

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	v
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 La sphingosine-1-phosphate.....	1
1.2 Grandes fonctions des récepteurs à la S1P.....	5
1.3 Les effets thérapeutiques du FTY720P	10
1.4 Les récepteurs NMDA du glutamate : fonctions et régulation	13
CHAPITRE II	
HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	19
CHAPITRE III	
ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	22
3.1 Contribution des auteurs.....	22
3.2 Article scientifique.....	23
Abstract.....	24
Introduction	25
Results	26
NMDA receptor phosphorylation by FTY720P	26
FTY720P increases plasma membrane levels of GluN2B- containing NMDA receptors.....	27
Regulation of Tau and Fyn by FTY720P	28
Discussion	29
Conclusion.....	32
Experimental procedures.....	33
Animals and ethics approval.....	33
Pharmacological agents and antibodies.....	33

Hippocampal slice preparation.....	34
Tissue samples and Western Blotting.....	34
Cell surface biotinylation	35
Statistical analysis.....	36
Acknowledgments.....	36
Figure Legends	37
Références.....	47
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	54
4.1 Enrichissement membranaire des récepteurs GluN2B	54
4.2 La régulation de la protéine Tau par le FTY720P : un processus initiateur de la régulation NMDA	58
4.3 Implication du sous-type 1 des récepteurs à la S1P	60
4.4 À la recherche des mécanismes régulateurs.....	62
CHAPITRE V	
CONCLUSION	64
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	66

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure		Page
1.1	Structure des sphingolipides.....	2
1.2	Biosynthèse, métabolisme et transport de la S1P.....	3
1.3	Rôles des récepteurs de la S1P dans le système nerveux central.....	10
1.4	Comparaison des structures du FTY720P et de la S1P	12
1.5	Structure générale de l'hippocampe	14
1.6	Organisation membranaire des récepteurs NMDA	16
4.1	Rôle des récepteurs NMDA synaptiques et extrasynaptiques	56
4.2	Effets du FTY720P sur la fonction des récepteurs NMDA	58

Tableau

1.1	Rôles physiologiques des récepteurs de la S1P	8
1.5	Les sites de phosphorylation des récepteurs NMDA	18

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

CaMKII	Protéine kinase Ca ²⁺ /calmoduline-dépendante II
HDAC	Histones déacétylases
LTP	Long Term Potentiation
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMDARs	Récepteurs NMDA
PIK3	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
Ras	Famille de protéines proto-oncogènes
RCPG	Récepteurs couplés à des protéines G
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
S1PRs	Récepteurs pour la sphingosine-1-Phosphate
Ser	Sérine
STEP	Striatal-enriched tyrosine phosphatase
TAU	Tubule-associated unit
Tyr	Tyrosine

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Le présent mémoire s'est intéressé à l'influence d'un analogue de la sphingosine-1-phosphate (le FTY720P) sur les récepteurs du neurotransmetteur glutamate, plus particulièrement, ceux de la famille sensible à l'action du N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Il s'agit là d'une question importante puisque les récepteurs NMDA sont connus pour jouer un rôle primordial dans le développement de la plasticité neuronale de l'hippocampe, un phénomène essentiel assurant la consolidation des souvenirs (Li et Tsien, 2009; Luscher et Malenka, 2012; Zhuo, 2009; Zhang *et al.*, 2016). On trouvera dans la première section de l'introduction les informations relatives aux effets cellulaires assurés par la S1P et son analogue, le FTY720P. La seconde portion, quant à elle s'évertuera à présenter les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des récepteurs NMDA et leur régulation par les processus de phosphorylation.

1.1 La sphingosine-1-phosphate

Les recherches portant sur la biochimie et la physiologie des sphingolipides (Figure 1.1) ont progressé de manière fulgurante au cours des dernières décennies (Lahiri et Futerman, 2007; Merrill *et al.*, 1997; Pralhada Rao *et al.*, 2013; Proia R.L. et Hla T.; 2015; Wang *et al.*, 2015). Les sphingolipides sont retrouvés de façon ubiquitaire chez tous les eucaryotes et sont indispensables à la vie des mammifères (Bartke et Hannun, 2009).

Parmi eux, on trouve notamment, les céramides, la sphingosine et la sphingosine-1-phosphate (S1P). La S1P se distingue des autres sphingolipides

par sa capacité à réguler les réponses immunitaires et l'inflammation (Chi, 2011; Spiegel et Milstien, 2011; Maceyka et Spiegel, 2014; Aoki *et al.*, 2016). Fait intéressant, les données expérimentales récentes laissent présager que les analogues de la S1P sont à même d'accroître les processus de mémorisation (Hait *et al.*, 2014) et leur utilisation thérapeutique dans plusieurs affections neurologiques est présentement considérée, notamment chez les sujets Alzheimer (Alesenko, 2013; Brunkhorst *et al.*, 2014).

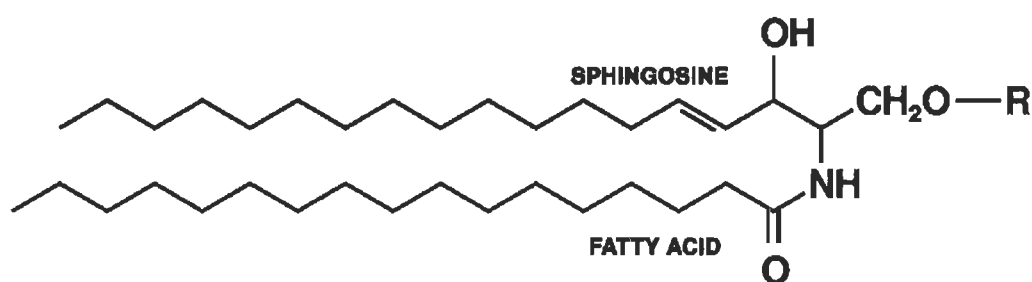
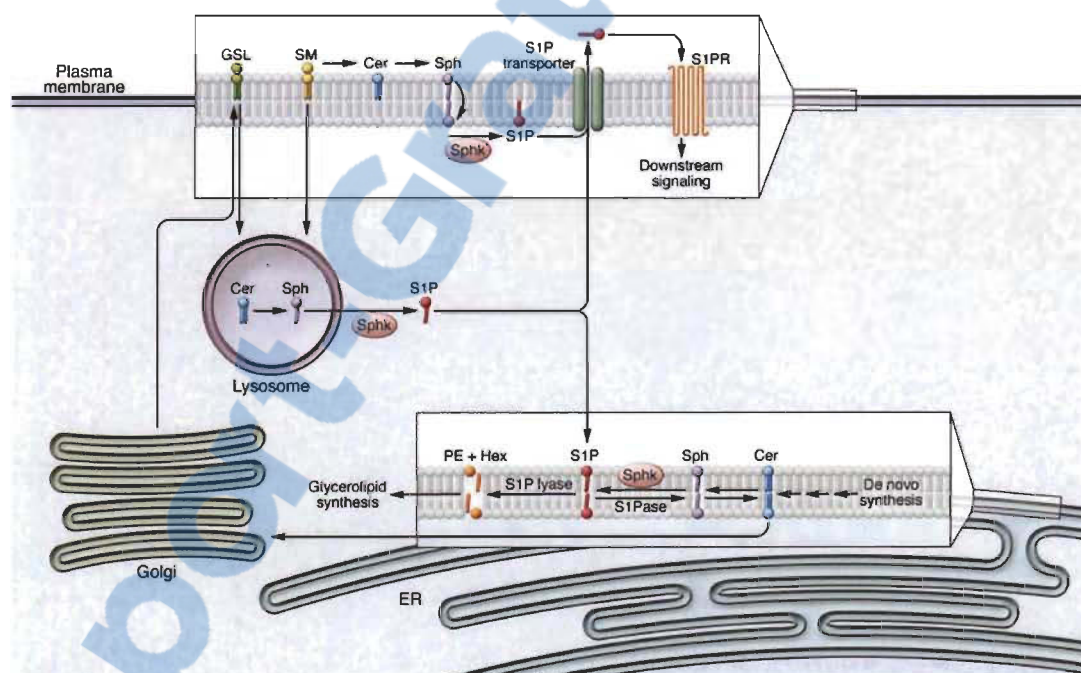


Figure 1.1 Structure des sphingolipides.

Les sphingolipides sont des lipides complexes résultant de l'amidification d'un acide gras sur la sphingosine, l'unité de base de tous les sphingolipides. Différents substituants peuvent s'ajouter sur la fonction alcool primaire de la sphingosine. Ainsi, lorsque la chaîne latérale est constituée d'un atome d'hydrogène, on pourra distinguer les céramides. (Image : Karol Langner, wikipedia.)

La S1P est un produit dérivant du métabolisme des sphingolipides. En réponse aux nombreux stimuli auxquels ils sont exposés, les sphingolipides sont d'abord transformés par des enzymes endogènes en lipides céramides (Bartke et Hannun, 2009; Kunkel *et al.*, 2013). Ces derniers sont ensuite hydrolysés sous l'action de céramidases pour former la sphingosine, nommée ainsi en référence au Sphynx de la mythologie grecque pour ses propriétés énigmatiques. On la retrouve dans divers compartiments de la cellule comme le lysosome, le réticulum endoplasmique ainsi que dans les membranes cellulaires (Spiegel et Milstien, 2003). Biochimiquement, la sphingosine se voit finalement transformée par d'autres enzymes, les sphingosines kinases (SPHKs), lesquelles assurent la

formation de la S1P (Pulkoski-Gross *et al.*, 2015; Tirodkar et Voelkel-Johnson, 2012) (Figure 1.2). Des transporteurs spécifiques de la S1P (ou SNPS) assurent, à terme, la libération extracellulaire de S1P. De fait, les concentrations de S1P sont maintenues élevées dans le plasma ($\sim 1 \mu\text{M}$) et dans la lymphe ($\sim 100 \text{ nM}$) de par la capacité des globules rouges et autres cellules endothéliales à libérer ce dérivé sphingolipidique. Une très grande partie de la S1P plasmatique est liée à des protéines de transports comme les HDL et l'albumine. Sur ce plan, des protéines accessoires interviennent afin de faciliter le transport de la S1P en augmentant sa solubilité et en limitant sa dégradation enzymatique par des lyases, notamment (Proia R.L. et Hla T.; 2015).



GSL : glycosphingolipides; SM : sphingomyéline; Cer : céramides; Sph : sphingosine; Sphk : sphingosine kinase.

Figure 1.2 Biosynthèse, métabolisme et transport de la S1P.

La S1P est formée dans les compartiments intracellulaires et dans la membrane plasmique. Elle sera libérée dans le milieu extracellulaire par des transporteurs pour agir, entre autres, sur des récepteurs membranaires couplés aux protéines G. (Image tirée de Proia R.L. et Hla T.; 2015.)

Les mécanismes d'action de la S1P

Les réponses physiologiques de la S1P semblaient, à l'origine, se limiter à l'activation de mécanismes intracellulaires. À l'intérieur de la cellule, plusieurs rôles de seconds messagers ont été initialement attribués à la S1P, découlant de sa capacité à lier plusieurs protéines cibles (Blaho et Hla, 2014). Elle peut par exemple, influencer la régulation de gènes spécifiques en régulant l'acétylation des histones (par inhibition des HDACs) (Hait *et al.*, 2014), elle peut aussi inhiber l'apoptose (en favorisant l'activation du NF- κ B), réguler la respiration mitochondriale (par interaction avec la Prohibitin 2) ou encore diminuer la production d'amyloïde β (Maceyka *et al.*, 2002). De plus, la S1P serait en mesure de réguler les niveaux de calcium en favorisant directement la relâche des stocks contenus dans les réserves du réticulum endoplasmique (Mattie *et al.*, 1994; Seol *et al.*, 2005; Strub *et al.*, 2010) et des réserves acides (Hoglinger *et al.*, 2015). Ce métabolite sphingolipidique est aussi connu pour son rôle dans les processus de survie et de mort cellulaire, du fait de l'équilibre métabolique entre les céramides, la sphingosine et la S1P. Alors que l'accumulation de céramides et de sphingosine conduit à la mort des cellules, la S1P agirait au contraire comme un agent mitogène en inhibant l'apoptose (Ratajczak *et al.*, 2014; Spiegel et Milstien, 2011). Ainsi, une augmentation anormale de la quantité de S1P favoriserait la prolifération cellulaire et l'apparition des cancers. À l'inverse, une diminution excessive de S1P aurait des effets pro-apoptotiques, ce qui pourrait jouer un rôle dans la mort neuronale et le développement de maladies neurodégénératives (Ceccom *et al.*, 2014). On sait, par ailleurs, que ce dérivé sphingolipidique est essentiel à l'organisation moléculaire des membranes plasmiques, particulièrement au sein des structures complexes que sont les radeaux lipidiques (Tirodkar et Voelkel-Johnson, 2012).

Les données récentes sur la S1P indiquent que plusieurs actions de ce médiateur lipidique découlent de l'activation d'une famille de cinq récepteurs couplés à des protéines G (ou RCPG) (Goetzl *et al.*, 2004; Maceyka *et al.*, 2012;

Rosen *et al.*, 2013; Blaho et Hla, 2014). Elle peut donc agir de manière autocrine ou paracrine en stimulant ses propres récepteurs à la surface de la cellule (Rosen et Goetzl, 2005; Strub *et al.*, 2010). Les études ont démontré que l'activation de ces récepteurs est impliquée dans plusieurs processus physiologiques tels que le trafic des lymphocytes, le développement vasculaire et l'inflammation (Maceyka *et al.*, 2012; Payne *et al.*, 2002; Rosen *et al.*, 2013). Nous l'avons vu, de par son rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, la S1P aurait un impact significatif dans l'apparition et la progression de cancers, de même que dans la résistance aux médicaments (Maceyka *et al.*, 2012). De fait, par l'activation de ses récepteurs elle favoriserait la métastase et l'invasion des tumeurs. Son implication dans plusieurs autres maladies est associée à son rôle dans le contrôle du trafic cellulaire (Spiegel et Milstien, 2011). La S1P apparaît aujourd'hui comme un acteur essentiel dans le développement du cerveau et le maintien des fonctions cérébrales (Spiegel et Milstien, 2003; Ghasemi *et al.*, 2016). On y reviendra.

1.2 Grandes fonctions des récepteurs à la S1P

Les récepteurs de la S1P (S1PRs) sont des récepteurs de surface appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de la classe A. À ce jour, cinq récepteurs de la S1P (S1PRs) ont été identifiés : S1PR₁₋₅ (Rosen *et al.*, 2013; Blaho et Hla, 2014). Ces récepteurs sont exprimés de façon différentielle d'un type cellulaire à l'autre, agissant en synergie ou encore en antagonisme. Ils sont en mesure d'activer une pléiade d'effecteurs cellulaires comme la phospholipase C (PLC), l'adénylate cyclase (AC), la phosphoinositide 3-kinase (PI-3K) et certaines GTPases (Rho et Ras) (Cuvillier, 2012). La stabilité évolutive des récepteurs de la S1P lui confère des fonctions importantes dans l'organisme (Tableau 1.1).

Le sous-type 1 des récepteurs à la S1P (S1PR₁) est exprimé dans de multiples systèmes cellulaires comme les cellules endothéliales, musculaires, immunitaires et neuronales. Il possède une très forte affinité pour son ligand endogène et est

classiquement associé à la prolifération, la survie et la migration cellulaires (Guerrero *et al.*, 2016). Or, plusieurs de ses effets semblent consécutifs à une augmentation des taux intracellulaires en calcium (Hinkovska-Galcheva *et al.*, 2008; Pimentel et Benaïm, 2012; Spiegel et Milstien, 2003). Par ailleurs, les études de la biologie moléculaire tentent de démontrer que la délétion du gène codant pour le S1PR1 s'avère mortelle pour l'embryon. De nombreuses observations faites chez l'animal ont clairement mis en évidence que ce phénotype de mortalité embryonnaire est spécifique au récepteur 1 de la S1P, n'étant pas reproduit lors de la délétion des autres récepteurs pour ce sphingolipide (Cuvillier, 2012). Des preuves solides montrent aussi que le S1PR1 est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques, faisant de lui une cible thérapeutique particulièrement intéressante. Par exemple, le S1PR1 apparaît essentiel à la sortie des lymphocytes T et B du thymus et des organes lymphoïdes secondaires, tels que les ganglions lymphatiques (M.J. Pulkoski-Gross *et al.*, 2015, Matloubian *et al.*, 2004; Cavone *et al.*, 2015). Selon toute vraisemblance, le S1PR1 jouerait également un rôle capital dans le développement et l'organisation du réseau vasculaire (Mendelson *et al.*, 2014).

Les études sur le sujet ont pu mettre en évidence que le récepteur de type 2 de la S1P (S1PR2) s'associe quant à lui avec des protéines G susceptibles d'activer diverses voies de signalisation, dont celle de la phospholipase C engagée dans la production d'inositol phosphate (IP3) et l'augmentation du calcium cytoplasmique (Blaho et Hla, 2014). Les souris knock-out pour le gène du récepteur 2 de la S1P naissent sans défauts anatomiques ou physiologiques apparents. Cependant, elles vont éventuellement présenter des convulsions sporadiques parfois létales, entre trois et sept semaines de vie (MacLennan *et al.*, 2001). Fait intéressant, on attribue au S1PR2 un rôle essentiel au fonctionnement normal des systèmes vestibulaires et auditifs, sa déficience entraînant la surdité des animaux (Kono *et al.*, 2007; Romero-Guevara *et al.*, 2015). Le récepteur de type 2 intervient également dans la régulation de la réponse du cerveau suite à une ischémie cérébrale (Kim *et al.*, 2015). Contrairement au S1PR1, l'activation du récepteur 2 est plutôt associée à

l'inhibition de la prolifération et de la migration de nombreux types cellulaires (Adada *et al.*, 2013).

Quant à lui, le récepteur de type 3 (S1PR3) active diverses voies de signalisation faisant intervenir de petites GTPases comme Rho et Rac afin de réguler la prolifération, la survie et la migration cellulaire, mais aussi le tonus vasculaire via la libération de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales. Les souris knock-out pour le gène de S1PR3 ne présentent aucune anomalie phénotypique évidente, elles se développent normalement (Camprubi-Robles *et al.*, 2013). Le S1PR4 s'exprime de manière plus restreinte, sa présence se limitant aux cellules du système hématopoïétique et lymphatique. Ses effets biologiques sont encore peu connus. Cependant, des études sur des animaux knock-out pour le gène de S1PR4 ont révélé que ce récepteur pouvait affecter de façon marginale les fonctions des lymphocytes T, et qu'il serait impliqué dans la migration des cellules dendritiques (Schulze *et al.*, 2011). En ce qui concerne le dernier sous-type de récepteur à la S1P identifié, le S1PR5, il possède un profil d'expression préférentiel aux oligodendrocytes myélinisants du système nerveux central. Diverses publications dans ce domaine tentent de démontrer que l'activation de ce récepteur faciliterait la survie des oligodendrocytes matures myélinisants (Novgorodov *et al.*, 2007). Toutefois, les études tirant avantage de la délétion moléculaire du S1PR5 invitent à la prudence en cette matière puisque les souris knock-out pour le S1PR5 ne présentent pas de déficit de myélinisation. Les recherches indiquent finalement que ce récepteur est modérément exprimé dans les cellules du système immunitaire, notamment chez les cellules NK (natural killer), où il jouerait un rôle dans leur mobilisation vers les sites inflammatoires (Cuvillier, 2012).

Tableau 1.1
Rôles physiologiques des récepteurs de la S1P

Type	Expression tissulaire	Rôles physiologiques
S1PR1	Endothélium Muscle lisse Cellules immunitaires Neurones Cardiomyocytes	Angiogenèse Intégrité endothéliale Circulation lymphocytaire Migration Neurogenèse Survie à l'ischémie-reperfusion des cardiomyocytes
S1PR2	Muscle lisse Cellules immunitaires Cardiomyocytes	Système vestibulaire et auditif Régulation du tonus vasculaire (contraction) Excitabilité neuronale Inhibition de la migration Dégranulation des mastocytes Survie à l'ischémie-reperfusion des cardiomyocytes
S1PR3	Muscle lisse Cellules immunitaires Cardiomyocytes Endothélium Neurones	Régulation du rythme cardiaque Régulation du tonus vasculaire (relaxation) Survie à l'ischémie-reperfusion des cardiomyocytes
S1PR4	Cellules immunitaires	Migration des cellules dendritiques
S1PR5	Cellules immunitaires Neurones	Survie des oligodendrocytes matures myélinisants

Neurophysiologie des récepteurs à la S1P

Les récepteurs de la S1P sont également très présents dans le cerveau où ils jouent des rôles déterminants (Figure 1.3) (Prager *et al.*, 2015; Spampinato *et al.*, 2015). Les études sur la présence et la fonction des récepteurs à la S1P dans le cerveau se sont d'abord concentrées sur les cellules dites non-neurales (ou cellules gliales) (Nishimura *et al.*, 2010). Dans les oligodendrocytes, qui forment la myéline des cellules du système nerveux central (SNC), les effets de la S1P passent par l'activation de plusieurs sous-types de récepteurs. Par exemple, on sait que les S1PR1, 3, 5 sont tous plus ou moins indispensables pour la survie des oligodendrocytes, qu'ils soient matures ou encore en période de développement (Jaillard *et al.*, 2005; Healy et Antel, 2015). Concernant les astrocytes, les cellules gliales spécialisées dans le soutien fonctionnel des neurones, l'activation conjointe

des S1PR1 et S1PR3, stimule quant à elle le métabolisme et ultimement la prolifération cellulaire (astroglie) (Farez et Correale, 2016). La microglie qui constitue environ 20 % des cellules gliales du cerveau est également sous le contrôle des récepteurs à la S1P. On sait, par exemple, que l'expression des S1PRs module l'état d'activation des cellules formant la microglie (Simon *et al.*, 2015; Yamagata *et al.*, 2003). Ils ont pour effet d'augmenter non seulement la relâche de facteurs proinflammatoires (via S1PR1-3), mais également la production de monoxyde d'azote par ces cellules.

Aujourd'hui, plusieurs travaux tentent de démontrer l'implication potentielle des S1PRs dans le contrôle des cellules neuronales. Les chercheurs ont d'ailleurs mis en évidence que l'activation des récepteurs à la S1P pourrait être impliquée dans les mécanismes sous-jacents à l'extension et la rétraction des axones lors du développement. De plus, les évidences expérimentales s'accumulent quant au rôle fonctionnel de la S1P sur les neurones. Il apparaît que ce dérivé lipidique est à même de réguler, via les S1PR1, la transmission synaptique en agissant sur l'excitabilité des membranes et la relâche de neurotransmetteurs (Kajimoto *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2006). Récemment, Langeslag et ses collaborateurs ont démontré que l'activation des S1PR1 a pour effet d'accroître les courants dans des cellules sensorielles soumises à un traitement nociceptif (Camprubi-Robles *et al.*, 2013). Un résultat en faveur d'un rôle potentiel des récepteurs 1 de la S1P dans le contrôle de la douleur. Les réponses des neurones sensoriels impliqués dans les mécanismes contrôlant la bronchoconstriction sont également accentuées suite à l'activation des récepteurs 3 de la S1P (Trankner *et al.*, 2014).

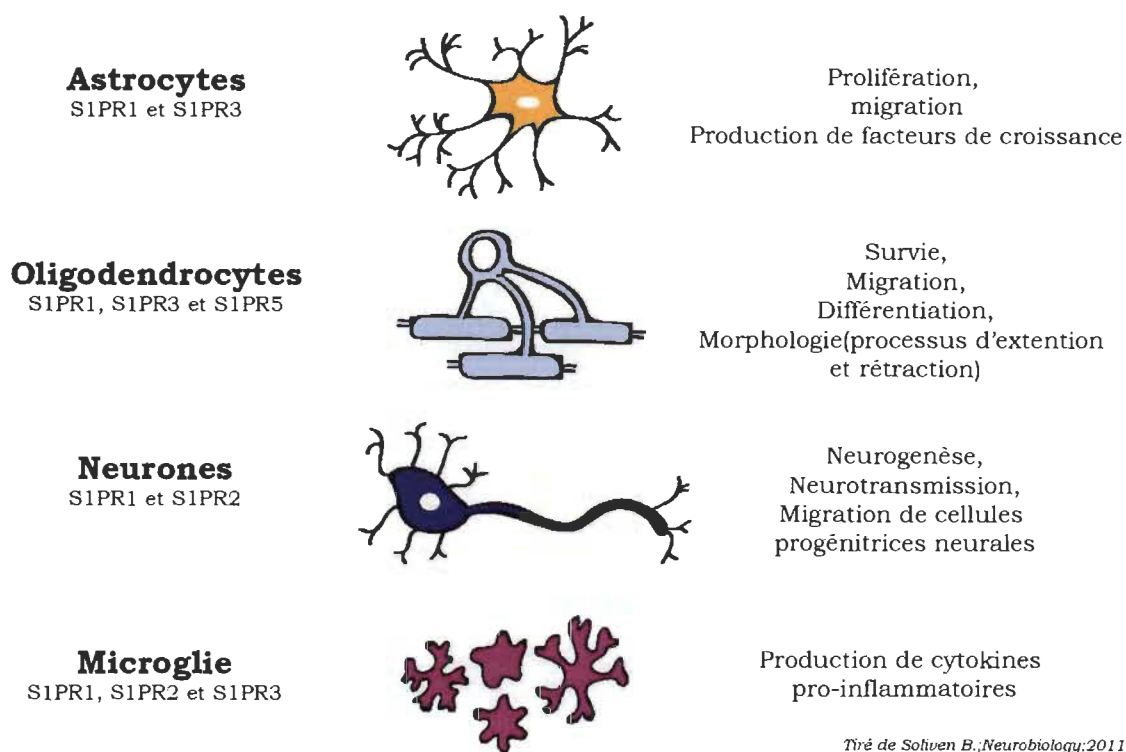


Figure 1.3 Rôles des récepteurs de la S1P dans le système nerveux central.
 Les récepteurs de la S1P s'expriment différemment dans les cellules gliales et dans les neurones produisant des effets variés d'une cellule à l'autre.

Concernant la pharmacologie des récepteurs à la S1P, les chercheurs disposent aujourd'hui d'un certain nombre de molécules capables d'affecter la fonction des récepteurs. La molécule SEW2871 agit sélectivement comme agoniste des récepteurs 1 de la S1P, alors que le composé W146 agit lui comme antagoniste de ces mêmes récepteurs. Pour sa part, l'analogue phosphorylé du fingolimod (FTY720P) induit une stimulation concertée des récepteurs à la S1P, à l'exception du sous-groupe 2 (S1PR2). En pratique médicale, le composé FTY720P s'est avéré bénéfique pour contrer l'évolution de la sclérose en plaques.

1.3 Les effets thérapeutiques du FTY720P

En 1992, une équipe de scientifiques japonais parvient à extraire la myriocine du champignon *Isaria Sinclairii*. De cette molécule est dérivé chimiquement le

fingolimod (ou FTY720), un analogue structural de la sphingosine (Figure 1.4), qui, une fois purifié, présente un puissant effet immunosuppresseur. Le fingolimod est d'abord connu pour prolonger la survie des greffons d'organes solides comme la prostate et le sein et pour sa capacité à prévenir le développement d'affections comme la polyarthrite rhumatoïde et l'encéphalopathie auto-immune (Kataoka *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2015). En 1997, la compagnie Novartis dévoile des résultats inédits quant à la propension du médicament à réduire également les symptômes de la sclérose en plaques, une découverte qui sera rapidement confirmée par la FDA (Brinkmann *et al.*, 2010; Chiba et Adachi, 2012; Chun et Hartung, 2010).

Comme les patients souffrant de la sclérose en plaques sont connus pour présenter un envahissement du cerveau par des cellules lymphocytaires, les chercheurs ont voulu en apprendre davantage sur les effets du médicament à ce niveau (Totaro *et al.*, 2015). Or, sur le plan cellulaire, l'effet thérapeutique de cette molécule semble d'abord s'exercer à la faveur d'une rétention (ou séquestration) des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques évitant, du coup, la pénétration cérébrale par ces cellules (Brinkmann *et al.*, 2002; Rudnicka *et al.*, 2015). Elle favoriserait de plus la myélinisation axonale par les cellules progénitrices d'oligodendrocytes et, finalement, limiterait la production de cytokines proinflammatoires par la microglie activée (Zhang *et al.*, 2015; Hunter *et al.*, 2016). De plus, il favoriserait la neuroprotection de par ses effets modulateurs sur l'excitotoxicité (Luchtman *et al.*, 2016). On sait maintenant que l'action du médicament requiert, au préalable, une phosphorylation *in vivo* (FTY720P) mettant à contribution une enzyme phosphorylante, la sphingosine kinase 2 (SPHK2) (Figure 1.4). Selon toute vraisemblance, le processus de séquestration des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques découlerait essentiellement de l'internalisation et la dégradation des récepteurs 1 pour la S1P (Ingwersen *et al.*, 2012). Le médicament agirait ainsi comme un antagoniste fonctionnel (Horga et Montalban, 2008; Kappos *et al.*, 2006). Il faut savoir finalement que, depuis quelques années, on s'intéresse aux vertus potentielles du médicament FTY720P dans le contexte de maladies autres que la sclérose en plaques. On pense ici à des

affections comme le cancer (White *et al.*, 2016), la rétinopathie diabétique (Fan et Yan, 2016) et certaines maladies cutanées d'origine inflammatoire (Tamakuwala et Stagni, 2015). Dans d'autres maladies inflammatoires, l'asthme notamment, le FTY720 aurait également des effets thérapeutiques prometteurs (Maceyka et Spiegel, 2014). En effet, une étude récente révèle que ce médicament est capable de supprimer l'inflammation aérienne et l'hypersensibilité des bronches (Lai *et al.*, 2011).

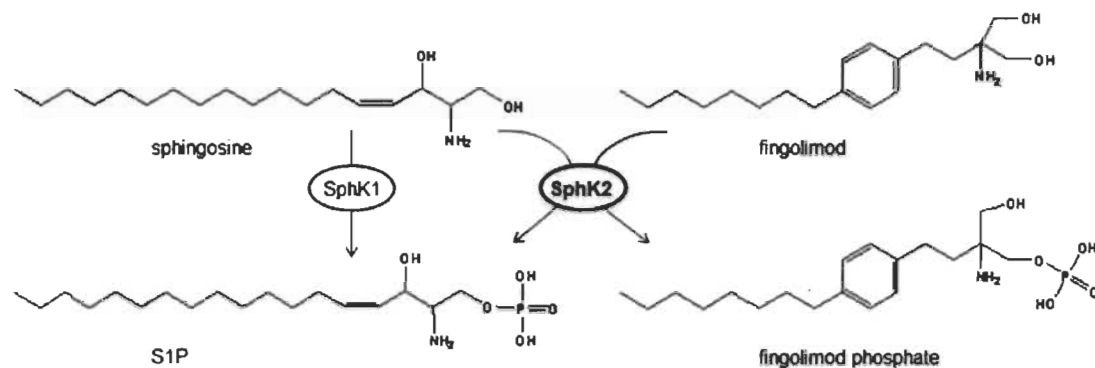


Figure 1.4 Comparaison des structures du FTY720P et de la S1P.

Structure chimique de la sphingosine-1-phosphate naturelle (à gauche) et du FTY720P analogue de synthèse de la S1P (à droite).

Des chercheurs ont récemment publié des articles intéressants qui éclairent d'un jour nouveau les relations entre FTY720P et la mémoire tout en ouvrant la voie à une nouvelle approche de maladies comme l'Alzheimer (Hemmati F. *et al.*, 2013; Asle-Rousta *et al.*, 2013; Doi *et al.*, 2013; Takasugi *et al.*, 2013) et la chorée d'Huntington (Miguez *et al.*, 2015; Wood, 2015). D'une part, une étude récente montre que l'administration orale de FTY720 améliore considérablement la mémoire de reconnaissance d'objet et l'apprentissage associatif chez des modèles de souris Alzheimer (Fukumoto *et al.*, 2014). Autre exemple, dans des modèles animaux d'Huntington, l'administration chronique de FTY720 réduit les déficits de mémoire à long terme et la perte d'épine dendritique qui reçoivent les contacts synaptiques des axones des neurones présynaptiques (Miguez *et al.*, 2015). Dans ces deux exemples, les scientifiques ont été en mesure de démontrer que les effets bénéfiques sur le cerveau résultent fort probablement de la capacité du

médicament FTY720P à accroître le phénomène de la plasticité synaptique qu'est la LTP (pour sigle de l'anglais de *long-term potentiation*) de l'hippocampe (Nazari *et al.*, 2016). On le sait depuis longtemps, la LTP hippocampale est généralement initiée à la suite de l'activation des récepteurs NMDA du glutamate (Collingridge, 1987; Luscher et Malenka, 2012; Pawlak *et al.*, 2005). Or, assez logiquement, il est possible d'imaginer que les effets procognitifs de la molécule FTY720P puissent passer par une régulation des récepteurs NMDA dans l'hippocampe. Un scénario que nous verrons à confirmer dans le cadre du présent travail.

1.4 Les récepteurs NMDA du glutamate : fonctions et régulation

S'agissant des effets physiologiques des récepteurs NMDA, ils sont nombreux (Vyklícky *et al.*, 2014). En outre, ils joueraient un rôle crucial dans le développement du système nerveux central (SNC), la production d'activités neuronales rythmiques requises pour la locomotion et la respiration de même que dans le traitement des informations sensibles relatives à la perception douloureuse (Van Dongen, 2009). On sait, par ailleurs, que l'apprentissage entraîne des changements durables d'efficacité synaptique dans certains réseaux de neurones requis pour la formation des souvenirs (Lewis, 2012). De très nombreuses études ont analysé les mécanismes moléculaires et cellulaires de cette adaptation neuronale, en prenant comme modèle les synapses excitatrices de l'hippocampe, qui utilisent les récepteurs NMDA pour communiquer (Collingridge, 1987; Li et Tsien, 2009; Rezvani, 2006; Bartsch et Wulff, 2015). Sur le plan électrophysiologique, on peut y révéler le phénomène de la LTP, un processus de renforcement synaptique qui correspond à une augmentation d'amplitude de la réponse post-synaptique à la suite d'une intense activation concertée de la synapse (Luscher et Malenka, 2012). C'est dans la portion initiale de la corne de Hamon (ou secteur CA1) formant l'hippocampe que l'on retrouve une forme de LTP susceptible de contribuer à la formation des souvenirs hippocampiques.

De manière schématique, les récepteurs NMDA, du fait de leur forte perméabilité au calcium, sont essentiels à l'induction de la LTP dans plusieurs secteurs de l'hippocampe (Pawlak *et al.*, 2005; Gough, 2014; Park *et al.*, 2014; Volianskis *et al.*, 2015). L'importance de la LTP pour la formation des souvenirs est particulièrement bien documentée dans la portion initiale de l'hippocampe, un secteur dénommé CA1 (Figure 1.5) (Lynch, 2004; Nabavi *et al.*, 2014). De fait, de nombreuses expériences ont fourni des indices solides qui montrent qu'en bloquant pharmacologiquement ou génétiquement les récepteurs NMDA on empêche l'instauration de la LTP hippocampique et le développement de la mémoire spatiale (Driesen *et al.*, 2013; Morris *et al.*, 1986; Cercato *et al.*, 2014). Chez le rongeur, par exemple, cette forme de mémoire s'avère indispensable à la réalisation de tâches durant laquelle l'animal se doit de repérer à la nage une plateforme de sortie se situant dans une piscine (labyrinthe de Morris) (Rezvani, 2006; Vorhees et Williams, 2006).

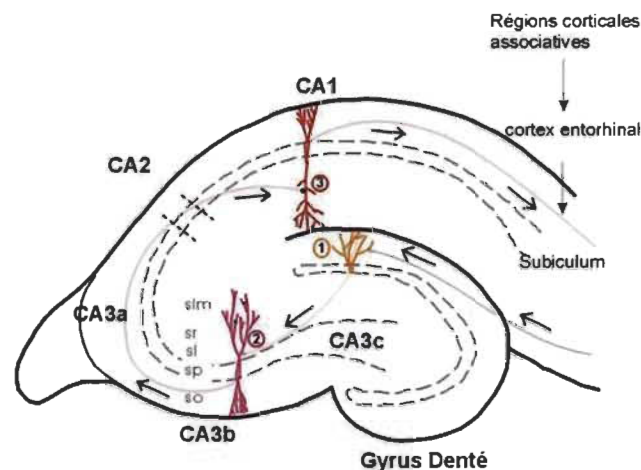


Figure 1.5 Structure générale de l'hippocampe.

L'hippocampe est formé par l'association de deux structures, le gyrus denté et la corne d'Ammon qui se subdivise elle-même en différents secteurs (CA1 à CA3). C'est dans le secteur CA1 que de nombreuses études sur les mécanismes et le rôle de la LTP ont été réalisées.

Les récepteurs NMDA sont des canaux ioniques exprimés abondamment dans le système nerveux central avec une préférence pour la région hippocampale

(Lee et Kesner, 2002). Ils sont sensibles aux acides aminés excitateurs comme le glutamate et, plus particulièrement, au dérivé pharmacologique qu'est le N-méthyl-D-aspartate (d'où NMDA). Ces récepteurs sont formés de quatre sous-unités, deux sous-unités GluN1 obligatoires s'associant à deux autres sous-unités complémentaires (GluN2A ou GluN2B) (Figure 1.6). L'agoniste naturel des récepteurs NMDA est le glutamate endogène, lequel se fixe essentiellement avec les sous-unités GluN2 (A et B). Les études de la biophysique neuronale indiquent toutefois que l'activation des récepteurs NMDA requiert, en plus du glutamate, la liaison d'un co-agoniste, la glycine. Une fixation qui n'intéresse alors que les sous-unités GluN1. L'ouverture des canaux survient, suite à la liaison de ces deux ligands, en plus de la dépolarisation de la membrane du neurone (Blanke et VanDongen, 2009; Newcomer *et al.*, 2000; Vyklícky *et al.*, 2014). Les études électrophysiologiques nous indiquent que c'est la quantité d'ions calcium qui favorise la survenue de la LTP hippocampique et la mémoire spatiale chez l'animal (Pawlak *et al.*, 2005; Cercato *et al.*, 2014). Fait intéressant, les études de la biologie cellulaire ont mis en évidence que les fonctions des récepteurs NMDA sont diverses et déterminées en grande partie par leur localisation neuronale; elle-même contrôlée par les processus de phosphorylation des sous-unités GluN.

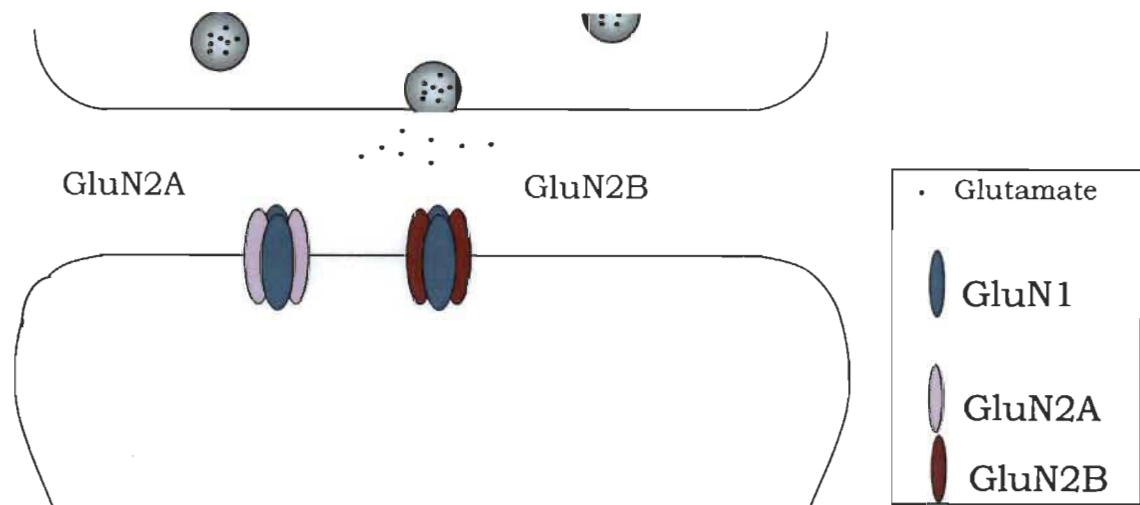


Figure 1.6 Organisation membranaire des récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs au glutamate de type ionotropiques. Ils sont formés de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2. Les sous-unités GluN1 sont obligatoires, alors que les sous-unités régulatrices GluN2 définissent les propriétés électrophysiologiques des récepteurs NMDA, notamment leur sensibilité au glutamate ou leur perméabilité au calcium. Ils jouent un rôle essentiel à la mémoire et à la plasticité synaptique.

Les mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation sont reconnus comme des acteurs indispensables assurant la régulation des récepteurs NMDA (Vyklicky *et al.*, 2014). La phosphorylation des résidus d'acides aminés formant les protéines sont diversifiés et contrôlés par deux types d'enzymes, les kinases phosphorylantes et les phosphatases déphosphorylantes (Chen et Roche, 2007; Ubersax et Ferrell, 2007) (Tableau 1.2). Des études portant sur le sujet indiquent que les récepteurs sont régulés par de nombreuses kinases comme la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante II (CaMKII) et par les tyrosines kinases du groupe Src (Salter *et al.*, 2009; Wang et Salter, 1994; Trepanier *et al.*, 2012). Sur ce plan, les chercheurs ont identifié les résidus (ou épitopes) phosphorylés des sous-unités protéiniques constituant les récepteurs NMDA, susceptibles d'être ciblés par ces diverses kinases (Tableau 1.2) (Zhu *et al.*, 2016).

On sait, par exemple, que la sous-unité GluN1 est essentiellement phosphorylée par la PKC sur les résidus Ser890 et Ser896, et par la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) sur l'épitope Ser897. La phosphorylation sur la Ser890 permettrait la redistribution cellulaire de la sous-unité GluN1, et ce, à la faveur d'une accumulation au niveau de la membrane cellulaire. Quant à elle, la phosphorylation individuelle des sites Ser896 et Ser897 n'affecte en rien la distribution subcellulaire des sous-unités GluN1 (Tingley *et al.*, 1993). Cependant, les études semblent démontrer que la phosphorylation conjointe de ces deux épitopes est nécessaire à l'enrichissement des récepteurs NMDA à la surface des membranes cytoplasmique (Scott *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter que le niveau de phosphorylation de ces deux sites est très élevé dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, suggérant ainsi un rôle important de ces épitopes dans le trafic intracellulaire de GluN1 (Kumar, A., 2015).

Les sous-unités GluN2 formant les récepteurs NMDA sont également régulées par la phosphorylation. Trois sites de phosphorylation Tyr sont présents sur les sous-unités GluN2A (Tyr1292, Tyr1325 et Tyr1387). Ils sont principalement connus pour être les cibles des kinases de la famille Src/Fyn. Ici, la phosphorylation aurait pour effet d'augmenter l'efficacité des courants ioniques transitant au sein des récepteurs NMDA (Kohr et Seeburg, 1996; Zheng *et al.*, 1998). Les sous-unités GluN2B contiennent eux aussi trois sites de phosphorylation ciblés par la protéine kinase Fyn (Tyr1252, Tyr1336 et Tyr1472). Sur le plan physiologique, le résidu Tyr1472 apparaît comme site préférentiel de phosphorylation. Il se lie directement à la chaîne moyenne de l'adaptine 2 (AP-2), empêchant l'endocytose du récepteur et, subséquemment, son accumulation à la surface des neurones (Lavezzari *et al.*, 2003; Roche *et al.*, 2001). Quant à elle, la phosphorylation des résidus Ser1480 de GluN2B par la kinase CaMKII aurait pour effet de réduire l'expression des récepteurs NMDA à la surface des membranes (Chung *et al.*, 2004; Strong *et al.*, 2014).

Tableau 1.2
Les sites de phosphorylation des récepteurs NMDA

Sous-unité	Sites de phosphorylation	Enzyme impliquée	Rôle
GluN1	Ser896	PKC	Seul, aucun effet
	Ser897	PKA	Combiné à S896, ↑ les récepteurs NMDA à la surface
	Ser890	PKC	Redistribution membranaire
GluN2A	Tyr1325	Tyrosine kinase	Diminue l'affinité pour CAMKII
	Ser1416	PKC	↓ Phosphorylation = désensibilisation
	Ser900 et Ser929	PP2B	Internalisation et stabilise à la membrane?
GluN2B	Tyr1472 et Tyr1336	Tyrosine kinase (Fyn/Src) STEP	Inhibe l'internalisation et stabilise à la membrane
	Ser1480	CAMKII	Empêche la liaison de NR2B avec PSD-95, régule l'expression des récepteurs à la surface
	Ser1303	PKC et CAMKII	Dissociation du complexe NR2B-CAMKII
	Ser1116	CDK5	Si déphosphorylé, plus de récepteurs à la membrane

En général, la phosphorylation a pour effet d'augmenter l'activation du récepteur et favoriser la LTP et la mémoire (Luscher et Malenka, 2012; Salter *et al.*, 2009). Les chercheurs ont toutefois découvert que la phosphorylation des récepteurs NMDA peut être limitée par l'action de protéines phosphatases (PP) se trouvant dans le cerveau comme PP1, PP2A et PP2B (ou calcineurine) ou encore par celles enrichies dans le striatum « striatal-enriched tyrosine phosphatase » (STEP). En se liant directement au récepteur NMDA, la protéine STEP jouerait un rôle dans le trafic de ces récepteurs et entraînerait une modification de leur activité au niveau des membranes neuronales (Braithwaite *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2015).

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Le FTY720P est un puissant activateur des récepteurs à la S1P. Depuis quelques années déjà, on songe à utiliser le composé en question pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, et ce, en raison de sa capacité à accroître les performances cognitives chez l'animal. Or, les recherches portant sur les mécanismes d'action du médicament FTY720P font l'objet de nombreuses investigations. Dans le cadre du présent mémoire, on s'intéresse à élucider les effets modulateurs potentiels de ce composé au niveau des récepteurs NMDA du glutamate. Rappelons-le, les récepteurs NMDA sont des acteurs indispensables contribuant à la formation des souvenirs, notamment ceux impliquant la région dite hippocampale du cerveau. Découlent de cette hypothèse générale trois objectifs de recherche qui tenteront de répondre aux questions suivantes :

Est-ce que la stimulation des RCPGs pour la S1P par le FTY720P a pour effet de modifier la phosphorylation des sous-unités protéiniques formant les récepteurs NMDA?

Les études biochimiques conduisent à penser que l'activation des RCPGs peut contribuer à la modulation des récepteurs NMDA, lesquels sont indispensables au développement de la plasticité neuronale et, conséquemment, de la mémoire. On sait que l'état de phosphorylation des sous-unités protéiniques composant les récepteurs NMDA constitue une étape clef de leur régulation. De fait, le premier volet expérimental de ce projet consistera à déterminer la possibilité que le composé FTY720P soit à même de modifier la phosphorylation de certains épitopes des protéines GluN1 (Ser897), GluN2A (Tyr1325) et GluN2B (Ser1480, Tyr1336 et Tyr1472) du récepteur NMDA. Sur le plan expérimental, les niveaux de

phosphorylation des épitopes en question ont été estimés par la technique classique d'immunobavardage de type Western sur des échantillons de protéines d'hippocampes de rats, préalablement traitées avec le FTY720P. Dans l'éventualité d'un effet observable, nous comptons déterminer la nature des récepteurs en cause (S1PRs) de même que la signalisation sous-jacente.

Est-ce que la distribution des récepteurs NMDA se voit affectée par le traitement au FTY720P?

La phosphorylation des sous-unités GluN est considérée comme indispensable à la livraison des récepteurs NMDA à la surface des neurones. En outre, il apparaît que l'endocytose des récepteurs NMDA implique souvent la phosphorylation de certains épitopes des sous-unités GluN2B. Le second volet de cette recherche s'appliquera à estimer les effets apportés par le FTY720P sur la localisation des récepteurs NMDA dans l'hippocampe. Cette question sera abordée en effectuant des expériences de biotinylation qui favorise la purification des protéines membranaires. Les niveaux des sous-unités, exprimés à la surface des membranes neuronales, seront par la suite estimés par la technique de Western blot.

Est-ce que la distribution de protéines accessoires aux récepteurs NMDA est altérée par le FTY720P?

La neurochimie a récemment braqué les projecteurs sur diverses protéines accessoires, lesquelles se présentent comme des acteurs fondamentaux de la régulation des récepteurs NMDA du glutamate. En utilisant la méthode de biotinylation comme procédure d'isolation des membranes cytoplasmiques, ce troisième volet de ma recherche consistera à évaluer la possibilité que le FTY720P soit en mesure de faciliter le transfert de la protéine Tau sur les membranes de surface, une protéine connue pour délivrer une kinase ciblant les récepteurs NMDA (la kinase Fyn). En ce sens, on verra dans ce dernier volet à évaluer sur le matériel

purifié par biotinylation la capacité du FTY720P à déplacer la protéine kinase Fyn vers les membranes de surface dans l'hippocampe.

CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Ce chapitre est présenté sous forme d'article, en anglais, qui a fait l'objet d'une publication dans la revue *Brain Research* en juillet 2015.

3.1 Contribution des auteurs

Étant la première auteure du manuscrit, j'ai rédigé l'article avec l'aide précieuse de mon directeur de recherche, le professeur Guy Massicotte. De plus, le professeur Michel Cyr a contribué avec mon directeur de recherche à l'ébauche conceptuelle du projet. Enfin mes collègues Marie-Élaine Laurier-Laurin et Élise Pépin ont contribué à la mise au point de techniques requises pour la réalisation de la démarche expérimentale retenue.

3.2 Article scientifique

GluN2B-containing NMDA receptors are upregulated in plasma membranes by the sphingosine-1-phosphate analog FTY720P

Suzanne ATTIORI ESSIS, Marie-Elaine LAURIER-LAURIN, Élise PÉPIN,
Michel CYR and Guy MASSICOTTE

Département de biologie médicale
Université du Québec à Trois-Rivières
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Number of pages: 26

Number of figures: 7

Number of words: 6019

Corresponding author's address: Guy Massicotte, Ph.D.

Département de biologie médicale

U.Q.T.R. C.P. 500

Trois-Rivières, Québec

Canada G9A 5H7

Telephone: (819) 376-5053

Fax: (819) 376-5084

E-mail: Guy.Massicotte@uqtr.ca

Abstract

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a ceramide derivative serving not only as a regulator of immune properties but also as a modulator of brain functions. To better understand the mechanism underlying the effects of S1P on brain functions, we investigated the potential impact of S1P receptor (S1PR) activation on NMDA receptor subunits. We used acute rat hippocampal slices as a model system, and determined the effects of the active phosphorylated S1P analogue, fingolimod (FTY720P) on various NMDA receptors. Treatment with FTY720P significantly increased phosphorylation of GluN2B-containing NMDA receptors at Tyr1472. This effect appears rather specific, as treatment with FTY720P did not modify GluN2B-Tyr1336, GluN2B-Ser1480, GluN2A-Tyr1325 or GluN1-Ser897 phosphorylation. Pre-treatment of hippocampal slices with the compounds W146 and PP1 indicated that FTY720P-induced GluN2B phosphorylation at Tyr1472 epitopes was dependent on activation of S1PR subunit 1 (S1PR1) and Src/Fyn kinase, respectively. Biotinylation experiments indicated that FTY720P-induced GluN2B phosphorylation at Tyr1472 was associated with increased levels of GluN1 and GluN2B subunits on membrane surface, whereas no change was observed for GluN2A subunits. We also demonstrate that FTY720P is inclined to favour Tau and Fyn accumulation on plasma membranes. These results suggest that activation of S1PR1 by FTY720P enhances GluN2B receptor phosphorylation in rat hippocampal slices, resulting in increased levels of GluN1 and GluN2B receptor subunits in neuronal membranes through a mechanism involving the Tau/Fyn signalling pathway.

Introduction

In various cell types, sphingosine is produced through ceramide metabolism, a process catalyzed by enzymes such as ceramidases (Bartke and Hannun, 2009; Laurier-Laurin et al., 2014; Soliven et al., 2011; van Echten-Deckert et al., 2014). Subsequently, phosphorylation of sphingosine by sphingosine kinases generates additional derivatives, such as sphingosine-1-phosphate (S1P) (Canals et al., 2011; Maceyka et al., 2012; Spiegel and Milstien, 2003). First considered as an intracellular second messenger (Olivera and Spiegel, 1993; Spiegel et al., 1994), S1P was later reported to act extracellularly through activation of G protein-coupled receptors (GPCRs) (Yang et al., 2014; Zhang et al., 2006). S1P receptors (S1PRs) are divided into five subtypes (S1PR1-5), with each subtype exhibiting different cell specificity in a wide variety of tissues (Blaho and Hla, 2014). S1PR1-3 receptors are expressed ubiquitously among tissues, while expression of S1PR4 and S1PR5 is less widespread. For instance, S1PR4 expression is restricted to lymphoid and hematopoietic tissues, whereas S1PR5 are primarily located in the white matter of the central nervous system and in the spleen (Soliven et al., 2011). In the vascular territory, S1PRs regulate angiogenesis, vascular stability, and permeability. In the immune system, it is recognized as a major regulator of trafficking of T and B cells. S1PRs are needed for the exit of immune cells from lymphoid organs (such as the thymus and lymph nodes) into lymphatic vessels (Kono et al., 2014; Liu et al., 2011).

The S1P agonist, fingolimod (FTY720P), acts on most S1PRs (except S1PR2) and provides beneficial effects in multiple sclerosis (Choi et al., 2011; Chun and Hartung, 2010; Lee et al., 2010). Its therapeutical action is generally thought to result from agonist-induced internalization, down-regulation and degradation of S1PR1, a receptor critical for lymphocyte trafficking (Graler and Goetzl, 2004; Mandala et al., 2002; Mullershausen et al., 2009). More recently, a growing body of investigations has also indicated that FTY720P reduces neural insult, neuroinflammation, and associative memory impairment in animal models of

Alzheimer's disease and epilepsy (Fukumoto et al., 2014; Gao et al., 2012). Based on electrophysiological experiments, the procognitive action of FTY720P might be attributed to its potential ability to facilitate synaptic plasticity in brain. In particular, Spiegel and her colleagues recently demonstrated that, in mouse hippocampal slices, FTY720P facilitates the induction of long-term potentiation (LTP) through postsynaptic modifications, independently of its established effects on lymphocyte trafficking (Hait et al., 2014). Considering that hippocampal LTP is typically initiated by activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Luscher and Malenka, 2012; Massicotte and Baudry, 1991; Pawlak et al., 2005), the present experiments were designed to determine the potential influence of FTY720P on this family of glutamate receptors. Our results indicate that S1PR1 activation by FTY720P up-regulates GluN2B-containing NMDA receptors in hippocampal neurons, possibly through Fyn-dependent phosphorylation at Tyr1472.

Results

NMDA receptor phosphorylation by FTY720P

In order to determine whether NMDA receptors are modulated by S1PR activation, we first analyzed the effects of FTY720P treatment on phosphorylation levels of GluN subunits. Acute hippocampal slices were treated for different periods of time with FTY720P and then processed for Western blotting. In initial experiments, Western blots from hippocampal homogenates were strongly and consistently labeled by antibodies recognizing phosphorylated (p)-GluN2B subunits at the Tyr1472 epitope (Morris et al.) and showing a molecular weight of around 180 kDa (Fig. 1). As shown in Figure 1A, levels of p-GluN2B-Tyr1472 increased as a function after FTY720P incubation. When normalized to total GluN2B subunit levels, FTY720P treatment increased GluN2B phosphorylation at Tyr1472, with a maximal increase observed in slices preincubated for a period of 3 to 4 h ($n = 5$, $p < 0.01$). Further analysis showed that this effect was specific, as treatment of rat

hippocampal slices with FTY720P did not produce significant changes in phosphorylation at other GluN2B residues, such as Tyr1336 and Ser1480 (Fig. 1B). In addition, no significant changes in the level of phosphorylation of either GluN1-Ser897 or GluN2A-Tyr1325 were observed in FTY720P-treated slices (Fig. 2).

Previous studies have shown that the S1PR1 subtype is important for regulating learning and memory (Asle-Rousta et al., 2013; Kolahdooz et al., 2015). Consequently, we determined whether S1PR1 could be responsible for regulating GluN2B-Tyr1472 phosphorylation. As shown in Figure 3A, the ability of FTY720P to increase Tyr1472 phosphorylation was completely eliminated by the S1PR1 antagonist W146 (10 μ M). In addition, S1P-induced increased p-Tyr1472-GluN2B could be mediated by Fyn activation, a signalling pathway involved in the regulation of GluN2B-Tyr1472 epitope (Abe et al., 2005). Western blot analysis indicated that, in slices treated with the global Src/Fyn kinase inhibitor PP1 (3 h, 150 nM), the effect of FTY720P on Tyr1472 phosphorylation was totally prevented, as compared to control slices (Fig. 3B).

FTY720P increases plasma membrane levels of GluN2B-containing NMDA receptors

We next addressed the potential effects of FTY720P on NMDA receptor distribution within cells. As increased phosphorylation at the Tyr1472 residue of GluN2B subunits has been shown to reduce receptor internalization (Chen and Roche, 2007; Dennis et al., 2011; Pabba et al., 2014), we postulated that FTY720P-induced GluN2B-Tyr1472 phosphorylation would be associated with membrane accumulation of NMDA receptor subunits. To verify this assumption hippocampal slices, incubated in the absence or presence of 10 μ M FTY720P for 3 h, were subjected to cell-surface biotinylation. Plasma membrane-associated proteins were then isolated on neutravidin beads. Figure 4A shows representative blots obtained from whole homogenate (Total) and biotinylated (Surface) fractions. Total and Surface fractions from samples prepared from untreated and FTY720P-treated

slices were tested with antibodies targeting biotinylated proteins, GAPDH and various NMDA receptor subunits. In agreement with the observed increase in GluN2B phosphorylation at its Tyr 1472 epitope, GluN2B levels were increased by about 75% in the Surface fraction (Fig. 4B) following exposure of slices to FTY720P, whereas the Total amount of GluN2B subunit present in whole homogenates remained unchanged (Fig. 4C). Interestingly, the levels of GluN1 subunits in the Surface fraction also increased while GluN2A subunit levels were not modified; if anything a small reduction in GluN2A was detected.

Regulation of Tau and Fyn by FTY720P

Tau is considered to play an important role to drive Fyn to the cytoplasmic membrane and to enhance phosphorylation of GluN2B-containing receptors (Mietelska-Porowska et al., 2014). Thus, we hypothesized that changes in Tau might precede changes in GluN2B receptor phosphorylation. Time-course experiments were performed to determine the phosphorylation status of Tau proteins in FTY720P-treated slices. Quantification of immunoreactive bands showed that Tau became hyperphosphorylated at the Ser262 epitope, but not at other phosphoepitopes such as Ser199/202 and Ser396 in hippocampal slices treated with FTY720P. As shown in Figure 5A, increased Tau-Ser262 phosphorylation following FTY720P treatment was time-dependent and, as expected, preceded the increase in GluN2B phosphorylation (see Fig. 1A).

As phosphorylation of Ser262 residues are known to favour Tau detachment from microtubules, we speculated that FTY720P treatment could be associated with Tau accumulation in plasma membranes (Gendron and Petrucelli, 2009; Lauckner et al., 2003; Scales et al., 2011). Hippocampal slices untreated or treated with 10 μ M FTY720P for 3 h were subjected to cell surface biotinylation and plasma membrane-associated proteins were isolated on neutravidin beads. Following FTY720P treatment, we observed that the amount of Tau associated with the plasma membrane increased significantly, whereas the total amount of proteins in

the whole homogenates remained unchanged (Fig. 6A). A similar result was found when biotinylated membranes were tested with a Fyn antibody (Fig. 6B). Taken together, these results strongly suggest that FTY720P enhances GluN2B-Tyr1472 phosphorylation by a mechanism involving Tau-dependent delivery of Fyn to the plasma membrane.

Discussion

Several reports have previously demonstrated that NMDA receptor properties and functions are regulated by different GPCRs (MacDonald et al., 2007; Rojas and Dingledine, 2013; Yang et al., 2014). As expected, the present study clearly indicates that biochemical properties and localization of NMDA receptors in rat hippocampal membranes are altered following activation of S1PRs by the S1P analogue FTY720P. Precisely, our data suggest that S1PR1 stimulation, in response to the application of FTY720P, enhances NMDA receptor activity via a mechanism involving GluN2B receptor phosphorylation. We demonstrated that, after FTY720P treatment in rat hippocampal slices, phosphorylation of GluN2B-Tyr1472 was increased, whereas the same treatment did not modify GluN2B-Ser1480, GluN2A-Tyr1325 and GluN1-Ser897 residues.

NMDA receptor subunits have large intracellular C-terminal tails, which contain serine, threonine and tyrosine residues representing potential sites of phosphorylation by various protein kinases, including protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC) and Src/Fyn family kinases (SFks) (Chen and Roche, 2007; Trepanier et al., 2012). Phosphorylation at these sites regulates NMDAR channel activity through a variety of means, including changes in single channel conductance, surface expression and receptor trafficking (Chung et al., 2004; Lau and Zukin, 2007). Accordingly, by recruiting these kinases to phosphorylate NMDAR subunits, GPCRs regulate NMDAR expression and channel function at both synaptic and extrasynaptic sites (Fan et al., 2014; Yang et al., 2014). Our results

indicate that the broad-spectrum SFKs inhibitor PP1 prevented GluN2B-Tyr1472 phosphorylation in response to FTY720P treatments, suggesting that Fyn is involved in the regulation of NMDA receptors following S1PR activation (Nygaard et al., 2014). Interestingly, Fyn-mediated phosphorylation of the GluN2B-Tyr1472 epitope is known to block NMDA receptor endocytosis in neurons (Laurier-Laurin et al., 2014; Shipton and Paulsen, 2014), and it has been suggested that Fyn-mediated enhancement of NMDA receptor phosphorylation might be associated with accumulation of GluN2B-containing NMDA receptors on hippocampal membranes (Carroll and Zukin, 2002; Luscher and Malenka, 2012).

Our data with surface biotinylation experiments confirmed that, following S1PR activation, GluN2B-containing NMDA receptors accumulated at the plasma membrane. The biochemical processes by which FTY720P enhances GluN2B phosphorylation and accumulation in neuronal membranes remain to be determined. Because Tau proteins have a well-established role in promoting Fyn translocation to plasma membrane (Frändemiché et al., 2014; Wang et al., 2013), we propose that S1PR activation by FTY720P also leads to Fyn/Tau accumulation in neuronal membranes. Consistently, we observed that both Fyn and Tau accumulated in biotinylated fractions following FTY720P treatment. As hyperphosphorylation of Tau at Ser262 preceded the effect of FTY720P on GluN2B phosphorylation, it is possible that Tau enrichment in plasma membranes reflects Tau detachment from microtubules (Lauckner et al., 2003). Indeed, the role of Fyn suggested here is consistent with a previous study revealing that S1PR activation is associated with Fyn-dependent phosphorylation of platelet/endothelial cell adhesion molecules (Huang et al., 2008). A putative biochemical model that accounts for the influence of S1PRs, Tau proteins and Fyn on GluN2B receptor phosphorylation and localisation is illustrated in Figure 7.

Additional experiments are required to fully resolve the subcellular dynamics of Tau/Fyn interactions in regulating GluN2B subunit after S1PR activation. Another important issue which remains to be clarified is the possibility that S1PR

activation might differentially regulate synaptic and extrasynaptic NMDA receptors by mechanisms influencing, for instance, PSD-95 association with GluN2B subunits (Lim et al., 2003). To our knowledge, there are better arguments that S1PR activation by FTY720P might be associated with synaptic receptors. For instance, it has been demonstrated that Tau-dependent delivery of Fyn to plasma membranes should be more inclined to accentuate NMDA/PSD-95 interaction in synaptic components (Barki-Harrington et al., 2009; Ittner et al., 2010). GluN2B/PSD-95 association is thought to facilitate accumulation of synaptic GluN2B-containing NMDA receptors and, subsequently, the activation of neuroprotective cascades, which could be related to increased expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Gutierrez-Vargas et al., 2014; Lynch and Baudry, 2014). Interestingly, the mechanism of action of FTY720P has been proposed to involve BDNF production in hippocampus (Doi et al., 2013) and further experiments will be required to determine whether (or not) FTY720P-induced BDNF formation results from up-regulation of GluN2B-containing NMDA receptors in plasma membranes.

To the best of our knowledge, no one has directly investigated NMDA receptor properties following S1PR activation by FTY720P. In recent years, however, FTY720P has been shown to facilitate both LTP and memory formation (Derecki et al., 2010; Hait et al., 2014), which usually rely on NMDA receptor activation (Luscher and Malenka, 2012; Newcomer et al., 2000; Riedel et al., 2003). At the electrophysiological level, it has been recently demonstrated that GluN2B-containing NMDA receptors are essential for the formation of LTP (Bliss and Collingridge, 2013; Morris, 2003; Shipton and Paulsen, 2014), emphasizing the functional significance of the ability of FTY720P to up-regulate GluN2B receptor subunits in hippocampal plasma membranes. Since FTY720P does not activate S1PR2 (Chiba and Adachi, 2012), the effects reported here are clearly not dependent on activation of this receptor system. This conclusion is further supported by the finding that FTY720P-induced GluN2B phosphorylation is totally abrogated by W146, a specific antagonist of S1PR1. One obvious observation from our studies is that the interaction between S1PRs and NMDA receptors requires

long-term treatment with FTY720P (i.e. hours). Because it is well established that prolonged treatment with FTY720P results in S1PR1 desensitization through receptor internalization (Mullershausen et al., 2009; Ratajczak et al., 2014), we cannot rule out the possibility that its effects on GluN2B-containing NMDA receptors are dependent on down-regulation of S1PR1 in hippocampal membranes. Interestingly, the data reported here (see Fig. 3) clearly suggest that the other types of S1PRs might actually exert opposite changes on GluN2B phosphorylation. Thus, additional experiments will be required to fully understand the influence of FTY720P on NMDA receptor properties.

Conclusion

Taken together, the present findings support the idea that brain S1PRs regulates neuronal properties (Chun and Hartung, 2010; Lee et al., 2010) (Chi and Nicol, 2010). In particular, FTY720P-induced accumulation of GluN2B at the plasma membrane may have wide-ranging functional consequences given that these receptors are implicated in a wide array of physiological and pathological functions (Pabba et al., 2014). In particular, our results provide new and exciting avenues for understanding the beneficial influences of FTY720P in various neuropathological illnesses such as Alzheimer's disease (He et al., 2010; Hemmati et al., 2013; Mielke and Lyketsos, 2010) and stroke (Brunkhorst et al., 2014). It should be kept in mind, however, that up-regulation of GluN2B-containing NMDA receptors is also considered to be important for the induction of cell death in neuropathological disorders (Lau and Zukin, 2007; Traynelis et al., 2010). Recent results indicate that FTY720P might, under certain circumstances, exacerbate neuronal damages (Mencle et al., 2014). Thus, further experiments will be directed at understanding the potential detrimental actions of FTY720P on neurons.

Experimental procedures

Animals and ethics approval

Adult male Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories (Montréal, QC, Canada) and housed in groups of four, in a temperature-controlled room, with free access to laboratory chow and water. Animals selected for the experiments were acclimatized at least one week before the beginning of treatments. Animal protocols were reviewed by the Institutional Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières and were in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Pharmacological agents and antibodies

The active S1P analogue fingolimod (FTY720P) was purchased from Cayman Chemical, as was the selective S1PR1 antagonist, W146, and the global Src/Fyn inhibitor, PP1 (1-(1,1-dimethylethyl)-3-(4-methylphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine). Antibodies for NMDA receptor (GluN) subunits, Tau and Fyn were purchased from AbCam (Cambridge, MA, USA). Polyclonal antibodies directed against GluN1, GluN2A and GluN2B subunits (dilution 1:1000) were used to estimate total protein levels in hippocampal extracts, along with polyclonal antibodies recognizing GluN1 phosphorylated at Ser897 (dilution 1:500), pGluN2A-Tyr1325, pGluN2B-Ser1480, pGluN2B-Tyr1336 and pGluN2B-Tyr1472 (1:1000). The mouse polyclonal antibody Tau-5 (dilution 1:500) served to estimate total Tau protein levels in hippocampal extracts, along with rabbit polyclonal antibodies recognizing Tau phosphorylated at Ser199-202 (dilution 1:1000), Ser262 (dilution 1:1000) and Ser396 (dilution 1:1000). The anti-biotin horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody (Cell Signaling; dilution 1:1000) was used to estimate total levels of biotinylated proteins. Antibodies recognizing β -actin (dilution 1:5000) and GAPDH (dilution 1:10000) were purchased from AbCam. Finally, goat anti-rabbit and goat anti-mouse peroxidase-

conjugated antibodies (dilution 1:5000), as well as SuperSignal chemiluminescent substrate kits were purchased from Pierce Chemical (Rockford, IL, USA).

Hippocampal slice preparation

For hippocampal slice preparation, adult male rats (200-250 g) animals were anesthetized by isoflurane inhalation (Baxter Corp., Toronto, ON, Canada) and decapitated. Their brains were quickly removed and placed in ice-cold cutting buffer containing 126 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 2.3 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 25 mM NaHCO_3 and 11 mM glucose, saturated with 95% O_2 /5% CO_2 (pH 7.4). Hippocampi were dissected, and transverse 350- μm slices were prepared with a McIlwain tissue chopper. Slices were placed on a nylon mesh in a liquid-gas interface recording chamber with aCSF containing (in mM): NaCl, 124; KCl, 3; KH_2PO_4 , 1.25; CaCl_2 , 3; MgSO_4 , 1; NaHCO_3 , 26 and glucose, 10 (De Montigny et al., 2013; Laurier-Laurin et al., 2014). On the day of experimentation, pharmacological agents were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, 0.1-0.2%) and mixed in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) to obtain the desired final concentration.

Tissue samples and Western Blotting

After pharmacological treatment, hippocampal slices were dissected to separate field CA1 and homogenized in ice-cold radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate and 1 mM EDTA supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (cOmplete and PhosSTOP; Roche). Protein levels were measured by the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). In most experiments, protein lysates (40 μg) were electrophoresed on 10% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide (SDS PAGE) gel. Separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, and nonspecific binding sites were blocked by incubation for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (pH 7.4) containing 5% bovine serum albumin (BSA fraction V) purchased from Fisher

Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Primary antibodies were added for overnight incubation at 4 °C. After several washes with 0.1% Tween 20, blots were incubated for 1 h at room temperature in specific secondary peroxidase-conjugated antibody solution. Both primary and secondary antibodies were diluted in Tris-buffered saline/0.1% Tween 20/1% BSA. Immunoreactivity was visualized by chemiluminescence reactions and membranes were processed for densitometry scanning with Vision Work LS software (UVP Bioimaging, Upland, CA, USA); band intensity was quantified using Image J software (W.S. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Densitometry data were expressed as relative optical density. In all experiments, labeling for β -actin was routinely performed to ensure identical protein loading on blots.

Cell surface biotinylation

These experiments were performed as previously described (Dennis et al., 2011), with few modifications. In brief, hippocampal slices were prepared and incubated for 3 h with or without FTY720P in a six-well plate. After 2 washes with aCSF constantly bubbled with 95%O₂/5%CO₂, slices were incubated for 45 min in the presence of 1 mg/ml sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido) ethyldithio-propionate (sulfo-NHS-SS-biotin) to biotinylate surface proteins. Excess biotin was then removed by washing the slices 3 times with a quenching solution (glycine; 100 mM) to eliminate free sulfo-NHS-SS-biotin, followed by 3 additional washes in cold aCSF. Twelve slices were pooled and homogenized in 600 μ l of modified RIPA buffer containing 150 mM NaCl, 20 mM Hepes, 1% Triton X-100, 0.5% SDS and 2 mM EDTA (pH 7.4), supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Samples were sonicated for 40 s and placed on ice under agitation during 1 h. Homogenates (total fractions) were collected and cell debris were removed by centrifugation for 10 min at 13,000 rpm at 4 °C. Supernatants were collected and incubated overnight at 4 °C with prewashed Neutravidin Agarose beads (50 μ l) to capture biotinylated proteins. Beads were recovered by a brief centrifugation and supernatants were discarded. Sedimented beads were washed

3 times in phosphate buffered saline (PBS) and biotinylated proteins were finally eluted with a buffer containing 83 mM Tris-HCl (pH 6.8), 3.3% SDS, 0.003% bromophenol blue, 13% glycerol and 6.7% β -mercaptoethanol (boiled at 100 °C for 5 min). Biotinylated fractions were collected and levels of surface proteins were estimated by Western Blotting (Dennis et al., 2011; Pabba et al., 2014).

Statistical analysis

Data are presented as means $\pm$ SEM. Variations in protein and phosphorylation levels were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keul's post hoc test (GraphPad Software, San Diego, CA). Conventional criteria of statistical significance were established to $p < 0.05$ values.

Acknowledgments

The present research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada: Grant 311763 to Michel Cyr and Grant 105942 to Guy Massicotte. The authors thank Ovid Da Silva for editing this manuscript.

Figure Legends

Figure 1. GluN2B-Tyr1472 phosphorylation is increased by FTY720P

Levels of phosphorylated GluN2B at Tyr1472 residue were estimated by Western blotting and expressed relative to total GluN2B levels in control and FTY720P-treated slices (10 μ M; 1 to 4 h). **B)** As in **A**, but phosphorylation levels were also determined for GluN2B-Ser1480 and GluN2B-Tyr1336 in slices incubated without or with FTY720P for 3 h. The data were expressed as percentage of control values and are means $\pm$ S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 5 different rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$, FTY720P-treated versus control.

Figure 2. GluN1-Ser897 and GluN2A-Tyr1325 phosphorylation is not altered by FTY720P

As in Figure 1A, but phosphorylated GluN1-Ser897 (**A**) and GluN2A-Tyr1325 levels (**B**), expressed relative to total GluN1 levels and GluN2A, respectively, were measured in control and FTY720P-treated slices. The data were expressed as percentage of control values and are means $\pm$ S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 5 different rats. FTY720P-treated versus control. Not significant.

Figure 3. GluN2B-Tyr1472 phosphorylation is mediated by the S1PR1 subtype and blocked by Fyn inhibition

Phosphorylation and protein levels were estimated by Western blotting on cell extracts obtained from acute hippocampal slices treated with FTY720P (10 μ M) for 3 h alone and in combination with the S1PR1 antagonist, W146 (10 μ M) or the global Src/Fyn inhibitor PP1 (150 nM). The data were expressed as percentage of control values and are means $\pm$ S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 6 different rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, FTY720P-treated versus control.

Figure 4. GluN1 and GluN2B cell surface levels are increased by FTY720P

A) Representative Western blots in the whole homogenates (Total) and the biotinylated fractions (Surface) showing an important augmentation in band intensity for biotinylated proteins in Surface fractions. There was also an important reduction in band intensity for GAPDH in Surface fractions, typical of an intracellular protein. GluN subunit levels were estimated by Western blotting on Total **(B)** and Surface **(C)** fractions obtained from acute hippocampal slices treated with 10 μ M FTY720P for 3 h. The data are means $\pm$ S.E.M. of 3 measurements obtained from 12 different rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, FTY720P-treated versus control.

Figure 5. Tau-Ser262 phosphorylation is enhanced by FTY720P

Tau phosphorylation and protein levels were estimated by Western blotting on cell extracts obtained from acute hippocampal slices treated without and with FTY720P (10 μ M). Phosphorylated Tau-Ser262 **(A)**, Tau-Ser199-202 **(B)** and Tau-Ser396 **(C)** levels were estimated relative to total Tau (Tau-5) for periods ranging from 1 to 3 h. The data are means $\pm$ S.E.M. of 3 measurements obtained from 6 different rats. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, FTY720P-treated versus control.

Figure 6. Tau and Fyn interactions with biotinylated materials are changed by FTY720P

Proteins levels were estimated by Western blotting on biotinylated proteins obtained from acute hippocampal slices treated with 10 μ M FTY720P for 3 h. **A)** Representative blots showing a marked augmentation in band intensity for Tau following FTY720P treatment in Surface fractions. **B)** As in **A)**, demonstrating that FTY720P is also inclined to increase Fyn levels on biotinylated proteins. The data are means $\pm$ S.E.M. of 3 measurements obtained from 6 different rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, FTY720P-treated versus control.

Figure 7. Model of GluN2B receptor regulation after S1PR activation

The S1P analogue FTY720P is recognized as a potent S1PR activator. Here, this analogue was found to accentuate NMDA receptor accumulation on plasma membranes through a mechanism involving GluN2B receptor phosphorylation at the Tyr1472 epitope. Our results suggest that FTY720P-induced regulation of GluN2B-containing NMDA receptors can be achieved by Tau-dependent delivery of Fyn to plasma membranes. By its action on NMDA receptors, FTY720P could have an impact on synaptic plasticity, memory processes and neuronal survival.

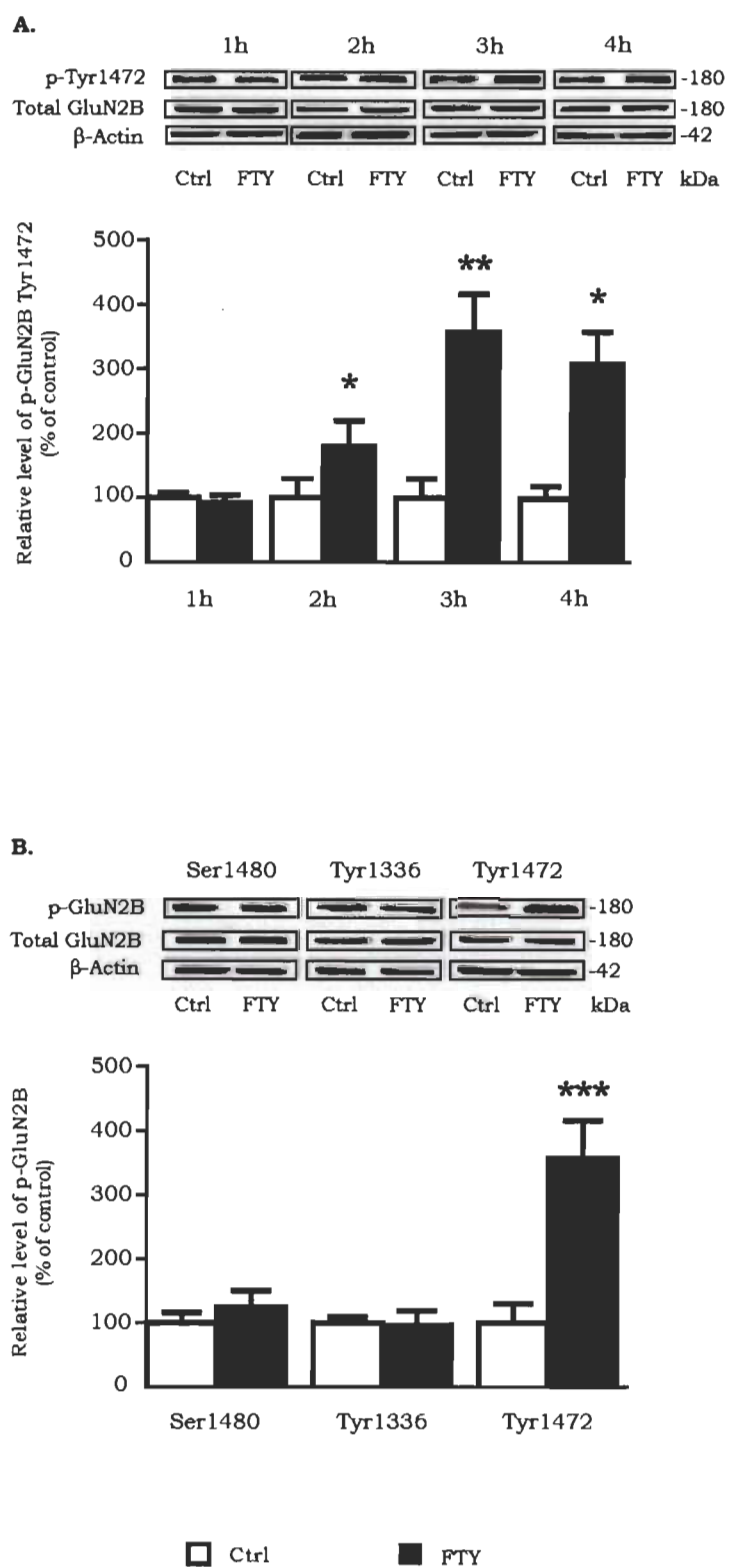


Figure 1 (Attiori et. al.)

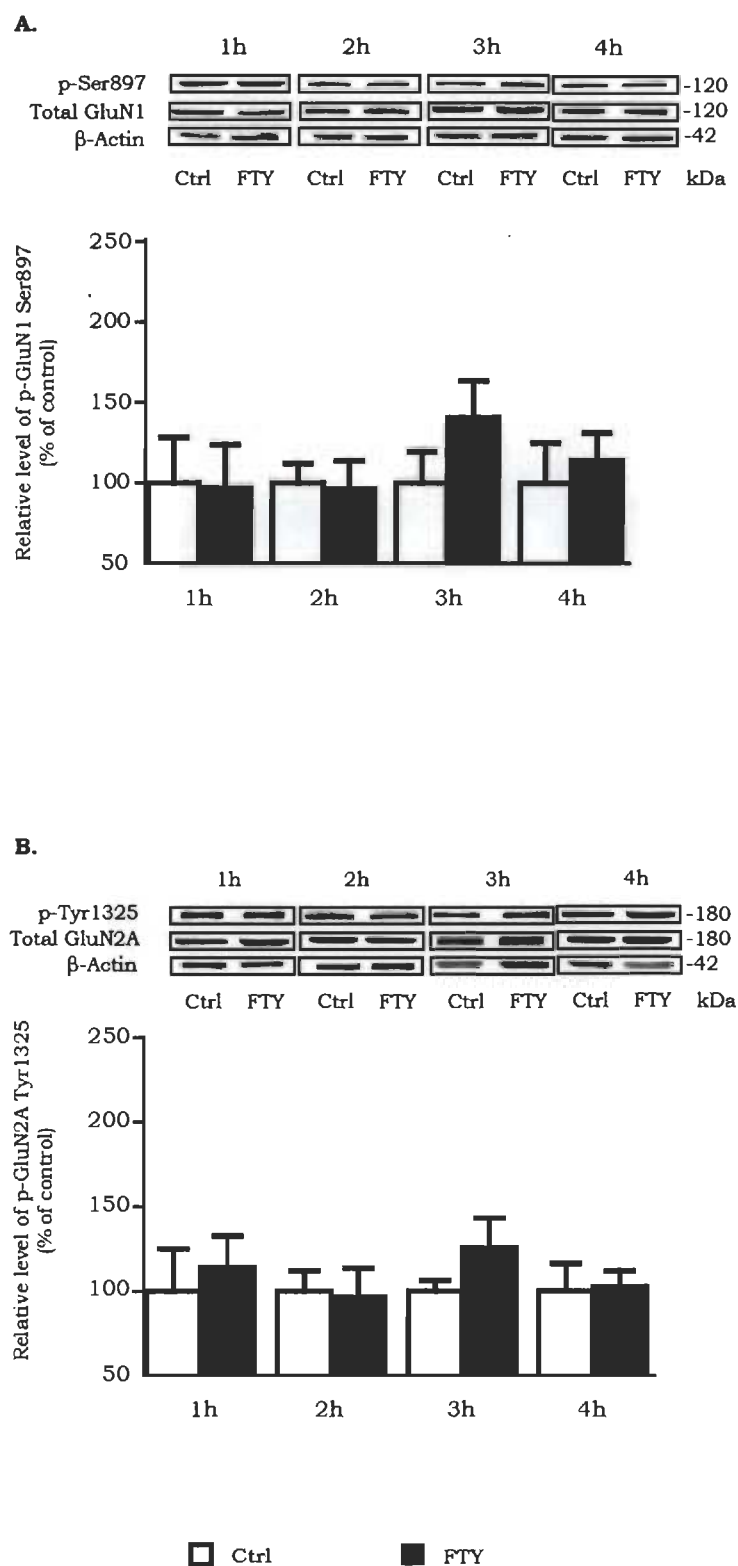
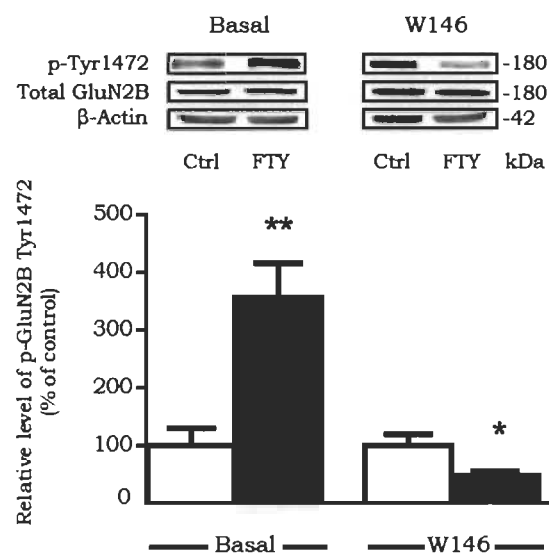
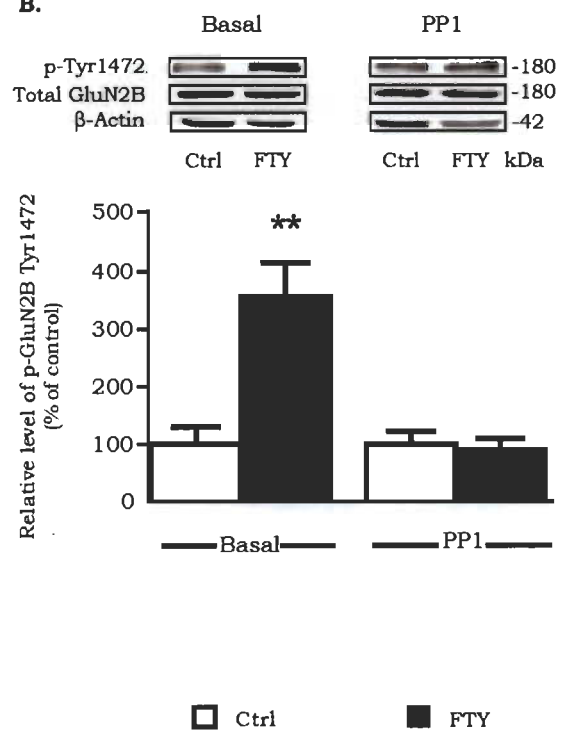
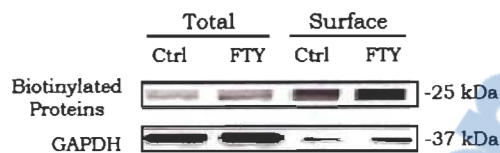
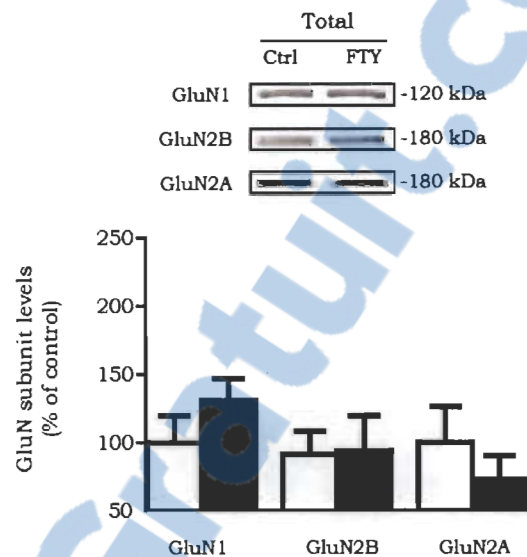
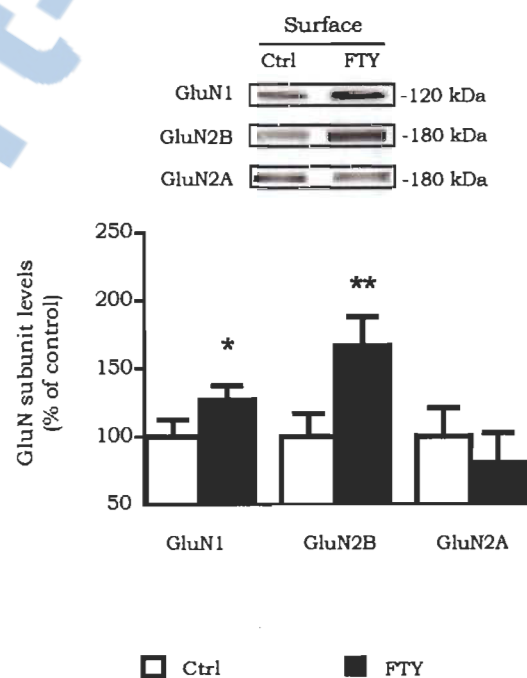


Figure 2 (Attiori et. al.)

A.**B.****Figure 3 (Attiori et. al.)**

A.**B.****C.****Figure 4 (Attiori et. al.)**

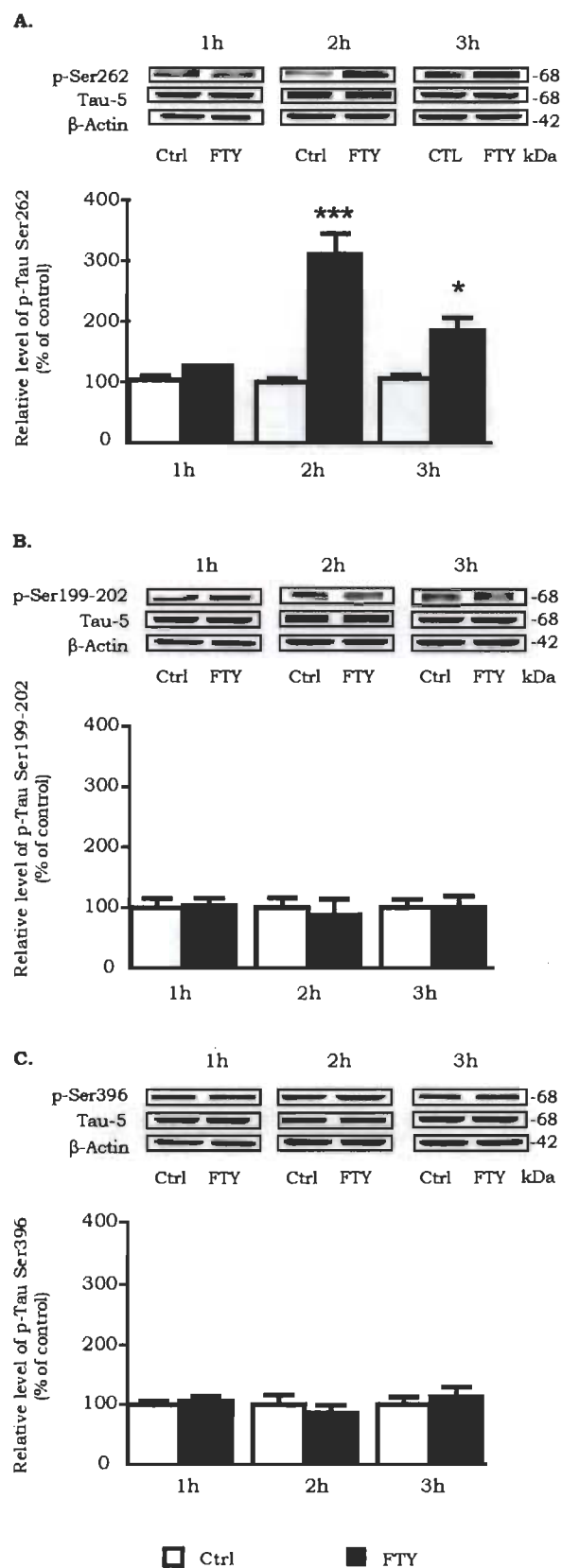
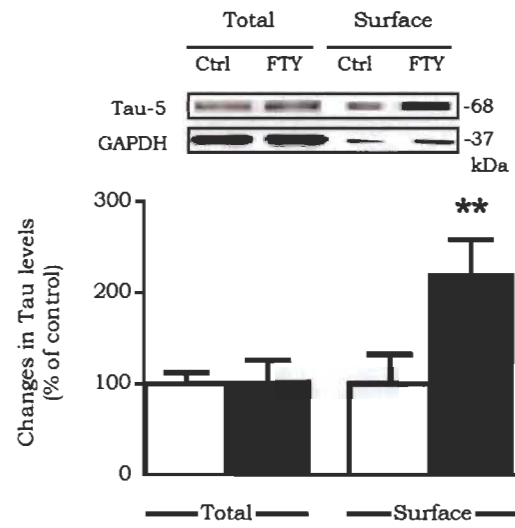
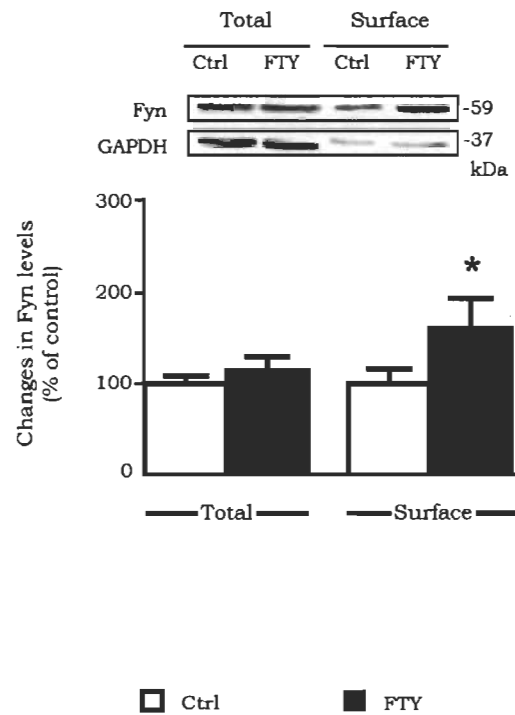


Figure 5 (Attiori et. al.)

A.**B.****Figure 6 (Attiori et. al.)**

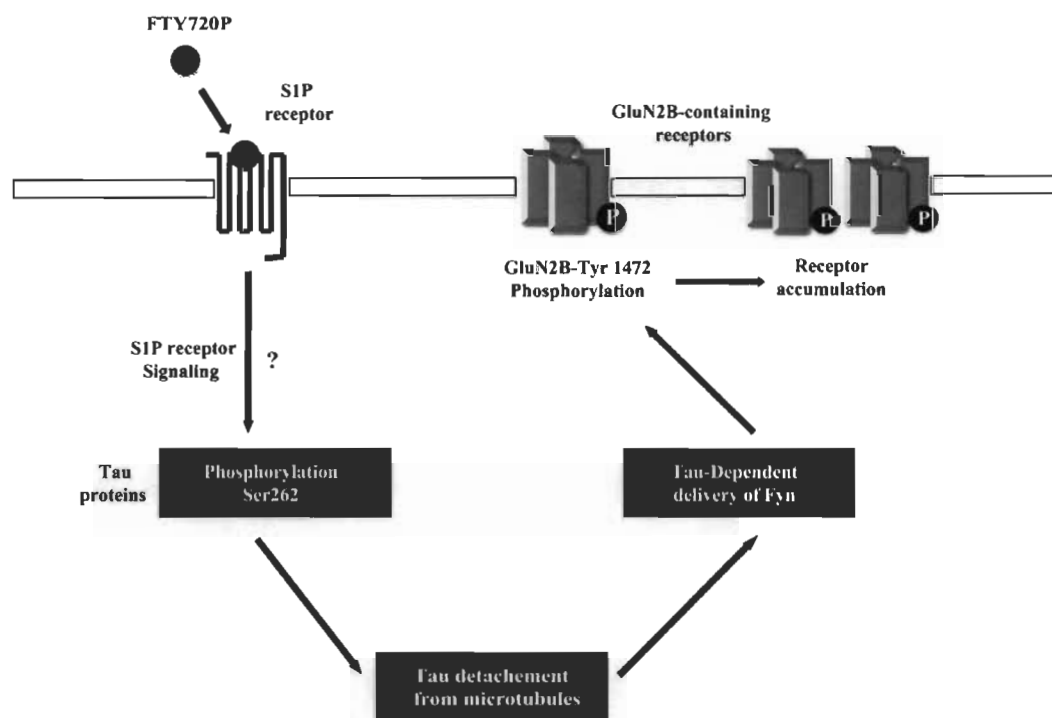


Figure 7 (Attiori et al.)

Références

- Abe, T., Matsumura, S., Katano, T., Mabuchi, T., Takagi, K., Xu, L., Yamamoto, A., Hattori, K., Yagi, T., Watanabe, M., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Mishina, M., Nakai, Y., Ito, S., 2005. Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1445-1454.
- Asle-Rousta, M., Kolahdooz, Z., Oryan, S., Ahmadiani, A., Dargahi, L., 2013. FTY720 (fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide (Abeta42)-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *J. Mol. Neurosci.* 50, 524-532.
- Bartke, N., Hannun, Y.A., 2009. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S91-S96.
- Barki-Harrington, L., Elkobi, A., Tzabary, T., Rosenblum, K., 2009. Tyrosine phosphorylation of the 2B subunit of the NMDA receptor is necessary for taste memory formation. *J. Neurosci.* 29, 9219-9226.
- Blaho, V.A., Hla, T., 2014. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Lipid Res.* 55, 1596-1608.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 2013. Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide. *Mol. Brain.* 6, 5.
- Brunkhorst, R., Vutukuri, R., Pfeilschifter, W., 2014. Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 283.
- Canals, D., Perry, D.M., Jenkins, R.W., Hannun, Y.A., 2011. Drug targeting of sphingolipid metabolism: sphingomyelinases and ceramidases. *Br. J. Pharmacol.* 163, 694-712.
- Carroll, R.C., Zukin, R.S., 2002. NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 571-577.
- Chen, B.S., Roche, K.W., 2007. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology.* 53, 362-368.
- Chi, X.X., Nicol, G.D., 2010. The sphingosine 1-phosphate receptor, S1PR(1), plays a prominent but not exclusive role in enhancing the excitability of sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 104, 2741-2748.

- Chiba, K., Adachi, K., 2012. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 as a useful target for treatment of multiple sclerosis. *Pharmaceuticals (Basel)*. 5, 514-528.
- Choi, J.W., Gardell, S.E., Herr, D.R., Rivera, R., Lee, C.W., Noguchi, K., Teo, S.T., Yung, Y.C., Lu, M., Kennedy, G., Chun, J., 2011. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *PNAS (USA)*. 108, 751-756.
- Chun, J., Hartung, H.P., 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* 33, 91-101.
- Chung, H.J., Huang, Y.H., Lau, L.F., Huganir, R.L., 2004. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J. Neurosci.* 24, 10248-10259.
- De Montigny, A., Elhiri, I., Allyson, J., Cyr, M., Massicotte, G., 2013. NMDA reduces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices by targeting NR2A receptors, GSK3beta, and PKC activities. *Neural plasticity*. 2013, 261593.
- Dennis, S.H., Jaafari, N., Cimarosti, H., Hanley, J.G., Henley, J.M., Mellor, J.R., 2011. Oxygen/glucose deprivation induces a reduction in synaptic AMPA receptors on hippocampal CA3 neurons mediated by mGluR1 and adenosine A3 receptors. *J. Neurosci.* 31, 11941-11952.
- Derecki, N.C., Cardani, A.N., Yang, C.H., Quinlins, K.M., Czeh, A., Lynch, K.R., Kipnis, J., 2010. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J. Exp. Med.* 207, 1067-1080.
- Doi, Y., Takeuchi, H., Horiuchi, H., Hanyu, T., Kawanokuchi, J., Jin, S., Parajuli, B., Sonobe, Y., Mizuno, T., Suzumura, A., 2013. Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid beta-induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PLoS One*. 8, e61988.
- Fan, X., Jin, W.Y., Wang, Y.T., 2014. The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 1-9.
- Frandemiche, M.L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lante, F., Buisson, A., 2014. Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *J. Neurosci.* 34, 6084-6097.

- Fukumoto, K., Mizoguchi, H., Takeuchi, H., Horiuchi, H., Kawanokuchi, J., Jin, S., Mizuno, T., Suzumura, A., 2014. Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid beta-induced memory impairment. *Behav. Brain Res.* 268, 88-93.
- Gao, F., Liu, Y., Li, X., Wang, Y., Wei, D., Jiang, W., 2012. Fingolimod (FTY720) inhibits neuroinflammation and attenuates spontaneous convulsions in lithium-pilocarpine induced status epilepticus in rat model. *Pharmac. Biochem. Behav.* 103, 187-196.
- Gendron, T.F., Petrucelli, L., 2009. The role of tau in neurodegeneration. *Mol. Neurodegen.* 4, 1-19.
- Graler, M.H., Goetzl, E.J., 2004. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* 18, 551-553.
- Gutierrez-Vargas, J.A., Munoz-Manco, J.I., Garcia-Segura, L.M., Cardona-Gomez, G.P., 2014. GluN2B N-Methyl-D-aspartic acid Receptor Subunit Mediates Atorvastatin-Induced Neuroprotection After Focal Cerebral Ischemia. *J. Neurosci. Res.* 92, 1529-1548.
- Hait, N.C., Wise, L.E., Allegood, J.C., O'Brien, M., Avni, D., Reeves, T.M., Knapp, P.E., Lu, J., Luo, C., Miles, M.F., Milstien, S., Lichtman, A.H., Spiegel, S., 2014. Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nat. Neurosci.* 17, 971-980.
- He, X., Huang, Y., Li, B., Gong, C.X., Schuchman, E.H., 2010. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 31, 398-08.
- Hemmati, F., Dargahi, L., Nasoohi, S., Omidbakhsh, R., Mohamed, Z., Chik, Z., Naidu, M., Ahmadiani, A., 2013. Neurorestorative effect of FTY720 in a rat model of Alzheimer's disease: comparison with memantine. *Behav. Brain Res.* 252, 415-421.
- Huang, Y.T., Chen, S.U., Chou, C.H., Lee, H., 2008. Sphingosine 1-phosphate induces platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 phosphorylation in human endothelial cells through cSrc and Fyn. *Cell Signal.* 20, 1521-1527.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wolfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., Gotz, J., 2010. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell.* 142, 387-397.

- Kolahdooz, Z., Nasoohi, S., Asle-Rousta, M., Ahmadiani, A., Dargahi, L., 2015. Sphingosin-1-phosphate Receptor 1: a Potential Target to Inhibit Neuroinflammation and Restore the Sphingosin-1-phosphate Metabolism. *Can. J. Neurol. Sci.* 1-8.
- Kono, M., Tucker, A.E., Tran, J., Bergner, J.B., Turner, E.M., Proia, R.L., 2014. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 reporter mice reveal receptor activation sites in vivo. *J. Clin. Invest.* 124, 2076-2086.
- Lau, C.G., Zukin, R.S., 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat.Rev. Neurosci.* 8, 413-426.
- Lauckner, J., Frey, P., Geula, C., 2003. Comparative distribution of tau phosphorylated at Ser262 in pre-tangles and tangles. *Neurobio. Aging.* 24, 767-776.
- Laurier-Laurin, M.E., De Montigny, A., Attiori Essis, S., Cyr, M., Massicotte, G., 2014. Blockade of Lysosomal Acid Ceramidase Induces GluN2B-Dependent Tau Phosphorylation in Rat Hippocampal Slices. *Neural plasticity.* 2014, 196812.
- Lee, C.W., Choi, J.W., Chun, J., 2010. Neurological S1P signaling as an emerging mechanism of action of oral FTY720 (fingolimod) in multiple sclerosis. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1567-1574.
- Lim, I.A., Merrill, M.A., Chen, Y., Hell, J.W., 2003. Disruption of the NMDA receptor-PSD-95 interaction in hippocampal neurons with no obvious physiological short-term effect. *Neuropharmacology.* 45, 738-754.
- Liu, X., Yue, S., Li, C., Yang, L., You, H., Li, L., 2011. Essential roles of sphingosine 1-phosphate receptor types 1 and 3 in human hepatic stellate cells motility and activation. *J. Cell. Physiol.* 226, 2370-2377.
- Luscher, C., Malenka, R.C., 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Persp. Biol.* 4.
- Lynch, G., Baudry, M., 2014. Brain and memory: Old arguments and new perspectives. *Brain Res.*, doi:10.1016/j.brainres.2014.1012.1052.
- MacDonald, J.F., Jackson, M.F., Beazely, M.A., 2007. G protein-coupled receptors control NMDARs and metaplasticity in the hippocampus. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768, 941-951.

- Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S., Spiegel, S., 2012. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* 22, 50-60.
- Maceyka, M., Spiegel, S., 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature.* 510, 58-67.
- Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G.J., Card, D., Keohane, C., Rosenbach, M., Hale, J., Lynch, C.L., Rupprecht, K., Parsons, W., Rosen, H., 2002. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science.* 296, 346-349.
- Massicotte, G., Baudry, M., 1991. Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15, 415-423.
- Mencl, S., Hennig, N., Hopp, S., Schuhmann, M.K., Albert-Weissenberger, C., Siren, A.L., Kleinschnitz, C., 2014. FTY720 does not protect from traumatic brain injury in mice despite reducing posttraumatic inflammation. *J. Neuroimmunol.* 274, 125-131.
- Mielke, M.M., Lyketsos, C.G., 2010. Alterations of the sphingolipid pathway in Alzheimer's disease: new biomarkers and treatment targets? *Neuromol. Med.* 12, 331-340.
- Mietelska-Porowska, A., Wasik, U., Goras, M., Filipek, A., Niewiadomska, G., 2014. Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 4671-4713.
- Morris, R.G., 2003. Long-term potentiation and memory. *Philos. Trans. R. Soc. London Biol. Sci.* 358, 643-647.
- Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D., Seuwen, K., 2009. Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nat. Chem. Biol.* 5, 428-434.
- Newcomer, J.W., Farber, N.B., Olney, J.W., 2000. NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2, 219-232.
- Nygaard, H.B., van Dyck, C.H., Strittmatter, S.M., 2014. Fyn kinase inhibition as a novel therapy for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 6, 8.
- Olivera, A., Spiegel, S., 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature.* 365, 557-560.

- Pabba, M., Wong, A.Y., Ahlskog, N., Hristova, E., Biscaro, D., Nassrallah, W., Ngsee, J.K., Snyder, M., Beique, J.C., Bergeron, R., 2014. NMDA receptors are upregulated and trafficked to the plasma membrane after sigma-1 receptor activation in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 34, 11325-11338.
- Pawlak, V., Jensen, V., Schupp, B.J., Kvello, A., Hvalby, O., Seeburg, P.H., Kohr, G., 2005. Frequency-dependent impairment of hippocampal LTP from NMDA receptors with reduced calcium permeability. *Eur. J. Neurosci.* 22, 476-484.
- Ratajczak, M.Z., Suszynska, M., Borkowska, S., Ratajczak, J., Schneider, G., 2014. The role of sphingosine-1 phosphate and ceramide-1 phosphate in trafficking of normal stem cells and cancer cells. *Expert Opin. Ther. Targets.* 18, 95-107.
- Riedel, G., Platt, B., Micheau, J., 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav. Brain Res.* 140, 1-47.
- Rojas, A., Dingledine, R., 2013. Ionotropic glutamate receptors: regulation by G-protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* 83, 746-752.
- Scales, T.M., Derkinderen, P., Leung, K.Y., Byers, H.L., Ward, M.A., Price, C., Bird, I.N., Perera, T., Kellie, S., Williamson, R., Anderton, B.H., Reynolds, C.H., 2011. Tyrosine phosphorylation of tau by the SRC family kinases lck and fyn. *Mol. Neurodegen.* 6, 12.
- Shipton, O.A., Paulsen, O., 2014. GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. London .Biol. Sci.* 369, 20130163.
- Soliven, B., Miron, V., Chun, J., 2011. The neurobiology of sphingosine 1-phosphate signaling and sphingosine 1-phosphate receptor modulators. *Neurology.* 76, S9-14.
- Spiegel, S., Olivera, A., Zhang, H., Thompson, E.W., Su, Y., Berger, A., 1994. Sphingosine-1-phosphate, a novel second messenger involved in cell growth regulation and signal transduction, affects growth and invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 31, 337-348.
- Spiegel, S., Milstien, S., 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 397-407.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R., 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405-496.

- Trepanier, C.H., Jackson, M.F., MacDonald, J.F., 2012. Regulation of NMDA receptors by the tyrosine kinase Fyn. *FEBS J.* 279, 12-19.
- van Echten-Deckert, G., Hagen-Euteneuer, N., Karaca, I., Walter, J., 2014. Sphingosine-1-phosphate: boon and bane for the brain. *Cell. Physiol. Biochem.* 34, 148-157.
- Wang, H., Ren, C.H., Gunawardana, C.G., Schmitt-Ulms, G., 2013. Overcoming barriers and thresholds - signaling of oligomeric Abeta through the prion protein to Fyn. *Mol. Neurodegen.* 8, 24.
- Yang, K., Jackson, M.F., MacDonald, J.F., 2014. Recent progress in understanding subtype specific regulation of NMDA receptors by G Protein Coupled Receptors (GPCRs). *Int. J. Mol. Sci.* 15, 3003-3024.
- Zhang, Y.H., Fehrenbacher, J.C., Vasko, M.R., Nicol, G.D., 2006. Sphingosine-1-phosphate via activation of a G-protein-coupled receptor(s) enhances the excitability of rat sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 96, 1042-1052.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La compréhension du rôle des récepteurs à la S1P dans la régulation du système immunitaire a constitué une importante avancée de la recherche sur les mécanismes pathologiques de la sclérose en plaques (Rivera *et al.*, 2008). S'agissant de l'implication de la S1P dans cette maladie, les recherches ont permis de mettre en évidence que l'efficacité clinique de l'analogue FTY720P repose sur la capacité du médicament à limiter la pénétration intempestive des lymphocytes dans le système nerveux central (Chiba et Adachi, 2012; Kataoka *et al.*, 2005). La découverte récente montrant que l'analogue en question est à même d'accroître la mémoire et la plasticité neuronale chez l'animal de laboratoire a été un des faits marquants dans le champ de la neuropharmacologie. Or, la présente recherche montre que le FTY720P interagit fort probablement avec les capacités cognitives en régulant les récepteurs NMDA de l'hippocampe (Hait *et al.*, 2014). Il semble que cette relation neurochimique intéresse principalement la phosphorylation de la sous-unité GluN2B constituant les récepteurs NMDA et concerne, au préalable, la livraison de la protéine kinase Fyn à la membrane plasmique, et ce, par l'intermédiaire d'un mécanisme moléculaire impliquant la protéine Tau. Au final en résulterait une hausse du nombre de récepteurs NMDA riches en sous-unités GluN2B, un phénomène qui pourrait rendre compte de l'accroissement des fonctions cognitives des animaux traités au FTY720P.

4.1 Enrichissement membranaire des récepteurs GluN2B

Les études sur la transgénèse ont mis en évidence le rôle crucial joué par les récepteurs GluN2B dans la mémoire et la plasticité neuronale chez l'animal (Wang

et al., 2009; Zhuo, 2009; Jacobs *et al.*, 2015). L'équipe de Joe Z. Tsien a montré, par exemple, qu'il était possible d'augmenter significativement les capacités cognitives des souris de laboratoire uniquement en accroissant l'expression des sous-unités GluN2B. Son groupe a montré que l'augmentation de l'expression du gène de GluN2B améliorait, par ailleurs, la mémoire déficiente de souris âgées (Jacobs *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 1999; Li et Tsien, 2009). Depuis quelque temps déjà, les données recueillies en imagerie cellulaire laissent présager que les effets physiologiques des récepteurs NMDA sont essentiellement déterminés par la localisation des sous-unités GluN2 au niveau des connexions neuronales (Gardoni *et al.*, 2009). On suspecte, de fait, que les effets des récepteurs GluN2B sont conditionnés par leur localisation dans le complexe synaptique, soit en pré-synapse où ils peuvent moduler la libération de neurotransmetteur, soit dans la densité postsynaptique où ils traduisent la transmission synaptique. Les récepteurs peuvent également se retrouver dans les compartiments extrasynaptiques, lesquels sont activés lors du débordement synaptique ou encore par la libération de glutamate par les cellules gliales (Petrulia, 2012; Thomas *et al.*, 2006).

L'une des caractéristiques principales des récepteurs GluN2B est la complexité de ses effets biologiques. Alors qu'il apparaît que ces récepteurs sont essentiels à la fonction synaptique et au stockage des souvenirs, on attribue également aux récepteurs GluN2B un rôle toxique dans le développement de maladies neurodégénératives (Loftis et Janowsky, 2003; Martin et Wang, 2010; Picconi *et al.*, 2006). Par exemple, les études sur la dégénérescence neuronale nous invitent à considérer les récepteurs GluN2B comme l'un des acteurs fondamentaux déclenchant les mécanismes sous-jacents à la mort des neurones survenant durant de multiples affections comme au cours de l'ischémie cérébrale, l'épilepsie, la sclérose latérale amyotrophique et possiblement lors de la maladie d'Alzheimer (Gogas, 2006; Li *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2012; Martel *et al.*, 2009). Les études de la localisation des récepteurs NMDA indiquent que la composition des sous-unités GluN2B varie considérablement selon les compartiments (Harris et Pettit, 2007). De façon générale, les données expérimentales tentent de démontrer que les effets

bénéfiques des récepteurs GluN2B sur la mémoire découlent de l'activation des récepteurs situés dans la densité postsynaptique, alors que les effets néfastes eux sont le fruit d'une stimulation intempestive des mêmes récepteurs se trouvant dans les compartiments extrasynaptiques (Figure 4.1) (Garcia-Munoz *et al.*, 2015; Gardoni *et al.*, 2009; Loftis et Janowsky, 2003; Petralia, 2012; Zhou *et al.*, 2015).

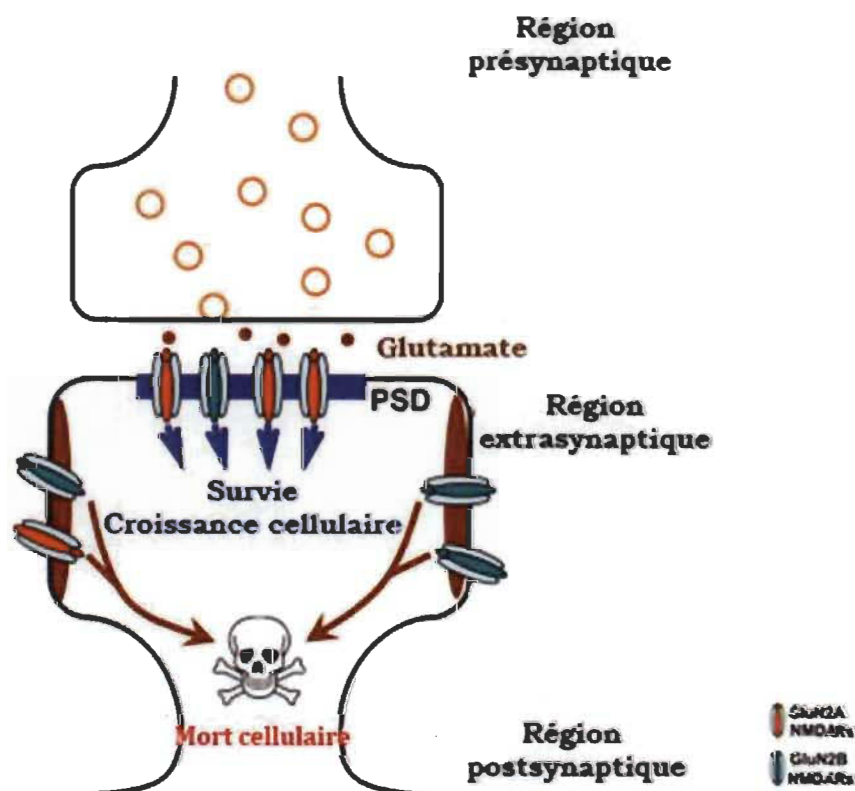


Figure 4.1 Rôle des récepteurs NMDA synaptiques et extrasynaptiques
La distribution des récepteurs NMDA varie au sein des synapses de l'hippocampe. Ils peuvent être soit synaptiques, soit extrasynaptiques. Ce qui pourrait jouer un rôle important dans la survie et la mort cellulaire. (Image adaptée de Zhou *et al.*, 2015.)

Notre travail montre, par ailleurs, que la hausse de phosphorylation du récepteur GluN2B à son site Tyr1472 résultant du traitement au FTY720P induit une accumulation du récepteur NMDA à la surface des membranes neuronales. Certes, il est permis de postuler que le FTY720P agirait sur la mémoire et la plasticité neuronale en augmentant le nombre de récepteurs GluN2B dans la

densité postsynaptique des neurones. Évidemment, on peut au passage s'interroger si les effets du médicament en question ne pourraient pas éventuellement favoriser une accumulation de récepteurs GluN2B dans les compartiments extrasynaptiques et produire, à terme, des effets secondaires indésirables (Figure 4.2). En ce sens, des études seront requises afin de dévoiler (ou non) les conséquences néfastes d'un tel traitement sur des neurones affligés par différentes anomalies cellulaires.

Une seconde question se pose quant aux raisons expliquant la régulation spécifique des sous-unités GluN2B par le médicament FTY720P. En effet, les sous-unités GluN2A peuvent-elles aussi être régulées par des kinases de la famille Src/Fyn. Là encore, des études supplémentaires sont donc nécessaires, notamment sur leurs voies de signalisations activées par chacune de ces sous-unités, ou encore sur leur interaction avec des molécules de signalisations différentes, permettront d'élucider la question. En effet, l'activation de ces récepteurs pourraient conduire à des effets distincts sur la force synaptique dépendante des récepteurs NMDA (Lujan *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013) et donc sur les processus de mémorisation (Shipton et Paulsen, 2014).

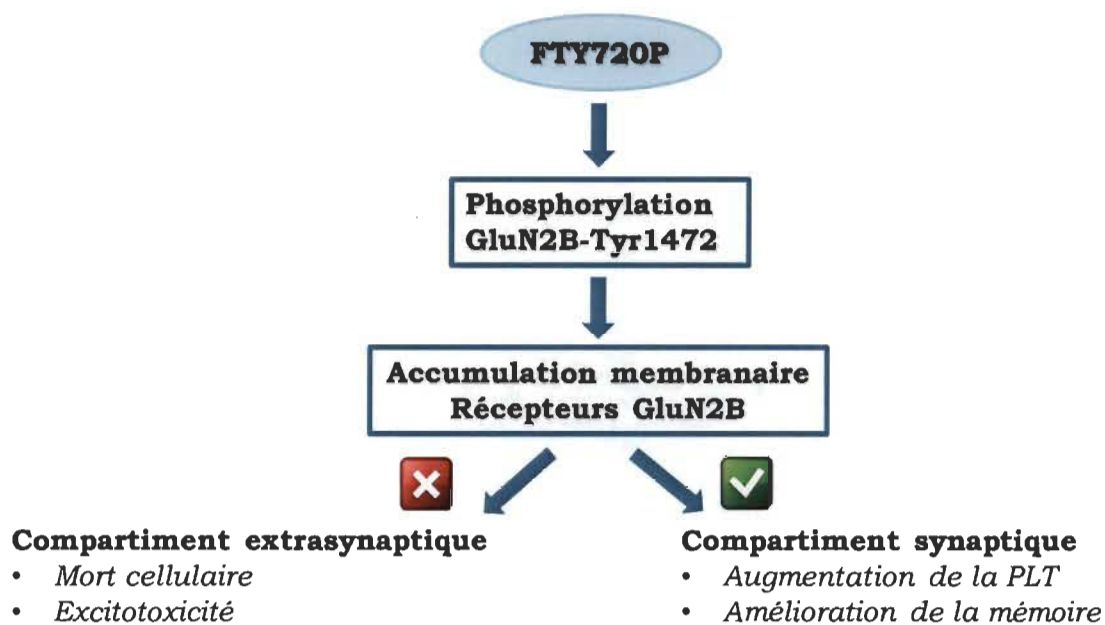


Figure 4.2 Effets du FTY720P sur la fonction des récepteurs NMDA.
Le FTY720P induit la phosphorylation de la sous-unité GluN2B au site Tyr1472. On observe alors une accumulation membranaire du nombre de récepteurs, ce qui à terme pourrait entraîner des effets bénéfiques ou au contraire toxiques, selon la localisation des récepteurs à la surface des cellules.

4.2 La régulation de la protéine Tau par le FTY720P : un processus initiateur de la régulation NMDA

Depuis plusieurs décennies, on s'intéresse grandement aux effets délétères de la protéine Tau dans la progression de la maladie d'Alzheimer et autres maladies neurodégénératives (Iqbal *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2011). Du fait de sa capacité à s'agréger dans les neurones, la protéine Tau pourrait contribuer à l'affaïssement du transport intracellulaire et du métabolisme énergétique. Les données sur la biochimie suggèrent que les effets délétères de cette protéine font suite à un état d'hyperphosphorylation, favorisant du coup l'agrégation toxique de Tau (Stoothoff et Johnson, 2005; Wang *et al.*, 2013). Les études disponibles dans la littérature fournissent des indications selon lesquelles l'état d'hyperphosphorylation de Tau serait dépendant de l'activation préalable des récepteurs NMDA, d'un influx d'ions calcium et éventuellement de l'activation de certaines kinases (Allyson *et al.*, 2010;

De Montigny *et al.*, 2013; Fleming et Johnson, 1995). Or, cette vision des choses ne correspond absolument pas aux études effectuées dans le cadre du présent mémoire. Les résultats de nos expériences sur les effets du FTY720P semblent suggérer que ce composé exercerait d'abord des perturbations de la phosphorylation (article figure 1A) et ensuite une hausse du nombre de récepteurs GluN2B à la surface des membranes neuronales (article figure 4B). Selon toute vraisemblance, les effets du composé FTY720P pourraient découler, au moins en partie, de la livraison de la kinase Fyn aux récepteurs GluN2B par la protéine Tau (article figure 6). Un effet possiblement attribuable au détachement microtubulaire de Tau et qui se traduirait, au préalable, par un état d'hyperphosphorylation à son site Ser262 (article figure 5A). Toutefois, dans le système étudié, la hausse de phosphorylation observée se distingue de l'hyperphosphorylation pathologique.

On le sait, plusieurs études ont mis en évidence un effet néfaste de la phosphorylation de Tau au niveau neuronal (Johnson et Stoothoff, 2004; Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2013; Ando *et al.*, 2016). D'autres suggèrent qu'une augmentation de la phosphorylation de cette protéine du cytosquelette ne serait pas nécessairement délétère (Castellani *et al.*, 2008; Cowan et Mudher, 2013; Luna-Muñoz *et al.*, 2013; Spires-Jones *et al.*, 2011) et favoriserait, du coup, la plasticité neuronale de l'hippocampe et la mémoire. Des chercheurs viennent de réaliser une série d'étude montrant que l'hyperphosphorylation de Tau contribue à la mise en œuvre de la mémoire dite renversée chez le rongeur (Ahmadian-Attar *et al.*, 2014; Nabavi *et al.*, 2014). Cette mémoire consiste à exploiter un moyen de contournement cognitif, en tenant compte du fait que l'expérience passée n'est plus convenable à la réalisation d'une tâche mémorisée. Lors de l'apprentissage en question, l'animal doit d'abord extraire de sa mémoire le scénario retenu pour la réalisation passée d'une épreuve mnésique associée, par exemple à la relocalisation d'une plateforme d'évitement dans le labyrinthe de Morris (Nabavi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2009). Ces travaux invitent à associer non pas la LTP à cette forme de mémorisation, mais plutôt la LTD, une plasticité neuronale mettant en évidence une réduction de la transmission neuronale glutamatergique (Regan *et al.*, 2015).

Expérimentalement, il sera évidemment important de vérifier si les effets du FTY720P sur la protéine Tau ont pour effet d'accroître cette forme de plasticité dans l'hippocampe.

4.3 Implication du sous-type 1 des récepteurs à la S1P

La mise en évidence d'une influence du FTY720P sur les récepteurs NMDA et, préalablement sur la protéine Tau, est intéressante. Toutefois, on ne connaît toujours pas les modalités moléculaires sous-jacentes à ces effets inédits des récepteurs à la S1P. Sur le plan pharmacologique, on observe qu'en présence du composé W146 l'effet du FTY720P sur la phosphorylation des récepteurs GluN2B est considérablement diminué. Il est donc logique d'imaginer que le sous-type 1 des récepteurs à la S1P joue un rôle crucial dans cette régulation. C'est donc son activation par le FTY720P et non sa dégradation qui est en cause dans l'effet généré sur les récepteurs GluN2B, contrairement à ce que l'on peut observer dans le cas du traitement de la sclérose en plaques. Plusieurs observations conduisent à établir un lien entre l'activation des S1PR1 et la mobilisation intracellulaire d'ions calcium par l'inositol phosphate, un second messager issu de la stimulation de la phospholipase C (Hinkovska-Galcheva *et al.*, 2008; Mattie *et al.*, 1994; Seol *et al.*, 2005). Poursuivant des études sur le sujet, nous avons récemment démontré que la chélation intracellulaire des ions calcium réduit considérablement la capacité du composé FTY720P à phosphoryler le récepteur GluN2B dans l'hippocampe. S'agissant de son implication au niveau de la protéine Tau, il apparaît que le calcium soit en mesure d'activer diverses kinases susceptibles de phosphoryler certains épitopes (Fleming et Johnson, 1995).

Les données accumulées dans le cadre de ce projet semblent converger vers une signalisation calcique destinée à cibler le site Ser262 de la protéine Tau. La protéine kinase en cause reste à préciser, mais les travaux conduisent à penser

que la régulation spécifique de cet épitope de Tau implique spécifiquement l'activation de la CaMKII dans l'hippocampe.

Or, comme bien d'autres récepteurs couplés aux protéines G, il faut savoir que lorsque la S1P se lie à son récepteur, ce dernier interagit avec une protéine G trimérique qui se dissocie en sous-unités α -GTP et $\beta\gamma$, capables d'activer différents effecteurs cellulaires. Dans les secondes ou les minutes qui suivent l'activation des RCPG, ceux-ci sont phosphorylés, ce qui conduit à leur découplage fonctionnel et promeut leur internalisation. Une fois le compartiment endosomal atteint, les récepteurs internalisés peuvent être recyclés vers la membrane plasmique ou dégradés via la fusion des endosomes avec les lysosomes (Hille, 2009). La phosphorylation des récepteurs à S1PR1 a été bien étudiée, rapidement internalisée après sa liaison avec la S1P (ou son agoniste synthétique SEW2871), puis recyclée (Blaho et Hla, 2014; Dong *et al.*, 2014; Garriss *et al.*, 2013; Ni *et al.*, 2015). Le FTY720 phosphorylé induit également une internalisation du S1PR1, mais s'en suit une dégradation et non le recyclage du récepteur à la surface membranaire (Brinkmann *et al.*, 2002; Chiba et Adachi, 2012; Kataoka *et al.*, 2005). On peut évidemment imaginer que le trafic différentiel des récepteurs à la S1P induit par les analogues pharmacologiques puisse éventuellement exercer des effets opposés sur les récepteurs NMDA. Une étude récente effectuée dans notre laboratoire supporte cette hypothèse, ayant démontré que l'agoniste SEW2871 favorise non pas une hausse de phosphorylation, mais une réduction de cette dernière au niveau du résidu Tyr1472 de la sous-unité GluN2B. Décidément, l'influence des récepteurs à la S1P semble variée et complexe et des études supplémentaires seront nécessaires afin de permettre d'approfondir les mécanismes moléculaires assurant la régulation NMDA par divers analogues pharmacologiques.

On considère en général que la S1P aurait un rôle dans le développement du système nerveux, étant donné que chez les souris, la délétion du S1PR1 affecte sévèrement la neurogenèse, un phénomène similaire à celui observé avec les

doubles *knock-out* pour les enzymes responsables de la phosphorylation de la sphingosine (SphK1 et SphK2) (Maceyka *et al.*, 2002; Rosen *et al.*, 2013; van Echten-Deckert *et al.*, 2014). Un autre argument suggérant un rôle de la S1P dans le système nerveux central est venu des études conduites sur les souris déficitaires pour le récepteur S1P2. Ces souris présentent de façon épisodique des convulsions parfois fatales, pouvant être expliquées par des défauts dans l'excitabilité neuronale (Li *et al.*, 2012). La S1P, via le S1P5, est aussi impliquée dans la croissance et dans la survie des oligodendrocytes, les cellules formant la gaine de myéline qui entoure la plupart des axones du système nerveux central. La destruction des oligodendrocytes par les cellules du système immunitaire est un événement clé dans le processus pathologique de la sclérose en plaques (Patel et Balabanov, 2012). De fait, les traitements utilisés à ce jour sont fondés sur une approche utilisant des immunomodulateurs qui visent à prévenir la destruction des oligodendrocytes par les cellules T et par les macrophages (Brinkmann *et al.*, 2010; Chun et Hartung, 2010; Tramacere *et al.*, 2015). Chez l'animal, des changements bénéfiques du FTY720P sur la mémoire et la plasticité neuronale de l'hippocampe ont été interprétés comme étant associés à la régulation de la fonction des neurones (Miguez *et al.*, 2015). Les présentes modifications observées au niveau des récepteurs NMDA par le FTY720P semblent concorder avec cette hypothèse.

4.4 À la recherche des mécanismes régulateurs

L'identification des mécanismes régulateurs en réponse au FTY720P ne fait que débiter et l'identification des molécules influencées par ce médicament s'avère essentielle à la compréhension de ses bienfaits thérapeutiques. Récemment, des travaux ont démontré que la production du facteur neurotrophique (BDNF) serait rapidement augmentée dans l'hippocampe à la suite d'un traitement au FTY720P (Fukumoto *et al.*, 2014). Fait intéressant, de nombreuses études conduisent à établir une relation entre le BDNF et la maladie d'Alzheimer (Durany *et al.*, 2000; Honea *et al.*, 2013; O'Bryant *et al.*, 2009). Par exemple, on sait que le BDNF agit

comme puissant agent neuroprotecteur et que sa concentration s'effondre précisément avant le début de la mort neuronale chez les sujets Alzheimer (Nagahara *et al.*, 2009). Puisque le BDNF est connu pour réguler les récepteurs GluN2B de l'hippocampe (Caldeira *et al.*, 2007), il apparaît plausible de supposer que les effets du FTY720P sur les récepteurs NMDA impliquent l'activation des récepteurs du facteur de croissance. Dans la plupart des cellules, le BDNF agit en activant un récepteur membranaire dénommé TrkB (Numakawa *et al.*, 2010). L'utilisation de composés pharmacologiques bloqueurs de ces récepteurs pourra nous en apprendre davantage sur la relation potentielle entre le récepteur à la S1P, la production de BDNF et la régulation éventuelle des récepteurs NMDA.

Détail intéressant, l'expression des S1PR1 est connue pour être très limitée dans les cellules neuronales et semble concerner davantage les cellules astrocytaires de l'hippocampe (Blaho et Hla, 2014; Nishimura *et al.*, 2010). Cette observation a été confirmée par des études réalisées sur des modèles animaux pour lesquels une délétion des récepteurs neuronaux, n'affecte pas l'effet du médicament. Il est donc permis d'envisager que la régulation des récepteurs neuronaux GluN2B par l'analogue FTY720P puisse découler d'une stimulation préalable des récepteurs astrocytaires. C'est par l'action paracrine des astrocytes sur les neurones que le FTY720P peut moduler la sécrétion du glutamate et la protection des neurones contre la mort excitotoxique (Groves *et al.*, 2013).

Bien que le lien entre l'activation des S1PR1 astrocytaires et la régulation neuronale des récepteurs GluN2B ne soit pas établi, des études fonctionnelles ont contribué à renforcer l'hypothèse selon laquelle les connexions chimiques astroneuronales peuvent jouer un rôle déterminant dans l'apparition de la plasticité neuronale (Barker et Ullian, 2010; De Pitta *et al.*, 2015; Wenker, 2010) et, lors de certaines situations pathologiques, comme la maladie d'Alzheimer (Ota *et al.*, 2013; Vincent *et al.*, 2010). Un champ d'études encore inexploré.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Le fardeau de la démence, plus particulièrement de la maladie d'Alzheimer, s'est rapidement accru depuis deux décennies. Le vieillissement de la population en étant la cause majeure (Qiu *et al.*, 2009; Tom *et al.*, 2015). Sur le plan thérapeutique, on s'interroge malheureusement sur l'efficacité réelle des médicaments employés à ce jour pour la prise en charge des atteintes cognitives chez les sujets Alzheimer. Toutefois, un espoir apparaît dans une direction plutôt inattendue, à savoir l'utilisation d'un médicament normalement réservé aux patients souffrant de la sclérose en plaques, le FTY720P (Brunkhorst *et al.*, 2014; Nazari *et al.*, 2016). Nous avons évoqué les données prometteuses des études comportementales portant sur l'analyse des apprentissages cognitifs chez l'animal traité au FTY720P. Or, les modifications synaptiques s'établissent dans le même sens, se caractérisant par une hausse de LTP lorsqu'elle est induite en présence du médicament (Hait *et al.*, 2014). La présente étude insiste sur le fait que les effets physiologiques décrits précédemment sont le résultat d'un accroissement du nombre de récepteurs NMDA à la surface des neurones hippocampiques. Bien que cette étude soit limitée à évaluer les niveaux d'expression de ces protéines membranaires par la technique de western blot, elle servira certainement de base pour des études futures sur les mécanismes moléculaires expliquant les effets positifs de certains médicaments sur la mémoire et les performances cognitives de la population en générale ou les personnes souffrant de maladies neuronales.

Ces travaux invitent à associer les effets procognitifs du FTY720P à une hausse de fonction glutamatergique. Ils nous invitent surtout à nous poser une question essentielle sur le plan neurobiologique : les effets rapportés ne risquent-ils pas de s'avérer néfastes pour le cerveau? Bien qu'en apparence contradictoire,

cette possibilité s'accorde assez bien avec plusieurs observations mettant en évidence une réduction de la survie des neurones sous l'action des récepteurs GluN2B. Par ailleurs, n'oublions pas que les mécanismes de la mémoire impliquent plusieurs familles de récepteurs glutamatergiques (AMPA et mGluR) (Peng *et al.*, 2011) et il n'est donc pas exclus de penser que les effets bénéfiques du FTY720P sur la cognition puissent découler de la régulation de ces autres systèmes de transmission. De quoi tenir en haleine les chercheurs œuvrant dans le domaine de la neurobiologie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adada, M., Canals, D., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2013. Sphingosine-1-phosphate receptor 2. *FEBS J.* 280, 6354-6366.
- Ahmadian-Attar, M.M., Ahmadiani, A., Kamalinejad, M., Dargahi, L., Mosaddegh, M., 2014. Chronic Cold-Water-Induced Hypothermia Impairs Memory Retrieval and *Nepeta menthoides* as a Traditional "Hot" Herb Reverses the Impairment. *Iran J Pharm Res.* 13, 185-193.
- Alesenko, A.V., 2013. The potential role for sphingolipids in neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *Biomed Khim.* 59, 25-50.
- Allyson, J., Dontigny, E., Auberson, Y., Cyr, M., Massicotte, G., 2010. Blockade of NR2A-containing NMDA receptors induces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neural Plast.* 2010, 340168.
- Ando, K., Maruko-Otake, A., Ohtake, Y., Hayashishita, M., Sekiya, M., Iijima, K.M., 2016. Stabilization of Microtubule-Unbound Tau via Tau Phosphorylation at Ser262/356 by Par-1/MARK Contributes to Augmentation of AD-Related Phosphorylation and Aβ42-Induced Tau Toxicity. *PLoS Genet.* 12, e1005917.
- Aoki, M., Aoki, H., Ramanathan, R., Hait, N.C., Takabe, K., 2016. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential. *Mediators of Inflammation.* 2016, 11.
- Asle-Rousta, M., Kolahdooz, Z., Oryan, S., Ahmadiani, A., Dargahi, L., 2013. FTY720 (fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide (Aβ42)-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *J Mol Neurosci.* 50, 524-532.
- Barker, A.J., Ullian, E.M., 2010. Astrocytes and synaptic plasticity. *Neuroscientist.* 16, 40-50.
- Bartke, N., Hannun, Y.A., 2009. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res.* 50 Suppl, S91-96.
- Bartsch, T., Wulff, P., 2015. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience.* 309, 1-16.

- Blaho, V.A., Hla, T., 2014. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res.* 55, 1596-1608.
- Blanke ML, VanDongen AMJ. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 13.
- Braithwaite, S.P., Adkisson, M., Leung, J., Nava, A., Masterson, B., Urfer, R., Oksenberg, D., Nikolich, K., 2006. Regulation of NMDA receptor trafficking and function by striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP). *Eur J Neurosci.* 23, 2847-2856.
- Brinkmann, V., Davis, M.D., Heise, C.E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., 2002. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem.* 277.
- Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., 2010. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* 9.
- Brunkhorst, R., Vutukuri, R., Pfeilschifter, W., 2014. Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives. *Front Cell Neurosci.* 8, 283.
- Caldeira, M.V., Melo, C.V., Pereira, D.B., Carvalho, R.F., Carvalho, A.L., Duarte, C.B., 2007. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 35, 208-219.
- Camprubí-Robles, M., Mair, N., Andratsch, M., Benetti, C., Beroukas, D., Rukwied, R., 2013. Sphingosine-1-phosphate-induced nociceptor excitation and ongoing pain behavior in mice and humans is largely mediated by S1P3 receptor. *J Neurosci.* 33.
- Castellani, R.J., Nunomura, A., Lee, H.G., Perry, G., Smith, M.A., 2008. Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above. *J Alzheimers Dis.* 14, 377-383.

- Cavone, L., Felici, R., Lapucci, A., Buonvicino, D., Pratesi, S., Muzzi, M., Hakiki, B., Maggi, L., Peruzzi, B., Caporale, R., Annunziato, F., Amato, M.P., Chiarugi, A., 2015. Dysregulation of sphingosine 1 phosphate receptor-1 (S1P1) signaling and regulatory lymphocyte-dependent immunosuppression in a model of post-fingolimod MS rebound. *Brain Behav Immun.* 50, 78-86.
- Ceccom, J., Loukh, N., Lauwers-Cances, V., Touriol, C., Nicaise, Y., Gentil, C., Uro-Coste, E., Pitson, S., Maurage, C.A., Duyckaerts, C., Cuvillier, O., Delisle, M.B., 2014. Reduced sphingosine kinase-1 and enhanced sphingosine 1-phosphate lyase expression demonstrate deregulated sphingosine 1-phosphate signaling in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2, 12.
- Cercato, M.C., Coletti, N., Snitcowsky, M., Aguirre, A.I., Kornisiuk, E.E., Baez, M.V., Jerusalinsky, D.A., 2014. Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory. *J Physiol Paris.* 108, 263-269.
- Chen, B.S., Roche, K.W., 2007. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology.* 53, 362-368.
- Chi, H., 2011. Sphingosine-1-phosphate and immune regulation: trafficking and beyond. *Trends Pharmacol Sci.* 32, 16-24.
- Chiba, K., Adachi, K., 2012. Discovery of fingolimod, the sphingosine 1-phosphate receptor modulator and its application for the therapy of multiple sclerosis. *Future Med Chem.* 4, 771-781.
- Chun, J., Hartung, H.P., 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol.* 33, 91-101
- Chung, H.J., Huang, Y.H., Lau, L.F., Huganir, R.L., 2004. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci.* 24, 10248-10259.
- Collingridge, G., 1987. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature.* 330, 604-605.
- Cowan, C.M., Mudher, A., 2013. Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front Neurol.* 4, 114.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., Spiegel, S., 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature.* 381, 800-803.

- Cuvillier, O., 2012. Sphingosine 1-phosphate receptors: from biology to physiopathology. *Med Sci (Paris)*. 28, 951-957.
- De Montigny, A., Elhiri, I., Allyson, J., Cyr, M., Massicotte, G., 2013. NMDA reduces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices by targeting NR2A receptors, GSK3 β , and PKC activities. *Neural Plast*. 2013, 261593.
- De Pitta, M., Brunel, N., Volterra, A., 2015. Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity *Neuroscience*.
- Doi, Y., Takeuchi, H., Horiuchi, H., Hanyu, T., Kawanokuchi, J., Jin, S., Parajuli, B., Sonobe, Y., Mizuno, T., Suzumura, A., 2013. Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid beta-induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PLoS One*. 8, e61988.
- Dong, J., Wang, H., Wu, G., Zhao, J., Zhang, L., Zuo, L., Zhu, W., Gong, J., Li, Y., Gu, L., Li, J., 2014. Oral treatment with SEW2871, a sphingosine-1-phosphate type 1 receptor agonist, ameliorates experimental colitis in interleukin-10 gene deficient mice. *Clin Exp Immunol*. 177, 94-101.
- Driesen, N.R., McCarthy, G., Bhagwagar, Z., Bloch, M.H., Calhoun, V.D., D'Souza, D.C., Gueorguieva, R., He, G., Leung, H.C., Ramani, R., Anticevic, A., Suckow, R.F., Morgan, P.T., Krystal, J.H., 2013. The impact of NMDA receptor blockade on human working memory-related prefrontal function and connectivity. *Neuropsychopharmacology*. 38, 2613-2622.
- Durany, N., Michel, T., Kurt, J., Cruz-Sanchez, F.F., Cervos-Navarro, J., Riederer, P., 2000. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels in Alzheimer's disease brains. *Int J Dev Neurosci*. 18, 807-813.
- Fan, L., Yan, H., 2016. FTY720 Attenuates Retinal Inflammation and Protects Blood-Retinal Barrier in Diabetic Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 57, 1254-1263.
- Farez, M.F., Correale, J., 2016. Sphingosine 1-phosphate signaling in astrocytes: Implications for progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 361, 60-65.
- Fleming, L.M., Johnson, G.V., 1995. Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP. *Biochem J*. 309 (Pt 1), 41-47.
- Fukumoto, K., Mizoguchi, H., Takeuchi, H., Horiuchi, H., Kawanokuchi, J., Jin, S., Mizuno, T., Suzumura, A., 2014. Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid beta-induced memory impairment. *Behav Brain Res*. 268, 88-93.

- Garcia-Munoz, M., Lopez-Huerta, V.G., Carrillo-Reid, L., Arbuthnott, G.W., 2015. Extrasynaptic glutamate NMDA receptors: key players in striatal function. *Neuropharmacology*. 89, 54-63.
- Gardoni, F., Mauceri, D., Malinverno, M., Polli, F., Costa, C., Tozzi, A., Siliquini, S., Picconi, B., Cattabeni, F., Calabresi, P., Di Luca, M., 2009. Decreased NR2B subunit synaptic levels cause impaired long-term potentiation but not long-term depression. *J Neurosci*. 29, 669-677.
- Garris, C.S., Wu, L., Acharya, S., Arac, A., Blaho, V.A., Huang, Y., Moon, B.S., Axtell, R.C., Ho, P.P., Steinberg, G.K., Lewis, D.B., Sobel, R.A., Han, D.K., Steinman, L., Snyder, M.P., Hla, T., Han, M.H., 2013. Defective sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) phosphorylation exacerbates TH17-mediated autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*. 14, 1166-1172.
- Ghasemi, R., Dargahi, L., Ahmadiani, A., 2016. Integrated sphingosine-1 phosphate signaling in the central nervous system: From physiological equilibrium to pathological damage. *Pharmacol Res*. 104, 156-164.
- Goetzl, E.J., Wang, W., McGiffert, C., Huang, M.C., Graler, M.H., 2004. Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system. *J Cell Biochem*. 92, 1104-1114.
- Gogas, K.R., 2006. Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists. *Curr Opin Pharmacol*. 6, 68-74.
- Gough, N.R., 2014. Revealing a Role for Presynaptic Glutamate Receptors in LTP. *Science Signaling*. 7, ec341-ec341.
- Groves, A., Kihara, Y., Chun, J., 2013. Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy. *J Neurol Sci*. 328.
- Guerrero, M., Urbano, M., Roberts, E., 2016. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 agonists: a patent review (2013-2015). *Expert Opin Ther Pat*. 26, 455-470.
- Hait, N.C., Wise, L.E., Allegood, J.C., O'Brien, M., Avni, D., Reeves, T.M., Knapp, P.E., Lu, J., Luo, C., Miles, M.F., Milstien, S., Lichtman, A.H., Spiegel, S., 2014. Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nat Neurosci*. 17, 971-980.
- Harris, A.Z., Pettit, D.L., 2007. Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. *J Physiol*. 584, 509-519.

- Healy, L.M., Antel, J.P., 2015. Sphingosine-1-Phosphate Receptors in the Central Nervous and Immune Systems. *Curr Drug Targets*.
- Hille, B., 2009. G protein-coupled receptor. In *Scholarpedia*. Vol. 4, eds., pp. 8214.
- Hinkovska-Galcheva, V., VanWay, S.M., Shanley, T.P., Kunkel, R.G., 2008. The role of sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate in calcium homeostasis. *Curr Opin Investig Drugs*. 9, 1192-1205.
- Hoglinger, D., Haberkant, P., Aguilera-Romero, A., Riezman, H., Porter, F.D., Platt, F.M., Galione, A., Schultz, C., 2015. Intracellular sphingosine releases calcium from lysosomes. *Elife*. 4.
- Honea, R.A., Cruchaga, C., Perea, R.D., Saykin, A.J., Burns, J.M., Weinberger, D.R., Goate, A.M., Alzheimer's Disease Neuroimaging, I., 2013. Characterizing the role of brain derived neurotrophic factor genetic variation in Alzheimer's disease neurodegeneration. *PLoS One*. 8, e76001.
- Horga, A., Montalban, X., 2008. FTY720 (fingolimod) for relapsing multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 8, 699-714.
- Hunter, S.F., Bowen, J.D., Reder, A.T., 2016. The Direct Effects of Fingolimod in the Central Nervous System: Implications for Relapsing Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*. 30, 135-147.
- Ingwersen, J., Aktas, O., Kuery, P., Kieseier, B., Boyko, A., Hartung, H.P., 2012. Fingolimod in multiple sclerosis: mechanisms of action and clinical efficacy. *Clin Immunol*. 142, 15-24.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X., Grundke-Iqbal, I., 2010. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res*. 7, 656-664.
- Jacobs, S., Wei, W., Wang, D., Tsien, J.Z., 2015. Importance of the GluN2B carboxy-terminal domain for enhancement of social memories. *Learn Mem*. 22, 401-410.
- Jaillard, C., Harrison, S., Stankoff, B., Aigrot, M.S., Calver, A.R., Duddy, G., Walsh, F.S., Pangalos, M.N., Arimura, N., Kaibuchi, K., Zalc, B., Lubetzki, C., 2005. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci*. 25, 1459-1469.

- Jang, S.S., Royston, S.E., Xu, J., Cavaretta, J.P., Vest, M.O., Lee, K.Y., Lee, S., Jeong, H.G., Lombroso, P.J., Chung, H.J., 2015. Regulation of STEP61 and tyrosine-phosphorylation of NMDA and AMPA receptors during homeostatic synaptic plasticity. *Mol Brain*. 8, 55.
- Johnson, G.V., Stoothoff, W.H., 2004. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci*. 117, 5721-5729.
- Kajimoto, T., Okada, T., Yu, H., Goparaju, S.K., Jahangeer, S., Nakamura, S., 2007. Involvement of sphingosine-1-phosphate in glutamate secretion in hippocampal neurons. *Mol Cell Biol*. 27, 3429-3440.
- Kappos, L., Antel, J., Comi, G., Montalban, X., O'Connor, P., Polman, C.H., Haas, T., Korn, A.A., Karlsson, G., Radue, E.W., Group, F.D.S., 2006. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 355, 1124-1140.
- Kataoka, H., Sugahara, K., Shimano, K., Teshima, K., Koyama, M., Fukunari, A., Chiba, K., 2005. FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration. *Cell Mol Immunol*. 2, 439-448.
- Kim, G.S., Yang, L., Zhang, G., Zhao, H., Selim, M., McCullough, L.D., Kluk, M.J., Sanchez, T., 2015. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in the disruption of cerebrovascular integrity in experimental stroke. *Nat Commun*. 6, 7893.
- Kohr, G., Seeburg, P.H., 1996. Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J Physiol*. 492 (Pt 2), 445-452.
- Kono, M., Belyantseva, I.A., Skoura, A., Frolenkov, G.I., Starost, M.F., Dreier, J.L., Lidington, D., Bolz, S.S., Friedman, T.B., Hla, T., Proia, R.L., 2007. Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *J Biol Chem*. 282, 10690-10696.
- Kumar, A., 2015. NMDA Receptor Function During Senescence: Implication on Cognitive Performance. *Front Neurosci*. 9, 473.
- Kunkel, G.T., Maceyka, M., Milstien, S., Spiegel, S., 2013. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 12, 688-702.

- Lahiri, S., Futerman, A.H., 2007. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci.* 64, 2270-2284.
- Lai, W.-Q., Wong, W.S.F., Leung, Bernard P., 2011. Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in asthma. *Bioscience Reports.* 31, 145-150.
- Lavezzari, G., McCallum, J., Lee, R., Roche, K.W., 2003. Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology.* 45, 729-737.
- Lee, I., Kesner, R.P., 2002. Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nat Neurosci.* 5, 162-168.
- Lewis, S., 2012. Synaptic physiology: It takes two for NMDA receptors. *Nat Rev Neurosci.* 13, 666-667.
- Li, C., Chi, X.X., Xie, W., Strong, J.A., Zhang, J.M., Nicol, G.D., 2012. Sphingosine 1-phosphate receptor 2 antagonist JTE-013 increases the excitability of sensory neurons independently of the receptor. *J Neurophysiol.* 108, 1473-1483.
- Li, C., Li, J.N., Kays, J., Guerrero, M., Nicol, G.D., 2015. Sphingosine 1-phosphate enhances the excitability of rat sensory neurons through activation of sphingosine 1-phosphate receptors 1 and/or 3. *J Neuroinflammation.* 12, 70.
- Li, F., Tsien, J.Z., 2009. Memory and the NMDA receptors. *N Engl J Med.* 361, 302-303.
- Liu, Z., Lv, C., Zhao, W., Song, Y., Pei, D., Xu, T., 2012. NR2B-containing NMDA receptors expression and their relationship to apoptosis in hippocampus of Alzheimer's disease-like rats. *Neurochem Res.* 37, 1420-1427.
- Loftis, J.M., Janowsky, A., 2003. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther.* 97, 55-85.
- Luchtman, D., Gollan, R., Ellwardt, E., Birkenstock, J., Robohm, K., Siffrin, V., Zipp, F., 2016. In vivo and in vitro effects of multiple sclerosis immunomodulatory therapeutics on glutamatergic excitotoxicity. *J Neurochem.* 136, 971-980.

- Lujan, B., Liu, X., Wan, Q., 2012. Differential roles of GluN2A- and GluN2B-containing NMDA receptors in neuronal survival and death. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 4, 211-218.
- Luna-Muñoz José, Harrington Charles R., Wischik Claude M., Flores-Rodríguez Paola, Avila Jesús, Zamudio Sergio R., De la Cruz Fidel, Mena Raúl, Meraz-Ríos Marco A. and Floran-Garduño Benjamin (2013). Phosphorylation of Tau Protein Associated as a Protective Mechanism in the Presence of Toxic, C-Terminally Truncated Tau in Alzheimer's Disease, *Understanding Alzheimer's Disease*, Prof. Inga Zerr (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/54228.
- Luscher, C., Malenka, R.C., 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4.
- Lynch, M.A., 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 84, 87-136.
- Maceyka, M., Payne, S.G., Milstien, S., Spiegel, S., 2002. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1585, 193-201.
- Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S., Spiegel, S., 2012. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* 22, 50-60.
- Maceyka, M., Spiegel, S., 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature.* 510, 58-67.
- MacLennan, A.J., Carney, P.R., Zhu, W.J., Chaves, A.H., Garcia, J., Grimes, J.R., Anderson, K.J., Roper, S.N., Lee, N., 2001. An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur J Neurosci.* 14, 203-209.
- Martel, M.A., Wyllie, D.J., Hardingham, G.E., 2009. In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience.* 158, 334-343.
- Martin, H.G., Wang, Y.T., 2010. Blocking the deadly effects of the NMDA receptor in stroke. *Cell.* 140, 174-176.
- Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., 2004a. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature.* 427.

- Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., Cyster, J.G., 2004b. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 427, 355-360.
- Mattie, M., Brooker, G., Spiegel, S., 1994. Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J Biol Chem*. 269, 3181-3188.
- Medeiros, R., Baglietto-Vargas, D., LaFerla, F.M., 2011. The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS Neurosci Ther*. 17, 514-524.
- Mendelson, K., Evans, T., Hla, T., 2014. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development*. 141, 5-9.
- Merrill, A.H., Jr., Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A., Wang, E., 1997. Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol*. 142, 208-225.
- Miguez, A., Garcia-Diaz Barriga, G., Brito, V., Straccia, M., Giralt, A., Gines, S., Canals, J.M., Alberch, J., 2015. Fingolimod (FTY720) enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in Huntington's disease by preventing p75NTR up-regulation and astrocyte-mediated inflammation. *Hum Mol Genet*. 24, 4958-4970.
- Mondragon-Rodriguez, S., Perry, G., Zhu, X., Moreira, P.I., Acevedo-Aquino, M.C., Williams, S., 2013. Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: implications for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2013, 940603.
- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 319, 774-776.
- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C.D., Lin, J.Y., Tsien, R.Y., Malinow, R., 2014. Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*. 511, 348-352.
- Nagahara, A.H., Merrill, D.A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B.E., Shaked, G.M., Wang, L., Blesch, A., Kim, A., Conner, J.M., Rockenstein, E., Chao, M.V., Koo, E.H., Geschwind, D., Masliah, E., Chiba, A.A., Tuszynski, M.H., 2009. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med*. 15, 331-337.

- Nazari, M., Keshavarz, S., Rafati, A., Namavar, M.R., Haghani, M., 2016. Fingolimod (FTY720) improves hippocampal synaptic plasticity and memory deficit in rats following focal cerebral ischemia. *Brain Res Bull.* 124, 95-102.
- Newcomer, J.W., Farber, N.B., Olney, J.W., 2000. NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues Clin Neurosci.* 2, 219-232.
- Ni, Q., Yuan, B., Liu, T., Lan, F., Luo, X., Lu, X., Huang, P., Dai, L., Jin, X., Yin, H., 2015. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist SEW2871 prolongs heterotopic heart allograft survival in mice. *Int Immunopharmacol.* 26, 37-42.
- Nishimura, H., Akiyama, T., Irei, I., Hamazaki, S., Sadahira, Y., 2010. Cellular localization of sphingosine-1-phosphate receptor 1 expression in the human central nervous system. *J Histochem Cytochem.* 58, 847-856.
- Novgorodov, A.S., El-Alwani, M., Bielawski, J., Obeid, L.M., Gudz, T.I., 2007. Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. *FASEB J.* 21, 1503-1514.
- Numakawa, T., Suzuki, S., Kumamaru, E., Adachi, N., Richards, M., Kunugi, H., 2010. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol.* 25, 237-258.
- O'Bryant, S.E., Hobson, V., Hall, J.R., Waring, S.C., Chan, W., Massman, P., Lacritz, L., Cullum, C.M., Diaz-Arrastia, R., Texas Alzheimer's Research, C., 2009. Brain-derived neurotrophic factor levels in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 17, 337-341.
- Ota, Y., Zanetti, A.T., Hallock, R.M., 2013. The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plast.* 2013, 185463.
- Park, H., Popescu, A., Poo, M.M., 2014. Essential role of presynaptic NMDA receptors in activity-dependent BDNF secretion and corticostriatal LTP. *Neuron.* 84, 1009-1022.
- Patel, J., Balabanov, R., 2012. Molecular mechanisms of oligodendrocyte injury in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int J Mol Sci.* 13, 10647-10659.
- Pawlak, V., Jensen, V., Schupp, B.J., Kvello, A., Hvalby, O., Seeburg, P.H., Kohr, G., 2005. Frequency-dependent impairment of hippocampal LTP from NMDA receptors with reduced calcium permeability. *Eur J Neurosci.* 22, 476-484.

- Payne, S.G., Milstien, S., Spiegel, S., 2002. Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett.* 531, 54-57.
- Peng, S., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H., Ren, B., 2011. Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. *Mol Biol Rep.* 38, 453-460.
- Petralia, R.S., 2012. Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons. *ScientificWorldJournal.* 2012, 267120.
- Picconi, B., Tortiglione, A., Barone, I., Centonze, D., Gardoni, F., Gubellini, P., Bonsi, P., Pisani, A., Bernardi, G., Di Luca, M., Calabresi, P., 2006. NR2B subunit exerts a critical role in postischemic synaptic plasticity. *Stroke.* 37, 1895-1901.
- Pimentel, A.A., Benaim, G., 2012. [Ca²⁺ and sphingolipids as modulators for apoptosis and cancer]. *Invest Clin.* 53, 84-110.
- Prager, B., Spampinato, S.F., Ransohoff, R.M., 2015. Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood-brain barrier. *Trends Mol Med.* 21, 354-363.
- Pralhada Rao, R., Vaidyanathan, N., Rengasamy, M., Mammen Oommen, A., Somaiya, N., Jagannath, M.R., 2013. Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases. *J Lipids.* 2013, 178910.
- Pulkoski-Gross, M.J., Donaldson, J.C., Obeid, L.M., 2015. Sphingosine-1-phosphate metabolism: A structural perspective. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1-16.
- Qiu, C., Kivipelto, M., von Strauss, E., 2009. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci.* 11, 111-128.
- Ratajczak, M.Z., Suszynska, M., Borkowska, S., Ratajczak, J., Schneider, G., 2014. The role of sphingosine-1 phosphate and ceramide-1 phosphate in trafficking of normal stem cells and cancer cells. *Expert Opin Ther Targets.* 18, 95-107.
- Regan, P., Piers, T., Yi, J.H., Kim, D.H., Huh, S., Park, S.J., Ryu, J.H., Whitcomb, D.J., Cho, K., 2015. Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD. *J Neurosci.* 35, 4804-4812.
- Rezvani, A.H., 2006. Involvement of the NMDA System in Learning and Memory. In *Animal Models of Cognitive Impairment. Frontiers in Neuroscience, Vol., E.D. Levin, J.J. Buccafusco, eds., Boca Raton (FL).*

- Rivera, J., Proia, R.L., Olivera, A., 2008. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol.* 8, 753-763.
- Roche, K.W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M.D., Wenthold, R.J., 2001. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci.* 4, 794-802.
- Romero-Guevara, R., Cencetti, F., Donati, C., Bruni, P., 2015. Sphingosine 1-phosphate signaling pathway in inner ear biology. New therapeutic strategies for hearing loss? *Front Aging Neurosci.* 7, 60.
- Rosen, H., Goetzl, E.J., 2005. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol.* 5, 560-570.
- Rosen, H., Stevens, R.C., Hanson, M., Roberts, E., Oldstone, M.B., 2013. Sphingosine-1-phosphate and its receptors: structure, signaling, and influence. *Annu Rev Biochem.* 82, 637-662.
- Rudnicka, J., Czerwiec, M., Grywalska, E., Siwicka-Gieroba, D., Walankiewicz, M., Grafka, A., Zgurski, M., Surdacka, A., Bartosik-Psujek, H., Rolinski, J., 2015. Influence of fingolimod on basic lymphocyte subsets frequencies in the peripheral blood of multiple sclerosis patients - preliminary study. *Cent Eur J Immunol.* 40, 354-359.
- Saba, A.K.a.J.D., 2012. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Vol., S. Choi, eds. Springer, Verlag New York, pp. XLVIII, 2030.
- Schulze, T., Golfier, S., Tabeling, C., Rabel, K., Graler, M.H., Witzenrath, M., Lipp, M., 2011. Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P(4)) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model. *FASEB J.* 25, 4024-4036.
- Scott, D.B., Blanpied, T.A., Swanson, G.T., Zhang, C., Ehlers, M.D., 2001. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci.* 21, 3063-3072.
- Seol, G.H., Kim, M.Y., Liang, G.H., Kim, J.A., Kim, Y.J., Oh, S., Suh, S.H., 2005. Sphingosine-1-phosphate-induced intracellular Ca²⁺ mobilization in human endothelial cells. *Endothelium.* 12, 263-269.
- Shipton, O.A., Paulsen, O., 2014. GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. London .Biol. Sci.* 369, 20130163.

- Simon, M.V., Prado Spalm, F.H., Politi, L.E., Rotstein, N.P., 2015. Sphingosine-1-Phosphate Is a Crucial Signal for Migration of Retina Muller Glial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 56, 5808-5815.
- Spampinato, S.F., Obermeier, B., Cotleur, A., Love, A., Takeshita, Y., Sano, Y., Kanda, T., Ransohoff, R.M., 2015. Sphingosine 1 Phosphate at the Blood Brain Barrier: Can the Modulation of S1P Receptor 1 Influence the Response of Endothelial Cells and Astrocytes to Inflammatory Stimuli? *PLoS One.* 10, e0133392.
- Spiegel, S., Milstien, S., 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 397-407.
- Spiegel, S., Milstien, S., 2011. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol.* 11, 403-415.
- Spires-Jones, T.L., Kopeikina, K.J., Koffie, R.M., de Calignon, A., Hyman, B.T., 2011. Are tangles as toxic as they look? *J Mol Neurosci.* 45, 438-444.
- Stoothoff, W.H., Johnson, G.V., 2005. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta.* 1739, 280-297.
- Strong, K.L., Jing, Y., Prosser, A.R., Traynelis, S.F., Liotta, D.C., 2014. NMDA receptor modulators: an updated patent review (2013-2014). *Expert Opin Ther Pat.* 24, 1349-1366.
- Strub, G.M., Maceyka, M., Hait, N.C., Milstien, S., Spiegel, S., 2010. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol.* 688, 141-155.
- Takasugi, N., Sasaki, T., Ebinuma, I., Osawa, S., Isshiki, H., Takeo, K., Tomita, T., Iwatsubo, T., 2013. FTY720/fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid-beta production in neurons. *PLoS One.* 8, e64050.
- Tamakuwala, M., Stagni, G., 2015. Fingolimod Hydrochloride Gel for Dermatological Applications: Optimization of Formulation Strength and Effect of Colloidal Oatmeal (Aveeno®) as Penetration Enhancer. *AAPS PharmSciTech.* 1-8.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z., 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature.* 401, 63-69.

- Thomas, C.G., Miller, A.J., Westbrook, G.L., 2006. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 95, 1727-1734.
- Tingley, W.G., Ehlers, M.D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J.B., Riley, C.T., Huganir, R.L., 1997. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem.* 272, 5157-5166.
- Tirodkar, T.S., Voelkel-Johnson, C., 2012. Sphingolipids in apoptosis. *Exp Oncol.* 34, 231-242.
- Tom, S.E., Hubbard, R.A., Crane, P.K., Haneuse, S.J., Bowen, J., McCormick, W.C., McCurry, S., Larson, E.B., 2015. Characterization of dementia and Alzheimer's disease in an older population: updated incidence and life expectancy with and without dementia. *Am J Public Health.* 105, 408-413.
- Totaro, R., Di Carmine, C., Costantino, G., Fantozzi, R., Bellantonio, P., Fuiani, A., Mundi, C., Ruggieri, S., Marini, C., Carolei, A., 2015. Fingolimod Treatment in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients: A Prospective Observational Multicenter Postmarketing Study. *Mult Scler Int.* 2015, 763418.
- Tramacere, I., Del Giovane, C., Salanti, G., D'Amico, R., Filippini, G., 2015. Immunomodulators and immunosuppressants for relapsing-remitting multiple sclerosis: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev.* 9, CD011381.
- Trankner, D., Hahne, N., Sugino, K., Hoon, M.A., Zuker, C., 2014. Population of sensory neurons essential for asthmatic hyperreactivity of inflamed airways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, 11515-11520.
- Trepanier, C.H., Jackson, M.F., MacDonald, J.F., 2012. Regulation of NMDA receptors by the tyrosine kinase Fyn. *FEBS J.* 279, 12-19.
- Ubersax, J.A., Ferrell, J.E., Jr., 2007. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 530-541.
- van Echten-Deckert, G., Hagen-Euteneuer, N., Karaca, I., Walter, J., 2014. Sphingosine-1-phosphate: boon and bane for the brain. *Cell Physiol Biochem.* 34, 148-157.
- VanDongen, A.M., 2009. Biology of the NMDA receptor. *Frontiers in neuroscience*, Vol., CRC Press, Boca Raton.

- Vincent, A.J., Gasperini, R., Foa, L., Small, D.H., 2010. Astrocytes in Alzheimer's disease: emerging roles in calcium dysregulation and synaptic plasticity. *J Alzheimers Dis.* 22, 699-714.
- Volianskis, A., France, G., Jensen, M.S., Bortolotto, Z.A., Jane, D.E., Collingridge, G.L., 2015. Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* 1621, 5-16.
- Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 1, 848-858.
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M., Vyklicky, L., 2014. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res.* 63 Suppl 1, S191-203.
- Wang, D., Cui, Z., Zeng, Q., Kuang, H., Wang, L.P., Tsien, J.Z., Cao, X., 2009. Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats. *PLoS One.* 4, e7486.
- Wang, J.Z., Xia, Y.Y., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2013. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *J Alzheimers Dis.* 33 Suppl 1, S123-139.
- Wang, S.Y., Zhang, J.L., Zhang, D., Bao, X.Q., Sun, H., 2015. [Recent advances in study of sphingolipids on liver diseases]. *Yao Xue Xue Bao.* 50, 1551-1558.
- Wang, Y.T., Salter, M.W., 1994. Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature.* 369, 233-235.
- Wenker, I., 2010. An active role for astrocytes in synaptic plasticity? *J Neurophysiol.* 104, 1216-1218.
- White, C., Alshaker, H., Cooper, C., Winkler, M., Pchejetski, D., 2016. The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. *Oncotarget.*
- Willems, L.M., Zahn, N., Ferreiros, N., Scholich, K., Maggio, N., Deller, T., Vlachos, A., 2016. Sphingosine-1-phosphate receptor inhibition prevents denervation-induced dendritic atrophy. *Acta Neuropathol Commun.* 4, 28.
- Wood, H., 2015. Neurodegenerative disease: Could fingolimod provide cognitive benefits in patients with Huntington disease? *Nat Rev Neurol.* 11, 426.

- Yamagata, K., Tagami, M., Torii, Y., Takenaga, F., Tsumagari, S., Itoh, S., Yamori, Y., Nara, Y., 2003. Sphingosine 1-phosphate induces the production of glial cell line-derived neurotrophic factor and cellular proliferation in astrocytes. *Glia*. 41, 199-206.
- Zhang, J., Zhang, Z.G., Li, Y., Ding, X., Shang, X., Lu, M., Elias, S.B., Chopp, M., 2015. Fingolimod treatment promotes proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol Dis*. 76, 57-66.
- Zhang, Y., Li, P., Feng, J., Wu, M., 2016. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurol Sci*.
- Zhang, Y.H., Fehrenbacher, J.C., Vasko, M.R., Nicol, G.D., 2006. Sphingosine-1-phosphate via activation of a G-protein-coupled receptor(s) enhances the excitability of rat sensory neurons. *J Neurophysiol*. 96.
- Zheng, F., Gingrich, M.B., Traynelis, S.F., Conn, P.J., 1998. Tyrosine kinase potentiates NMDA receptor currents by reducing tonic zinc inhibition. *Nat Neurosci*. 1, 185-191.
- Zhou, X., Ding, Q., Chen, Z., Yun, H., Wang, H., 2013. Involvement of the GluN2A and GluN2B subunits in synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function and neuronal excitotoxicity. *J Biol Chem*. 288, 24151-24159.
- Zhou, X., Chen, Z., Yun, W., Wang, H., 2015. NMDA receptor activity determines neuronal fate: location or number? *Rev Neurosci*. 26, 39-47.
- Zhu, S., Stein, R.A., Yoshioka, C., Lee, C.H., Goehring, A., McHaourab, H.S., Gouaux, E., 2016. Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation. *Cell*. 165, 704-714.
- Zhuo, M., 2009. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Mol Brain*. 2, 4.