time during the first 2 minutes exposure to each context, using the tone period as an internal control (data not shown). The freezing in each context is measured to evaluate the contextual fear conditioning and the comparison between the freezing in the neutral and the conditioning context allows us to assess the “pattern separation”.

Data collection and statistical analyses. No method of randomization to assign experimental groups was performed but they are similar to those reported in previous publications (Moreau *et al.*, 2010; Hilal *et al.*, 2016). Data collection and analysis were performed blind to the conditions of the experiment. All animals were assigned randomly to the different experimental conditions. Normality and homogeneity of variances from the samples were tested with Shapiro-Wilk test and Bartlett test respectively. If data were parametric, Student’s t-test (two comparisons), ANOVA 1-way (multiple comparisons), ANOVA 2-way or ANOVA 3-way were used. Otherwise non-parametric tests were used (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis). When significant interaction effects of main factors were detected, post-hoc analyses, recommended by GraphPad Prism 7 software (Bonferroni’s, Sidak’s or Tukey’s for ANOVA and Dunn’s for Kruskal-Wallis), were performed. Effects with p values ≤ 0.05 are reported as significant.

Acknowledgements

We thank Prof. Dr G. Schütz and colleagues for the CaMKII Cre mice (DKFZ, Germany). We also thank Chantal Medina, Maureen Decroo, Shaam Al-Abed, Emma Navarro, Arnaldo Ferreira for technical assistance; We thank all the personnel of the Animal Facility of the Neurocentre Magendie for mouse care, notably Melyssa Jacquet; of the genotyping facility, notably Delphine Gonzales and her team, the “Biochemistry and Biophysics Facility” of

Bordeaux Neurocampus and notably Jean-Michel Blanc. All these facilities are funded by the Labex B.R.A.I.N. (ANR-10-LABX-43).

Funding

This work was supported by INSERM, ANR MossyPCP ANR-12-BSV4-0016-01 (NS,CM, AM), Conseil Régional d'Aquitaine (NS), Neurocampus program (MM), La Fondation pour la Recherche Médicale, Equipe FRM 2016, DEQ20160334899 (MM). BJAR was an INSERM/CRA Ph.D. fellow and also received funding for a 4th year from the LABEX BRAIN; SDSC was supported by an ENC Neurasmus Ph.D. fellowship and FRM 4eme annee FDT20150532542. AQ is funded by La Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, SPF20150934238). The Bordeaux Neurocampus teams are all part of the Labex B.R.A.I.N. (ANR-10-LABX-43).

Author Contributions

Author contributions: NS, MM, AD, AM designed research and obtained the different fundings; BJAR, MMM, BA performed the behavioral analysis; with the help of LBB, CG, & AD; BJAR, SDSC, AQ, MG, CR performed the morphological analysis; BG, MC, SF & BJAR performed the electrophysiological experiments; BG, RP, JRM design and produced the constructs and viral preparation; BJAR., M.M.M., AD, AM and N.S. analyzed data; BJAR, MM and N.S. wrote the paper; All the authors commented on the paper.

References

- Altar, C. A. *et al.* Deficient hippocampal neuron expression of proteasome, ubiquitin, and mitochondrial genes in multiple schizophrenia cohorts. *Biol. Psychiatry* **58**, 85–96 (2005).
- Arruda-Carvalho, M. *et al.* Conditional deletion of α -CaMKII impairs integration of adult-generated granule cells into dentate gyrus circuits and hippocampus-dependent learning. *J. Neurosci.* **34**, 11919–11928 (2014).
- Babayeva, S., Zilber, Y. & Torban, E. Planar cell polarity pathway regulates actin rearrangement, cell shape, motility, and nephrin distribution in podocytes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **300**, F549–560 (2011).
- Bellaïche, Y., Gho, M., Kaltschmidt, J. A., Brand, A. H. & Schweisguth, F. Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* **3**, 50–57 (2001).
- Casanova, E. *et al.* A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis* **31**, 37–42 (2001).
- Clelland, C. D. *et al.* A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* **325**, 210–213 (2009).
- Copp, A. J. & Greene, N. D. E. Neural tube defects – disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **2**, 213–227 (2013).
- Deng, W., Mayford, M. & Gage, F. H. Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *eLife Sciences* **2**, e00312 (2013).
- Desmedt, A., Marighetto, A., Garcia, R. & Jaffard, R. The effects of ibotenic hippocampal lesions on discriminative fear conditioning to context in mice: impairment or facilitation depending on the associative value of a phasic explicit cue. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 1953–1963 (2003).
- Du, Z. *et al.* Early GABAergic transmission defects in the external globus pallidus and rest/activity rhythm alteration in a mouse model of Huntington’s disease. *Neuroscience* **329**, 363–379 (2016).
- Espósito, M. S. *et al.* Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development. *J. Neurosci.* **25**, 10074–10086 (2005).
- Ezan, J. & Montcouquiol, M. Revisiting planar cell polarity in the inner ear. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **24**, 499–506 (2013).
- Feng, J. *et al.* A Role for Atypical Cadherin Celsr3 in Hippocampal Maturation and Connectivity. *J. Neurosci.* **32**, 13729–13743 (2012).
- Goodrich, L. V. The plane facts of PCP in the CNS. *Neuron* **60**, 9–16 (2008).
- Hagihara, H., Takao, K., Walton, N. M., Matsumoto, M. & Miyakawa, T. Immature Dentate Gyrus: An Endophenotype of Neuropsychiatric Disorders. *Neural Plast* **2013**, (2013).

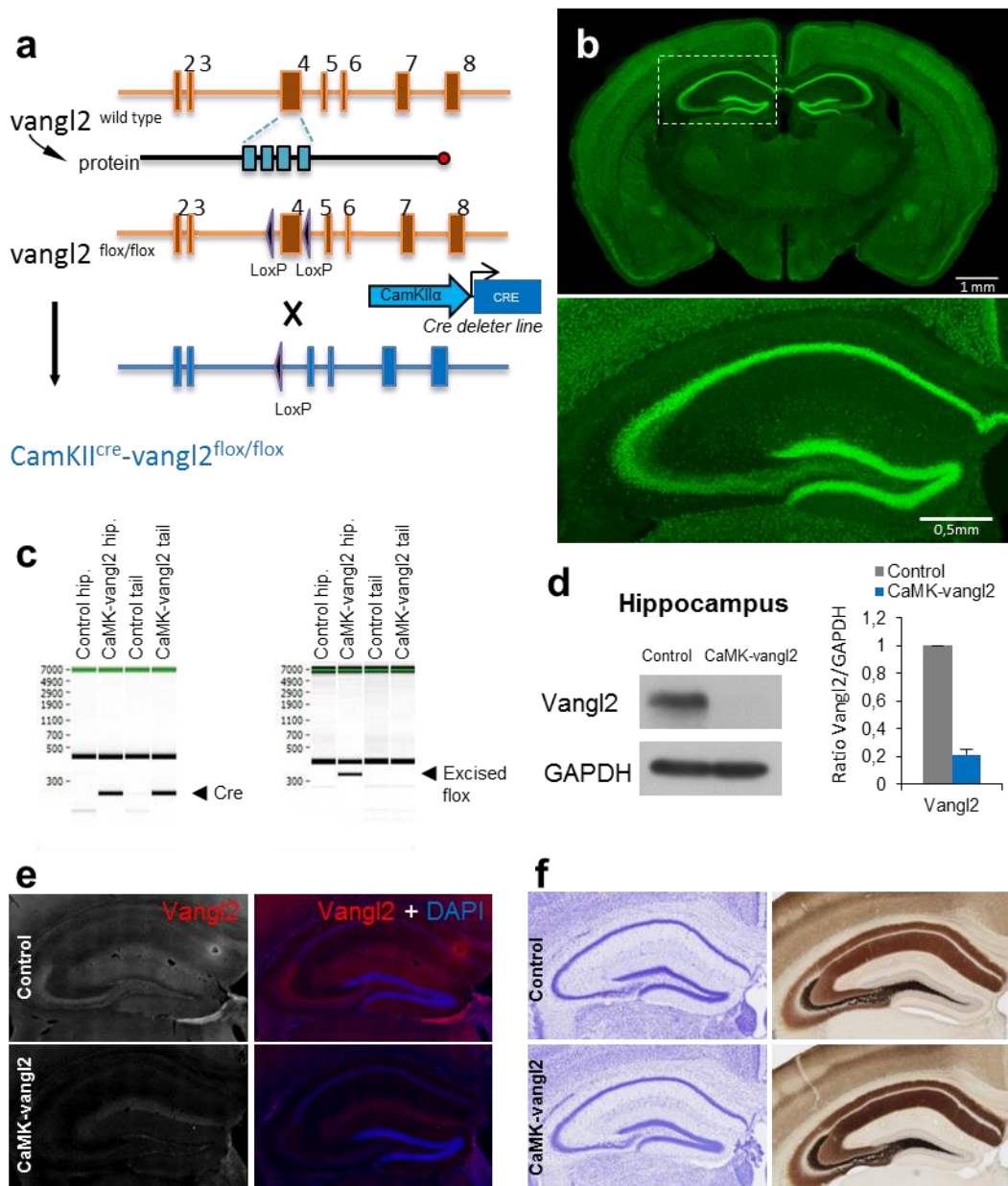
- Hagiwara, A., Yasumura, M., Hida, Y., Inoue, E. & Ohtsuka, T. The planar cell polarity protein Vangl2 bidirectionally regulates dendritic branching in cultured hippocampal neurons. *Mol Brain* **7**, 79 (2014).
- Heimer-McGinn, V. & Young, P. Efficient inducible Pan-neuronal cre-mediated recombination in SLICK-H transgenic mice. *Genesis* **49**, 942–949 (2011).
- Hilal, M. L. *et al.* Activity-Dependent Neuroplasticity Induced by an Enriched Environment Reverses Cognitive Deficits in Scribble Deficient Mouse. *Cereb. Cortex* 1–17 (2016). doi:10.1093/cercor/bhw333
- Holden, H. M. & Gilbert, P. E. Less efficient pattern separation may contribute to age-related spatial memory deficits. *Front Aging Neurosci* **4**, (2012).
- Hunsaker, M. R. & Kesner, R. P. The operation of pattern separation and pattern completion processes associated with different attributes or domains of memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **37**, 36–58 (2013).
- Iijima, T., Miura, E., Watanabe, M. & Yuzaki, M. Distinct expression of C1q-like family mRNAs in mouse brain and biochemical characterization of their encoded proteins. *Eur. J. Neurosci.* **31**, 1606–1615 (2010).
- Iliescu, A., Gravel, M., Horth, C. & Gros, P. Independent mutations at Arg181 and Arg274 of Vangl proteins that are associated with neural tube defects in humans decrease protein stability and impair membrane targeting. *Biochemistry* **53**, 5356–5364 (2014).
- Kesner, R. P. A process analysis of the CA3 subregion of the hippocampus. *Front Cell Neurosci* **7**, (2013).
- Kheirbek, M. A., Tannenholz, L. & Hen, R. NR2B-Dependent Plasticity of Adult-Born Granule Cells is Necessary for Context Discrimination. *J. Neurosci.* **32**, 8696–8702 (2012).
- Kibar, Z. *et al.* Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat. Genet.* **28**, 251–255 (2001).
- Lake, B. B. & Sokol, S. Y. Strabismus regulates asymmetric cell divisions and cell fate determination in the mouse brain. *J. Cell Biol.* **185**, 59–66 (2009).
- Lee, R. C. *et al.* The protocadherin Flamingo is required for axon target selection in the Drosophila visual system. *Nat. Neurosci.* **6**, 557–563 (2003).
- Lei, Y.-P. *et al.* VANGL2 mutations in human cranial neural-tube defects. *N. Engl. J. Med.* **362**, 2232–2235 (2010).
- Lin, J. Y., Lin, M. Z., Steinbach, P. & Tsien, R. Y. Characterization of Engineered Channelrhodopsin Variants with Improved Properties and Kinetics. *Biophys J* **96**, 1803–1814 (2009).
- Lu, B., Usui, T., Uemura, T., Jan, L. & Jan, Y. N. Flamingo controls the planar polarity of sensory bristles and asymmetric division of sensory organ precursors in Drosophila. *Curr. Biol.* **9**, 1247–1250 (1999).
- Madisen, L. *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* **13**, 133–140 (2010).

- Marchal, C. & Mulle, C. Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors. *J Physiol* **561**, 27–37 (2004).
- Marín-Burgin, A., Mongiat, L. A., Pardi, M. B. & Schinder, A. F. Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science* **335**, 1238–1242 (2012).
- McAvoy, K., Besnard, A. & Sahay, A. Adult hippocampal neurogenesis and pattern separation in DG: a role for feedback inhibition in modulating sparseness to govern population-based coding. *Front Syst Neurosci* **9**, (2015).
- McClelland, J. L. & Goddard, N. H. Considerations arising from a complementary learning systems perspective on hippocampus and neocortex. *Hippocampus* **6**, 654–665 (1996).
- Montcouquiol, M. *et al.* Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J. Neurosci.* **26**, 5265–5275 (2006).
- Moreau, M. M. *et al.* The planar polarity protein Scribble1 is essential for neuronal plasticity and brain function. *J. Neurosci.* **30**, 9738–9752 (2010).
- Nakashiba, T. *et al.* Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation whereas Old Granule Cells Contribute to Pattern Completion. *Cell* **149**, 188–201 (2012).
- Nakazawa, K. *et al.* Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* **297**, 211–218 (2002).
- Neunuebel, J. P. & Knierim, J. J. CA3 Retrieves Coherent Representations from Degraded Input: Direct Evidence for CA3 Pattern Completion and Dentate Gyrus Pattern Separation. *Neuron* **81**, 416–427 (2014).
- Newman, E. L. & Hasselmo, M. E. CA3 sees the big picture while dentate gyrus splits hairs. *Neuron* **81**, 226–228 (2014).
- O’Reilly, R. C. & McClelland, J. L. Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus* **4**, 661–682 (1994).
- Ohata, S. *et al.* Loss of Dishevelleds disrupts planar polarity in ependymal motile cilia and results in hydrocephalus. *Neuron* **83**, 558–571 (2014).
- Ohira, K. *et al.* Synaptosomal-associated protein 25 mutation induces immaturity of the dentate granule cells of adult mice. *Mol Brain* **6**, 12 (2013).
- Ramsbottom, S. A. *et al.* Vangl2-regulated polarisation of second heart field-derived cells is required for outflow tract lengthening during cardiac development. *PLoS Genet.* **10**, e1004871 (2014).
- Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dickstein, D. L., Hof, P. R. & Wearne, S. L. Automated Three-Dimensional Detection and Shape Classification of Dendritic Spines from Fluorescence Microscopy Images. *PLoS ONE* **3**, (2008).
- Rolls, E. T. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front Syst Neurosci* **7**, (2013).

- Sachidhanandam, S., Blanchet, C., Jeantet, Y., Cho, Y. H. & Mulle, C. Kainate receptors act as conditional amplifiers of spike transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.* **29**, 5000–5008 (2009).
- Sans, N. *et al.* mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1179–1190 (2005).
- Sans, N. *et al.* Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J. Neurosci.* **21**, 7506–7516 (2001).
- Sans, N., Ezan, J., Moreau, M. & Montcouquiol, M. Planar Cell Polarity Gene Mutations in Autism Spectrum Disorder, Intellectual Disabilities, and Related Deletion/Duplication Syndromes. in 189–219 (2016). doi:10.1016/B978-0-12-800109-7.00013-3
- Santoro, A. Reassessing pattern separation in the dentate gyrus. *Front Behav Neurosci* **7**, (2013).
- Schafer, S. T. *et al.* The Wnt Adaptor Protein ATP6AP2 Regulates Multiple Stages of Adult Hippocampal Neurogenesis. *J Neurosci* **35**, 4983–4998 (2015).
- Shelton, D. J. & Kirwan, C. B. A possible negative influence of depression on the ability to overcome memory interference. *Behav. Brain Res.* **256**, 20–26 (2013).
- South, M. *et al.* Overactive Pattern Separation Memory Associated with Negative Emotionality in Adults Diagnosed with Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord* **45**, 3458–3467 (2015).
- Squire, L. R. & Alvarez, P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology* **5**, 169–177 (1995).
- Stark, S. M., Yassa, M. A. & Stark, C. E. L. Individual differences in spatial pattern separation performance associated with healthy aging in humans. *Learn Mem* **17**, 284–288 (2010).
- Stoeckli, E. & Zou, Y. How are neurons wired to form functional and plastic circuits? Meeting on Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity. *EMBO Rep* **10**, 326–330 (2009).
- Szymczak-Workman, A. L., Vignali, K. M. & Vignali, D. A. A. Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harb Protoc* **2012**, 199–204 (2012).
- Tamminga, C. A., Southcott, S., Sacco, C., Wagner, A. D. & Ghose, S. Glutamate dysfunction in hippocampus: relevance of dentate gyrus and CA3 signaling. *Schizophr Bull* **38**, 927–935 (2012).
- Thakar, S. *et al.* Evidence for opposing roles of Celsr3 and Vangl2 in glutamatergic synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E610–E618 (2017).
- Tissir, F. & Goffinet, A. M. Expression of planar cell polarity genes during development of the mouse CNS. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 597–607 (2006).
- Tissir, F. & Goffinet, A. M. Shaping the nervous system: role of the core planar cell polarity genes. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 525–535 (2013).
- Tissir, F. *et al.* Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat. Neurosci.* **13**, 700–707 (2010).

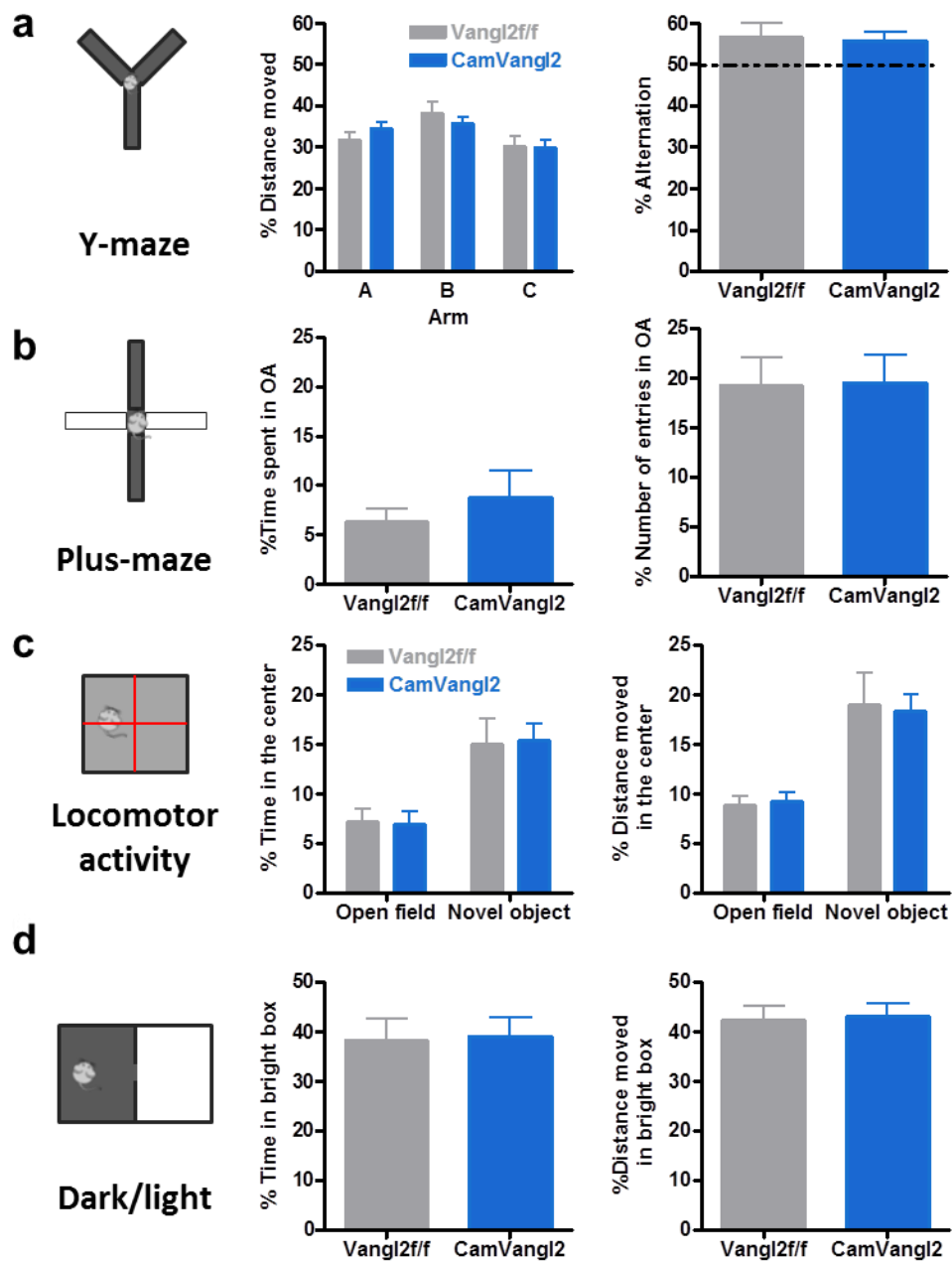
- Torban, E. *et al.* Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 3449–3454 (2008).
- Vadodaria, K. C. & Jessberger, S. Maturation and integration of adult born hippocampal neurons: signal convergence onto small Rho GTPases. *Front Synaptic Neurosci* **5**, (2013).
- Walton, N. M. *et al.* Detection of an immature dentate gyrus feature in human schizophrenia/bipolar patients. *Transl Psychiatry* **2**, e135 (2012).
- Wentholt, R. J., Petralia, R. S., Blahos J, I. I. & Niedzielski, A. S. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J. Neurosci.* **16**, 1982–1989 (1996).
- Wilson, I. A., Gallagher, M., Eichenbaum, H. & Tanila, H. Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding. *Trends in Neurosciences* **29**, 662–670 (2006).
- Yassa, M. A., Mattfeld, A. T., Stark, S. M. & Stark, C. E. L. Age-related memory deficits linked to circuit-specific disruptions in the hippocampus. *PNAS* **108**, 8873–8878 (2011).
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G. & Gage, F. H. Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *J. Neurosci.* **26**, 3–11 (2006).

Extended data



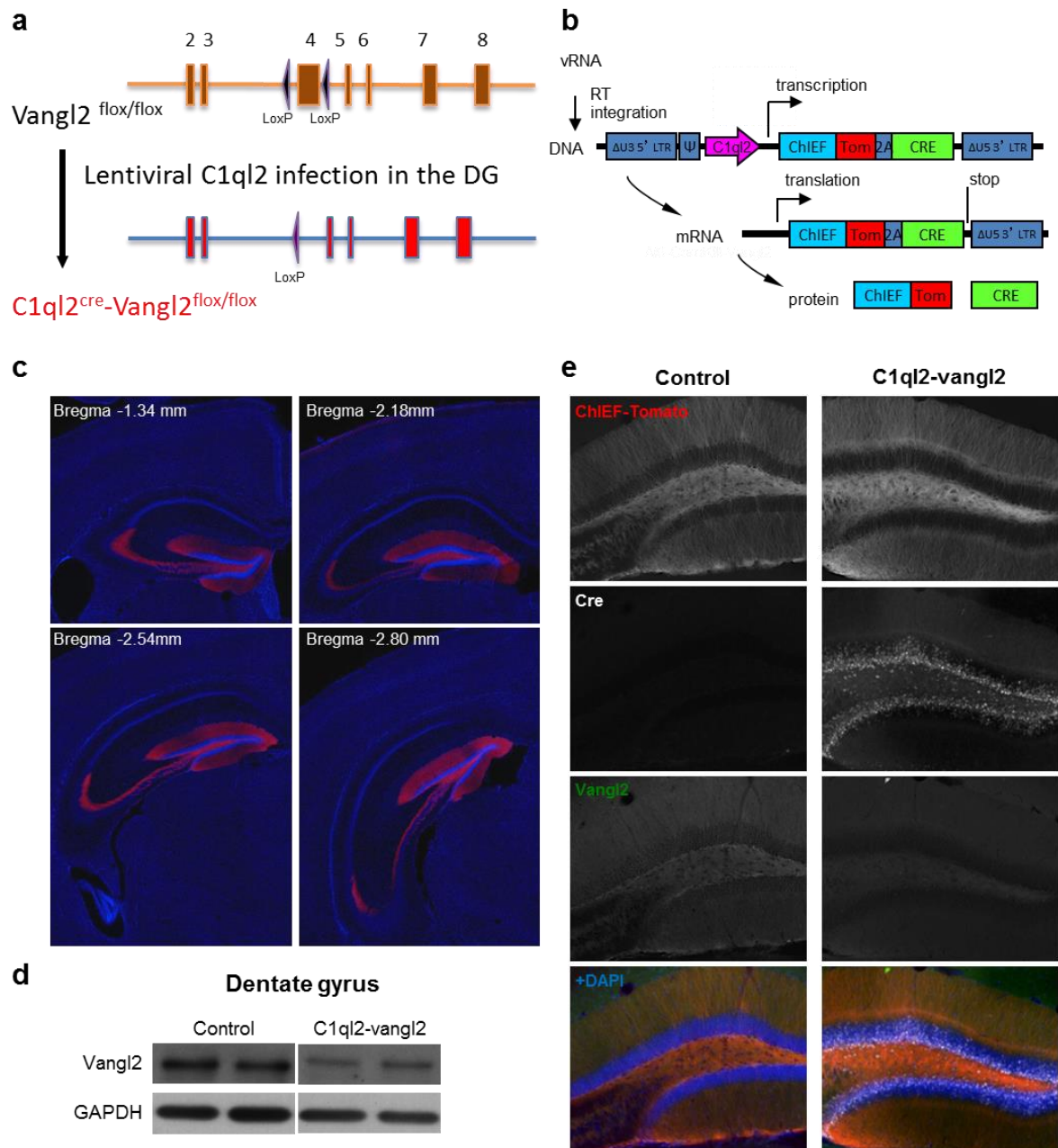
Extended data Fig. 1. Generation of conditional deletion of *vangl2* gene via Cre-lox system

(a) Schematic representation of the strategy to generate CaMK-*vangl2* mice. 'Cre deleter line' (that expresses Cre recombinase under the control of CaMKII α promoter) is crossed with a '*vangl2* flox/flox allele line'. CaMK-*vangl2* mice have an excised form of *vangl2* gene in the glutamatergic neurons of the central nervous system from P3 postnatal. **(b)** Brain slice of an adult (10 weeks) mouse from the breeding of CaMKII α -Cre mice with an Ai6 (carrying a floxed STOP codon preventing the expression of a green fluorescent protein). Recombination occurs where the green fluorescent is expressed **(c)** Genotyping of CaMK-*vangl2* shows the presence of Cre gene in mutant mice, and the excised flox in hippocampus (not in tail). Gene is still present in hippocampus because of the other cell types than glutamatergic neurons. **(d)** Western blots show a decrease of the expression of the Vangl2 protein in hippocampus in CaMK-*vangl2* adult mice compared to control. **(e)** Immunohistochemistry of brain slices showing the decrease of the expression of Vangl2 in DG, CA3 and CA1 in CaMK-*vangl2* adult mice hippocampus, compared to control. **(f)** Nissl staining (left) and Timm staining (right) on hippocampal slices of control and CaMK-*vangl2* mice do not reveal gross abnormality.



Extended data Fig. 2. CaMKII-cKO mice display normal work memory, anxiety and locomotion

(a) Y-maze shows no impairment in short term memory and exploration. **(b)** In elevated plus maze, CaMK-vangl2 mice show a normal anxiety compared to the control. **(c)** In open field, CaMK-vangl2 do not have impairments in global locomotor activity and exploration; **(d)** There is no difference between both groups for the anxiety in light/dark box experiment.



Extended data Fig. 3. Generation of conditional deletion of *vangl2* gene in the DG via viral injection

(a) Schematic representation of the strategy Cre-lox to generate C1ql2-vangl2 mice by lentiviral injection in the DG of *vangl2*^{flox/flox} allele line. (b) C1ql2 promoter restrict the expression in granule cells of the DG, of the Cre recombinase and ChiEF-tomato as a fluorescent reporter of recombination. (c) Coronal hippocampal sections of an injected mice showing a rostral-caudal infection of the DG. (d) Western blotting shows a decrease of the expression of the Vangl2 protein in the DG of C1ql2-vangl2 adult mice compared to control. (e) Immunohistochemistry of brain slices showing the expression of Cre recombinase in the cKO correlated with a decrease of the expression of Vangl2 in the DG.

Expériences complémentaires

Late deletion of Vangl2 in the dentate gyrus leads to improvement of context discrimination and impairment of spatial completion

Benjamin Robert^{1,2} | Maité Moreau^{1,2}

Mireille Montcouquiol^{1,2*@} | Nathalie Sans^{1,2*@}

1. INSERM, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la plasticité neuronale, U1215, Bordeaux, France.

2. Univ. Bordeaux, Neurocentre Magendie, U1215, Bordeaux, France.

* *Equal Senior contribution*; @ Corresponding authors

This work was done in collaboration with:

- Dr. Aline Marighetto and Dr. Aline Desmedt for the behavioral analysis (Neurocentre Magendie, Team: Pathophysiology of declarative memory).

PomC-vangl2 mice as a specific model of *vangl2* deletion in the DG exhibit similar behavioral phenotypes than CaMK-vangl2 and C1ql2-vangl2 mice models

Our previous results are consistent with Vangl2 enrichment in the cell body (and probably neurites) of young postmitotic GCs at the time of their maturation, and in mature GC dendrites and hippocampal mossy fibers. To restrict the deletion of *vangl2* in postnatal neurons, we created another conditional knockout mice by crossing mice carrying a conditional allele of the *vangl2* gene (*vangl2^{f/f}*) (Ramsbottom *et al.*, 2014) with mice carrying the PomC-Cre-recombinase allele (McHugh *et al.*, 2007). These conditional knock-out mice are here referred to as PomC-vangl2 (Fig. C1a). PomC is a transgenic marker for newly born granule cells in DG (Overstreet *et al.*, 2004) allowing us, here, to restrict expression of Cre recombinase in the postnatal DG. The spatial pattern of Cre/loxP recombination in the PomC-vangl2 mouse line was examined by crossing this line with an Ai6 ZsGreen1 reporter mouse (Madisen *et al.*, 2010). At 10 weeks of age, green fluorescence certifying the

recombination occurred in a sparse proportion of granule cells ($\approx 7\%$, not shown) and, in 30 week-old mice, around 20% of granule cells were labelled (Fig. C1b).

Many theoretical and experimental studies suggested that DG young GCs promote the ability to distinguish between similar events (Deng *et al.*, 2013; Hunsaker & Kesner, 2013, Santoro, 2013; McAvoy *et al.*, 2015), and our data, obtained with CaMK-vangl2 and C1ql2-vangl2 models, suggest that Vangl2 plays a role in the DG for support maturation of GC and is essential to maintain the balance it could exist between pattern separation and pattern separation. To test this hippocampal-dependent memory process, we tested 30 week-old PomC-vangl2 mice in the contextual fear discrimination paradigm (Desmedt *et al.*, 2003; Nakashiba *et al.*, 2012; see methods).

During block 1 (day 2 to 4), the PomC-cKO mice exhibit a similar level of freezing in the conditioning context compared to the neutral context, as the control mice (Two-way ANOVA, Context x Genotype interaction: $F_{(1, 80)} = 2.192$, $p > 0.05$; Genotype: $F_{(1, 80)} = 3.458$, $p > 0.05$; Fig. C1c; Context: $F_{(1, 80)} = 0.047$, $p > 0.05$). During block 2 (day 5 to 8), PomC-Cre mice discriminate both contexts, while the control mice have the same level of freezing in the neutral and conditioning context (Two-way ANOVA, Context x Genotype interaction: $F_{(1, 108)} = 19.57$, $p = 0.0001^{***}$; Bonferroni's multiple comparisons test: Control, Neutral vs. Cond. $p > 0.05$; PomC-vangl2, Neutral vs. Cond. $p < 0.0001$; Fig. C1d). Indeed, PomC-vangl2 mice display a higher level of freezing in the conditioning context than in neutral context (Two-way ANOVA RM, Context (Days 1 to 8): $F_{(1, 12)} = 9.8$, $p = 0.0087^{**}$; Fig. C1e), and control display a similar level of freezing in both contexts (Two-way ANOVA RM, Context (Days 1 to 8): $F_{(1, 12)} = 1.1054$, $p > 0.05$; Fig.1f). This result shows that PomC-vangl2 cKO mice discriminate the aversive context from the neutral one, while the control group is unable to discriminate after 8 days of conditioning, suggesting that deletion of *vangl2* in 20% of granular cells in the DG is sufficient to improve pattern separation in 30 week-old mice.

To evaluate whether an early deletion of *vangl2* could affect spatial pattern completion processes, we exposed PomC-vangl2 cKO mice to the behavioral pattern completion test in the Morris water. We did not observe any difference between the PomC-vangl2 cKO mice and the control group for the latency to reach the cued platform during visual learning and spatial learning (Two-way ANOVA RM, Visual: Training session x Genotype interaction: $F_{(2,$

$_{40}) = 1.29, p > 0.05$; Genotype: $F_{(1, 20)} = 0.003, p > 0.05$; Spatial: Training session x Genotype interaction: $F_{(16, 340)} = 0.828, p > 0.05$; Genotype: $F_{(1, 340)} = 0.7296, p > 0.05$; **Fig. C1g**). To test the spatial memory we performed a probe test and both groups spent around 40% of the time in the phantom platform (PPF) compared to the others PF (less than 25% each), demonstrating that the absence of *Vangl2* does not affect the hippocampal-dependent spatial learning (Two-way ANOVA, PPF x Genotype interaction: $F_{(3, 84)} = 0.1583, p > 0.05$; Genotype: $F_{(1, 84)} < 0.0001, p > 0.05$; PPF: $F_{(3, 84)} = 18.92, p < 0.0001$; Bonferroni's multiple comparisons: control and cKO target vs others, $p < 0.001^{***}$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.05^*$ respectively; **Fig. C1h**). Next, we removed some of the spatial cues and evaluated again the time spend in PPF. When most of the cues were removed, PomC-*vangl2* cKO mice spent an equivalent amount of time in each PPF ($\approx 25\%$), while control mice continued to show preference for the target ($\approx 40\%$) (Two-way ANOVA, PPF x Genotype interaction: $F_{(3, 84)} = 2.321, p = 0.0811$; Genotype: $F_{(1, 84)} < 0.0001, p > 0.05$; PPF: $F_{(3, 84)} = 6.905, p < 0.0003$; Bonferroni's multiple comparisons: control target vs others, $p < 0.05^*$; cKO target vs others : $p > 0.05$; **Fig. C1i**). Both groups were lost in the no cue condition, demonstrating the need of specific spatial cues to locate the platform (Two-way ANOVA, PPF x Genotype interaction: $F_{(3, 88)} = 0.4921, p > 0.05$; Genotype: $F_{(1, 88)} < 0.0001, p > 0.05$; PPF: $F_{(3, 88)} = 2.973, p < 0.05$; Bonferroni's multiple comparisons: control target vs others, $p > 0.05$; cKO target vs others : $p > 0.05$; **Fig. C1j**).

These data show that PomC-*vangl2* cKO mice can form new spatial memories, but are impaired when they need to retrieve these memories from partial cues, indicative of pattern completion defect. Altogether the results are consistent with what I observed in CaMK-*vangl2* and C1q12-*vangl2* models. Moreover, the sparse recombination of *vangl2* in PomC-*vangl2* model at 30 weeks is sufficient to disrupt the balance pattern separation/completion, supporting our hypothesis of the specificity of the role of *Vangl2* in the DG neuron functions after the end of developmental networking of hippocampal structure.

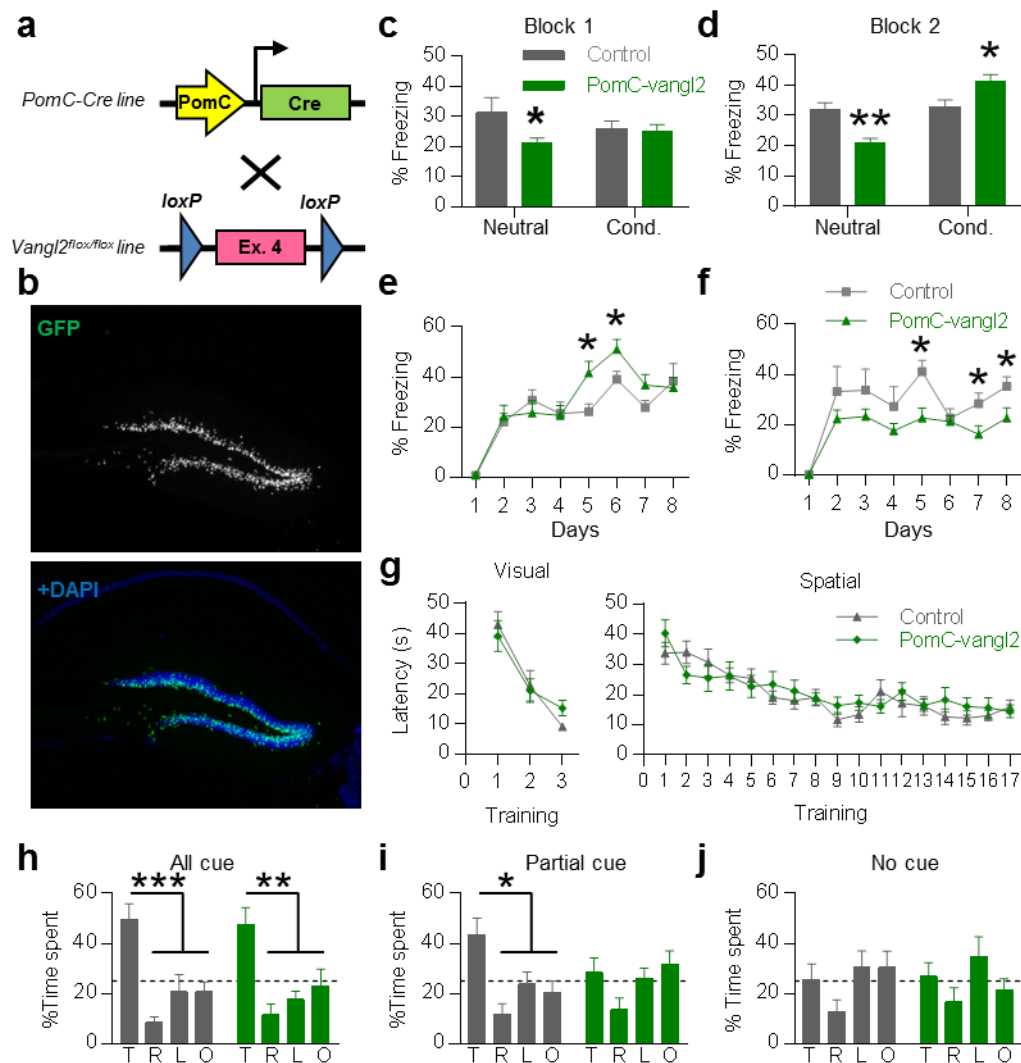


Figure C1 : Les souris PomC-vangl2 ont une amélioration de la discrimination contextuelle et un déficit de pattern completion spatial

(a) Schematic representation of the strategy to generate PomC-vangl2 mice. (b) Hippocampal slice of an adult (30 weeks) mouse from the breeding of PomC-Cre mice with an Ai6 (carrying a floxed STOP codon preventing the expression of a green fluorescent protein). Recombination occurs where the green fluorescent is expressed. (c-d) Mean of freezing of both groups in neutral or conditioning context (c) during the first block, (d) during the second block of training. (e-f) Percentage of freezing during the 8 days, (e) in the conditioning context and, (f) in the neutral context. The deletion of Vangl2 leads to an improvement of the 'pattern separation' in a fear conditioning task. (g) 30-week-old male PomC-vangl2 mice (green, n = 7) and their control littermates (grey, n = 7) did not differ significantly in the escape latency during the visual learning or the spatial learning. (h) With all cues, both groups spend much more time in the target PPF. (i) With partial cues, only control mice spend much more time in target PPF compared to all others while PomC-vangl2 spend the same time in all PPF. (j) without any cue, both groups are lost. Dotted lines represent the chance. T: Target, R: Right, L: Left, O: Opposite.

Methods

Conditional knock-out mice generation

Experiments were approved by the local ethical committee of the University of Bordeaux (approval number 5012046-A). Male C57BL/6N mice were purchased from Janvier (France). *vangl2*-flox mice, obtained from Dr. Deborah Henderson, had been crossed to C57Bl/6 for at least 5 generations before being used for experiments (Ramsbottom et al, 2014). PomC-Cre (McHugh *et al.*, 2007) obtained from Dr. Daniela Cota (Neurocentre Magendie, Bordeaux, France), were intercrossed with the *vangl2*-flox line and B6.Cg-Gt(Rosa)26Sortm6(CAG-ZsGreen1)Hze/J (Ai6) mice (Jackson Laboratory. All mice were maintained on the C57Bl/6N background. Mice were maintained under standard conditions (food and water ad libitum; $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 7 h–12 h light–dark cycle, light on at 7:00; experiments were performed between 9:00 and 17:00). Only male mice were used for behavioral experiments, and were housed collectively in groups of five to eight in polypropylene cages for biochemical experiments and in individual cages for behavioral experiments.

Behavioral testing

Behavioral experiments were conducted during the light phase of a 12 h light/dark cycle, under conditions of dim light and low noise. All animals had been weighed twice a week from 8 to 18 weeks of age. Mice were tested in activity cages for their locomotor activity, in open field test for their exploratory activity and anxiety-like behavior, and in Morris water maze for their spatial learning and memory performances.

Water Maze / Pattern completion. In this experiment, the water maze evaluates the ability of mice to orient them in space, using spatial cues to find a platform that allows them to escape the water. When mice have learned the spatial map to find this platform, some cues are removed. The mice have to find the platform with the remaining cues. We test here the ability of rebuilding the spatial map named “pattern completion”. The apparatus is a circular arena ($\varnothing 150\text{cm}$) filled with water ($19\text{--}20^\circ\text{C}$) mixed with white nontoxic dye. A video camera fixed to the ceiling of the room was used to collect and transmit data to a computerized tracking system (Viewpoint) located in an adjacent room. The experiment have three phases, visual learning, spatial learning and probe tests. *Visual learning:* First, the mice are tested in their capability to swim, their willingness to escape

the water and their visual acuity. The platform is cued and the mice are allowed to freely swim in the water maze during 1min. If the mice find the platform, they are returned in their homecage. Otherwise they are guided to the escape platform. The latency to reach the platform is measured to assess the visual learning. *Spatial learning*: Next, when the mice have learned how to find the platform, the cue is removed to allow the spatial learning. The mice have to use the external spatial cues placed around the water maze to localize the platform. They are put in the water with a different starting point and they are allowed to swim freely during 1min. The latency to reach the platform is measured to assess the spatial learning. Strategies to locate the platform were quantified manually and blindly regarding the genotype and classified adapting criteria from Brody & Holtzman, 2006). *Probe tests*: Three probe tests are used to confirm the spatial learning and the “pattern completion” during which platform is removed. The mice are placed in the water maze and allowed to swim freely during 1min. The latency to reach the phantom platform (PPF, means the platform location), the time spent and the distance moved in this PPF are measured. First, the probe test “all cues” evaluates the spatial learning of the mice. Next, the probe test “partial cues” in which the most of the cues are removed assesses the “pattern completion”. Finally, the probe test “no cue” in which all the cues are removed allows to show the specificity of the previous spatial learning and “pattern completion” probe tests. Between each probe test, mice have a spatial training to avoid extinction.

Fear conditioning / Pattern Separation. Every day during 8 days, the mice are exposed to two similar contexts, in the morning and in the afternoon in a pseudo-random manner. These two contexts are similar in volume (10m^3) and brightness (80 lux), but differed by the experimental materials they contained and by the cues placed on their walls. Thus, these two contexts only differed in their background distal cues, proximal cues provided by the conditioning chamber remaining the same across testing. Moreover, in order to limit the possibility of a simple direct association between the US and one particular static contextual feature, an effort was made to prevent any of the distal cues to be more salient than the other ones.

In the conditioning context (C), mice are placed in a chamber during 2 minutes, then exposed to a 2 minutes tone (1000Hz – 63dB) spaced of 30 seconds from a mild foot-shock (0,4 mA – 1s) (trace conditioning). The tone, being the most salient (phasic) cue present in

both contexts is used in order to contrast with all the other (tonic) contextual cues, preventing thereby a “contextual” discrimination based on an elemental strategy: its saliency limits any potential simple association between a simple tonic contextual cue and the US. In the neutral context (N), mice never receive any foot-shock. We quantified the freezing behavioral response (blind analysis) defined as a complete immobility lasting more than one second (except for respiratory movements). In order to quantify the contextual discrimination, we measured the freezing time during the first 2 minutes exposure to each context, using the tone period as an internal control (data not shown). The freezing in each context is measured to evaluate the contextual fear conditioning and the comparison between the freezing in the neutral and the conditioning context allows us to assess the “pattern separation”.

Data collection and Statistical analyses

No method of randomization to assign experimental groups was performed but they are similar to those reported in previous publications (Moreau *et al.*, 2010; Hilal *et al.*, 2016). Data collection and analysis were performed blind to the conditions of the experiment. All animals were assigned randomly to the different experimental conditions. Normality and homogeneity of variances from the samples were tested with Shapiro-Wilk test and Bartlett test respectively. If data were parametric, Student’s t-test (two comparisons), ANOVA 1-way (multiple comparisons), ANOVA 2-way or ANOVA 3-way were used. Otherwise non-parametric tests were used (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis). When significant interaction effects of main factors were detected, post-hoc analyses, recommended by GraphPad Prism software (Bonferroni’s, Sidak’s or Tukey’s for ANOVA and Dunn’s for Kruskal-Wallis), were performed. Effects with p values ≤ 0.05 are reported as significant.

Electrophysiological properties of DG granule cells in CaMK-vangl2 model

Benjamin Robert^{1,2} | Gaël Barthet^{3,4}

Christophe Mulle^{3,4} | Mireille Montcouquiol^{1,2* @} | Nathalie Sans^{1,2* @}

1. INSERM, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la plasticité neuronale, U1215, Bordeaux, France.
2. Univ. Bordeaux, Neurocentre Magendie, U1215, Bordeaux, France.
3. CNRS, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, UMR 5297, Bordeaux, France.
4. Univ. Bordeaux, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, UMR 5297, Bordeaux, France.

* *Equal Senior contribution*; @ Corresponding authors

Granular cells synaptic transmission in CaMK-vangl2 cKOs

In order to test if the morphological arborization alteration of granular cells (GCs), cumulated with spines maturation changes in CaMK-vangl2, I started preliminary experiment to address whether or not the loss of *vangl2* resulted in postsynaptic changes at excitatory inputs to DG granular cells. I prepared hippocampal sagittal slices from 10-13 week-old CaMK-vangl2 mice and control, and standard slice electrophysiology investigation was performed. Recordings were done with the whole cell patch clamp techniques in voltage clamp mode (holding potential set at -70 mV) from DG-GCs identified using a DIC interface microscope. PP input was stimulated by placing a monopolar glass electrode in the molecular layer in the medial molecular layer at the tip of the DG. I have found no major differences between genotypes in basic synaptic transmission. In details I have found that the basal amplitude (stimulation frequency 0.1 Hz) of the pharmacological isolated PP-DG-GCs response was not different between control and CaMK-vangl2 cKO mice (**Fig. C2a**), but the initial slope of the EPSC response in the cKO is non-significant increased compared to control (Mann Whitney, $p = 0.0667\#$; **Fig. C2b**). No difference was found in both paired-pulse ratio, suggesting that paired-pulse facilitation is normal (PPR 40 ms interval; **Fig. C2c**).

This preliminary data did not show major defect in basal transmission between perforant pathway and DG GCs. This data are consistent with a previous study that uses a conditional mutant to delete the NR1 subunit of NMDAR in the DG (McHugh *et al.*, 2007). In this study, the cKO mice were impaired in contextual fear discrimination but the basal properties (amplitude and slope and facilitation) of DG GCs were unaffected by the loss of NR1 subunits. However the authors showed that synaptic plasticity in the DG, but not in CA1 was impaired in cKO. Then, we wanted to investigate if the synaptic plasticity between PP and GCs was affected by the deletion of *vangl2*. Indeed dendritic and spines morphological alteration we observed in CaMK-vangl2 cKO mice could affect synaptic plasticity, and correlate with behavioral deficits. In an other hand, immature and mature neurons share different electrophysiological properties that could participate to different functions in information processing (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004; Dieni *et al.*, 2016). The delay of the maturation we observed in CaMK-vangl2 could be accompanied with immature electrophysiological feature. Also, one of our next goals is to investigate the intrinsic properties of the GCs to see if immature morphological features we observed could alter their intrinsic properties.

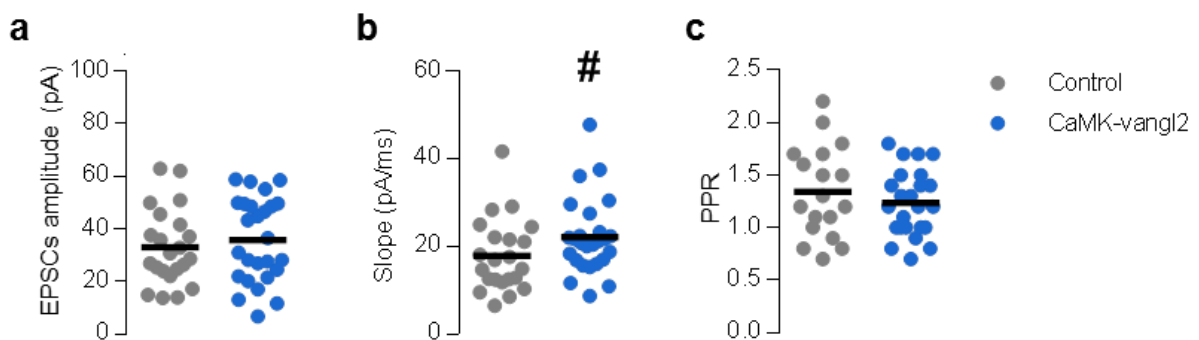


Figure C2 : Basal transmission in GCs is unaffected in CaMK-vangl2

(a) Histogram of the basal amplitude and, (b) the initial slope of the response after a 0,1 Hz stimulation. No differences were observed between control and CaMK-vangl2 mice. (c) Histogram of the Paired pulse ration (40 ms interval) showing no difference in the post-synaptic facilitation between both groups.

Methods

Slice preparation

Parasagittal hippocampal slices (260 μ m thick) were obtained in 10-13 week-old mice. Animals were anesthetized with intra-peritoneal ketamine/xylazine injection (75 and 10 mg per kg, respectively). After checking their reflexes, animals were perfused transcardially with aCSF (the composition is given below) followed by decapitation. The brain was quickly

removed and immersed in ice-cold aCSF solution. The hemispheres were separated by a sagittal cut in the corpus callosum and each one was glued and mounted on the vibratome (Leica VT 1200S, Leica Microsystems, Germany). Brain slices were made with by a razor blade with an angle of $\sim 17^\circ$ at 0.16 mm/s.

All the preparation was performed under oxygenation (95% O₂ and 5% CO₂), in an ice-cold aCSF solution. For 10-13 weeks old mice the following solution was used (in mM): 120 NaCl, 27 NaHCO₃, 16.5 Glucose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 2.8 pyruvic acid and 0.5 ascorbic acid. Right after slicing, slices were then transferred into a bath at 35°C during 30 min for recovery, and were then placed at room temperature for the rest of the day.

Electrophysiological recordings

Slices were transferred to a recording chamber in which they were continuously superfused with an oxygenated extracellular medium (95% O₂ and 5% CO₂) containing (mM): 120 NaCl, 27 NaHCO₃, 16.5 Glucose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 2.8 pyruvic acid and 0.5 ascorbic acid, pH 7.4. Bicuculline (10 μ M) and CGP 55845 (3 μ M) were present in all experiments in order to block GABA_A and GABA_B receptors respectively. Recordings were performed at room temperature in voltage-clamp or current clamp mode from DG granule cells using borosilicate pipettes (Harvard apparatus 1.5 OD x 0.86 ID) pulled with micropipette puller (P97, Sutter Instruments, Novato, CA), which had resistances between 3 and 4.5 M Ω . The patch electrodes were filled with a solution containing (mM): 140 CsCH₃SO₃, 2 MgCl₂, 4 NaCl, 5 phospho-creatine, 2 Na₂ATP, 0.2 EGTA, 10 HEPES, 0.33 GTP, pH 7.3 adjusted with CsOH. In the experiments presented in figure x the EGTA concentration was raised to 20 mM.

Evoked EPSCs were recorded in DG granule cells in the whole-cell patch clamp mode by stimulating with a glass pipette the performant pathway in the molecular layer. DG granule cells EPSCs were evoked by minimal intensity stimulation according to the protocol described previously (Marchal & Mulle, 2004; Sachidhanandam *et al.*, 2009). A glass microelectrode was placed in the molecular layer of the dentate gyrus to stimulate performant pathway. While recording from a DG granule cell, the stimulating electrode was moved to a position where a sharp EPSC with fixed latency was evoked. Stimulation intensity was adjusted just above the sharp threshold for activation of a synaptic response.

Using such low minimal stimulations, no prominent polysynaptic activation was observed. PP stimulation was assessed by its large dynamic range of short-term facilitation (40 ms paired pulse ratio > 2 or 1 Hz/0.1 Hz ratio>4).

Data acquisition and analysis

Recordings were made *via* Patchmaster 2.71 using an EPC10 amplifier (HEKA Elektronik, Lambrecht/ Pfalz, Germany), filtered at 0.5–1kHz, digitized at 5 kHz, and stored on a personal computer. Analysis was performed using Neuromatic (www.neuromatic.thinkrandom.com) written within the Igor Pro 6.0 environment (WaveMetrics, Lake Oswego, OR). Values are presented as mean \pm s.e.m. Either a paired or unpaired non-parametric tests were used to assess statistical differences between values using Prism 7. No statistical methods were used to predetermine sample sizes, but our sample sizes are similar to those generally employed in the field. No data point (outliers) was removed from the collected datasets. N mentioned in the paper represents a single measurement from a single cell. We considered biological replication each different cell. During both the experiments and the analysis the experimenter was blind to the genotype of the animal used.

Role of Vangl2 in the CA3 autoassociative cognitive functions

Benjamin Robert^{1,2} | Arnaldo Ferreira^{1,2}

Mireille Montcouquiol^{1,2*@} | Nathalie Sans^{1,2*@}

1. INSERM, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la plasticité neuronale, U1215, Bordeaux, France.
2. Univ. Bordeaux, Neurocentre Magendie, U1215, Bordeaux, France.

Vangl2 in the CA3

We showed that Vangl2 in the adult DG is essential to sustain contextual discrimination and spatial pattern completion. However several studies support the hypothesis that CA3, and more specifically its autoassociative network formed by recurrent collateral, is the main support of pattern completion (Kesner, 2013 ; Rolls, 2013 ; Hunsaker & Kesner, 2013). Even though we observed an enrichment of Vangl2 in the *stratum lucidum* of the CA3, we were not able to observe a proper colocalization of Vangl2 with presynaptic (Bassoon) or postsynaptic (PSD95) compartments in the *stratum lucidum* (Carvalho & Montcouquiol, in prep.). Vangl2 colocalizes with Tau protein, an axonal marker (Carvalho & Montcouquiol, in prep.). However Vangl2 was also detected in post-synaptic density by immunoblotting (Nagaoka *et al.*, 2014; Carvalho & Montcouquiol, in prep.). My results did not show deficits in mossy fibers / CA3 pyramidal cells synaptic transmission and plasticity in Vangl2 conditional mutant, despite spatial pattern completion deficit. Even if the maturation of DG GCs could be the reason of the disruption of the balance between pattern separation and pattern completion, Vangl2 could also play a role in CA3 connectivity and functions, such as pattern completion. In order to test this hypothesis, we performed preliminary experiments to target deletion of *vangl2* in the CA3 of adult mice (**Fig. C3**). Using a viral approach (**Fig. C3a; see methods**), we were able to express Cre recombinase in dorsal CA3 pyramidal cells of *vangl2^{ff}* mice (**Fig. C3b**) and tested this model, referred as CA3-vangl2 cKO in Morris water maze protocol (**see methods**) to evaluate spatial learning, memory and pattern completion. We did not observe any

difference between the CA3-vangl2 cKO mice and the control group for the latency to reach the cued platform during spatial learning (Two-way ANOVA RM, Spatial: Training session x Genotype interaction: $F_{(25, 325)} = 1.022$, $p > 0.05$; Genotype: $F_{(1, 13)} = 3.332$, $p > 0.05$; **Fig. C3c**).

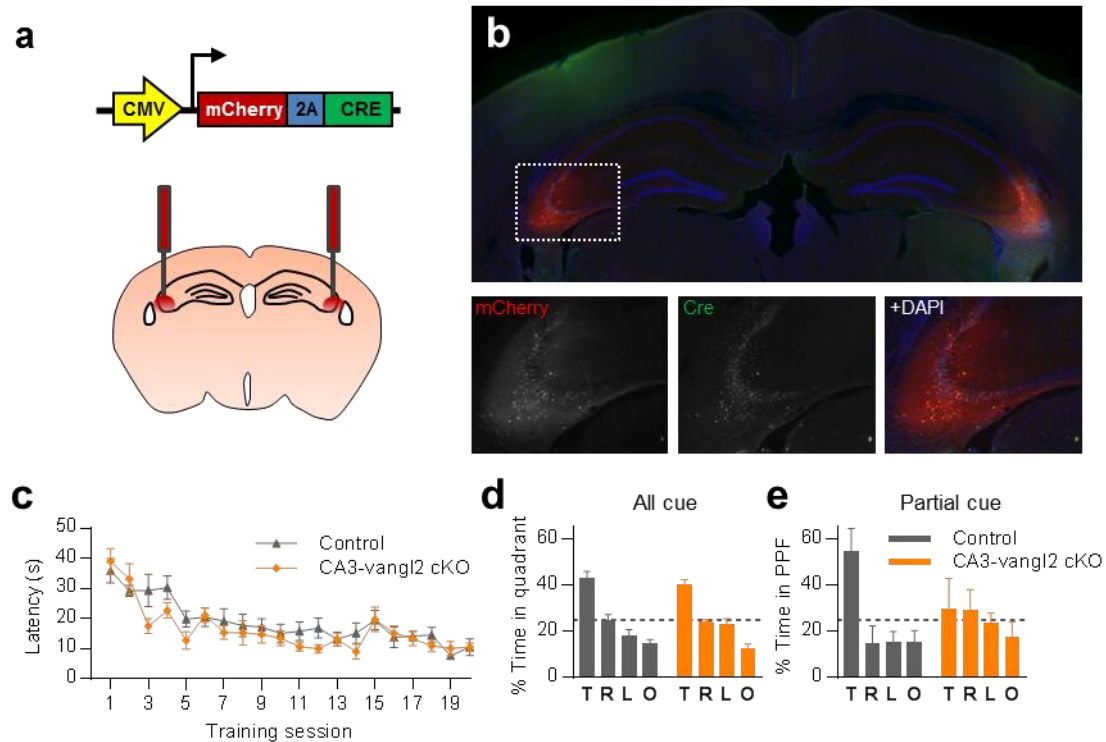


Figure C3: CA3-vangl2 cKO mice exhibit deficits in spatial pattern completion

(a) Schematic representation of the transgene carried by the AAV injected bilaterally in CA3. **(b)** Brain slice of an injected mice after behavioral experiment (top) and, (bottom) high magnification on CA3 region with (bottom left) immunohistochemistry anti-mCherry, (bottom middle) anti-Cre and (bottom right) merged images with DAPI **(c)** 10- to 13-week-old male CaMK-CA3-vangl2 cKO mice (blue, $n = 7$), control littermates (grey, $n = 8$) are trained in the spatial learning test and do not differ significantly in the escape latency. **(d)** Bars show the percentage of time spent in each quadrant with all cues, all groups spend much more time in the target quadrant compared to others quadrants. **(e)** Bars show the percentage of time spent in each PPF with partial cues, only controls spend more time in target PPF compared to CA3-vangl2 cKO are lost. Dotted lines represent the chance. T: Target, R: Right, L: Left, O: Opposite.

To test the spatial memory we performed a probe test and both groups spent around 40% of the time in the target quadrant compared to the others (less than 25% each), demonstrating that the absence of Vangl2 in CA3 does not affect the hippocampal-dependent spatial learning (Two-way ANOVA, Quadrant x Genotype interaction: $F_{(3, 48)} = 1.218$, $p > 0.05$; Genotype: $F_{(1, 48)} < 0.0001$, $p > 0.05$; PPF: $F_{(3, 48)} = 51.45$, $p < 0.0001$; Bonferroni's multiple comparisons: control and cKO target vs others, $p < 0.001^{***}$; **Fig. C3d**). Next, we removed some of the spatial cues and evaluated again the time spend in

phantom platform. When most of the cues were removed, CA3-vangl2 cKO mice spent an equivalent amount of time in each PPF ($\approx 25\%$), while control mice continued to show preference for the target ($\approx 40\%$) (Two-way ANOVA, Quadrant x Genotype interaction: $F_{(3, 48)} = 2.258$, $p = 0.0936$; Bonferroni's multiple comparisons: control: target vs others, $p < 0.01^{**}$; cKO: target vs others, $p > 0.05$; **Fig. C3e**).

Altogether, these results suggest that Vangl2 is also necessary in the CA3 to sustain spatial pattern completion. Further experiments are needed to understand the role of Vangl2 in the CA3, notably if the autoassociative network is disrupted when Vangl2 is lacking in CA3 pyramidal neurons.

Methods

AAV virus generation and stereotaxic injection

We used an Adeno-associated virus (AAV/Dj-CMV-mCherry-2A-iCre-WPRE) construct purchased from Vectors Biolabs (Malvern, PA 19355) to express the Cre recombinase with a mCherry fluorescent reporter. Cre and mCherry transgenes were driven by a ubiquity CMV promoter, with a T2A peptide linker in between for self-cleavage co-expression. The virus titer was 4.6×10^{13} GC/ml in distilled PBS with 5% glycerol and was used non-diluted. As a control, we used a AAV/Dj-CMV-mCherry-WPRE with an original titer of 1.8×10^{13} GC/ml in dPBS with 5% glycerol.

Five-week old *vangl2*-flox mice were anesthetized with isoflurane and injected in IP with 10% Buprecare and locally with 50% Lurocaine. They received bilateral microinjections of lentivirus control or expressing the cre recombinase (300 nl per minute) in the CA3 dorsal region of hippocampus (anteroposterior [Y] -2 mm from bregma, mediolateral [X] ± 3 mm, dorsoventral [Z] -2.5 mm).

Immunohistochemistry

Animals were perfused transcardially with phosphate buffer (PB) followed by 4% paraformaldehyde (PFA), brains were removed and fixed in 4% PFA for 2 h at 4°C. Coronal vibratome sections (40 μ m) were obtained and incubated with primary antibody overnight (mCherry - Cre) at 4°C, followed by Alexa secondary antibodies for 45 min at room temperature (RT). Images were acquired with a Leica DM6000 microscope and CoolSNAPHQ2 camera (PhotoMetrics) or a Zeiss AxioImager Z1 and an AxioCam MRm, and

with Nanozoomer (Hamamatsu).

Behavioral testing

Behavioral experiments were conducted during the light phase of a 12 h light/dark cycle, under conditions of dim light and low noise. All animals had been weighed twice a week from 8 to 18 weeks of age. Mice were tested in activity cages for their locomotor activity, in open field test for their exploratory activity and anxiety-like behavior, and in Morris water maze for their spatial learning and memory performances.

Water Maze / Pattern completion. Because of undesired spatial cues, we adapt our previous protocol with two additional parameters. First, in order to avoid visual spatial cues unremovable (door, lamps...), black curtains were hanging around the water maze (50 cm from the border), and desired cues were attached on them. Second, in order to prevent other spatial cues, not relying on visual perception, we proceed to rotation of the platform and desired spatial cues in a pseudorandomly fashion between every training session. Together, these parameters prevent mice to use undesired cues to locate the platform position, but the learning phase is more complicated for the mice. The rest of the experiment is the same as previously described.

The mice have to find the platform with the remaining cues. We test here the ability of rebuilding the spatial map named “pattern completion”. The apparatus is a circular arena (ø150cm) filled with water (19-20°C) mixed with white nontoxic dye. A video camera fixed to the ceiling of the room was used to collect and transmit data to a computerized tracking system (Viewpoint) located in an adjacent room. The experiment has three phases, visual learning, spatial learning and probe tests. *Visual learning:* First, the mice are tested in their capability to swim, their willingness to escape the water and their visual acuity. The platform is cued and the mice are allowed to freely swim in the water maze during 1min. If the mice find the platform, they are returned in their homecage. Otherwise they are guided to the escape platform. The latency to reach the platform is measured to assess the visual learning. *Spatial learning:* Next, when the mice have learned how to find the platform, the cue is removed to allow the spatial learning. The mice have to use the external spatial cues placed around the water maze to localize the platform. They are put in the water with a different starting point and they are allowed to swim freely during 1min. The latency to reach the platform is measured to assess the spatial learning.

Strategies to locate the platform were quantified manually and blindly regarding the genotype and classified adapting criteria from Brody & Holtzman, 2006). *Probe tests*: Three probe tests are used to confirm the spatial learning and the “pattern completion” during which platform is removed. The mice are placed in the water maze and allowed to swim freely during 1min. The latency to reach the phantom platform (PPF, means the platform location), the time spent and the distance moved in this PPF are measured. First, the probe test “all cues” evaluates the spatial learning of the mice. Next, the probe test “partial cues” in which the most of the cues are removed assesses the “pattern completion”. Finally, the probe test “no cue” in which all the cues are removed allows to show the specificity of the previous spatial learning and “pattern completion” probe tests. Between each probe test, mice have a spatial training to avoid extinction.

Data collection and Statistical analyses

No method of randomization to assign experimental groups was performed but they are similar to those reported in previous publications (Moreau *et al.*, 2010; Hilal *et al.*, 2016). Data collection and analysis were performed blind to the conditions of the experiment. All animals were assigned randomly to the different experimental conditions. Normality and homogeneity of variances from the samples were tested with Shapiro-Wilk test and Bartlett test respectively. If data were parametric, Student’s t-test (two comparisons), ANOVA 1-way (multiple comparisons), ANOVA 2-way or ANOVA 3-way were used. Otherwise non-parametric tests were used (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis). When significant interaction effects of main factors were detected, post-hoc analyses, recommended by GraphPad Prism software (Bonferroni’s, Sidak’s or Tukey’s for ANOVA and Dunn’s for Kruskal-Wallis), were performed. Effects with p values ≤ 0.05 are reported as significant.

Discussion générale

PCP: une voie de signalisation conservée

Les études pionnières chez la drosophile ont permis d'identifier six gènes centraux contrôlant une polarité définie par sa direction perpendiculaire à l'axe classique apico-basolatéral. Cette polarité est régulée par une voie de signalisation, la voie de la PCP. Initialement, la voie de la PCP a été identifiée par sa capacité à coordonner la polarité au sein des cellules épithéliales mais aussi au sein des tissus entiers (Zallen, 2007 ; Butler & Wallingford, 2017). Les gènes centraux de la voie de la PCP codent pour des protéines cytosoliques ou transmembranaires dont la cible principale est la régulation de la dynamique du cytosquelette. La voie de la PCP est conservée au fil de l'évolution, et différents orthologues existent chez les mammifères (Goodrich, 2008 ; Wallingford, 2012 ; Tissir & Goffinet, 2013). Les études de mutants de gènes de la PCP chez les mammifères, ont permis de montrer que cette voie régule le développement de nombreux tissus et organes, y compris le système nerveux. Ainsi, la gastrulation et la neurulation sont les deux stades développementaux les plus affectés chez ces mutants (Wallingford, 2012). Cependant les gènes de la PCP sont toujours exprimés chez l'adulte et leurs rôles sont encore mal compris.

Les modèles d'étude de Vangl2 dans le système nerveux de mammifère

En 1949, Strong et Hollander ont identifié une mutation spontanée chez la souris caractérisée par des NTDs, entraînant la mort à la naissance, chez les homozygotes, et la présence d'une queue en tire-bouchon chez les hétérozygotes, nommant ainsi la mutation, *Looptail (Lp)*. La mutation *Lp* ($Vangl2^{S464N}$) est identifiée comme une mutation faux-sens dans le gène *van gogh-like 2 (vangl2)*, orthologue du gène de la PCP *strabismus* identifié chez la drosophile (Gubb & Garcia-Bellido, 1982 ; Kibar *et al.*, 2001a ; Kibar *et al.*, 2001b ; Kibar *et al.*, 2003).

À ce jour, la vaste majorité des études sur le rôle de Vangl2 dans le système nerveux chez les mammifères a été réalisée sur des souris hétérozygotes portant la mutation *Lp*, puisque contrairement aux homozygotes, elles survivent à l'âge adulte, mais présentent de nombreuses malformations (Strong & Hollander, 1949 ; Henderson *et al.*, 2001 ; Montcouquiol *et al.*, 2003 ; Vandenberg & Sassoon, 2009 ; Torban *et al.*, 2012). Ce modèle

conduit à la perte de 50-80% de la protéine dans tout l'organisme, et la protéine mutée (vangl2^{S464N}) a un effet dominant négatif sur la voie de signalisation, retenant Vangl1 dans le réticulum endoplasmique (Yin *et al.*, 2012). Les études utilisant ce modèle ont donc pu observer un mélange d'effets dus à la quasi-absence de protéine Vangl2, mais aussi à l'effet dominant-négatif de la protéine mutée Vangl2^{S464N}, et non pas le résultat d'une simple perte de fonction de Vangl2. L'utilisation de mutants conditionnels s'est donc avérée nécessaire non seulement pour limiter la délétion de *vangl2* au système nerveux central, garantir la survie de l'animal, mais aussi pour s'affranchir de l'effet dominant-négatif.

L'expression de Vangl2 est abondante dans tout le système nerveux central très tôt au cours du développement (Kibar *et al.*, 2011a; Torban *et al.*, 2008), et diminue progressivement à l'âge adulte, ce qui suggère un rôle développemental important. En 2009, Lake et Sokol ont démontré, chez des embryons de souris *Looptail*, que les progéniteurs du cortex présentent une différenciation précoce en l'absence d'un Vangl2 fonctionnel (Lake & Sokol, 2006). Vangl2 est distribué asymétriquement dans la cellule lors de la division et régule l'orientation du fuseau de division, contrôlant ainsi la distribution asymétrique des déterminants cellulaires, et donc le devenir du futur neurone.

Vangl2 est nécessaire à la maturation de réseaux dépendant de l'hippocampe

En utilisant un anticorps généré par notre laboratoire, nous avons confirmé l'enrichissement de la protéine Vangl2 dans l'hippocampe de souris adulte, et plus précisément dans le gyrus denté et le stratum lucidum du CA3. L'utilisation de souris mutantes conditionnelles pour *vangl2* m'a permis d'étudier le rôle de la protéine sur des animaux postnataux et adultes, en m'affranchissant de l'effet dominant-négatif de la mutation *Looptail* (Yin *et al.*, 2012), et le rôle de *vangl2* sur la division des progéniteurs, par l'utilisation du promoteur CaMKII α (Casanova *et al.*, 2001; Arruda-Carvalho *et al.*, 2014). J'ai montré que la perte de Vangl2 dans les mutants CaMK-vangl2 entraînait une augmentation du nombre de neurones immatures (CaIR-positifs) sans affecter la prolifération cellulaire dans le DG de souris adulte. Ces résultats suggèrent que Vangl2 intervient dans la maturation des cellules granulaires, et en conséquence, participe à la mise en place et au maintien de mécanismes cognitifs dépendants du DG. Chez le

nématode *C. elegans*, il a été montré que la perte de l'orthologue invertébré *vang1* entraîne une augmentation de la survie de l'organisme en activant le facteur de transcription DAF-16/FoxO, appartenant à la voie de signalisation IGF-1-like (Honnen *et al.*, 2012). Cette voie de signalisation joue un rôle essentiel dans la prolifération, la survie cellulaire et la différenciation neuronale (Brooker *et al.*, 2000 ; Kang *et al.*, 2012). Des résultats préliminaires de notre laboratoire obtenus *in vitro* dans des cellules hétérologues (COS-7) suggèrent que la surexpression de *vangl2* pourrait perturber la distribution intranucléaire du facteur de transcription FOXO-1, c'est-à-dire son niveau de phosphorylation, reflétant son activation. S'ils sont confirmés, ces résultats suggèreraient que Vangl2 pourrait intervenir dans la maturation des neurones *via* la voie de signalisation IGF-1-like dans l'hippocampe de mammifère.

Nos résultats *in vivo* brossent un portrait complexe de l'impact de l'absence de Vangl2 sur l'arborisation des cellules granulaires du DG en fonction des différentes couches moléculaires. La perte de Vangl2 après la naissance a pour conséquence une réduction de l'arborisation dendritique proximale des cellules granulaires, associée à une ramification plus dense des dendrites dans la région distale. De plus, la densité d'épines matures est diminuée dans la région distale de l'arbre dendritique, et la densité d'épines immatures est augmentée dans les régions plus proximales. Ces résultats suggèrent des changements de connectivité des cellules granulaires dans la couche moléculaire. En effet la couche moléculaire est divisée en trois sous-parties, la couche interne, la couche moyenne et la couche externe (IML, MML et OML respectivement). Les afférences des cellules granulaires diffèrent en fonction des sous-parties de la couche moléculaire. L'IML comprend majoritairement les afférences des cellules moussues du hile, alors que la MML et l'OML comprennent principalement les afférences du cortex entorhinal médian et latéral, respectivement (Lopez-Rojas & Kreutz, 2016). Les modifications complexes de l'arborisation dendritique provoquées par l'absence de Vangl2 pourraient altérer la connectivité des cellules granulaires avec les afférences excitatrices de l'EC ainsi qu'avec le rétrocontrôle exercé par les cellules moussues, décrites comme pouvant moduler l'orthogonalisation de l'information par les cellules granulaires (Nakazawa, 2017). Plusieurs études ont démontré *in vitro* que l'utilisation d'ARN interférents (shRNA) pour *vangl2* dans des neurones de l'hippocampe ou du cortex en culture mène à une diminution globale de l'arborisation dendritique et de la densité des épines (Hagiwara *et al.*, 2014 ; Nagaoka *et*

al., 2014 ; Okerlund *et al.*, 2016), alors que la densité synaptique glutamatergique était augmentée dans le CA1 dans un mutant conditionnel jeune de *vangl2* (Thakar *et al.*, 2017). Ensemble, ces résultats suggèrent que Vangl2 joue un rôle complexe dans le développement et le fonctionnement des dendrites. Mes résultats dans le DG confirment l'implication de Vangl2 dans le développement dendritique des cellules granulaires après la naissance chez l'animal adulte, et les déficits comportementaux observés chez les mutants C1ql2-vangl2 suggèrent que Vangl2 est également essentiel à l'âge adulte dans les cellules granulaires du DG pour assurer son bon fonctionnement. Mes résultats préliminaires d'électrophysiologie sur la caractérisation des cellules granulaires ne me permettent pas de conclure sur la nature des déficits de connectivité, cependant les modifications morphologiques observées dans les cellules granulaires suggèrent que les cellules granulaires ont une transmission de l'information altérée. Ainsi, les conséquences fonctionnelles que j'ai observées sont cohérentes avec une perturbation de réseaux liés à l'hippocampe, et plus particulièrement au DG.

Vangl2 n'intervient pas dans toutes les fonctions dépendantes de l'hippocampe.

L'hippocampe est une structure cérébrale essentielle à l'encodage et au rappel de la mémoire spatiale (Morris *et al.*, 1982 ; O'Keefe & Burgess, 1996 ; Eichenbaum, 2000 ; Buzsaki & Moser, 2013). Dans notre étude, la perte de Vangl2 n'affecte pas l'apprentissage et la mémoire spatiale dans un paradigme classique en piscine de Morris. Ces résultats contrastent avec deux études (Feng *et al.*, 2012; Thakar *et al.*, 2017) qui suggèrent que la perte de *Celsr3* dans des mutants conditionnels perturbe l'apprentissage et la mémoire spatiale, ainsi que la mémoire de peur contextuelle. Le mutant utilisé par l'équipe de Yimin Zou dans l'étude de 2017 est issu du croisement d'une lignée *celsr3^{ff}* avec une lignée exprimant une CreER^{T2} inductible sous le contrôle du promoteur SLICK-A. L'administration de tamoxifène pour induire la recombinaison de *celsr3* a lieu 7 à 8 jours après la naissance, afin d'identifier des mécanismes consécutifs à une perte tardive de *Celsr3*. Cependant la recombinaison dans ce modèle semble avoir lieu dans le CA1, le DG et dans certaines aires corticales sans injection de tamoxifène (Heimer-McGinn & Young, 2011). En effet, le site internet du Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/strain/007606>) note: «SLICK-A mice exhibit significant cre-mediated recombination in the absence of tamoxifen. This "leaky"»

recombination in SLICK-A mice was prominent in areas that have bright YFP labeling (such as hippocampal CA1 and cortical layer V». Dans l'étude de Feng et al (2012), les phénotypes les plus sévères sont observés dans un mutant conditionnel généré grâce à une lignée knock-in FoxG1-Cre, qui permet l'expression de la Cre recombinase dès E9.5 et dans tout le télencéphale. L'insertion de la Cre recombinase à la place d'un allèle FoxG1 conduit à des phénotypes morphologiques au niveau du télencéphale, et en particulier de l'hippocampe (voir <https://www.jax.org/strain/006084>). De plus, la mort des animaux à 3 semaines nécessiterait l'évaluation des problèmes locomoteurs, psychomoteurs ou autres, non décrits. Ce modèle n'est donc pas un modèle d'étude idéal pour des mécanismes dépendants de l'hippocampe.

Dans leur étude, Yimin Zou et collaborateurs opposent les fonctions synaptiques de Celsr3 et Vangl2 dans des neurones d'hippocampe en culture issus d'embryons à E18.5 (Thakar et al., 2017). Ainsi, ils suggèrent que Celsr3 est nécessaire à la formation des synapses glutamatergiques, alors que l'absence de Vangl2 (mutant conditionnel généré avec la même lignée SLICK-A-CreER^{T2}) augmenterait le nombre de synapses excitatrices dans le *stratum radiatum* du CA1. De plus, ils observent une diminution de la transmission synaptique en absence de Celsr3 et une augmentation en absence de Vangl2 dans les neurones pyramidaux du CA1, suggérant que Celsr3 facilite la transmission synaptique alors que Vangl2 l'inhibe. Cependant la variabilité entre les contrôles de Celsr3 et de Vangl2, associée à l'unique paramètre électrophysiologique mesuré, rend la conclusion d'un rôle opposé entre les deux protéines hâtive. De plus, les conséquences comportementales n'ont pas été évaluées dans cette étude pour le mutant conditionnel Vangl2.

Dans mon étude, la perte de Vangl2 ne semble entraîner ni déficit, ni amélioration d'apprentissage, de mémoire spatiale ou de mémoire contextuelle. De plus, la transmission synaptique entre le DG et le CA3 *via* les fibres moussues ne semble pas affectée chez les CaMK-vangl2. Nous devons encore analyser les propriétés électrophysiologiques des cellules granulaires ainsi que la plasticité synaptique qui s'établit entre la voie perforante provenant du cortex entorhinal vers les dendrites des cellules granulaires.

Vangl2 joue un rôle spécifique dans les fonctions du DG

Comme mentionné précédemment, malgré l'enrichissement de Vangl2 dans le réseau formé par le DG et le CA3, la délétion du gène *vangl2* à des stades tardifs de développement n'entraîne pas de perturbation de l'apprentissage, la mémoire spatiale, ou encore de la mémoire contextuelle, qui dépendent de l'hippocampe. J'ai évalué les conséquences comportementales d'une telle délétion pour des processus cognitifs spécifiques qui dépendent du DG et du CA3, et j'ai montré que l'absence de *vangl2* améliore la discrimination contextuelle, et perturbe le pattern completion spatial. De nombreuses études considèrent le DG et la neurogenèse adulte comme le principal support du processus de pattern separation (Sahay *et al.*, 2011a ; Yassa & Stark ; 2011 ; Holden & Gilbert, 2012 ; Hunsaker & Kesner, 2013 ; Clemenson *et al.*, 2015) et le réseau autoassociatif du CA3 comme support du pattern completion (Hunsaker & Kesner, 2013 ; Rolls, 2013 ; Kesner 2013). À elle seule, la perte de Vangl2 dans le DG est suffisante pour entraîner une amélioration du pattern separation et un déficit du pattern completion. Les altérations comportementales et le maintien d'une population de cellules granulaires du DG à un stade immature observés chez les mutants conditionnels pour *vangl2* sont en accord avec les observations du laboratoire du Prof. Susumu Tonegawa qui suggèrent que la maturation des nouveaux neurones participe à l'équilibre entre le pattern separation et le pattern completion (Nakashiba *et al.*, 2012). Cette étude démontre que les jeunes neurones immatures participent dans un premier temps à la médiation du pattern separation et ensuite, au cours de leur maturation, vont progressivement faciliter le processus de pattern completion. Nos résultats suggèrent que, chez les mutants CaMK-*vangl2*, le plus grand nombre de neurones immatures favorise l'encodage du pattern separation, au "détriment" du pattern completion (directement ou indirectement). Les résultats obtenus dans les modèles C1ql2-*vangl2*, PomC-*vangl2* et dans le modèle de réexpression de Vangl2 dans le DG des CaMK-*vangl2* soutiennent l'hypothèse selon laquelle Vangl2 dans le DG est essentiel au bon fonctionnement de l'hippocampe pour maintenir l'équilibre entre les processus de pattern separation et pattern completion.

Vangl2 et le réseau autoassociatif du CA3

Mes résultats obtenus avec les différents mutants conditionnels ont mis en évidence que Vangl2 dans le DG adulte est essentiel pour assurer le fonctionnement du pattern completion spatial. De nombreuses études suggèrent cependant que le réseau autoassociatif du CA3 est le principal support du pattern completion (Kesner, 2013 ; Rolls, 2013 ; Hunsaker & Kesner, 2013). Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de colocalisation entre des marqueurs présynaptique (Bassoon) ou postsynaptique (PSD95) et Vangl2 (Carvalho et Montcouquiol, en préparation). Pour autant, dans le *stratum lucidum*, le marquage Vangl2 colocalise avec Tau, un marqueur axonal (Carvalho et Montcouquiol, en préparation), et nous sommes capables, ainsi qu'un autre laboratoire, de détecter par immunoblot Vangl2 dans la densité post-synaptique d'hippocampes (Nagaoka *et al.*, 2014a).

Si la délétion de *vangl2* dans les souris CaMK-vangl2 a affecté le réseau du CA3, mes résultats n'ont pas permis d'identifier de déficits de transmission synaptique *via* les fibres moussues dans ce modèle. En revanche, nos résultats préliminaires sur la délétion conditionnelle et tardive de Vangl2 dans les neurones pyramidaux du CA3 suggèrent que Vangl2 participe au bon fonctionnement du pattern completion spatial qui dépend du réseau autoassociatif du CA3 (Kesner, 2013 ; Rolls, 2013 ; Hunsaker & Kesner, 2013). Il serait intéressant de déterminer, dans un modèle de délétion spécifique de *vangl2* dans les neurones pyramidaux du CA3, si la perte de Vangl2 entraîne des perturbations de la réception de l'information provenant de la voie perforante, et/ou des collatérales récurrentes, ce qui permettrait de savoir si Vangl2 est impliqué dans le fonctionnement du réseau auto-associatif du CA3.

Vangl2 et les pathologies

Dans le cadre de notre étude, la perte de Vangl2 ralentit la maturation des cellules granulaires du DG et altère les processus de pattern completion au profit du pattern separation. Plusieurs études sur la schizophrénie suggèrent qu'une immaturité du DG cause des effets délétères sur ses fonctions séparatrices pouvant entraîner des associations erronées de la part du CA3 (généralisation) et mener à des troubles psychotiques (Tamminga *et al.*, 2012 ; Hagihara *et al.*, 2013). Ces phénotypes qui semblent opposés à ceux observés dans notre étude peuvent s'expliquer par le nombre bien plus

important de neurones immatures et, corrélativement, bien plus faible de neurones matures dans leur modèle, menant le DG à transmettre des informations peu ou non-orthogonalisées au CA3, ce qui aurait pour conséquence une hypergénéralisation. Il est important de noter que généralisation et pattern completion, souvent considérés comme synonymes chez l'Homme, peuvent dépendre de mécanismes différents (Kumaran & McClelland, 2012 ; Kumaran, 2012). En effet l'hypergénéralisation est parfois définie comme une altération voire une absence de pattern separation, menant l'hippocampe à ne transmettre que des informations non-orthogonalisées. Dans le cadre des troubles liés à l'anxiété ou les troubles de stress post-traumatique, les patients ont tendance à ne pas discriminer une nouvelle situation, partageant des similitudes avec un épisode traumatique vécu, menant à une généralisation de réponse de stress ou de peur dans des situations inadaptées (Kheirberg *et al.*, 2012). Dans notre étude, les modèles mutants conditionnels pour *vangl2* présentent une amélioration de la discrimination contextuelle dans un paradigme de peur contextuelle. Il est alors envisageable que dans des modèles de stress post-traumatique, les mutants pour *vangl2* discriminent correctement des contextes similaires, et par conséquent ne généralisent pas. D'autre part, de récentes études montrent que des patients avec des troubles émotionnels, ou atteints de certaines formes d'autisme ont tendance à trop séparer des stimuli pourtant identiques, suggérant une dérégulation positive du pattern separation (Shelton & Kirwan, 2013 ; South *et al.*, 2015). La perte de fonction du gène *EHTM1* en particulier entraîne chez l'Homme le syndrome de Kleefstra, associé à des déficits intellectuels et une certaine forme d'autisme (Kleefstra *et al.*, 2006 ; Willemsen *et al.*, 2012). Une étude très récente chez le modèle murin portant une mutation hétérozygote pour le gène *ehm1* montre que les souris mutantes ont une augmentation de la prolifération neuronale dans le DG associée à une amélioration de discrimination visuelle, suggérant un pattern separation aberrant (Benevento *et al.*, 2017). La mutation de certains gènes de la PCP semble corrélérer avec l'apparition de troubles autistiques (Sans *et al.*, 2016). Vangl2, ainsi que d'autres protéines de la PCP, est un excellent candidat pour participer au bon développement de l'hippocampe, permettant de soutenir les processus cognitifs dépendant du pattern separation et completion qui sont altérés dans des pathologies telles que les troubles du stress post-traumatique ou les troubles du spectre autistique.

Vangl2 est-il essentiel dans tous les processus cognitifs reposant sur le pattern separation et le pattern completion ?

Nous avons montré que le maintien de l'expression de Vangl2 dans l'hippocampe de souris adulte était nécessaire pour le fonctionnement des processus de pattern separation et de pattern completion. L'hippocampe permet de soutenir le pattern separation principalement grâce aux nouveaux neurones intégrés au réseau du DG et le pattern completion par le réseau autoassociatif du CA3. De manière similaire à l'hippocampe, le système olfactif est aussi capable de sous-tendre une forme sensorielle du pattern separation et du pattern completion (Sahay *et al.*, 2011b). En effet, les nouveaux neurones issus de la zone sous-ventriculaire qui migrent vers le bulbe olfactif semblent impliqués dans la discrimination olfactive (Sahay *et al.*, 2011b) alors que le cortex piriforme possède un réseau autoassociatif de neurones qui permet le pattern completion olfactif (Barkai & Hasselmo, 1997 ; Barnes *et al.*, 2008). La diminution de l'expression de Vangl2 dans les précurseurs neuronaux de la zone sous-ventriculaire altère la formation et la morphologie de l'arborisation dendritique des nouveaux neurones du bulbe olfactif, suggérant un rôle crucial de Vangl2 dans la maturation des neurones issus de la neurogenèse adulte du bulbe olfactif (Hirota *et al.*, 2012). De plus, Vangl2 est enrichie dans le cortex piriforme (Moreau M. & Montcouquiol M., données non publiées). Il est alors tentant de poursuivre le parallèle entre l'hippocampe et le système olfactif, avec Vangl2 comme régulateur de la maturation des neurones impliqués dans les différents processus de pattern separation et pattern completion. Il serait alors intéressant d'étudier les conséquences comportementales d'une délétion spécifique de *vangl2* dans le système olfactif dans des paradigmes de pattern separation et completion olfactifs.

Existe-t-il une balance entre pattern separation et pattern completion ?

Le pattern separation et le pattern completion ont longtemps été considérés comme des processus assurant des fonctions opposées (Sahay *et al.*, 2011b). D'un côté, le pattern separation permet de différencier des événements ou des stimuli partageant des caractères similaires afin d'adapter une réponse appropriée. De l'autre côté, le pattern completion permet à partir d'un stimulus partiel de se souvenir de l'intégralité de l'information liée à ce stimulus. Considérons un stimulus dégradé, par exemple une image

déjà vue auparavant, sur laquelle un filtre opaque est placé. Plus le filtre est important, plus il crée de l'interférence et, moins l'image originale sera reconnaissable. Le pattern separation contribuera à la discrimination entre l'image originale et l'image dégradée, en favorisant l'encodage des différences entre les deux images (le filtre) et réduisant les similarités. Au contraire, le pattern completion facilitera le rappel de l'image originale en activant les neurones codant pour les parties non-filtrées de l'image. En ce sens, les deux processus participent à des conséquences comportementales opposées et complémentaires, et l'équilibre entre les deux permet de s'adapter à toutes les situations. Dans le cas où reconnaître l'image originale apporte une récompense, le pattern completion sera sollicité. En revanche, avoir une récompense à chaque fois que l'on reconnaît une image sensiblement dégradée, nécessitera l'utilisation de pattern separation. La compétition entre les deux processus permet alors de s'adapter en fonction de la situation, mais cela nécessite un équilibre dans le réseau qui sous-tend ces deux processus. En augmentant la neurogenèse adulte par manipulation génétique (Sahay *et al.*, 2011a) ou par enrichissement de l'environnement (Clemenson *et al.*, 2015), il a été démontré que les souris présentent de meilleures performances de discrimination contextuelle (Fig. 17b). Une augmentation de la neurogenèse permet alors d'être plus sensible aux détails et d'encoder différentes situations similaires, ce qui favorise une plus grande flexibilité cognitive, permettant l'adoption d'une réponse adaptée à chaque nouvelle situation. Cependant, poussée à l'extrême, une discrimination excessive peut mener à des réponses désavantageuses, comme une attention excessive aux détails ou l'impossibilité d'associer des informations identiques, pouvant être la conséquence de certains troubles pathologiques comme certaines formes d'autisme ou des troubles de la personnalité obsessionnelle-compulsive (Shelton & Kirwan, 2013 ; South *et al.*, 2015 ; Benevento *et al.*, 2017 ; Sahay *et al.*, 2011b). À l'inverse, en diminuant la neurogenèse (Tronel *et al.*, 2012) ou en supprimant la sous-unité NR2B des NMDAR de nouveaux neurones (Kheirbek *et al.*, 2012), la discrimination contextuelle est altérée. La diminution de l'orthogonalisation par les nouveaux neurones peut favoriser la généralisation, permettant de faire des liens entre des situations similaires, et adopter une réponse similaire à celle adoptée précédemment. De la même façon, une généralisation excessive peut mener à des réponses inadaptées, comme dans le cadre du stress post-traumatique (Sahay *et al.*, 2011b ; Besnard & Sahay, 2016).

Toutes ces observations suggèrent qu'une balance existe entre les processus de pattern separation et pattern completion, et que l'intégration des neurones issus de la neurogenèse dans le réseau joue un rôle crucial dans cet équilibre. Pourtant de nombreux auteurs s'accordent à dire que pattern separation et pattern completion sont deux processus différents qui ne font pas partie du même continuum, car ils interviennent dans des phases différentes de la mémoire (encodage et rappel), et qu'ils sont supportés par des structures neuroanatomiques différentes (Aimone *et al.*, 2011 ; Sahay *et al.*, 2011b ; Hunsaker & Kesner, 2013 ; Paleja & Spaniol, 2013). L'activité éparse des neurones granulaires et les synapses « détonatrices » des fibres moussues favoriseraient le pattern separation. Le réseau autoassociatif du CA3, constitué de nombreuses connexions favorisant une rétroactivation positive des neurones pyramidaux, serait le principal support du pattern completion. Bien que les deux réponses comportementales semblent opposées, les deux processus computationnels qui les sous-tendent forment des représentations de l'information en parallèle qui entrent en compétition, sans pour autant interférer l'une sur l'autre (Neunuebel & Knierim, 2014 ; Newman et Hasselmo, 2014). Cependant, les travaux de l'équipe du Prof. Tonegawa suggèrent qu'il existe, au sein du DG, une balance entre pattern separation et pattern completion qui dépend du degré de maturation des cellules granulaires issues du DG (Nakashiba *et al.*, 2012). Les jeunes neurones encore immatures seraient essentiels au support du pattern separation alors que les cellules granulaires matures et complètement intégrées au réseau faciliteraient le pattern completion (Nakashiba *et al.*, 2012). Mes résultats suggèrent que le ralentissement de la maturation des cellules granulaires et leur maintien dans un stade immature plus longtemps par la délétion de *vangl2* sont suffisants pour améliorer, dans le même modèle, les performances en discrimination contextuelle, et altérer les performances en pattern completion spatial. Ces données semblent soutenir la théorie selon laquelle il existe une balance entre le pattern separation et le pattern completion, qui peut être affectée par la perturbation de l'intégrité de la maturation des cellules granulaires du DG. Il est alors essentiel de faire la distinction entre l'équilibre de la maturation des neurones, l'équilibre entre les deux processus cognitifs, et l'équilibre entre les sorties comportementales qui en découlent (Santoro, 2013). Il est possible que la régulation de la maturation des cellules granulaires par *Vangl2*, nécessaire au bon fonctionnement de la connectivité du DG, intervienne dans le fonctionnement des processus de pattern separation et completion. La

délétion de *vangl2* entraîne alors une augmentation du nombre de neurones immatures, menant à un pattern separation plus efficace, peut-être plus compétitif, que le pattern completion. La balance entre les deux sorties comportementales est alors perturbée, ne permettant plus d'apporter une réponse adaptée pour chaque situation rencontrée, mais favorisant principalement l'orthogonalisation.

Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le rôle d'un des gènes centraux de la PCP dans des fonctions cognitives qui dépendent de l'hippocampe. J'ai montré que la protéine Vangl2 est enrichie dans le DG et le *stratum lucidum* de l'hippocampe, et qu'elle joue un rôle dans la maturation des cellules granulaires, ainsi que dans la morphologie de leur arborisation et de leurs épines dendritiques. Cette maturation est décrite comme régulant l'équilibre entre deux processus cognitifs dépendants de l'hippocampe, le pattern separation et le pattern completion. Mes résultats montrent que la protéine Vangl2, dans le DG, est requise pour conserver l'équilibre entre ces deux processus spécifiques. Peu d'études ont démontré l'implication de la voie de la PCP dans des fonctions cognitives. Cependant la majorité des acteurs de la PCP sont enrichis dans différentes zones cérébrales et la PCP a récemment été associée à des pathologies telles que les troubles du spectre autistique. Ainsi, la compréhension des différents rôles des gènes de la PCP permettrait de mieux saisir l'importance de cette voie de signalisation dans certaines pathologies du cerveau adulte, encore mal comprises.

Références Générales

- van Abeelen, J.H., and Raven, S.M. (1968). Enlarged ventricles in the cerebrum of loop-tail mice. *Experientia* 24, 191–192.
- Abrous, D.N., and Wojtowicz, J.M. (2015). Interaction between Neurogenesis and Hippocampal Memory System: New Vistas. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- Ackley, B.D. (2014). Wnt-signaling and planar cell polarity genes regulate axon guidance along the anteroposterior axis in *C. elegans*. *Dev Neurobiol* 74, 781–796.
- Adler, P.N. (2002). Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Cell* 2, 525–535.
- Adler, P.N., and Lee, H. (2001). Frizzled signaling and cell-cell interactions in planar polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 635–640.
- Adler, P.N., Zhu, C., and Stone, D. (2004). Inturned localizes to the proximal side of wing cells under the instruction of upstream planar polarity proteins. *Curr. Biol.* 14, 2046–2051.
- Aguilar-Arredondo, A., Arias, C., and Zepeda, A. (2015). Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional integration. *Rev Neurosci* 26, 269–279.
- Aimone, J.B., Wiles, J., and Gage, F.H. (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat. Neurosci.* 9, 723–727.
- Aimone, J.B., Deng, W., and Gage, F.H. (2011). Resolving New Memories: A Critical Look at the Dentate Gyrus, Adult Neurogenesis, and Pattern Separation. *Neuron* 70, 589–596.
- Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., and Gage, F.H. (2014). Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. *Physiological Reviews* 94, 991.
- Altar, C.A., Jurata, L.W., Charles, V., Lemire, A., Liu, P., Bukhman, Y., Young, T.A., Bullard, J., Yokoe, H., Webster, M.J., *et al.* (2005). Deficient hippocampal neuron

expression of proteasome, ubiquitin, and mitochondrial genes in multiple schizophrenia cohorts. *Biol. Psychiatry* 58, 85–96.

Altman, J., and Das, G.D. (1967). Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214, 1098–1101.

Amaral, D.G., and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571–591.

Amaral, D.G., Scharfman, H.E., and Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163, 3–22.

Anagnostaras, S.G., Maren, S., and Fanselow, M.S. (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J. Neurosci.* 19, 1106–1114.

Anagnostaras, S.G., Gale, G.D., and Fanselow, M.S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. *Hippocampus* 11, 8–17.

Andersen, P., Bliss, T.V., and Skrede, K.K. (1971). Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res* 13, 222–238.

Arleo, A., and Rondi-Reig, L. (2007). Multimodal sensory integration and concurrent navigation strategies for spatial cognition in real and artificial organisms. *J. Integr. Neurosci.* 06, 327–366.

Armstrong, A., Ryu, Y.K., Chieco, D., and Kuruvilla, R. (2011). Frizzled3 Is Required for Neurogenesis and Target Innervation during Sympathetic Nervous System Development. *J. Neurosci.* 31, 2371–2381.

Arruda-Carvalho, M., Restivo, L., Guskjolen, A., Epp, J.R., Elgersma, Y., Josselyn, S.A., and Frankland, P.W. (2014). Conditional deletion of α -CaMKII impairs integration

of adult-generated granule cells into dentate gyrus circuits and hippocampus-dependent learning. *J. Neurosci.* *34*, 11919–11928.

Avilés, E.C., and Stoeckli, E.T. (2016). Canonical wnt signaling is required for commissural axon guidance. *Dev Neurobiol* *76*, 190–208.

Babayeva, S., Zilber, Y., and Torban, E. (2011). Planar cell polarity pathway regulates actin rearrangement, cell shape, motility, and nephrin distribution in podocytes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *300*, F549–560.

Bakker, A., Kirwan, C.B., Miller, M., and Stark, C.E.L. (2008). Pattern Separation in the Human Hippocampal CA3 and Dentate Gyrus. *Science* *319*, 1640–1642.

Barkai, E., and Hasselmo, M.H. (1997). Acetylcholine and associative memory in the piriform cortex. *Mol. Neurobiol.* *15*, 17–29.

Barnes, D.C., Hofacer, R.D., Zaman, A.R., Rennaker, R.L., and Wilson, D.A. (2008). Olfactory perceptual stability and discrimination. *Nat. Neurosci.* *11*, 1378–1380.

Bassuk, A.G., Wallace, R.H., Buhr, A., Buller, A.R., Afawi, Z., Shimojo, M., Miyata, S., Chen, S., Gonzalez-Alegre, P., Griesbach, H.L., *et al.* (2008). A homozygous mutation in human PRICKLE1 causes an autosomal-recessive progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *83*, 572–581.

Bastock, R., Strutt, H., and Strutt, D. (2003). Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning. *Development* *130*, 3007–3014.

Battaglia, A., Hoyme, H.E., Dallapiccola, B., Zackai, E., Hudgins, L., McDonald-McGinn, D., Bahi-Buisson, N., Romano, C., Williams, C.A., Brailey, L.L., *et al.* (2008). Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics* *121*, 404–410.

- Bellaïche, Y., Gho, M., Kaltschmidt, J.A., Brand, A.H., and Schweisguth, F. (2001). Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* 3, 50–57.
- Belotti, E., Puvirajesinghe, T.M., Audebert, S., Baudelet, E., Camoin, L., Pierres, M., Lasvaux, L., Ferracci, G., Montcouquiol, M., and Borg, J.-P. (2012). Molecular characterisation of endogenous Vangl2/Vangl1 heteromeric protein complexes. *PLoS ONE* 7, e46213.
- Benevento, M., Oomen, C.A., Horner, A.E., Amiri, H., Jacobs, T., Pauwels, C., Frega, M., Kleefstra, T., Kopanitsa, M.V., Grant, S.G.N., *et al.* (2017). Haploinsufficiency of EHMT1 improves pattern separation and increases hippocampal cell proliferation. *Scientific Reports* 7, srep40284.
- Besnard, A., and Sahay, A. (2016). Adult Hippocampal Neurogenesis, Fear Generalization, and Stress. *Neuropsychopharmacology* 41, 24–44.
- Bosoi, C.M., Capra, V., Allache, R., Trinh, V.Q.-H., De Marco, P., Merello, E., Drapeau, P., Bassuk, A.G., and Kibar, Z. (2011). Identification and characterization of novel rare mutations in the planar cell polarity gene PRICKLE1 in human neural tube defects. *Hum. Mutat.* 32, 1371–1375.
- Brandau, D.T., Lund, M., Cooley, L.D., Sanger, W.G., and Butler, M.G. (2008). Autistic and dysmorphic features associated with a submicroscopic 2q33.3-q34 interstitial deletion detected by array comparative genomic hybridization. *Am. J. Med. Genet. A* 146A, 521–524.
- Brandt, M.D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., von der Behrens, W., and Kempermann, G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 603–613.
- Brock Kirwan, C., Hartshorn, A., Stark, S.M., Goodrich-Hunsaker, N.J., Hopkins, R.O., and Stark, C.E.L. (2012). Pattern separation deficits following damage to the hippocampus. *Neuropsychologia* 50, 2408–2414.

- Brooker, G.J., Kalloniatis, M., Russo, V.C., Murphy, M., Werther, G.A., and Bartlett, P.F. (2000). Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *J. Neurosci. Res.* *59*, 332–341.
- Bruel-Jungerman, E., Rampon, C., and Laroche, S. (2007). Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci* *18*, 93–114.
- Bunn, K.J., Daniel, P., Rösken, H.S., O’Neill, A.C., Cameron-Christie, S.R., Morgan, T., Brunner, H.G., Lai, A., Kunst, H.P.M., Markie, D.M., *et al.* (2015). Mutations in DVL1 cause an osteosclerotic form of Robinow syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *96*, 623–630.
- Butler, M.T., and Wallingford, J.B. (2017). Planar cell polarity in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 375–388.
- Caddy, J., Wilanowski, T., Darido, C., Dworkin, S., Ting, S.B., Zhao, Q., Rank, G., Auden, A., Srivastava, S., Papenfuss, T.A., *et al.* (2010). Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway. *Dev. Cell* *19*, 138–147.
- Caruana, D.A., Alexander, G.M., and Dudek, S.M. (2012). New insights into the regulation of synaptic plasticity from an unexpected place: Hippocampal area CA2. *Learn. Mem.* *19*, 391–400.
- Casanova, E., Fehsenfeld, S., Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Greiner, E., Stewart, A.F., and Schütz, G. (2001). A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis* *31*, 37–42.
- Chae, J., Kim, M.J., Goo, J.H., Collier, S., Gubb, D., Charlton, J., Adler, P.N., and Park, W.J. (1999). The *Drosophila* tissue polarity gene *starry night* encodes a member of the protocadherin family. *Development* *126*, 5421–5429.
- Chai, G., Zhou, L., Manto, M., Helmbacher, F., Clotman, F., Goffinet, A.M., and Tissir, F. (2014). *Celsr3* is required in motor neurons to steer their axons in the hindlimb. *Nat. Neurosci.* *17*, 1171–1179.

- Chandrasekhar, A., Moens, C.B., Warren, J.T., Kimmel, C.B., and Kuwada, J.Y. (1997). Development of branchiomotor neurons in zebrafish. *Development* 124, 2633–2644.
- Chen, B., Mao, H.H., Chen, L., Zhang, F.L., Li, K., and Xue, Z.F. (2013). Loop-tail phenotype in heterozygous mice and neural tube defects in homozygous mice result from a nonsense mutation in the *Vangl2* gene. *Genet. Mol. Res.* 12, 3157–3165.
- Chevalier, M., Cardoit, L., Moreau, M., Sans, N., Montcouquiol, M., Simmers, J., and Thoby-Brisson, M. (2017). The embryonic development of hindbrain respiratory networks is unaffected by mutation of the planar polarity protein Scribble. *Neuroscience* 357, 160–171.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D., Fagniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., *et al.* (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210–213.
- Clemenson, G.D., Lee, S.W., Deng, W., Barrera, V.R., Iwamoto, K.S., Fanselow, M.S., and Gage, F.H. (2015). Enrichment Rescues Contextual Discrimination Deficit Associated With Immediate Shock. *Hippocampus* 25, 385–392.
- Copp, A.J., and Greene, N.D.E. (2013). Neural tube defects – disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2, 213–227.
- Cowan, N. (2008). What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Prog Brain Res* 169, 323–338.
- Criscuolo, C., de Leva, M.F., Sorrentino, P., Piro, R., Carbone, R., Guacci, A., De Michele, G., and Filla, A. (2010). PRICKLE1 progressive myoclonus epilepsy in Southern Italy. *Mov. Disord.* 25, 2686–2687.
- Curtin, J.A., Quint, E., Tshipouri, V., Arkell, R.M., Cattanach, B., Copp, A.J., Henderson, D.J., Spurr, N., Stanier, P., Fisher, E.M., *et al.* (2003). Mutation of *Celsr1*

disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr. Biol.* *13*, 1129–1133.

Danielson, N.B., Turi, G.F., Ladow, M., Chavlis, S., Petrantonakis, P.C., Poirazi, P., and Losonczy, A. (2017). In Vivo Imaging of Dentate Gyrus Mossy Cells in Behaving Mice. *Neuron* *93*, 552–559.e4.

Darken, R.S., Scola, A.M., Rakeman, A.S., Das, G., Mlodzik, M., and Wilson, P.A. (2002). The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *EMBO J.* *21*, 976–985.

Das, G., Jenny, A., Klein, T.J., Eaton, S., and Mlodzik, M. (2004). *Diego* interacts with *Prickle* and *Strabismus/Van Gogh* to localize planar cell polarity complexes. *Development* *131*, 4467–4476.

Davey, C.F., Mathewson, A.W., and Moens, C.B. (2016). PCP Signaling between Migrating Neurons and their Planar-Polarized Neuroepithelial Environment Controls Filopodial Dynamics and Directional Migration. *PLoS Genet.* *12*, e1005934.

Davis, M. (1997). Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* *9*, 382–402.

de Almeida, L., Idiart, M., and Lisman, J.E. (2009). The input-output transformation of the hippocampal granule cells: from grid cells to place fields. *J. Neurosci.* *29*, 7504–7512.

Deans, M.R., Antic, D., Suyama, K., Scott, M.P., Axelrod, J.D., and Goodrich, L.V. (2007). Asymmetric distribution of *prickle-like 2* reveals an early underlying polarization of vestibular sensory epithelia in the inner ear. *J. Neurosci.* *27*, 3139–3147.

Deardorff, M.A., Tan, C., Conrad, L.J., and Klein, P.S. (1998). *Frizzled-8* is expressed in the Spemann organizer and plays a role in early morphogenesis. *Development* *125*, 2687–2700.

- Deng, W., Aimone, J.B., and Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews. Neuroscience* 11, 339.
- Deng, W., Mayford, M., and Gage, F.H. (2013). Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *ELife Sciences* 2, e00312.
- Desmedt, A., Marighetto, A., Garcia, R., and Jaffard, R. (2003). The effects of ibotenic hippocampal lesions on discriminative fear conditioning to context in mice: impairment or facilitation depending on the associative value of a phasic explicit cue. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1953–1963.
- Devenport, D. (2014). The cell biology of planar cell polarity. *J Cell Biol* 207, 171–179.
- Ding, S.-L. (2013). Comparative anatomy of the prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum, and parasubiculum in human, monkey, and rodent. *J. Comp. Neurol.* 521, 4145–4162.
- Du, Z., Chazalon, M., Bestaven, E., Leste-Lasserre, T., Baufreton, J., Cazalets, J.-R., Cho, Y.H., and Garret, M. (2016). Early GABAergic transmission defects in the external globus pallidus and rest/activity rhythm alteration in a mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience* 329, 363–379.
- Duan, X., Kang, E., Liu, C.Y., Ming, G., and Song, H. (2008). Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 18, 108–115.
- Eichenbaum, H., Stewart, C., and Morris, R.G. (1990). Hippocampal representation in place learning. *J. Neurosci.* 10, 3531–3542.
- Eichenbaum, H. (2017). On the Integration of Space, Time, and Memory. *Neuron* 95, 1007–1018.
- Espósito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., and Schinder, A.F. (2005). Neuronal Differentiation in the Adult

Hippocampus Recapitulates Embryonic Development. *J. Neurosci.* 25, 10074–10086.

Etheridge, S.L., Ray, S., Li, S., Hamblet, N.S., Lijam, N., Tsang, M., Greer, J., Kardos, N., Wang, J., Sussman, D.J., *et al.* (2008). Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. *PLoS Genet.* 4, e1000259.

Ezan, J., and Montcouquiol, M. (2013). Revisiting planar cell polarity in the inner ear. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24, 499–506.

Fanselow, M.S., and Dong, H.-W. (2010). Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7.

Feng, J., Xu, Y., Wang, M., Ruan, Y., So, K.-F., Tissir, F., Goffinet, A., and Zhou, L. (2012). A Role for Atypical Cadherin Celsr3 in Hippocampal Maturation and Connectivity. *J. Neurosci.* 32, 13729–13743.

Fenstermaker, A.G., Prasad, A.A., Bechara, A., Adolfs, Y., Tissir, F., Goffinet, A., Zou, Y., and Pasterkamp, R.J. (2010). Wnt/planar cell polarity signaling controls the anterior-posterior organization of monoaminergic axons in the brainstem. *J. Neurosci.* 30, 16053–16064.

Finnegan, R., and Becker, S. (2015). Neurogenesis paradoxically decreases both pattern separation and memory interference. *Front Syst Neurosci* 9.

Frankland, P.W., and Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6, 119–130.

Gammill, L.S., and Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 795–805.

Gao, B., Song, H., Bishop, K., Elliot, G., Garrett, L., English, M.A., Andre, P., Robinson, J., Sood, R., Minami, Y., *et al.* (2011). Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev. Cell* 20, 163–176.

- Gao, F.B., Kohwi, M., Brenman, J.E., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2000). Control of dendritic field formation in *Drosophila*: the roles of flamingo and competition between homologous neurons. *Neuron* 28, 91–101.
- Ge, S., Pradhan, D.A., Ming, G., and Song, H. (2007a). GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends in Neurosciences* 30, 1–8.
- Ge, S., Yang, C.-H., Hsu, K.-S., Ming, G.-L., and Song, H. (2007b). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54, 559–566.
- Geiller, T., Royer, S., and Choi, J.-S. (2017). Segregated Cell Populations Enable Distinct Parallel Encoding within the Radial Axis of the CA1 Pyramidal Layer. *Exp Neurobiol* 26, 1–10.
- Giese, A.P., Ezan, J., Wang, L., Lasvaux, L., Lembo, F., Mazzocco, C., Richard, E., Reboul, J., Borg, J.-P., Kelley, M.W., *et al.* (2012). *Gipc1* has a dual role in *Vangl2* trafficking and hair bundle integrity in the inner ear. *Development* 139, 3775–3785.
- Gilbert, P.E., Kesner, R.P., and Lee, I. (2001). Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11, 626–636.
- Gilland, E., and Baker, R. (2005). Evolutionary patterns of cranial nerve efferent nuclei in vertebrates. *Brain Behav. Evol.* 66, 234–254.
- Gilman, S.R., Iossifov, I., Levy, D., Ronemus, M., Wigler, M., and Vitkup, D. (2011). Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron* 70, 898–907.
- Gold, A.E., and Kesner, R.P. (2005). The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. *Hippocampus* 15, 808–814.

- Gonçalves, J.T., Schafer, S.T., and Gage, F.H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167, 897–914.
- Goode, B.L., and Eck, M.J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 593–627.
- Goodrich, L.V. (2008). The plane facts of PCP in the CNS. *Neuron* 60, 9–16.
- GoodSmith, D., Chen, X., Wang, C., Kim, S.H., Song, H., Burgalossi, A., Christian, K.M., and Knierim, J.J. (2017). Spatial Representations of Granule Cells and Mossy Cells of the Dentate Gyrus. *Neuron* 93, 677–690.e5.
- Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 481–488.
- Gubb, D., and García-Bellido, A. (1982). A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 68, 37–57.
- Guo, N., Hawkins, C., and Nathans, J. (2004). Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9277–9281.
- Guo, Y., Zanetti, G., and Schekman, R. (2013). A novel GTP-binding protein-adaptor protein complex responsible for export of Vangl2 from the trans Golgi network. *Elife* 2, e00160.
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436, 801–806.
- Hagihara, H., Takao, K., Walton, N.M., Matsumoto, M., and Miyakawa, T. (2013). Immature Dentate Gyrus: An Endophenotype of Neuropsychiatric Disorders. *Neural Plast* 2013.
- Hagiwara, A., Yasumura, M., Hida, Y., Inoue, E., and Ohtsuka, T. (2014). The planar cell polarity protein Vangl2 bidirectionally regulates dendritic branching in cultured hippocampal neurons. *Mol Brain* 7, 79.

- Hartley, T., Lever, C., Burgess, N., and O'Keefe, J. (2014). Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. *Phil. Trans. R. Soc. B* *369*, 20120510.
- Hatakeyama, J., Wald, J.H., Printsev, I., Ho, H.-Y.H., and Carraway, K.L. (2014). Vangl1 and Vangl2: planar cell polarity components with a developing role in cancer. *Endocr. Relat. Cancer* *21*, R345-356.
- Hegazy, S.A., Alshareef, A., Gelebart, P., Anand, M., Armanious, H., Ingham, R.J., and Lai, R. (2013). Disheveled proteins promote cell growth and tumorigenicity in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cell. Signal.* *25*, 295–307.
- Heimer-McGinn, V., and Young, P. (2011). Efficient inducible Pan-neuronal cre-mediated recombination in SLICK-H transgenic mice. *Genesis* *49*, 942–949.
- Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saúde, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., and Wilson, S.W. (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* *405*, 76–81.
- Henderson, D.J., Conway, S.J., Greene, N.D., Gerrelli, D., Murdoch, J.N., Anderson, R.H., and Copp, A.J. (2001). Cardiovascular defects associated with abnormalities in midline development in the Loop-tail mouse mutant. *Circ. Res.* *89*, 6–12.
- Hida, Y., Fukaya, M., Hagiwara, A., Deguchi-Tawarada, M., Yoshioka, T., Kitajima, I., Inoue, E., Watanabe, M., and Ohtsuka, T. (2011). Prickle2 is localized in the postsynaptic density and interacts with PSD-95 and NMDA receptors in the brain. *J. Biochem.* *149*, 693–700.
- Hilal, M.L., Moreau, M.M., Racca, C., Pinheiro, V.L., Piguel, N.H., Santoni, M.-J., Dos Santos Carvalho, S., Blanc, J.-M., Abada, Y.-S.K., Peyroutou, R., *et al.* (2016). Activity-Dependent Neuroplasticity Induced by an Enriched Environment Reverses Cognitive Deficits in Scribble Deficient Mouse. *Cereb. Cortex* 1–17.
- Hilal, M.L., Moreau, M.M., Racca, C., Pinheiro, V.L., Piguel, N.H., Santoni, M.-J., Dos Santos Carvalho, S., Blanc, J.-M., Abada, Y.-S.K., Peyroutou, R., *et al.* Activity-

Dependent Neuroplasticity Induced by an Enriched Environment Reverses Cognitive Deficits in Scribble Deficient Mouse. *Cereb Cortex* 1–17.

Hirota, Y., Sawada, M., Kida, Y.S., Huang, S., Yamada, O., Sakaguchi, M., Ogura, T., Okano, H., and Sawamoto, K. (2012). Roles of Planar Cell Polarity Signaling in Maturation of Neuronal Precursor Cells in the Postnatal Mouse Olfactory Bulb. *STEM CELLS* 30, 1726–1733.

Hitti, F.L., and Siegelbaum, S.A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature* 508, 88–92.

Holden, H.M., and Gilbert, P.E. (2012). Less efficient pattern separation may contribute to age-related spatial memory deficits. *Front Aging Neurosci* 4.

Hua, Z.L., Smallwood, P.M., and Nathans, J. (2013). Frizzled3 controls axonal development in distinct populations of cranial and spinal motor neurons. *Elife* 2, e01482.

Hunsaker, M.R., and Kesner, R.P. (2013). The operation of pattern separation and pattern completion processes associated with different attributes or domains of memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 37, 36–58.

Huttlin, E.L., Bruckner, R.J., Paulo, J.A., Cannon, J.R., Ting, L., Baltier, K., Colby, G., Gebreab, F., Gygi, M.P., Parzen, H., *et al.* (2017). Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature* 545, 505–509.

Iijima, T., Miura, E., Watanabe, M., and Yuzaki, M. (2010). Distinct expression of C1q-like family mRNAs in mouse brain and biochemical characterization of their encoded proteins. *Eur. J. Neurosci.* 31, 1606–1615.

Iliescu, A., Gravel, M., Horth, C., and Gros, P. (2014). Independent mutations at Arg181 and Arg274 of Vangl proteins that are associated with neural tube defects in humans decrease protein stability and impair membrane targeting. *Biochemistry* 53, 5356–5364.

- Ito, R., and Lee, A.C.H. (2016). The role of the hippocampus in approach-avoidance conflict decision-making: Evidence from rodent and human studies. *Behavioural Brain Research* 313, 345–357.
- James, R.G., Bosch, K.A., Kulikauskas, R.M., Yang, P.T., Robin, N.C., Toroni, R.A., Biechele, T.L., Berndt, J.D., von Haller, P.D., Eng, J.K., *et al.* (2013). Protein kinase PKN1 represses Wnt/ β -catenin signaling in human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 288, 34658–34670.
- Jenny, A., Darken, R.S., Wilson, P.A., and Mlodzik, M. (2003). Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. *EMBO J.* 22, 4409–4420.
- Jessen, J.R., Topczewski, J., Bingham, S., Sepich, D.S., Marlow, F., Chandrasekhar, A., and Solnica-Krezel, L. (2002). Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements. *Nat. Cell Biol.* 4, 610–615.
- Jinde, S., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Pickel, J., Kohno, K., Belforte, J.E., and Nakazawa, K. (2012). Hilar Mossy Cell Degeneration Causes Transient Dentate Granule Cell Hyperexcitability and Impaired Pattern Separation. *Neuron* 76, 1189–1200.
- Johnston, S.T., Shtrahman, M., Parylak, S., Gonçalves, J.T., and Gage, F.H. (2016). Paradox of pattern separation and adult neurogenesis: A dual role for new neurons balancing memory resolution and robustness. *Neurobiology of Learning and Memory* 129, 60–68.
- Kang, C., Zhou, L., Liu, H., and Yang, J. (2011). Association study of the frizzled 3 gene with Chinese Va schizophrenia. *Neurosci. Lett.* 505, 196–199.
- Kang, H.J., Yi, Y.W., Kim, H.J., Hong, Y.B., Seong, Y.S., and Bae, I. (2012). BRCA1 negatively regulates IGF-1 expression through an estrogen-responsive element-like site. *Cell Death Dis* 3, e336.

- Katoh, M. (2002). Molecular cloning and characterization of Strabismus 2 (STB2). *Int. J. Oncol.* 20, 993–998.
- Katsu, T., Ujike, H., Nakano, T., Tanaka, Y., Nomura, A., Nakata, K., Takaki, M., Sakai, A., Uchida, N., Imamura, T., *et al.* (2003). The human frizzled-3 (FZD3) gene on chromosome 8p21, a receptor gene for Wnt ligands, is associated with the susceptibility to schizophrenia. *Neurosci. Lett.* 353, 53–56.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., and Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27, 447–452.
- Kesner, R.P., Hunsaker, M.R., and Ziegler, W. (2011). The role of the dorsal and ventral hippocampus in olfactory working memory. *Neurobiol Learn Mem* 96, 361–366.
- Kesner, R.P., Lee, I., and Gilbert, P. (2004). A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev Neurosci* 15, 333–351.
- Kesner, R.P. (2013). A process analysis of the CA3 subregion of the hippocampus. *Front Cell Neurosci* 7.
- Kheirbek, M.A., Tannenholz, L., and Hen, R. (2012). NR2B-Dependent Plasticity of Adult-Born Granule Cells is Necessary for Context Discrimination. *J. Neurosci.* 32, 8696–8702.
- Kibar, Z., Underhill, D.A., Canonne-Hergaux, F., Gauthier, S., Justice, M.J., and Gros, P. (2001a). Identification of a new chemically induced allele (Lp(m1Jus)) at the loop-tail locus: morphology, histology, and genetic mapping. *Genomics* 72, 331–337.
- Kibar, Z., Vogan, K.J., Groulx, N., Justice, M.J., Underhill, D.A., and Gros, P. (2001b). Ltap, a mammalian homolog of *Drosophila* Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat. Genet.* 28, 251–255.

- Kibar, Z., Gauthier, S., Lee, S.-H., Vidal, S., and Gros, P. (2003). Rescue of the neural tube defect of loop-tail mice by a BAC clone containing the *Ltap* gene. *Genomics* 82, 397–400.
- Kibar, Z., Torban, E., McDearmid, J.R., Reynolds, A., Berghout, J., Mathieu, M., Kirillova, I., De Marco, P., Merello, E., Hayes, J.M., *et al.* (2007). Mutations in *VANGL1* associated with neural-tube defects. *N. Engl. J. Med.* 356, 1432–1437.
- Kibar, Z., Bosoi, C.M., Kooistra, M., Salem, S., Finnell, R.H., De Marco, P., Merello, E., Bassuk, A.G., Capra, V., and Gros, P. (2009). Novel mutations in *VANGL1* in neural tube defects. *Hum. Mutat.* 30, E706-715.
- Kim, J.J., and Jung, M.W. (2006). Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 30, 188–202.
- Kivimäe, S., Yang, X.Y., and Cheyette, B.N. (2011). All Dact (Dapper/Frodo) scaffold proteins dimerize and exhibit conserved interactions with *Vangl*, *Dvl*, and serine/threonine kinases. *BMC Biochem* 12, 33.
- Kleefstra, T., Brunner, H.G., Amiel, J., Oudakker, A.R., Nillesen, W.M., Magee, A., Geneviève, D., Cormier-Daire, V., van Esch, H., Fryns, J.-P., *et al.* (2006). Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase 1 (*EHMT1*) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 370–377.
- Klein, T.J., and Mlodzik, M. (2005). Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 155–176.
- Kropff, E., Yang, S.M., and Schinder, A.F. (2015). Dynamic role of adult-born dentate granule cells in memory processing. *Current Opinion in Neurobiology* 35, 21–26.
- Kumaran, D., and McClelland, J.L. (2012). Generalization through the recurrent interaction of episodic memories: a model of the hippocampal system. *Psychol Rev* 119, 573–616.

- Kumaran, D. (2012). What representations and computations underpin the contribution of the hippocampus to generalization and inference? *Front Hum Neurosci* 6, 157.
- Lake, B.B., and Sokol, S.Y. (2009). Strabismus regulates asymmetric cell divisions and cell fate determination in the mouse brain. *J. Cell Biol.* 185, 59–66.
- Lassalle, J.-M., Bataille, T., and Halley, H. (2000). Reversible Inactivation of the Hippocampal Mossy Fiber Synapses in Mice Impairs Spatial Learning, but neither Consolidation nor Memory Retrieval, in the Morris Navigation Task. *Neurobiology of Learning and Memory* 73, 243–257.
- Leal, S.L., Tighe, S.K., Jones, C.K., and Yassa, M.A. (2014). Pattern Separation of Emotional Information in Hippocampal Dentate and CA3. *Hippocampus* 24, 1146–1155.
- Lee, O.-K., Frese, K.K., James, J.S., Chadda, D., Chen, Z.-H., Javier, R.T., and Cho, K.-O. (2003a). Discs-Large and Strabismus are functionally linked to plasma membrane formation. *Nat. Cell Biol.* 5, 987–993.
- Lee, R.C., Clandinin, T.R., Lee, C.-H., Chen, P.-L., Meinertzhagen, I.A., and Zipursky, S.L. (2003b). The protocadherin Flamingo is required for axon target selection in the *Drosophila* visual system. *Nat. Neurosci.* 6, 557–563.
- Lee, S., Song, Y.-A., Park, Y.-L., Cho, S.-B., Lee, W.-S., Lee, J.-H., Chung, I.-J., Kim, K.-K., Rew, J.-S., and Joo, Y.-E. (2011). Expression of KITENIN in human colorectal cancer and its relation to tumor behavior and progression. *Pathol. Int.* 61, 210–220.
- Lei, Y., Zhu, H., Yang, W., Ross, M.E., Shaw, G.M., and Finnell, R.H. (2014). Identification of novel CELSR1 mutations in spina bifida. *PLoS ONE* 9, e92207.
- Lei, Y.-P., Zhang, T., Li, H., Wu, B.-L., Jin, L., and Wang, H.-Y. (2010). VANGL2 mutations in human cranial neural-tube defects. *N. Engl. J. Med.* 362, 2232–2235.

- Leutgeb, J.K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* *315*, 961–966.
- Leutgeb, S., and Leutgeb, J.K. (2007). Pattern separation, pattern completion, and new neuronal codes within a continuous CA3 map. *Learn. Mem.* *14*, 745–757.
- Li, P., Zhang, H.Z., Huff, S., Nimmakayalu, M., Qumsiyeh, M., Yu, J., Szekely, A., Xu, T., and Pober, B.R. (2006). Karyotype-phenotype insights from 11q14.1-q23.2 interstitial deletions: FZD4 haploinsufficiency and exudative vitreoretinopathy in a patient with a complex chromosome rearrangement. *Am. J. Med. Genet. A* *140*, 2721–2729.
- Li, Y., Stam, F.J., Aimone, J.B., Goulding, M., Callaway, E.M., and Gage, F.H. (2013). Molecular layer perforant path-associated cells contribute to feed-forward inhibition in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 9106–9111.
- Lieberwirth, C., Pan, Y., Liu, Y., Zhang, Z., and Wang, Z. (2016). HIPPOCAMPAL ADULT NEUROGENESIS: ITS REGULATION AND POTENTIAL ROLE IN SPATIAL LEARNING AND MEMORY. *Brain Res* *1644*, 127–140.
- Lin, J.Y., Lin, M.Z., Steinbach, P., and Tsien, R.Y. (2009). Characterization of Engineered Channelrhodopsin Variants with Improved Properties and Kinetics. *Biophys J* *96*, 1803–1814.
- Lindqvist, M., Horn, Z., Bryja, V., Schulte, G., Papachristou, P., Ajima, R., Dyberg, C., Arenas, E., Yamaguchi, T.P., Lagercrantz, H., *et al.* (2010). Vang-like protein 2 and Rac1 interact to regulate adherens junctions. *J. Cell. Sci.* *123*, 472–483.
- Liu, W., Sato, A., Khadka, D., Bharti, R., Diaz, H., Runnels, L.W., and Habas, R. (2008). Mechanism of activation of the Formin protein Daam1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 210–215.
- Lopez-Rojas, J., and Kreutz, M.R. (2016). Mature granule cells of the dentate gyrus—Passive bystanders or principal performers in hippocampal function? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* *64*, 167–174.

- Lu, B., Usui, T., Uemura, T., Jan, L., and Jan, Y.N. (1999). Flamingo controls the planar polarity of sensory bristles and asymmetric division of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *9*, 1247–1250.
- Lu, Q., Schafer, D.A., and Adler, P.N. (2015). The *Drosophila* planar polarity gene *multiple wing hairs* directly regulates the actin cytoskeleton. *Development* *142*, 2478–2486.
- Lyuksyutova, A.I., Lu, C.-C., Milanesio, N., King, L.A., Guo, N., Wang, Y., Nathans, J., Tessier-Lavigne, M., and Zou, Y. (2003). Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* *302*, 1984–1988.
- Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., *et al.* (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* *13*, 133–140.
- Maguire, E.A., Frackowiak, R.S., and Frith, C.D. (1997). Recalling routes around london: activation of the right hippocampus in taxi drivers. *J. Neurosci.* *17*, 7103–7110.
- Manns, J.R., Hopkins, R.O., and Squire, L.R. (2003). Semantic Memory and the Human Hippocampus. *Neuron* *38*, 127–133.
- Marchal, C., and Mulle, C. (2004). Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors. *J Physiol* *561*, 27–37.
- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.* *24*, 897–931.
- Marín-Burgin, A., Mongiat, L.A., Pardi, M.B., and Schinder, A.F. (2012). Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science* *335*, 1238–1242.

- Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 262, 23–81.
- Martens, M.A., Wilson, S.J., and Reutens, D.C. (2008). Research Review: Williams syndrome: a critical review of the cognitive, behavioral, and neuroanatomical phenotype. *J Child Psychol Psychiatry* 49, 576–608.
- McAvoy, K., Besnard, A., and Sahay, A. (2015). Adult hippocampal neurogenesis and pattern separation in DG: a role for feedback inhibition in modulating sparseness to govern population-based coding. *Front Syst Neurosci* 9.
- McClelland, J.L., and Goddard, N.H. (1996). Considerations arising from a complementary learning systems perspective on hippocampus and neocortex. *Hippocampus* 6, 654–665.
- McHugh, T.J., Jones, M.W., Quinn, J.J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J.K., Lowell, B.B., Fanselow, M.S., Wilson, M.A., and Tonegawa, S. (2007). Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* 317, 94–99.
- McNaughton, B.L., Battaglia, F.P., Jensen, O., Moser, E.I., and Moser, M.-B. (2006). Path integration and the neural basis of the “cognitive map.” *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 663–678.
- Merla, G., Brunetti-Pierri, N., Micale, L., and Fusco, C. (2010). Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Hum. Genet.* 128, 3–26.
- Merte, J., Jensen, D., Wright, K., Sarsfield, S., Wang, Y., Schekman, R., and Ginty, D.D. (2010). Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure. *Nat. Cell Biol.* 12, 41-46; sup pp 1-8.
- Messéant, J., Ezan, J., Delers, P., Glebov, K., Marchiol, C., Lager, F., Renault, G., Tissir, F., Montcouquiol, M., Sans, N., *et al.* (2017). Wnt proteins contribute to neuromuscular junction formation through distinct signaling pathways. *Development* 144, 1712–1724.

- Messier, B., Leblond, C.P., and Smart, I. (1958). Presence of DNA synthesis and mitosis in the brain of young adult mice. *Experimental Cell Research* 14, 224–226.
- Micheau, J., Vimoney, A., Normand, E., Mulle, C., and Riedel, G. (2014). Impaired hippocampus-dependent spatial flexibility and sociability represent autism-like phenotypes in GluK2 mice. *Hippocampus* 24, 1059–1069.
- Montcouquiol, M., Rachel, R.A., Lanford, P.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Kelley, M.W. (2003). Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423, 173–177.
- Montcouquiol, M., Sans, N., Huss, D., Kach, J., Dickman, J.D., Forge, A., Rachel, R.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Bogani, D., *et al.* (2006). Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J. Neurosci.* 26, 5265–5275.
- Moreau, M.M., Piguel, N., Papouin, T., Koehl, M., Durand, C.M., Rubio, M.E., Loll, F., Richard, E.M., Mazzocco, C., Racca, C., *et al.* (2010). The planar polarity protein Scribble1 is essential for neuronal plasticity and brain function. *J. Neurosci.* 30, 9738–9752.
- Morris, A.M., Curtis, B.J., Churchwell, J.C., Maasberg, D.W., and Kesner, R.P. (2013). Temporal associations for spatial events: the role of the dentate gyrus. *Behav. Brain Res.* 256, 250–256.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O’Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683.
- Mrkusich, E.M., Flanagan, D.J., and Whittington, P.M. (2011). The core planar cell polarity gene *prickle* interacts with *flamingo* to promote sensory axon advance in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* 358, 224–230.
- Murdoch, J.N., Doudney, K., Paternotte, C., Copp, A.J., and Stanier, P. (2001). Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of *Lpp1*, a novel gene involved in floor plate specification. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2593–2601.

- Nader, K., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. (2000). The labile nature of consolidation theory. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 216–219.
- Nagaoka, T., and Kishi, M. (2016). The planar cell polarity protein Vangl2 is involved in postsynaptic compartmentalization. *Neuroscience Letters* *612*, 251–255.
- Nagaoka, T., Inutsuka, A., Begum, K., Bin hafiz, K. musabbir, and Kishi, M. (2014a). Vangl2 regulates E-cadherin in epithelial cells. *Sci Rep* *4*, 6940.
- Nagaoka, T., Ohashi, R., Inutsuka, A., Sakai, S., Fujisawa, N., Yokoyama, M., Huang, Y.H., Igarashi, M., and Kishi, M. (2014b). The Wnt/planar cell polarity pathway component Vangl2 induces synapse formation through direct control of N-cadherin. *Cell Rep* *6*, 916–927.
- Nagaoka, T., Tabuchi, K., and Kishi, M. (2015). PDZ interaction of Vangl2 links PSD-95 and Prickle2 but plays only a limited role in the synaptic localisation of Vangl2. *Sci Rep* *5*, 12916.
- Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Barrera, V.R., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., *et al.* (2012). Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation whereas Old Granule Cells Contribute to Pattern Completion. *Cell* *149*, 188–201.
- Nakazawa, K., Quirk, M.C., Chitwood, R.A., Watanabe, M., Yeckel, M.F., Sun, L.D., Kato, A., Carr, C.A., Johnston, D., Wilson, M.A., *et al.* (2002). Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* *297*, 211–218.
- Nakazawa, K. (2017). Dentate Mossy Cell and Pattern Separation. *Neuron* *93*, 465–467.
- Nallathambi, J., Shukla, D., Rajendran, A., Namperumalsamy, P., Muthulakshmi, R., and Sundaresan, P. (2006). Identification of novel FZD4 mutations in Indian patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Mol. Vis.* *12*, 1086–1092.

- Neunuebel, J.P., and Knierim, J.J. (2014). CA3 Retrieves Coherent Representations from Degraded Input: Direct Evidence for CA3 Pattern Completion and Dentate Gyrus Pattern Separation. *Neuron* 81, 416–427.
- Neves, G., Cooke, S.F., and Bliss, T.V.P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9, 65–75.
- Newman, E.L., and Hasselmo, M.E. (2014). CA3 sees the big picture while dentate gyrus splits hairs. *Neuron* 81, 226–228.
- Ohata, S., Nakatani, J., Herranz-Pérez, V., Cheng, J., Belinson, H., Inubushi, T., Snider, W.D., García-Verdugo, J.M., Wynshaw-Boris, A., and Álvarez-Buylla, A. (2014). Loss of Dishevelleds disrupts planar polarity in ependymal motile cilia and results in hydrocephalus. *Neuron* 83, 558–571.
- Ohira, K., Kobayashi, K., Toyama, K., Nakamura, H.K., Shoji, H., Takao, K., Takeuchi, R., Yamaguchi, S., Kataoka, M., Otsuka, S., *et al.* (2013). Synaptosomal-associated protein 25 mutation induces immaturity of the dentate granule cells of adult mice. *Mol Brain* 6, 12.
- O’Keefe, J., and Burgess, N. (1996). Geometric determinants of the place fields of hippocampal neurons. *Nature* 381, 425–428.
- O’Keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175.
- Okerlund, N.D., Stanley, R.E., and Cheyette, B.N.R. (2016). The Planar Cell Polarity Transmembrane Protein Vangl2 Promotes Dendrite, Spine and Glutamatergic Synapse Formation in the Mammalian Forebrain. *Mol Neuropsychiatry* 2, 107–114.
- O’Mara, S. (2005). The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *J. Anat.* 207, 271–282.

- O'Neil, E.B., Newsome, R.N., Li, I.H.N., Thavabalasingam, S., Ito, R., and Lee, A.C.H. (2015). Examining the Role of the Human Hippocampus in Approach-Avoidance Decision Making Using a Novel Conflict Paradigm and Multivariate Functional Magnetic Resonance Imaging. *J. Neurosci.* *35*, 15039–15049.
- O'Reilly, R.C., and McClelland, J.L. (1994). Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus* *4*, 661–682.
- Overstreet, L.S., Hentges, S.T., Bumashny, V.F., de Souza, F.S.J., Smart, J.L., Santangelo, A.M., Low, M.J., Westbrook, G.L., and Rubinstein, M. (2004). A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus. *J. Neurosci.* *24*, 3251–3259.
- Paemka, L., Mahajan, V.B., Skeie, J.M., Sowers, L.P., Ehaideb, S.N., Gonzalez-Alegre, P., Sasaoka, T., Tao, H., Miyagi, A., Ueno, N., *et al.* (2013). PRICKLE1 interaction with SYNAPSIN I reveals a role in autism spectrum disorders. *PLoS ONE* *8*, e80737.
- Paleja, M., and Spaniol, J. (2013). Spatial pattern completion deficits in older adults. *Front Aging Neurosci* *5*, 3.
- Palombo, D.J., Keane, M.M., and Verfaellie, M. (2015). How does the hippocampus shape decisions? *Neurobiol Learn Mem* *125*, 93–97.
- Peng, Y., and Axelrod, J.D. (2012). Asymmetric protein localization in planar cell polarity. *Curr Top Dev Biol* *101*, 33–53.
- Phillips, R.G., and LeDoux, J.E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* *106*, 274–285.
- Piazzini, G., Selgrad, M., Garcia, M., Ceccarelli, C., Fini, L., Bianchi, P., Laghi, L., D'Angelo, L., Paterini, P., Malferttheiner, P., *et al.* (2013). Van-Gogh-like 2 antagonises the canonical WNT pathway and is methylated in colorectal cancers. *Br. J. Cancer* *108*, 1750–1756.

- Piguel, N.H., Fievre, S., Blanc, J.-M., Carta, M., Moreau, M.M., Moutin, E., Pinheiro, V.L., Medina, C., Ezan, J., Lasvaux, L., *et al.* (2014). Scribble1/AP2 complex coordinates NMDA receptor endocytic recycling. *Cell Rep* 9, 712–727.
- Price, D.J., Kennedy, H., Dehay, C., Zhou, L., Mercier, M., Jossin, Y., Goffinet, A.M., Tissir, F., Blakey, D., and Molnár, Z. (2006). The development of cortical connections. *Eur. J. Neurosci.* 23, 910–920.
- Puvirajesinghe, T.M., Bertucci, F., Jain, A., Scerbo, P., Belotti, E., Audebert, S., Sebbagh, M., Lopez, M., Brech, A., Finetti, P., *et al.* (2016). Identification of p62/SQSTM1 as a component of non-canonical Wnt VANGL2-JNK signalling in breast cancer. *Nat Commun* 7, 10318.
- Qu, Y., Glasco, D.M., Zhou, L., Sawant, A., Ravní, A., Fritzscht, B., Damrau, C., Murdoch, J.N., Evans, S., Pfaff, S.L., *et al.* (2010). Atypical cadherins Celsr1-3 differentially regulate migration of facial branchiomotor neurons in mice. *J. Neurosci.* 30, 9392–9401.
- Ramsbottom, S.A., Sharma, V., Rhee, H.J., Eley, L., Phillips, H.M., Rigby, H.F., Dean, C., Chaudhry, B., and Henderson, D.J. (2014). Vangl2-regulated polarisation of second heart field-derived cells is required for outflow tract lengthening during cardiac development. *PLoS Genet.* 10, e1004871.
- Rebola, N., Carta, M., and Mulle, C. (2017). Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding. *Nat Rev Neurosci* 18, 208–220.
- Roberts, J.L., Hovanes, K., Dasouki, M., Manzardo, A.M., and Butler, M.G. (2014). Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene* 535, 70–78.
- Robitaille, J., MacDonald, M.L.E., Kaykas, A., Sheldahl, L.C., Zeisler, J., Dubé, M.-P., Zhang, L.-H., Singaraja, R.R., Guernsey, D.L., Zheng, B., *et al.* (2002). Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nat. Genet.* 32, 326–330.

- Rodriguez, A., Ehlenberger, D.B., Dickstein, D.L., Hof, P.R., and Wearne, S.L. (2008). Automated Three-Dimensional Detection and Shape Classification of Dendritic Spines from Fluorescence Microscopy Images. *PLoS ONE* 3.
- Rolls, E.T., and Kesner, R.P. (2006). A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog. Neurobiol.* 79, 1–48.
- Rolls, E.T. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front Syst Neurosci* 7.
- Rolls, E.T. (1996). A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus* 6, 601–620.
- Ryu, H.-S., Park, Y.-L., Park, S.-J., Lee, J.-H., Cho, S.-B., Lee, W.-S., Chung, I.-J., Kim, K.-K., Lee, K.-H., Kweon, S.-S., *et al.* (2010). KITENIN is associated with tumor progression in human gastric cancer. *Anticancer Res.* 30, 3479–3486.
- Sachidhanandam, S., Blanchet, C., Jeantet, Y., Cho, Y.H., and Mulle, C. (2009). Kainate receptors act as conditional amplifiers of spike transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.* 29, 5000–5008.
- Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O’Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A., and Hen, R. (2011a). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472, 466–470.
- Sahay, A., Wilson, D.A., and Hen, R. (2011b). Pattern Separation: A Common Function for New Neurons in Hippocampus and Olfactory Bulb. *Neuron* 70, 582–588.
- Sajan, S.A., Fernandez, L., Nieh, S.E., Rider, E., Bukshpun, P., Wakahiro, M., Christian, S.L., Rivière, J.-B., Sullivan, C.T., Sudi, J., *et al.* (2013). Both rare and de novo copy number variants are prevalent in agenesis of the corpus callosum but not in cerebellar hypoplasia or polymicrogyria. *PLoS Genet.* 9, e1003823.

- Sanchez-Alvarez, L., Visanuvimol, J., McEwan, A., Su, A., Imai, J.H., and Colavita, A. (2011). VANG-1 and PRKL-1 cooperate to negatively regulate neurite formation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* *7*, e1002257.
- Sans, N., Racca, C., Petralia, R.S., Wang, Y.X., McCallum, J., and Wenthold, R.J. (2001). Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J. Neurosci.* *21*, 7506–7516.
- Sans, N., Wang, P.Y., Du, Q., Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Nakka, S., Blumer, J.B., Macara, I.G., and Wenthold, R.J. (2005). mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. *Nat. Cell Biol.* *7*, 1179–1190.
- Sans, N., Ezan, J., Moreau, M., and Montcouquiol, M. (2016). Planar Cell Polarity Gene Mutations in Autism Spectrum Disorder, Intellectual Disabilities, and Related Deletion/Duplication Syndromes. pp. 189–219.
- Sans, N.A., Montcouquiol, M.E., and Raymond, J. (2000). Postnatal developmental changes in AMPA and NMDA receptors in the rat vestibular nuclei. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *123*, 41–52.
- Santoro, A. (2013). Reassessing pattern separation in the dentate gyrus. *Front Behav Neurosci* *7*.
- Sasselli, V., Boesmans, W., Vanden Berghe, P., Tissir, F., Goffinet, A.M., and Pachnis, V. (2013). Planar cell polarity genes control the connectivity of enteric neurons. *J. Clin. Invest.* *123*, 1763–1772.
- Schafer, S.T., Han, J., Pena, M., von Bohlen und Halbach, O., Peters, J., and Gage, F.H. (2015). The Wnt Adaptor Protein ATP6AP2 Regulates Multiple Stages of Adult Hippocampal Neurogenesis. *J Neurosci* *35*, 4983–4998.
- Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* *20*, 11–21.

- Senti, K.-A., Usui, T., Boucke, K., Greber, U., Uemura, T., and Dickson, B.J. (2003). Flamingo regulates R8 axon-axon and axon-target interactions in the *Drosophila* visual system. *Curr. Biol.* *13*, 828–832.
- Senzai, Y., and Buzsáki, G. (2017). Physiological Properties and Behavioral Correlates of Hippocampal Granule Cells and Mossy Cells. *Neuron* *93*, 691–704.e5.
- Shafer, B., Onishi, K., Lo, C., Colakoglu, G., and Zou, Y. (2011). Vangl2 promotes Wnt/planar cell polarity-like signaling by antagonizing Dvl1-mediated feedback inhibition in growth cone guidance. *Dev. Cell* *20*, 177–191.
- Shelton, D.J., and Kirwan, C.B. (2013). A possible negative influence of depression on the ability to overcome memory interference. *Behav. Brain Res.* *256*, 20–26.
- Shima, Y., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Chisaka, O., Takeichi, M., and Uemura, T. (2002). Differential expression of the seven-pass transmembrane cadherin genes *Celsr1-3* and distribution of the *Celsr2* protein during mouse development. *Dev. Dyn.* *223*, 321–332.
- Shima, Y., Kengaku, M., Hirano, T., Takeichi, M., and Uemura, T. (2004). Regulation of dendritic maintenance and growth by a mammalian 7-pass transmembrane cadherin. *Dev. Cell* *7*, 205–216.
- Shima, Y., Kawaguchi, S., Kosaka, K., Nakayama, M., Hoshino, M., Nabeshima, Y., Hirano, T., and Uemura, T. (2007). Opposing roles in neurite growth control by two seven-pass transmembrane cadherins. *Nat. Neurosci.* *10*, 963–969.
- Shimada, Y., Usui, T., Yanagawa, S., Takeichi, M., and Uemura, T. (2001). Asymmetric colocalization of Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, and Dishevelled in planar cell polarization. *Curr. Biol.* *11*, 859–863.
- Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., and Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* *410*, 372–376.

- Singh, J., and Mlodzik, M. (2012). Planar Cell Polarity Signaling: Coordination of cellular orientation across tissues. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1, 479–499.
- Sittaramane, V., Pan, X., Glasco, D.M., Huang, P., Gurung, S., Bock, A., Li, S., Wang, H., Kawakami, K., Matise, M.P., *et al.* (2013). The PCP protein Vangl2 regulates migration of hindbrain motor neurons by acting in floor plate cells, and independently of cilia function. *Dev. Biol.* 382, 400–412.
- Sloviter, R.S., and Lømo, T. (2012). Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization. *Front Neural Circuits* 6, 102.
- Smith, M.L. (1988). Recall of spatial location by the amnesic patient H.M. *Brain Cogn* 7, 178–183.
- Smith, M.L., and Milner, B. (1989). Right hippocampal impairment in the recall of spatial location: encoding deficit or rapid forgetting? *Neuropsychologia* 27, 71–81.
- Sokol, S.Y. (1996). Analysis of Dishevelled signalling pathways during *Xenopus* development. *Curr. Biol.* 6, 1456–1467.
- Song, H., Hu, J., Chen, W., Elliott, G., Andre, P., Gao, B., and Yang, Y. (2010). Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning. *Nature* 466, 378–382.
- South, M., Stephenson, K.G., Nielson, C.A., Maisel, M., Top, D.N., and Kirwan, C.B. (2015). Overactive Pattern Separation Memory Associated with Negative Emotionality in Adults Diagnosed with Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord* 45, 3458–3467.
- Sowers, L.P., Loo, L., Wu, Y., Campbell, E., Ulrich, J.D., Wu, S., Paemka, L., Wassink, T., Meyer, K., Bing, X., *et al.* (2013a). Disruption of the non-canonical Wnt gene PRICKLE2 leads to autism-like behaviors with evidence for hippocampal synaptic dysfunction. *Mol. Psychiatry* 18, 1077–1089.

- Sowers, L.P., Mouw, T.J., Ferguson, P.J., Wemmie, J.A., Mohapatra, D.P., and Bassuk, A.G. (2013b). The non-canonical Wnt ligand Wnt5a rescues morphological deficits in Prickle2-deficient hippocampal neurons. *Mol. Psychiatry* 18, 1049.
- Soldano, A., Okray, Z., Janovska, P., Tmejová, K., Reynaud, E., Claeys, A., Yan, J., Atak, Z.K., De Strooper, B., Dura, J.-M., *et al.* (2013). The Drosophila Homologue of the Amyloid Precursor Protein Is a Conserved Modulator of Wnt PCP Signaling. *PLoS Biol* 11.
- Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82, 171–177.
- Squire, L.R. (2009). The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron* 61, 6–9.
- Squire, L.R., and Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology* 5, 169–177.
- Stark, S.M., Yassa, M.A., and Stark, C.E.L. (2010). Individual differences in spatial pattern separation performance associated with healthy aging in humans. *Learn Mem* 17, 284–288.
- Steimel, A., Wong, L., Najarro, E.H., Ackley, B.D., Garriga, G., and Hutter, H. (2010). The Flamingo ortholog FMI-1 controls pioneer-dependent navigation of follower axons in *C. elegans*. *Development* 137, 3663–3673.
- Stein, K.F., and Mackensen, J.A. (1957). Abnormal development of the thoracic skeleton in mice homozygous for the gene for looped-tail. *Am. J. Anat.* 100, 205–223.
- Steinel, M.C., and Whitington, P.M. (2009). The atypical cadherin Flamingo is required for sensory axon advance beyond intermediate target cells. *Dev. Biol.* 327, 447–457.
- Stoeckli, E., and Zou, Y. (2009). How are neurons wired to form functional and plastic circuits? Meeting on Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity. *EMBO Rep* 10, 326–330.

- Strong L. C., Hollander W. F. (1949). Hereditary loop-tail in the house mouse accompanied by imperforate vagina and with lethal craniorachischisis when homozygous. *J. Hered.* 40, 329-334
- Strutt, D. (2003). Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Development* 130, 4501–4513.
- Strutt, D.I. (2002). The asymmetric subcellular localisation of components of the planar polarity pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 225–231.
- Strutt, D., and Warrington, S.J. (2008). Planar polarity genes in the *Drosophila* wing regulate the localisation of the FH3-domain protein Multiple Wing Hairs to control the site of hair production. *Development* 135, 3103–3111.
- Strutt, H., and Strutt, D. (2009). Asymmetric localisation of planar polarity proteins: Mechanisms and consequences. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 957–963.
- Strutt, D.I., Weber, U., and Mlodzik, M. (1997). The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature* 387, 292–295.
- Suriben, R., Kivimäe, S., Fisher, D.A.C., Moon, R.T., and Cheyette, B.N.R. (2009). Posterior malformations in *Dact1* mutant mice arise through misregulated *Vangl2* at the primitive streak. *Nat. Genet.* 41, 977–985.
- Szymczak-Workman, A.L., Vignali, K.M., and Vignali, D.A.A. (2012). Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harb Protoc* 2012, 199–204.
- Tabarés-Seisdedos, R., and Rubenstein, J.L.R. (2009). Chromosome 8p as a potential hub for developmental neuropsychiatric disorders: implications for schizophrenia, autism and cancer. *Mol. Psychiatry* 14, 563–589.
- Tamminga, C.A., Southcott, S., Sacco, C., Wagner, A.D., and Ghose, S. (2012). Glutamate dysfunction in hippocampus: relevance of dentate gyrus and CA3 signaling. *Schizophr Bull* 38, 927–935.

- Tao, H., Manak, J.R., Sowers, L., Mei, X., Kiyonari, H., Abe, T., Dahdaleh, N.S., Yang, T., Wu, S., Chen, S., *et al.* (2011). Mutations in prickle orthologs cause seizures in flies, mice, and humans. *Am. J. Hum. Genet.* *88*, 138–149.
- Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., and Gage, F.H. (2006). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* *442*, 929–933.
- Taylor, J., Abramova, N., Charlton, J., and Adler, P.N. (1998). Van Gogh: a new *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics* *150*, 199–210.
- Thakar, S., Wang, L., Yu, T., Ye, M., Onishi, K., Scott, J., Qi, J., Fernandes, C., Han, X., Yates, J.R., *et al.* (2017). Evidence for opposing roles of *Celsr3* and *Vangl2* in glutamatergic synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, E610–E618.
- Ting, S.B., Wilanowski, T., Cerruti, L., Zhao, L.-L., Cunningham, J.M., and Jane, S.M. (2003). The identification and characterization of human Sister-of-Mammalian Grainyhead (SOM) expands the grainyhead-like family of developmental transcription factors. *Biochem. J.* *370*, 953–962.
- Ting, S.B., Caddy, J., Hislop, N., Wilanowski, T., Auden, A., Zhao, L.-L., Ellis, S., Kaur, P., Uchida, Y., Holleran, W.M., *et al.* (2005). A homolog of *Drosophila* grainy head is essential for epidermal integrity in mice. *Science* *308*, 411–413.
- Tissir, F., and Goffinet, A.M. (2006). Expression of planar cell polarity genes during development of the mouse CNS. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 597–607.
- Tissir, F., and Goffinet, A.M. (2013). Shaping the nervous system: role of the core planar cell polarity genes. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 525–535.
- Tissir, F., Qu, Y., Montcouquiol, M., Zhou, L., Komatsu, K., Shi, D., Fujimori, T., Labeau, J., Tyteca, D., Courtoy, P., *et al.* (2010). Lack of cadherins *Celsr2* and *Celsr3* impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat. Neurosci.* *13*, 700–707.

- Torban, E., Kor, C., and Gros, P. (2004a). Van Gogh-like2 (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates. *Trends Genet.* *20*, 570–577.
- Torban, E., Wang, H.-J., Groulx, N., and Gros, P. (2004b). Independent mutations in mouse *Vangl2* that cause neural tube defects in looptail mice impair interaction with members of the Dishevelled family. *J. Biol. Chem.* *279*, 52703–52713.
- Torban, E., Patenaude, A.-M., Leclerc, S., Rakowiecki, S., Gauthier, S., Andelfinger, G., Epstein, D.J., and Gros, P. (2008). Genetic interaction between members of the *Vangl* family causes neural tube defects in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 3449–3454.
- Tree, D.R.P., Shulman, J.M., Rousset, R., Scott, M.P., Gubb, D., and Axelrod, J.D. (2002). Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell* *109*, 371–381.
- Treves, A., and Rolls, E.T. (1994). Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus* *4*, 374–391.
- Tronel, S., Belnoue, L., Grosjean, N., Revest, J.-M., Piazza, P.-V., Koehl, M., and Abrous, D.N. (2012). Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus* *22*, 292–298.
- Trouche, S., Bontempi, B., Roullet, P., and Rampon, C. (2009). Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 5919–5924.
- Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R.W., Schwarz, T.L., Takeichi, M., and Uemura, T. (1999). Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* *98*, 585–595.

- Vadodaria, K.C., and Jessberger, S. (2013). Maturation and integration of adult born hippocampal neurons: signal convergence onto small Rho GTPases. *Front Synaptic Neurosci* 5.
- Vandenberg, A.L., and Sassoon, D.A. (2009). Non-canonical Wnt signaling regulates cell polarity in female reproductive tract development *via* van gogh-like 2. *Development* 136, 1559–1570.
- Veeman, M.T., Slusarski, D.C., Kaykas, A., Louie, S.H., and Moon, R.T. (2003). Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr. Biol.* 13, 680–685.
- Vinson, C.R., and Adler, P.N. (1987). Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*. *Nature* 329, 549–551.
- Vivancos, V., Chen, P., Spassky, N., Qian, D., Dabdoub, A., Kelley, M., Studer, M., and Guthrie, S. (2009). Wnt activity guides facial branchiomotor neuron migration, and involves the PCP pathway and JNK and ROCK kinases. *Neural Dev* 4, 7.
- Vladar, E.K., Bayly, R.D., Sangoram, A.M., Scott, M.P., and Axelrod, J.D. (2012). Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia. *Curr. Biol.* 22, 2203–2212.
- Wallingford, J.B. (2012). Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 627–653.
- Walton, N.M., Zhou, Y., Kogan, J.H., Shin, R., Webster, M., Gross, A.K., Heusner, C.L., Chen, Q., Miyake, S., Tajinda, K., *et al.* (2012). Detection of an immature dentate gyrus feature in human schizophrenia/bipolar patients. *Transl Psychiatry* 2, e135.
- Wang, Y., and Nathans, J. (2007). Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* 134, 647–658.

- Wang, J., Hamblet, N.S., Mark, S., Dickinson, M.E., Brinkman, B.C., Segil, N., Fraser, S.E., Chen, P., Wallingford, J.B., and Wynshaw-Boris, A. (2006a). Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Development* 133, 1767–1778.
- Wang, Y., Guo, N., and Nathans, J. (2006b). The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J. Neurosci.* 26, 2147–2156.
- Wang, Y.K., Samos, C.H., Peoples, R., Pérez-Jurado, L.A., Nusse, R., and Francke, U. (1997). A novel human homologue of the *Drosophila* frizzled wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23. *Hum. Mol. Genet.* 6, 465–472.
- Wansleben, C., Feitsma, H., Montcouquiol, M., Kroon, C., Cuppen, E., and Meijlink, F. (2010). Planar cell polarity defects and defective Vangl2 trafficking in mutants for the COPII gene Sec24b. *Development* 137, 1067–1073.
- Weeden, C.S.S., Hu, N.J., Ho, L.U.N., and Kesner, R.P. (2014). The role of the ventral dentate gyrus in olfactory pattern separation. *Hippocampus* 24, 553–559.
- Wen, S., Zhu, H., Lu, W., Mitchell, L.E., Shaw, G.M., Lammer, E.J., and Finnell, R.H. (2010). Planar cell polarity pathway genes and risk for spina bifida. *Am. J. Med. Genet. A* 152A, 299–304.
- Wentholt, R.J., Petralia, R.S., Blahos J, I.I., and Niedzielski, A.S. (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J. Neurosci.* 16, 1982–1989.
- White, J., Mazzeu, J.F., Hoischen, A., Jhangiani, S.N., Gambin, T., Alcino, M.C., Penney, S., Saraiva, J.M., Hove, H., Skovby, F., *et al.* (2015). DVL1 frameshift mutations clustering in the penultimate exon cause autosomal-dominant Robinow syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 96, 612–622.
- Willemsen, M.H., Vulto-van Silfhout, A.T., Nillesen, W.M., Wissink-Lindhout, W.M., van Bokhoven, H., Philip, N., Berry-Kravis, E.M., Kini, U., van Ravenswaaij-Arts,

- C.M.A., Delle Chiaie, B., *et al.* (2012). Update on Kleefstra Syndrome. *Mol Syndromol* 2, 202–212.
- Williams, B.B., Cantrell, V.A., Mundell, N.A., Bennett, A.C., Quick, R.E., and Jessen, J.R. (2012). VANGL2 regulates membrane trafficking of MMP14 to control cell polarity and migration. *J. Cell. Sci.* 125, 2141–2147.
- Willshaw, D.J., and Buckingham, J.T. (1990). An assessment of Marr's theory of the hippocampus as a temporary memory store. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 329, 205–215.
- Wilson, D.B., and Center, E.M. (1977). Differences in cerebral morphology in 2 stocks of mutant mice heterozygous for the loop-tail (Lp)-gene. *Experientia* 33, 1502–1503.
- Wilson, D.A. (2009). Pattern separation and completion in olfaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170, 306–312.
- Wilson, I.A., Gallagher, M., Eichenbaum, H., and Tanila, H. (2006). Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding. *Trends in Neurosciences* 29, 662–670.
- Winter, C.G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J.D., and Luo, L. (2001). *Drosophila* Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* 105, 81–91.
- Wiskott, L., Rasch, M.J., and Kempermann, G. (2006). A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: Avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus* 16, 329–343.
- Witter, M.P., Doan, T.P., Jacobsen, B., Nilssen, E.S., and Ohara, S. (2017). Architecture of the Entorhinal Cortex A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes. *Front Syst Neurosci* 11.
- Wolff, T., and Rubin, G.M. (1998). Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*. *Development* 125, 1149–1159.

- Wong, L.L., and Adler, P.N. (1993). Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J. Cell Biol.* *123*, 209–221.
- Wu, J., and Mlodzik, M. (2008). The frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stbm during nonautonomous planar cell polarity signaling. *Dev. Cell* *15*, 462–469.
- Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H., and Sasaki, H. (2008). Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev. Cell* *15*, 23–36.
- Yamasaki, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kajii, Y., Maeda, J., Soma, M., Takao, K., Tanda, K., Ohira, K., Toyama, K., *et al.* (2008). Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders. *Mol Brain* *1*, 6.
- Yan, J., Lu, Q., Fang, X., and Adler, P.N. (2009). Rho1 has multiple functions in *Drosophila* wing planar polarity. *Dev. Biol.* *333*, 186–199.
- Yao, R., Natsume, Y., and Noda, T. (2004). MAGI-3 is involved in the regulation of the JNK signaling pathway as a scaffold protein for frizzled and Ltap. *Oncogene* *23*, 6023–6030.
- Yassa, M.A., and Stark, C.E.L. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends in Neurosciences* *34*, 515–525.
- Yassa, M.A., Mattfeld, A.T., Stark, S.M., and Stark, C.E.L. (2011). Age-related memory deficits linked to circuit-specific disruptions in the hippocampus. *PNAS* *108*, 8873–8878.
- Yates, L.L., Papakrivopoulou, J., Long, D.A., Goggolidou, P., Connolly, J.O., Woolf, A.S., and Dean, C.H. (2010a). The planar cell polarity gene *Vangl2* is required for mammalian kidney-branching morphogenesis and glomerular maturation. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 4663–4676.

- Yates, L.L., Schnatwinkel, C., Murdoch, J.N., Bogani, D., Formstone, C.J., Townsend, S., Greenfield, A., Niswander, L.A., and Dean, C.H. (2010b). The PCP genes *Celsr1* and *Vangl2* are required for normal lung branching morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 2251–2267.
- Yin, H., Copley, C.O., Goodrich, L.V., and Deans, M.R. (2012). Comparison of phenotypes between different *vangl2* mutants demonstrates dominant effects of the Looptail mutation during hair cell development. *PLoS ONE* *7*, e31988.
- Yoon, T.M., Kim, S.-A., Lee, J.K., Park, Y.-L., Kim, G.Y., Joo, Y.-E., Lee, J.H., Kim, K.K., and Lim, S.C. (2013). Expression of KITENIN and its association with tumor progression in oral squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* *40*, 222–226.
- Yoshioka, T., Hagiwara, A., Hida, Y., and Ohtsuka, T. (2013). *Vangl2*, the planar cell polarity protein, is complexed with postsynaptic density protein PSD-95 [corrected]. *FEBS Lett.* *587*, 1453–1459.
- Yu, T., Tensaouti, Y., Bagha, Z.M., Davidson, R., Kim, A., and Kernie, S.G. (2017). Adult newborn neurons interfere with fear discrimination in a protocol-dependent manner. *Brain Behav* *7*.
- Zallen, J.A. (2007). Planar Polarity and Tissue Morphogenesis. *Cell* *129*, 1051–1063.
- Zeesman, S., Kjaergaard, S., Hove, H.D., Kirchhoff, M., Stevens, J.M., and Nowaczyk, M.J.M. (2012). Microdeletion in distal 17p13.1: a recognizable phenotype with microcephaly, distinctive facial features, and intellectual disability. *Am. J. Med. Genet. A* *158A*, 1832–1836.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Ming, G., and Gage, F.H. (2006). Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *J. Neurosci.* *26*, 3–11.
- Zhou, L., Bar, I., Achouri, Y., Campbell, K., De Backer, O., Hebert, J.M., Jones, K., Kessar, N., de Rouvroit, C.L., O’Leary, D., *et al.* (2008). Early forebrain wiring: genetic dissection using conditional *Celsr3* mutant mice. *Science* *320*, 946–949.

