

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
ÉLISE PÉPIN

CIBLER LES RÉCEPTEURS À LA SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE POUR
CONTRER LA MALADIE DE PARKINSON

AVRIL 2019

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers mes deux dévoués directeurs de recherche, le Dr Michel Cyr et le Dr Guy Massicotte. Notre rencontre au baccalauréat a été déterminante pour mon avenir professionnel. Merci de m'avoir permis d'évoluer dans un cadre d'étude rigoureux où j'ai pu m'épanouir autant intellectuellement, professionnellement que personnellement. La solide formation que vous m'avez dispensée est pour moi significative et grâce à la confiance que vous m'avez accordée, j'ai pu développer mon autonomie professionnelle. Je vous remercie sincèrement pour votre franchise, votre patience, votre grande disponibilité et pour m'avoir toujours encouragée à poursuivre mes ambitions.

Je ne peux passer sous silence mes collègues de travail, particulièrement Guillaume L. Lemieux, mon cher ami, avec qui j'ai eu un plaisir fou à travailler au quotidien. J'emporte de merveilleux souvenirs inoubliables. Merci à mes autres collègues étudiants, spécialement à Yan Bergeron, Maxence Brouillette, Suzanne Attiori Essis et Bruno Ouimet, qui au-delà de nos collaborations, ont su égayer mes journées au laboratoire. Mon parcours n'aurait pas été le même sans votre écoute et votre présence. Un énorme merci à Tim Jalinier, pour son soutien expérimental exceptionnel lors de cette phase critique que fut la rédaction de mon article scientifique.

J'adresse aussi mes remerciements aux personnes qui m'ont permis de me familiariser avec les procédures expérimentales utilisées dans le cadre de mon projet, Laure Chagniel et Geneviève Bureau, auxiliaires de recherche au laboratoire. La qualité et la rigueur de votre travail sont pour moi un exemple à suivre. Votre aide sur mon projet fut précieuse, nos discussions furent enrichissantes, et votre écoute et votre appui furent inestimables. Je vous remercie pour votre soutien professionnel et personnel.

Je tiens finalement à mentionner l'aide financière de mes deux directeurs, le Dr Guy Massicotte et le Dr Michel Cyr, du Fonds de recherche du Québec – Santé qui m'a attribué

la bourse de formation à la maîtrise ainsi que mon institution, pour les nombreuses bourses d'aide à la diffusion qui m'ont été octroyées. Au-delà de l'aide financière, ces reconnaissances font toute la différence dans mon cheminement.

RÉSUMÉ

On sait depuis plusieurs décennies que la maladie de Parkinson se caractérise par la disparition progressive des neurones de la substance noire dans le cerveau. En résulte ainsi une baisse d'innervation dopaminergique vers le striatum et, du coup, l'apparition de troubles moteurs caractéristiques de cette affection. Une panoplie d'études *post-mortem* chez l'humain suggèrent qu'un des facteurs importants contribuant à la pathogenèse de la maladie est l'activation des astrocytes et des cellules de la microglie de même que la formation subséquente de cytokines pro-inflammatoires, comme le facteur de nécrose tumorale (TNF- α). La réduction de la synthèse du facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF) est une autre anomalie distinctive associée à la progression de la maladie. On l'imagine bien, les principaux médicaments utilisés pour freiner le développement des symptômes moteurs chez les patients parkinsoniens visent essentiellement à limiter la déficience en dopamine dans le cerveau. Malheureusement, ces substances ne sont pas en mesure de réduire la neurodégénérescence dopaminergique et leurs effets ne sont conséquemment que temporaires. Dans cette optique, mes travaux à la maîtrise se sont efforcés à identifier les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate (S1P) comme nouvelle cible thérapeutique du Parkinson. Or, les résultats obtenus dans le cadre du présent mémoire indiquent que l'activation continue des récepteurs de la S1P par l'agoniste global FTY720 prévient la mort des neurones dopaminergiques et les déficits moteurs chez les souris traitées au MPTP - une toxine reproduisant plusieurs anomalies biochimiques et comportementales de la maladie de Parkinson. Plus important encore, nos études indiquent que les effets protecteurs de ce composé proviendraient essentiellement de leur capacité à réduire l'inflammation, et ce, par l'inactivation des cellules gliales responsables de la production de molécules pro-inflammatoires dans des régions du cerveau contribuant au contrôle de la fonction motrice. Par ailleurs, nos données expérimentales suggèrent fortement que l'activation des récepteurs à la S1P serait en mesure de contrer la carence en BDNF dans le modèle MPTP. Sur le plan pharmacologique, nous avons finalement découvert que la protection constatée dans ce modèle peut être reproduite par le composé SEW2871, un agoniste spécifique des récepteurs 1 de la S1P (S1PR1). Une observation originale qui nous laisse croire que ces récepteurs constituent une cible de choix pour limiter la dégénérescence neuronale dopaminergique chez les sujets parkinsoniens. Rappelons-le, la maladie de Parkinson constitue la seconde affection neurodégénérative progressive après la maladie d'Alzheimer. Notre recherche permet d'ailleurs d'espérer un développement thérapeutique novateur pour les malades et leurs familles.

• •

[illegible]

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS
RÉSUMÉ
LISTE DES FIGURES
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES
 CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Organisation corticale du mouvement volontaire	1
1.2 Les ganglions de la base – importance physiologique et pathologique	2
1.3 La dopamine et ses récepteurs	6
1.4 La maladie de Parkinson	10
1.5 La sphingosine-1-phosphate et ses analogues	17
 CHAPITRE II	
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	26
 CHAPITRE III	
SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE RECEPTORS MODULATORS DECREASE NEUROINFLAMMATION AND PREVENT PARKINSON'S DISEASE SYMPTOMS IN THE MPTP MOUSE MODEL	30
3.1 Contribution des auteurs	30
3.2 Article scientifique	31
Introduction	33
Materials and Methods	34
Results	38
S1PRs modulators reduced MPTP-induced inflammation	38
S1PRs modulators reduced astrogliosis and microgliosis in the SNc	39
S1PRs modulators protects against MPTP-induced nigrostriatal loss	39
Motor abilities were preserved with S1PRs modulators administration ..	40
Discussion	41
References	46

Figure legends	53
Figures	55
 CHAPITRE IV	
DISCUSSION GÉNÉRALE	62
4.1 Analogues de la S1P et la neuroinflammation	62
4.2 Modulation du facteur neurotrophique BDNF	63
4.3 Analogues de la S1P et la microglie	65
4.4 La neuroprotection	66
4.5 Le potentiel des analogues de la S1P sur le plan locomoteur	71
4.6 Conclusion et perspectives thérapeutiques	73
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	75

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Commande cérébrale du mouvement moteur volontaire	2
1.2 Régions anatomiques du striatum	4
1.3 Schéma simplifié de l'organisation des ganglions de la base	6
1.4 Schéma de la synthèse de la dopamine	8
1.5 Représentation de l'effet de la perte de dopamine sur la boucle cortico-ganglions de la base-thalamo-corticale	10
1.6 Mécanisme d'action du MPTP	14
1.7 Schéma représentatif de l'activation des cellules gliales dans la MP ou à la suite de l'administration du MPTP	16
1.8 Expression des différents sous-types des récepteurs à la sphingosine-1-phosphate au niveau cérébral	22

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AC	Adénylate cyclase
AMPc	Adénosime 3', 5'-monophosphate cyclique
Akt	Protéine kinase B
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CREB	cAMP-responsive element-binding protein
DARP-32	Dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein-32kDA
DAT	Transporteur à la dopamine
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases ½
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
GPe	Globus pallidus externe
GPi	Globus pallidus interne
HDACs	Histone désacétylase
Iba-1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IF	Immunofluorescence
L-DOPA	L-dihydroxyphénylalanine
LTP	Potentialisation à long terme
MAO	Monoamine oxydase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MP	Maladie de Parkinson
MPP+	1-méthyl -4-pyridinium
MPTP	1-méthyl-1-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

NeuN	Neuronal nuclei
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PLC	Phospholipase C
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
SEP	Sclérose en plaques
SNc	Substance noire pars compacta
SNC	Système nerveux central
SNr	Substance noire pars reticula
SPHKs	Sphingosine kinase
STN	Noyau sous-thalamique
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S1PRs	Récepteur à la sphingosine-1-phosphate
S1P1R	Sous-type 1 du récepteur à la sphingosine-1-phosphate
S1P2R	Sous-type 2 du récepteur à la sphingosine-1-phosphate
S1P3R	Sous-type 3 du récepteur à la sphingosine-1-phosphate
S1P5R	Sous-type 5 du récepteur à la sphingosine-1-phosphate
TH	Tyrosine hydroxylase
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale
VMAT2	Transporteurs vésiculaires de monoamine de type 2
VTa	Aire tegmentale ventrale
WB	Western blot
6-OHDA	6-hydroxydopamine

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Le présent mémoire s'est intéressé aux effets potentiellement bénéfiques d'analogues chimiques de la SIP, et ce, dans le contexte de la pathologie cellulaire caractéristique de la maladie de Parkinson (MP). On trouvera dans la première section de l'introduction des informations relatives à l'exécution des mouvements volontaires de même que l'implication des ganglions de la base dans le contrôle fin de la motricité. On y trouvera également une description des anomalies neuropathologiques et comportementales caractéristiques de la MP. La seconde portion, quant à elle, s'évertuera à présenter les effets cellulaires assurés par la SIP et ses analogues (le FTY720 et le SEW2871 notamment), deux substances pharmacologiques reconnues pour leurs effets protecteurs dans le cerveau.

1.1 Organisation corticale du mouvement volontaire

Si les mouvements réflexes sont régis par la moelle épinière, les mouvements volontaires en revanche sont organisés de manière hiérarchique et dépendent d'un ensemble de structures du système nerveux central (SNC). Or, avant d'exécuter une série de gestes agencés en une séquence motrice cohérente, il faut premièrement, en réaction à une situation donnée, sélectionner une réponse adaptée. Deuxièmement, ordonner la série de contractions musculaires nécessaires pour la réaliser avant enfin, troisièmement, d'exécuter le mouvement ainsi anticipé. Ces trois opérations nécessaires au déclenchement d'un mouvement volontaire sont prises en charge par trois zones distinctes du cortex cérébral. Plus précisément, lorsque nous exécutons un mouvement volontaire, le cortex préfrontal définit l'action à réaliser et planifie le mouvement. Les instructions sont ensuite transmises au cortex prémoteur qui organise et produit les séquences motrices. Puis, ces séquences sont transmises au cortex moteur qui donnera l'ordre

d'exécuter le mouvement en véhiculant l'information à la moelle épinière (Figure 1.1, p.11) (Kolb and Wishaw 2002).

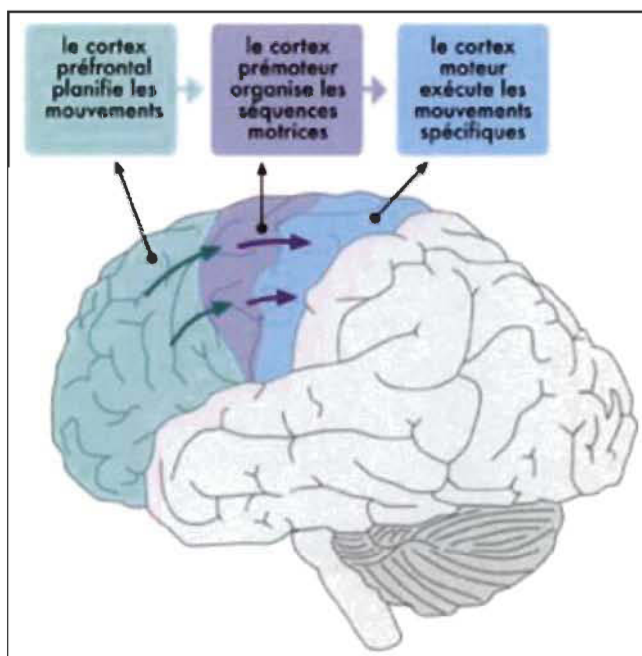


Figure 1.1 Commande cérébrale du mouvement moteur volontaire.

Tirée de l'adresse suivante : <http://www.frcneurodon.org/>.

Bien sûr, afin de réaliser avec aisance une tâche motrice, les séquences motrices doivent être apprises et mémorisées. Pour cela, les séquences sont effectuées de manière répétée et plusieurs séances d'entraînement sont nécessaires. L'apprentissage et la mémorisation de ces séquences s'effectuent donc graduellement à travers la pratique. Une fois apprise et mémorisée, la tâche motrice pourra être rapidement effectuée malgré une période prolongée sans pratique (Karni *et al.* 1998; Ungerleider *et al.* 2002; Doyon *et al.* 2009).

1.2 Les ganglions de la base – importance physiologique et pathologique

La production d'un mouvement volontaire harmonieux ne dépend pas uniquement de l'activité corticale. De fait, de nombreuses études ont mis en évidence l'existence de

boucles de rétroaction dans le contrôle des mouvements volontaires susceptibles de réguler finement les fonctions corticales. Une de ces boucles fait intervenir des structures sous-corticales localisées dans un réseau dénommé ganglions de la base. Ce réseau hautement spécialisé module de nombreux aspects de la motricité volontaire tels que la fluidité, la rapidité, la coordination et la précision avec laquelle le mouvement sera généré. De fait, les ganglions de la base sont essentiels à la réalisation harmonieuse du mouvement et leurs dysfonctionnements contribuent, on l'imagine bien, à l'apparition de troubles moteurs importants (Kolb and Wishaw 2002). On sait, par exemple, que le développement des troubles moteurs chez les patients parkinsoniens implique des anomalies caractéristiques au niveau du striatum (et autres structures connexes) se trouvant dans les ganglions de la base. On y reviendra.

1.2.1 Division structurelle, composition cellulaire et rôle du striatum

Les ganglions de la base sont formés du striatum, de la substance noire pars reticulata (SNr), de la substance noire pars compacta (SNc), du globus pallidus interne (GPi), du globus pallidus externe (Gpe) et du noyau sous-thalamique (STN). Le striatum, structure clé dans la modulation du mouvement, est un carrefour où transite l'information entre les structures cérébrales des ganglions de la base.

Chez le singe et l'humain, le striatum est divisé en deux principales régions : dorsale et ventrale. Le striatum dorsal est composé du putamen et du noyau caudé, alors que le striatum ventral comprend quant à lui le noyau accumbens (Figure 1.2, p.13) (Joel and Weiner 2000; Voorn *et al.* 2004). Chez la souris, le putamen et le noyau caudé sont combinés et on ne reconnaît que le striatum.

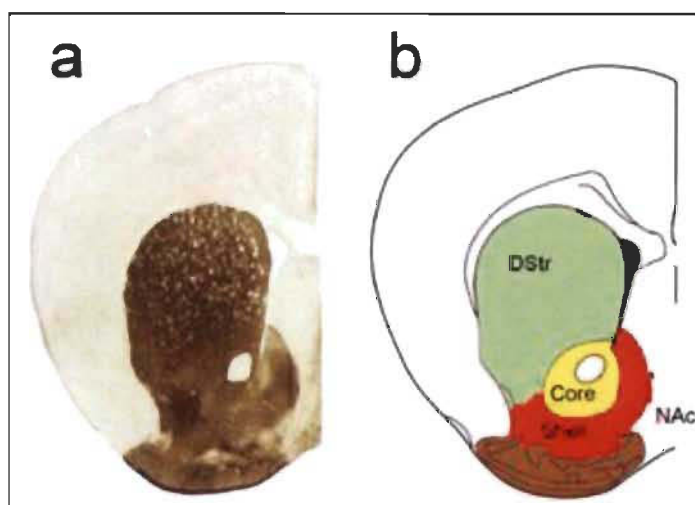


Figure 1.2 Régions anatomiques du striatum chez l'humain.

(A) Coupe coronale d'un cerveau de souris (Bregma : 1.18 mm) marqué avec l'AchE par la technique d'immunohistochimie (Paxinos, 2001). (B) Au même niveau, diagramme montrant les divisions anatomiques du striatum : striatum dorsal (DStr), striatum ventral composé du noyau accumbens (NAc). Le NAc est divisé en *core* et en *shell* (Adaptée de Paxinos, 2001).

Au niveau cellulaire, le striatum est constitué d'un réseau de plusieurs types de neurones interconnectés. Il est composé principalement de neurones épineux GABAergique de taille moyenne, constituant 90 % de la population neuronale du striatum. Ces neurones de projections utilisent l'acide γ -aminobutyrique (GABA), le principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau (Parent and Hazrati 1995; Kreitzer 2009; Valjent *et al.* 2009; Surmeier *et al.* 2011). Ces neurones GABAergiques sont subdivisés en deux populations en fonction de leurs sites de projection et des molécules qu'ils expriment. D'une part, une population exprime la substance P, la dynorphine et le récepteur dopaminergique D₁. D'autre part, une autre population de neurones exprime l'enképhaline de même que les récepteurs dopaminergiques D₂ (Gerfen *et al.* 1990; Le Moine and Bloch 1995; Surmeier *et al.* 1996; Gong *et al.* 2003; Bertran-Gonzalez *et al.* 2008; Matamalas *et al.* 2009). Il est à mentionner qu'un faible pourcentage de neurones épineux coexprime les récepteurs dopaminergiques D₁ et D₂ (Bertran-Gonzalez *et al.* 2008). De plus, le striatum est aussi composé de quatre classes d'interneurones, représentant 5 à 10 % de

l'ensemble des neurones : les interneurones cholinergiques, les interneurones GABAergiques exprimant la calrétinine, les interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine et les interneurones GABAergiques exprimant le neuropeptide Y, la somatostatine et l'oxyde nitrique synthase (Parent and Hazrati 1995; Kreitzer 2009; Valjent *et al.* 2009; Surmeier *et al.* 2011).

Le striatum constitue la porte d'entrée des circuits moteurs des ganglions de la base, en recevant des afférences glutamatergiques excitatrices des cortex moteur, prémoteur et somatosensoriel. Au niveau du striatum, l'information est transmise au GPi et à la SNr, qui représentent les portes de sortie des ganglions de la base, selon deux voies : la voie directe et la voie indirecte (Obeso *et al.* 2008; Redgrave *et al.* 2010). La voie directe est formée de neurones épineux qui exercent une influence GABAergique inhibitrice sur le GPi et la SNr. L'activation de cette voie permet ainsi la levée de l'inhibition exercée par le GPi et la SNr sur le thalamus. L'information sera alors transmise du thalamus au cortex. La voie indirecte comprend des neurones épineux véhiculant l'information au GPi et à la SNr par un relais impliquant le GPe et le STN. Leurs projections inhibitrices sur le GPe permettent la levée d'inhibition du STN et par le fait même, l'excitation du GPi et de la SNr. D'un point de vue fonctionnel, l'activation de la voie directe facilite le mouvement alors que l'activation de la voie indirecte freine le mouvement. Les voies directes et indirectes fonctionnent donc de manière complémentaire en créant une balance entre l'activation (voie directe) et l'inhibition (voie indirecte) du thalamus. L'activation de ces deux voix est modulée par les neurones dopaminergiques en provenance de la SNc. Ces neurones libèrent comme neurotransmetteur la dopamine au niveau du striatum (Figure 1.3, p.15).

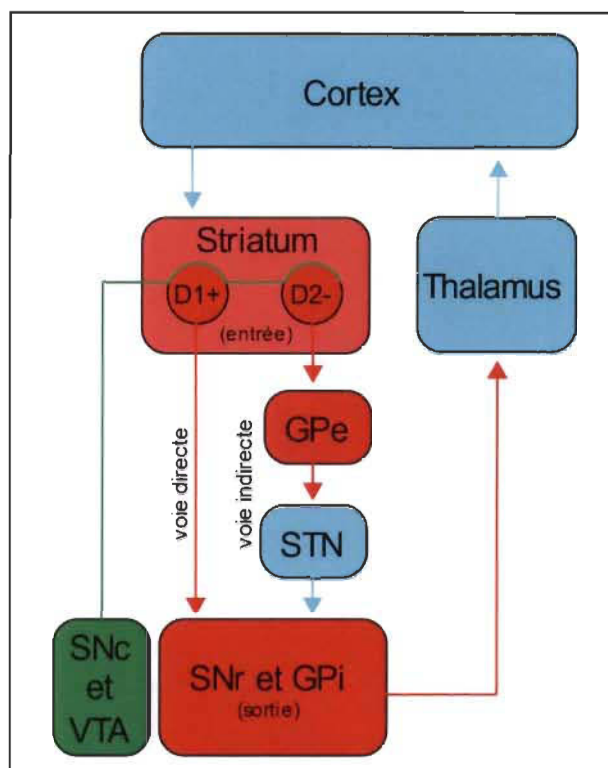


Figure 1.3 Schéma simplifié de l'organisation des ganglions de la base.

Les afférences glutamatergiques excitatrices sont en bleues, GABAergiques inhibitrices en rouges et dopaminergiques en verts. L'activation de la voie directe facilite le mouvement alors que l'activation de la voie indirecte freine le mouvement. Les neurones dopaminergiques contenus dans la SNc/VTA modulent ces afférences au striatum. GPi (globus pallidus interne), VTA (aire tegmentale ventrale), SNc (substance noire pars compacta), GPe (globus pallidus externe), SNr (substance noire reticulata), D1+ (récepteur dopaminergique D1 à signalisation activatrice), D2- (récepteur dopaminergique D2 à signalisation inhibitrice) et STN (noyau sous-thalamique) (Adaptée de Paxinos, 2001).

1.3 La dopamine et ses récepteurs

La dopamine est un neurotransmetteur de faible poids moléculaire appartenant à la famille des catécholamines avec la noradrénaline et l'adrénaline. On la regroupe

également parmi les monoamines avec la sérotonine et la noradrénaline. Elle est synthétisée par les neurones dopaminergiques localisés principalement au niveau du mésencéphale, plus particulièrement au niveau de la SNc et de l'aire tegmentale ventrale (VTA). Les neurones dopaminergiques de la SNc se projettent au niveau du striatum dorsal et forment la voie nigrostriée, impliquée dans la motricité. Par conséquent, une destruction de ces neurones dopaminergiques, comme c'est le cas dans la MP, induira des troubles du mouvement. Les neurones dopaminergiques du VTA forment, quant à eux, deux voies : la voie mésolimbique et mésocorticale. La voie mésolimbique est formée des neurones dopaminergiques du VTA qui se projettent sur des structures du système limbique comme le striatum ventral, l'amygdale et le cortex cingulaire. Cette voie joue un rôle important pour la motivation et les comportements associés à la récompense telle que la dépendance aux drogues (Corbit *et al.* 2007). La voie mésocorticale est formée des neurones dopaminergiques du VTA se projetant au niveau du cortex préfrontal. Cette voie joue un rôle dans les processus cognitifs tels que la mémoire de travail (Blumenfeld 2010).

La dopamine est synthétisée à partir de la tyrosine, un acide aminé essentiel. La tyrosine est transformée en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par la tyrosine hydroxylase (TH), qui représente l'enzyme limitante de la synthèse de dopamine. La L-DOPA est ensuite décarboxylée en dopamine par la DOPA-décarboxylase. La dopamine sera alors emmagasinée dans des vésicules de stockage par les transporteurs vésiculaires des monoamines de type 2 (VMAT2). Cet emmagasinage prévient la dégradation de la dopamine par les monoamines oxydases (MAO) intraneurales et permet aussi de contrôler sa concentration. Théoriquement, la dopamine est libérée en continu dans la fente synaptique par la décharge tonique des neurones dopaminergiques. Elle peut aussi être relâchée de manière transitoire, dite phasique, à la suite de la décharge en bouffée des neurones dopaminergiques (Grace 1995; Goto *et al.* 2007). Ce type de libération joue un rôle important dans les comportements associés à la récompense (Grace 1995; Schultz 2010). Une fois dans la fente synaptique, la dopamine activera les récepteurs dopaminergiques présents sur les neurones postsynaptiques du striatum pour moduler la transmission synaptique. Après avoir exercé son action, la dopamine sera soit recapturée par les neurones dopaminergiques par l'action du transporteur à la dopamine (DAT), soit

dégradée en acide homovanillique et en acide dihydroxyphénylacétique par l'action de la catéchol-O-méthyltransférase et des MAO (Figure 1.4, p.17) (Landry and Gies 2009). Au niveau biochimique, TH et DAT sont deux excellents marqueurs moléculaires de l'intégrité des terminaisons dopaminergiques et de la relâche du neurotransmetteur, utilisés entre autres, dans les modèles animaux de la MP.

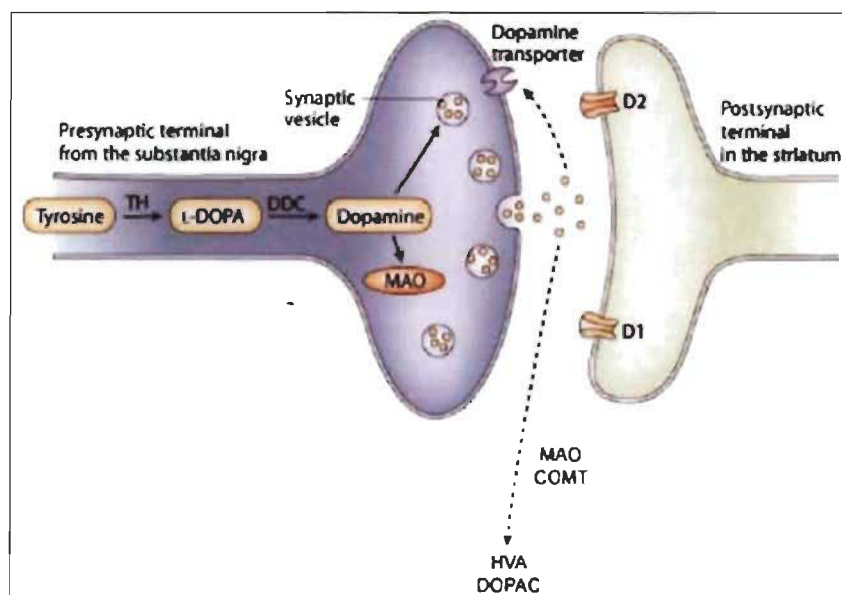


Figure 1.4 Schéma de la synthèse de la dopamine.

COMT (Catéchol-O-méthyltransférase), DDC (DOPA-décarboxylase), DOPAC (acide dihydroxyphénylacétique), HVA (acide homovanillique), L-DOPA (L-dihydroxyphénylalanine), MAO (monoamine oxydase), TH (tyrosine hydroxylase), D1 (récepteur dopaminergique D1) et D2 (récepteur dopaminergique D2) (Adaptée de Youdim and Riederer 2007).

Les effets physiologiques de la dopamine sont issus de l'activation des récepteurs dopaminergiques et des voies de signalisation qui en découlent. Il existe cinq sous types de récepteurs à la dopamine, nommés de D1 à D5, issues de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils sont classés en deux familles en fonction de leurs propriétés structurales, biochimiques et pharmacologiques. La famille des récepteurs D₁ inclut les récepteurs D₁ et D₅ et la famille des récepteurs D₂ regroupe les récepteurs D₂, D₃ et D₄. La localisation et la densité des récepteurs dopaminergiques, dans le cerveau,

varient selon le sous-type (Beaulieu and Gainetdinov 2011). Ils sont aussi retrouvés au niveau présynaptique sur les terminaisons nerveuses dopaminergiques, où ils régulent la libération de la dopamine, jouant ainsi un rôle d'autorégulateur.

Au striatum, la relâche de dopamine facilite l'excitation des neurones épineux de la voie directe et atténue l'excitation des neurones épineux de la voie indirecte. Il en résulte un déséquilibre en faveur de l'activation du thalamus, ce qui facilitera le mouvement (Figure 1.3, p.15). À l'opposé, la réduction de la dopamine causée par la perte des neurones dopaminergiques, comme c'est le cas chez les patients parkinsoniens, entraîne un déséquilibre en faveur de l'inhibition du thalamus, d'où la perte de mouvement observée chez ces patients (Figure 1.5, p.19) (Obeso *et al.* 2008; Redgrave *et al.* 2010). C'est au fin contrôle antagoniste, mais complémentaire qu'exerce la dopamine sur ces deux voies de projection que l'on doit la finesse de l'exécution des mouvements. Dès lors, il s'avère évident qu'un dérèglement de la transmission dopaminergique entraînera des troubles de la motricité.

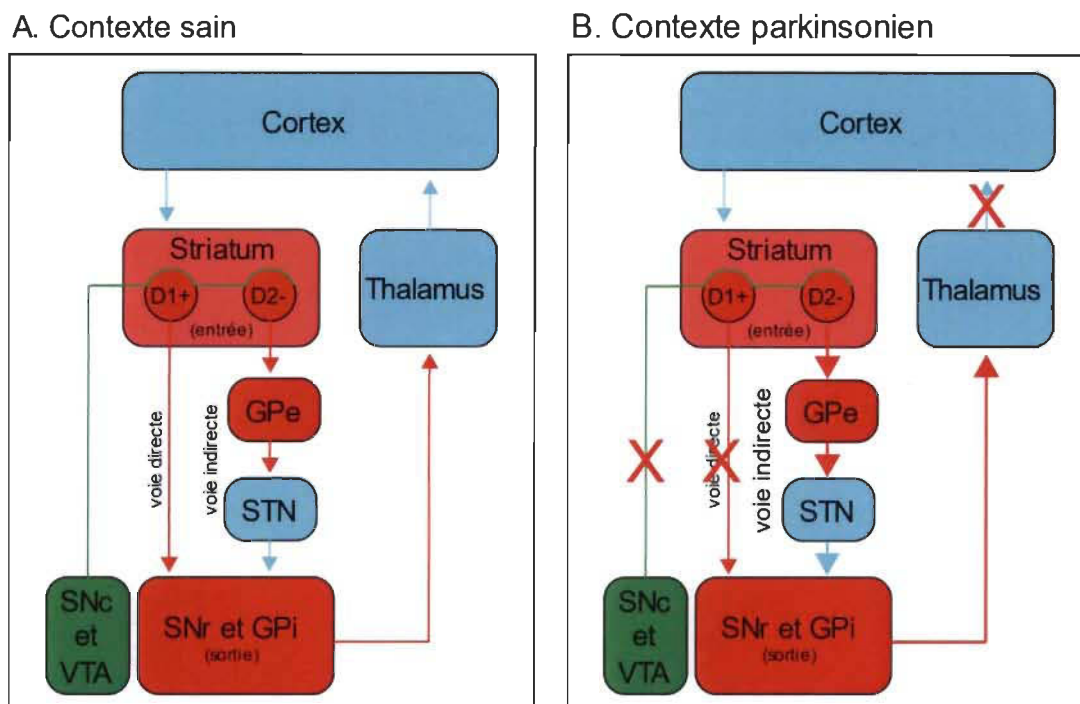


Figure 1.5 Représentation de l'effet de la perte de dopamine sur la boucle cortico-ganglions de la base-thalamo-corticale.

(A) Organisation des ganglions de la base dans un état sain et (B) dans un état parkinsonien. Chez les patients parkinsoniens, la perte en dopamine diminue l'activation de la voie directe et augmente l'activation de la voie indirecte, induisant l'inhibition du thalamus et l'apparition de symptômes moteurs. Globus pallidus externe (GPe), globus pallidus interne (GPi), substance noire pars compacta (SNc), substance noire pars reticulata (SNr) et noyau sous-thalamique (STN) (Tirée de Cenci 2007).

1.4 La maladie de Parkinson

1.4.1 Épidémiologie

Cette maladie neurodégénérative progressive est la deuxième en importance après la maladie d'Alzheimer. Sa prévalence est de 0,3 % dans la population générale et elle augmente jusqu'à 1-2 % chez les personnes âgées de plus de 60 ans (Pringsheim *et al.*

2014; Abdullah *et al.* 2015). Son incidence est de 8 à 18 pour 100 000 personnes par an et elle augmente aussi après 60 ans (de Lau and Breteler 2006). La maladie se développe généralement entre la fin de la cinquantaine et le milieu de la soixantaine et les hommes sont plus touchés que les femmes (de Lau and Breteler 2006). Dans la plupart des cas, la MP est sporadique (90 %) et dite idiopathique, c'est-à-dire de causes inconnues, laissant suggérer une étiologie multifactorielle (Ferreira and Massano 2017). Toutefois, les facteurs environnementaux et génétiques prédisposent à la maladie dans un faible pourcentage (environ 10 %) (Surmeier *et al.* 2011) et on y regroupe l'exposition aux pesticides et aux herbicides tels que la roténone et le paraquat. Parmi les facteurs génétiques sont retrouvés, entre autres, des mutations sur les gènes de l' α -synucléine, LRRK2, PARKIN, PINK1 et DJ1.

1.4.2 La physiopathologie de la MP

Au niveau biochimique, la MP se caractérise en majeure partie par la dégénérescence des neurones produisant la dopamine dans la SNc (Jellinger 2012). Nous l'avons vu, la mort des neurones dopaminergiques induit une perte de la modulation exercée par la dopamine au niveau du striatum et l'apparition de symptômes moteurs (Figure 1.5, p.19). D'autres structures peuvent aussi être affectées telles que le noyau basal de Meynert, le locus coeruleus et le noyau du raphé, contribuant à l'apparition de symptômes non moteurs tels que la dépression et la démence (Lang and Lozano 1998). Les mécanismes menant à la dégénérescence des neurones dopaminergiques sont loin d'être élucidés. Le stress oxydatif, la neuroinflammation et les dysfonctions mitochondriales ou du système ubiquitine-protéasome sont des facteurs qui ont été proposés comme participant à la dégénérescence des neurones (Samii *et al.* 2004; Gasser 2005; Horowitz and Greenamyre 2010; Surmeier *et al.* 2011).

La perte des neurones est accompagnée de la présence de corps de Lewy, une autre caractéristique neuropathologique de la maladie (Spillantini *et al.* 1997; Goedert *et al.* 2013). Ce sont des inclusions éosinophiles intraneurales formées d'agrégats protéiniques dont l' α -synucléine est le composant majeur, retrouvés entre autres dans la

SNc (Braak *et al.* 2004; Samii *et al.* 2004). Toutefois, il n'est pas clair si leur présence cause de la mort neuronale ou s'ils en sont une conséquence. Les corps de Lewy ne sont pas spécifiques à la MP, on les retrouve également dans la maladie d'Alzheimer de même que dans la démence à corps de Lewy mais leur présence dans la SNc est révélatrice de la MP.

1.4.3 Les symptômes de la MP

Au niveau comportemental, la maladie se caractérise par une triade de symptômes moteurs incluant la bradykinésie, correspondant à une lenteur du mouvement, les tremblements au repos et la rigidité musculaire auxquels s'ajoutent les troubles de la posture (Fahn 2003; Samii *et al.* 2004; Jankovic 2008; Bourdain *et al.* 2013). À partir de ces symptômes, un diagnostic peut être établi. Les signes moteurs grossiers de la maladie apparaissent lorsque la dégénérescence des neurones de la SNc et la perte de dopamine au striatum atteignent, respectivement, 50 % et 80 % (Samii *et al.* 2004). Ces troubles moteurs sont souvent précédés par la manifestation de dysfonctions olfactives et intestinales (Langston 2006) et les patients développeront probablement des symptômes non moteurs parmi lesquels sont retrouvés des troubles cognitifs comme la démence, la dépression, l'anxiété et l'apathie (Jankovic 2008).

1.4.4 Les modèles animaux de la MP

Les modèles animaux ont pour but de reproduire les changements neuropathologiques et comportementaux de la MP. Ils sont généralement basés sur l'administration de toxines qui induisent la destruction des neurones dopaminergiques. Parmi les toxines les plus couramment utilisées, on retrouve le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahdropyridine (MPTP) et la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Il existe également des modèles animaux induits par les pesticides et des modèles génétiques de la MP. Étant donné que les travaux de recherche présentés dans cet ouvrage ont été effectués chez la souris MPTP, seulement ce modèle expérimental sera introduit.

La molécule MPTP fut découverte vers le début des années 1980 lorsque produite par inadvertance durant la synthèse d'un analogue du narcotique mépéridine, le 1-méthyl-4-phényl-4-propionoxypipéridine, que les toxicomanes préparaient illicitement et s'injectaient (Przedborski 2017). À la suite du développement d'un éventail de symptômes moteurs, la dégénérescence des neurones de la SNc induite par l'administration du MPTP fut confirmée par les études *post-mortem* (Davis *et al.* 1979; Langston *et al.* 1999). Chez le singe et la souris, la toxine reproduit les changements neuropathologiques associés au développement de la maladie, soit la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc, des terminaisons postsynaptiques de ces mêmes neurones au striatum, l'apparition de symptômes moteurs et la présence de neuroinflammation (Blesa and Przedborski 2014).

Chez la souris, il est possible d'utiliser plusieurs régimes d'administration du MPTP pour induire différents degrés de destruction des neurones, entre autres, le régime aigu, sub-chronique et chronique (Meredith *et al.* 2008; Meredith *et al.* 2008). Chacun de ses protocoles influence l'immunoréactivité des neurones de la SNc. Cependant, cette perte n'est pas nécessairement associée à la mort des neurones en soi étant donné que l'administration du MPTP module à la baisse les niveaux d'expression génique de TH, le marqueur moléculaire des neurones dopaminergiques. Il est aussi à mentionner que la souche, le sexe, l'âge et le poids de l'animal influencent la sensibilité au MPTP et la reproductivité de la lésion (Blum *et al.* 2001; Jakowec and Petzinger 2004; Bove *et al.* 2005; Jackson-Lewis and Przedborski 2007; Antzoulatos *et al.* 2010; Blandini and Armentero 2012; Blesa *et al.* 2012).

Le MPTP n'est pas toxique en soi, toutefois, à la suite de son injection systémique, celui-ci passe la barrière hémato-encéphalique où il est converti en sa forme toxique, le 1-méthyl-4-pyridinium (MPP⁺) par les MAO des astrocytes. Le MPP⁺ relâché dans l'espace extracellulaire est ensuite transporté à l'intérieur des neurones dopaminergiques par les DAT, confondant la structure chimique du MPP⁺ avec celle de la dopamine. Une fois à l'intérieur, le MPP⁺ se lie au transporteur monoamine et induit la mort des neurones par l'inhibition du complexe I de la chaîne mitochondriale, ce qui provoque la production de

stress oxydatif et d'espèces réactives d'oxygène, de neuroinflammation et inévitablement, la mort des neurones (Figure 1.6, p.23) (Tolwani *et al.* 1999; Przedborski *et al.* 2001; Jakowec and Petzinger 2004). Fait intéressant, le rat n'est pas affecté par la toxine en raison d'un fonctionnement différent de leur MAO au SNC (Sedelis *et al.* 2000).

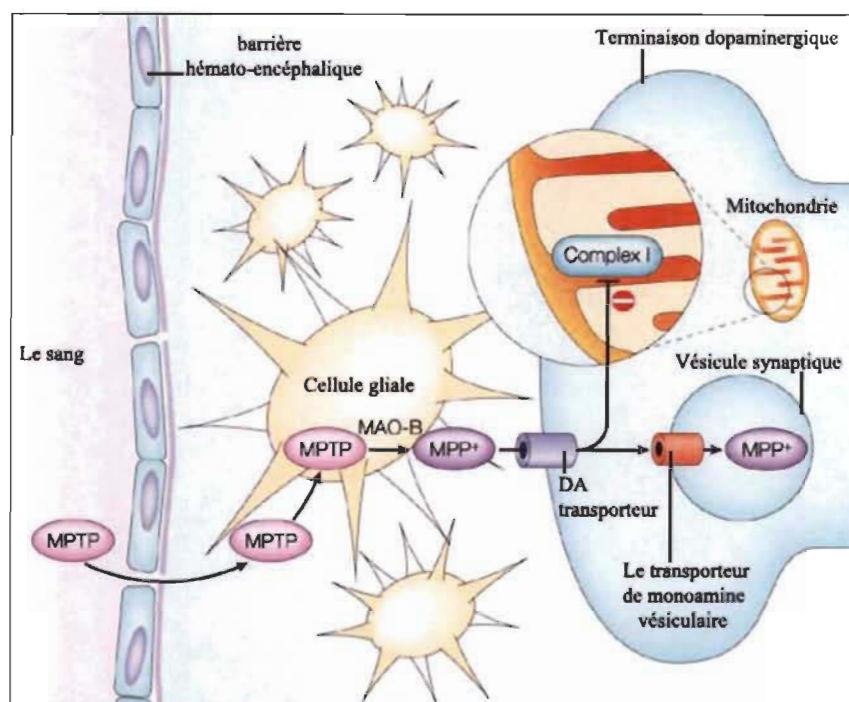


Figure 1.6 Mécanisme d'action du MPTP.

(Adaptée de Dauer and Przedborski 2003)

1.4.5 La neuroinflammation

Un éventail d'études épidémiologiques et *post-mortem* chez l'humain couplé aux résultats obtenus dans des modèles expérimentaux de la MP, comme chez la souris MPTP, indique clairement que la neuroinflammation est impliquée dans le processus neurodégénératif de cette maladie (Marchetti and Abbracchio 2005; McGeer and McGeer 2008; Meredith *et al.* 2008; Obeso *et al.* 2017; L'Episcopo *et al.* 2018). Les réactions inflammatoires au cerveau sont principalement médiées par les cellules du système immunitaire inné au SNC : les astrocytes et la microglie.

Les cellules de la microglie sont immunocompétentes et phagocytaires. À leur état basal, elles exhibent une morphologie ramifiée et sont capables de constamment monitorer leur environnement (Whitton 2007). Lorsqu'activées, elles subissent de dramatiques changements de conformations et passent d'un phénotype quiescent (M2) à un phénotype dit nocif (M1) (Streit 2002; Perry and Teeling 2013). Ce changement est caractérisé, entre autres, par l'augmentation de l'expression d'une protéine spécifique à la microglie activée, soit l'*ionizing calcium-binding adaptor molecule 1* (Iba-1). Cet état nocif leur permet de phagocyter et de produire des molécules pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et espèces réactives d'oxygènes dans l'optique de se débarrasser des débris toxiques. Une réponse excessive des cellules microgliales est également à l'origine de l'infiltration des cellules du système immunitaire inné, incluant les lymphocytes T (Figure 1.7, p.25) (Yang *et al.* 2018).

Quant aux astrocytes, la modulation de leur environnement est associée à l'expression et à la relâche d'une variété de facteurs neurotrophiques comme le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), médiateurs pro/anti-inflammatoires et molécules anti-oxydantes (Marchetti *et al.* 2013). À la suite d'une lésion, ils se transforment en astrocytes actifs et sont capables d'exercer des fonctions neuroprotectrices ou neurotoxiques. Dans ce cas, les astrocytes activés sont caractérisés par l'augmentation de l'expression de certaines de leurs protéines structurales, soit le *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) et produisent, entre autres, des chimiokines et des cytokines qui agissent comme médiateurs inflammatoires en coopération avec celles produites par la microglie (Marchetti and Abbracchio 2005). Les astrocytes assistent donc les cellules de la microglie dans l'exécution d'une réponse inflammatoire et sont également capables d'influencer l'état d'activation de ces dernières (Figure 1.7 p.25) (Liu *et al.* 2011; Norden *et al.* 2016; Yang *et al.* 2018).

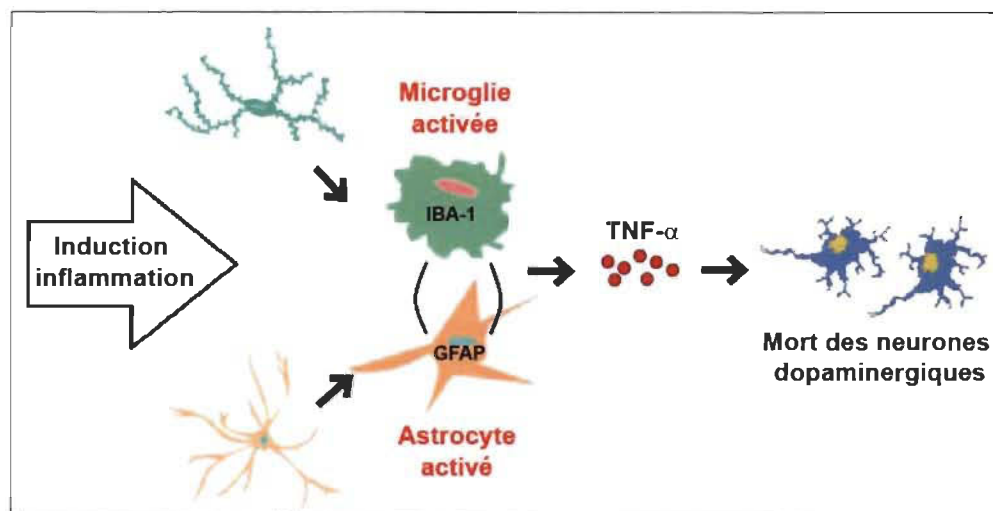


Figure 1.7 Schéma représentatif de l'activation des cellules gliales dans la MP ou à la suite de l'administration du MPTP.

Cette activité est primordiale et bénéfique pour le développement neuronal et lorsqu'il y a présence de lésions. Toutefois, une réponse inflammatoire excessive peut causer des dommages tissulaires, avec pour résultante, un dysfonctionnement ou la mort des neurones (Perry and Teeling 2013). Dans un contexte parkinsonien, la microglie et les astrocytes activés sont proéminents dans les substances noires et striatums déjà atteints par la maladie. On peut donc y voir une robuste réaction inflammatoire. De plus, il faut savoir que les neurones dopaminergiques de la SNc sont reconnus comme étant plus vulnérables à ce micro-environnement inflammatoire (Whitton 2007; Tansey and Goldberg 2010; Taylor *et al.* 2013). Ils dégénèrent donc plus rapidement que les neurones des régions adjacentes (VTA), exacerbant les processus neurodégénératifs déjà enclenchés (Block and Hong 2007; Hirsch and Hunot 2009; Phani *et al.* 2012). Toutefois, la nature des événements responsable de l'activation des processus inflammatoires chez les patients parkinsoniens est toujours méconnue.

1.4.6 Les traitements de la MP

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la MP (Hirsch 2012; Ganguly *et al.* 2017). Les principaux traitements utilisés pour freiner le développement des symptômes moteurs chez les patients visent essentiellement à préserver l'autonomie

fonctionnelle ainsi qu'à améliorer les conditions de vie du patient, par la normalisation de la transmission dopaminergique au cerveau. Malheureusement, ces substances ne sont pas en mesure de réduire la neurodégénérescence dopaminergique et leurs effets ne sont conséquemment que temporaires.

Les traitements peuvent être pharmacologiques et chirurgicaux (implantation d'électrodes de stimulation, cellules souches ou dissections), selon l'âge et le statut cognitif du patient, de la sévérité des symptômes ainsi que de la réponse aux traitements déjà administrés (Chen and Swope 2007; Jankovic and Poewe 2012). Néanmoins, la pharmacothérapie représente toujours le premier recours thérapeutique (Jankovic and Poewe 2012). Étant donné que les symptômes de la maladie résultent d'un manque de dopamine, les principaux médicaments ont pour but de compenser cette perte. Ce sont les traitements dopaminergiques. Ils peuvent rétablir les niveaux de dopamine (L-DOPA), imiter l'action de la dopamine (agonistes des récepteurs dopaminergiques) ou augmenter la disponibilité en dopamine dans la fente synaptique (inhibiteurs des MAO) (Chen and Swope 2007; Jankovic and Poewe 2012; Obeso *et al.* 2017). Toutefois, ils ne viennent que temporairement atténuer les symptômes moteurs, sans stopper la progression de la maladie (Olanow and Schapira 2013). En plus des nouvelles thérapies géniques et cellulaires actuellement révisées, de nouveaux traitements visant le prolongement de l'effet de la L-DOPA sont à l'étude (Poewe *et al.* 2012).

Depuis quelques années, on s'intéresse toutefois davantage à la modulation du système immunitaire pour la pharmacothérapie de la MP. D'ailleurs, certains groupes ont songé à utiliser un agoniste des récepteurs à la S1P, et ce, en raison de sa capacité à réduire de façon robuste l'activation des cellules gliales dans diverses affections neurologiques au cerveau (Czubowicz *et al.* 2019).

1.5 La sphingosine-1-phosphate et ses analogues

La S1P, un lysophospholipide régulant d'importantes fonctions biologiques, 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 and Hannun 2009; Kunkel *et al.* 2013). Ces derniers sont ensuite hydrolysés sous l'action de céramidases pour former la sphingosine. On la retrouve dans divers compartiments de la cellule comme le lysosome, le réticulum endoplasmique ainsi que dans les membranes cellulaires (Spiegel and Milstien 2003). Biochimiquement, la sphingosine se voit finalement transformée par d'autres enzymes, les sphingosines kinases (SPHKs), lesquelles assurent la formation de la S1P (Tirodkar and Voelkel-Johnson 2012; Pulkoski-Gross *et al.* 2015). La S1P peut agir à l'intérieur de la cellule ou être libérée dans le milieu extracellulaire par ses transporteurs spécifiques. Elle est présente en grande quantité dans le plasma (jusqu'à 1 μ M), liée à plus de 90 % aux lipoprotéines de haute densité et à l'albumine. Les cellules d'origine hématopoïétique : plaquettes, mastocytes et surtout érythrocytes constituent les sources majeures de S1P dans le plasma. Dans la lymphe, où la S1P est aussi présente (environ 100 nM), c'est l'endothélium qui représenterait la source principale. La S1P se distingue des autres sphingolipides par sa capacité à réguler les réponses immunitaires et l'inflammation (Spiegel and Milstien 2003; Chi 2011; Maceyka and Spiegel 2014; Aoki *et al.* 2016).

1.5.1 Les mécanismes d'action de la S1P

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 and Hla 2014). Elle peut par exemple, influencer la régulation de gènes spécifiques en modulant 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 (Maceyka and Spiegel 2014). 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 sphingosines conduit à la mort des cellules, la S1P agirait au contraire

comme un agent mitogène en inhibant l'apoptose (Spiegel and Milstien 2011; Ratajczak *et al.* 2014). Ainsi, une augmentation anormale de la quantité de SIP favoriserait la prolifération cellulaire et l'apparition des cancers. À l'inverse, une diminution excessive de SIP 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).

1.5.2 Grandes fonctions des récepteurs à la SIP

Plusieurs actions de ce médiateur lipidique découlent de l'activation d'une famille de cinq RCPG (Goetzl *et al.* 2004; Maceyka *et al.* 2012; Rosen *et al.* 2013; Blaho and Hla 2014), les récepteurs à la SIP (SIPRs). Ces récepteurs sont exprimés de façon différentielle d'un type cellulaire à l'autre, œuvrant en synergie ou en antagonisme et l'effet biologique observé en réponse à la SIP représente finalement la somme de toutes leurs actions. La SIP peut agir de manière autocrine ou paracrine en stimulant ses propres récepteurs à la surface de la cellule (Rosen and Goetzl 2005; Strub *et al.* 2010).

Lorsqu'elle 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 SIPRs, ceux-ci sont phosphorylés, ce qui conduit à leur découplage fonctionnel et promeut leur internalisation. Une fois le compartiment endosomique atteint, les récepteurs internalisés peuvent être recyclés vers la membrane plasmique ou dégradés via la fusion des endosomes avec les lysosomes. 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 (Payne *et al.* 2002; Maceyka *et al.* 2012; Rosen *et al.* 2013). Ils sont également en mesure d'activer une pléiade d'effecteurs cellulaires comme la PLC, l'AC, la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et certaines GTPases (Rho et Ras) (Cuvillier, 2012). Seulement les sous-types des récepteurs 1, 3 et 5 seront décrits ici.

Le sous-type 1 des récepteurs à la SIP (SIP1R) est exprimé dans de multiples systèmes cellulaires comme les cellules endothéliales, musculaires, immunitaires et en abondance au niveau des cellules gliales et neuronales (Chae *et al.* 2004; Aktas *et al.* 2010). Il possède une très forte affinité pour son ligand endogène (Lee *et al.* 1998) et est le seul récepteur exclusivement couplé à la protéine Gi. Son activation conduit à la diminution de la concentration en AMPc, la stimulation des MAPK (ERK), l'augmentation de la production d'inositol phosphate et de calcium, l'activation de la voie PI3K/Akt et la libération d'oxyde nitrique dans les cellules endothéliales (Cuvillier 2012). De manière générale, l'activation du SIP1R conduit à la prolifération, la survie et la migration cellulaire (Guerrero *et al.* 2016). Par ailleurs, les études tentent de démontrer que la délétion du gène codant pour le SIP1R 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 SIP, n'étant pas reproduit lors de la délétion des autres récepteurs pour ce sphingolipide (Cuvillier, 2012). Des preuves solides montrent aussi que le SIP1R est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques, faisant de lui une cible thérapeutique particulièrement intéressante. À ce titre, le SIP1R est intimement lié à la fonction des cellules du système immunitaire. Par exemple, il apparaît essentiel à la sortie des lymphocytes T et B du thymus et des organes lymphoïdes secondaires, tels que les ganglions lymphatiques (Matloubian *et al.* 2004; Cavone *et al.* 2015; Pulkoski-Gross *et al.* 2015).

Quant à lui, le récepteur de type 3 (SIP3R) s'exprime principalement sur les poumons, le cœur et le cerveau, au niveau des cellules gliales et des neurones (Motyl and Strosznajder 2018). Il active diverses voies de signalisation faisant intervenir PI3K/Akt, PLC, ERK ainsi que 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 SIP3R ne présentent aucune anomalie phénotypique évidente, elles se développent normalement indiquant le rôle non essentiel de ce récepteur dans le développement et suggérant que la perte du SIP3R est compensée par d'autres récepteurs (Camprubi-Robles *et al.* 2013).

En ce qui concerne le dernier sous-type de récepteur identifié, le SIP5R, il possède un profil d'expression préférentiel aux oligodendrocytes myélinisants du SNC. Il est couplé aux protéines Gi et G12/13 qui activent les voies PLC/IP3/Ca²⁺, PI3K/Akt, Rho et l'inhibition de l'AC. Le SIP5R est impliqué dans l'inhibition de la prolifération et de la migration cellulaires, et plus particulièrement dans les cellules précurseurs d'oligodendrocytes. En revanche, le SIP5R médie la survie des oligodendrocytes matures myélinisants (Novgorodov *et al.* 2007). Finalement, 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).

1.5.3 Neurophysiologie des récepteurs à la SIP

Les récepteurs de la SIP sont également très présents dans le cerveau où ils y jouent des rôles déterminants (Prager *et al.* 2015; Spampinato *et al.* 2015; Park and Im 2017). Quatre des cinq SIPRs sont exprimés dans les neurones et cellules gliales du SNC (SIPRs-1-2-3-5). Ils sont essentiels aux processus d'embryogenèse (Mizugishi *et al.* 2005) et influencent la synthèse de facteurs neurotrophiques comme le BDNF au niveau du SNC mature. Nous l'avons vu, chez les souris, la délétion du SIP1R affecte sévèrement la neurogenèse. Un autre argument suggérant un rôle de la SIP dans le SNC provient des études conduites sur le SIP1R et 5, récepteurs impliqués dans la croissance et dans la survie des oligodendrocytes. La destruction des oligodendrocytes, cellules formant la gaine de myéline qui entoure la plupart des axones du SNC, est un événement clé dans le processus pathologique de la sclérose en plaques (SEP). 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 (Figure 1.8, p.31).

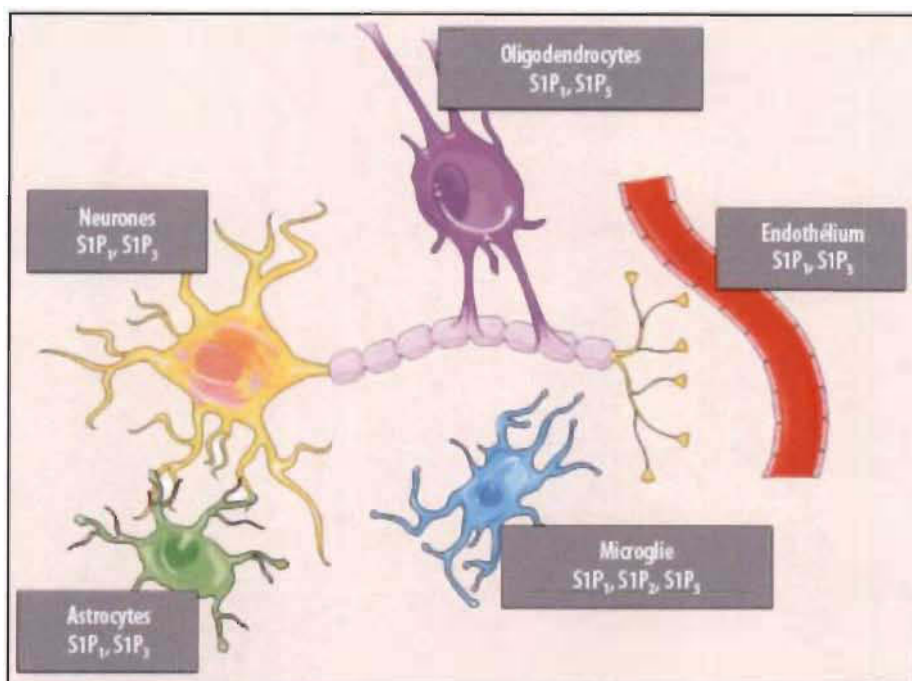


Figure 1.8 Expression des différents sous-types des récepteurs à la sphingosine-1-phosphate au niveau cérébral.

(Tirée de Bordet 2011)

1.5.4 Les effets thérapeutiques du FTY720 au cerveau

Le FTY720 (2-amino-2-[2-(4-octylphényl) éthyl] propane-1,3-diol) a été synthétisé pour la première fois en 1992 par modification structurelle de la myriocine, un métabolite fongique ayant des propriétés immunosuppressives isolées à partir d'une culture d'*Isaria sinclairii*. Le FTY720 est phosphorylé *in vivo* par les SPHKs, pour aboutir au FTY720-phosphate (FTY720-P), un analogue structural biologiquement actif de la S1P (Kharel *et al.* 2005; Zemmann *et al.* 2006; Takabe *et al.* 2008). Le FTY720-P se lie à tous les récepteurs connus de la S1P, sauf le S1P2R. Le FTY720 est d'abord connu pour prolonger la survie des greffons d'organes solides comme la prostate et le rein 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 SEP, une découverte qui sera rapidement confirmée par la FDA (Brinkmann *et al.* 2010; Chun and Hartung 2010; Chiba and Adachi 2012). Bien qu'il soit

un agoniste du récepteur S1P1R, le FTY720 induit l'internalisation et la dégradation de ce récepteur (Graler and Goetzl 2004). Or, sur le plan cellulaire, l'effet thérapeutique de cette molécule semble d'abord s'exercer à la faveur d'une séquestration des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques évitant, du coup, la pénétration cérébrale par ces cellules (Brinkmann *et al.* 2002; Mandala *et al.* 2002; Matloubian *et al.* 2004; Rudnicka *et al.* 2015). En effet, dans les modèles animaux de la SEP, le FTY720 empêche l'apparition de la maladie et réduit les lésions neurologiques établies (Brinkmann *et al.* 2002; Fujino *et al.* 2003; Webb *et al.* 2004).

Il faut savoir finalement que, depuis quelques années, on s'intéresse aux vertus potentielles du médicament FTY720 dans le contexte de maladies autres que la SEP. Des chercheurs ont récemment publié des articles intéressants qui éclairent d'un jour nouveau les relations entre le FTY720 et la mémoire tout en ouvrant la voie à une nouvelle approche de maladies comme l'Alzheimer (Asle-Rousta *et al.* 2013; Doi *et al.* 2013; Hemmati *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 du 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 du 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 chercheurs ont été en mesure de démontrer que les effets bénéfiques sur le cerveau résultent fort probablement de la capacité du médicament FTY720 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; Pawlak *et al.* 2005; Luscher and Malenka 2012). Or, assez logiquement, il est possible d'imaginer que les effets procognitifs du FTY720 passent par une régulation des récepteurs NMDA dans l'hippocampe. À cet effet, l'équipe du professeur Guy Massicotte a montré qu'une activation des récepteurs de la S1P par le composé FTY720 est en mesure de moduler les récepteurs glutamatergiques de

l'hippocampe (Attiori Essis *et al.* 2015). Une observation qui tente évidemment à démontrer le rôle capital exercé par les S1PRs dans la plasticité neuronale et la formation des souvenirs.

Par son action sur le S1P1R, le FTY720 limiterait la production de cytokines pro-inflammatoires par la microglie activée (Zhang *et al.* 2015; Hunter *et al.* 2016). De plus, il favoriserait la neuroprotection via ses effets modulateurs sur l'excitotoxicité (Luchtman *et al.* 2016). Les nombreux effets répertoriés du FTY720 dans des affections diverses comme la maladie d'Alzheimer (Martin and Sospedra 2014; Aytan *et al.* 2016) la maladie d'Huntington (Di Pardo *et al.* 2014; Miguez *et al.* 2015) et au cours de l'ischémie (Brunkhorst *et al.* 2014; Nazari *et al.* 2016), laissent envisager que ce médicament serait en mesure de réduire les dommages au cerveau lors du développement de la neurodégénérescence, suggérant ainsi qu'il serait un candidat potentiel à titre d'agent neuroprotecteur et anti-inflammatoire au SNC (Motyl and Strosznajder 2018).

Les effets secondaires de ce traitement se traduisent par une bradycardie, une rhinopharyngite, une dyspnée, des maux de tête, de la diarrhée et des nausées via l'activation des S1P3R (Cohen and Chun 2011). De fait, une panoplie d'agonistes plus spécifiques sont en développement dans l'optique de cibler uniquement le S1P1R.

1.5.5 Les effets thérapeutiques du SEW2871

Le SEW2871, agoniste sélectif du récepteur S1P1R, est structuellement différent de la S1P et sa phosphorylation n'est pas nécessaire pour la liaison au récepteur. Le SEW2871, comme la S1P, induit l'internalisation et le recyclage du S1P1R (Liu *et al.* 1999) à la différence du FTY720, qui médie son internalisation et dégradation (Graler and Goetzl 2004). Cette divergence entre la S1P et le FTY720 serait la conséquence d'une ubiquitinylation différente du S1P1R. La polyubiquitinylation du S1P1R induite par le FTY720 conduit à sa dégradation, alors qu'une mono-ubiquitinylation est observée en réponse à son agoniste naturel, la S1P (Oo *et al.* 2007). Comme le FTY720, Le SEW2871 est en mesure d'induire une lymphopénie chez la souris par un mécanisme dépendant du

SIP1R (Sanna *et al.* 2004; Morris *et al.* 2005). Au SNC, lorsqu'administré de façon systémique, le composé serait en mesure d'atténuer les plaques de bêta-amyloïde et la mort neurorale au niveau de l'hippocampe chez le rat (Asle-Rousta *et al.* 2013). Aussi, dans un contexte d'ischémie, l'activation du SIP1R via l'administration intrapéritonéale du SEW2871 aurait un effet neuroprotecteur chez le rat (Hasegawa *et al.* 2010). Ces études supportent l'idée que le SEW2871 passe la barrière hémato-encéphalique et agit directement sur les SIP1R exprimés au cerveau pour y exercer son effet neuroprotecteur (Motyl and Strosznajder 2018).

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Le processus même à l'origine de la MP reste encore énigmatique et les traitements pour freiner la progression de cette terrible affection se font toujours attendre. Il ressort des travaux récents que le FTY720, un médicament modulateur des récepteurs de la S1P destiné aux patients souffrant de la sclérose en plaques, pourrait s'avérer bénéfique dans le traitement d'autres affections neurodégénératives progressives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Fukumoto *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015; Aytan *et al.* 2016; Hunter *et al.* 2016; Motyl and Strosznajder 2018). Dans des modèles animaux du Parkinson, des chercheurs sont de fait parvenus à démontrer que l'administration du médicament est en mesure de faire chuter considérablement la neurodégénérescence dopaminergique (Zhao *et al.* 2017). Cependant, dans le cadre de ces travaux, les auteurs ne discutent guère de l'implication des processus anti-inflammatoires comme mécanisme sous-jacent de l'effet neuroprotecteur du FTY720. Autre détail important, on sait que la protection induite par le FTY720 chez les patients souffrant de sclérose en plaques implique essentiellement les récepteurs 1 de la S1P. Or, on ne connaît toujours pas la nature des récepteurs susceptibles de freiner la mort des neurones dopaminergique dans le contexte de la MP. En utilisant des souris injectées à la toxine MPTP comme modèle de Parkinson, le présent travail s'est intéressé à l'idée que la protection induite par le composé FTY720 implique l'inhibition de processus inflammatoires, et ce, par l'activation spécifique des récepteurs 1 de la S1P. De cette hypothèse découlent 5 objectifs de recherche qui tenteront de répondre aux questions suivantes :

2.1 Est-ce que l'administration d'agents modulateurs des récepteurs à la S1P diminue la neuroinflammation chez les souris traitées au MPTP ?

Un regard nouveau sur les mécanismes de la neurodégénérescence dopaminergique dans la MP conduit à penser que l'apparition des processus inflammatoires de même que la baisse de BDNF neuronale pourraient être des éléments déclencheurs fondamentaux qui précèdent la mort des neurones (Marchetti and Abbracchio 2005; McGeer and McGeer 2008; Meredith *et al.* 2008; Machado *et al.* 2016; Obeso *et al.* 2017; L'Episcopo *et al.* 2018). On sait que le développement de la maladie de Parkinson implique avant toute chose une détérioration de certaines structures des ganglions de la base comme la substance noire et du striatum (Cenci 2007). Du coup, le premier volet expérimental de ce travail de recherche consistera à évaluer les conséquences du traitement MPTP sur ces régions du cerveau. Ce volet portera d'abord sur l'évaluation des niveaux d'expression des protéines GFAP et TNF- α dans le striatum des animaux contrôles et traités au MPTP. Rappelons-le, la littérature indique clairement que la mesure du GFAP offre sur le plan expérimental une très bonne appréciation du degré d'activation des astrocytes dans diverses maladies neurodégénératives. Les niveaux de TNF- α étant quant à eux, un indicateur fiable de la production de molécules pro-inflammatoires par les cellules microgliales activées.

La capacité du MPTP à modifier l'expression de ces marqueurs moléculaires de l'inflammation sera appréciée sur des homogénats de striatum à l'aide de la technique traditionnelle d'immunobuvardage de type Western. Par ailleurs, on pourra dans ces circonstances vérifier le potentiel bénéfique de l'agoniste global FTY720 et d'un analogue plus spécifique aux récepteurs 1 de la S1P (le SEW2871) quant à leurs effets anti-inflammatoires.

2.2 Est-ce que l'administration d'agents modulateurs des récepteurs à la S1P freine également la perte de BDNF chez les souris traitées au MPTP ?

La recherche sur les maladies neurodégénératives, et plus généralement sur les systèmes protecteurs endogènes, s'oriente sur le rôle des facteurs de croissance comme mécanismes susceptibles de protéger le cerveau contre diverses pathologies. La molécule

BDNF doit, dans cette perspective, faire l'objet d'une attention particulière si l'on en juge par les données expérimentales montrant que les taux de cette protéine s'abaissent considérablement dans la maladie de Parkinson (Machado *et al.* 2016; Shen *et al.* 2018). On verra donc dans ce deuxième volet à estimer le niveau de déplétion en BDNF dans le striatum des souris MPTP. Une emphase sera évidemment portée sur la capacité du FTY720 et du SEW2871 à freiner la baisse intempestive de ce facteur neuroprotecteur.

2.3 Qu'en est-il de la microglie chez les souris traitées aux analogues de la S1P ?

Les cellules de la microglie représentent environ 10 % de toutes les cellules gliales du SNC. Or, une activation exacerbée de la microglie peut s'avérer nocive, car elle aggrave alors les lésions tissulaires et contribue indirectement à la pathophysiologie et au développement de maladies neurodégénératives comme la sclérose en plaques et les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Whitton 2007; More *et al.* 2013). Il est possible de mettre en évidence le niveau d'activation de la microglie par le marquage de la protéine Iba-1, via la technique d'immunofluorescence (IF). On verra donc à mesurer dans ce troisième volet de ma recherche les niveaux d'activation de la microglie dans la substance noire des animaux traités au MPTP. On profitera de l'occasion pour revalider en IF l'activation astrocytaire par le marquage du GFAP. Le pouvoir inhibiteur des analogues de la S1P sur l'activation des astrocytes et de la microglie sera estimé en prenant avantage de la procédure d'imagerie cellulaire par microscopie à épifluorescence. La spécificité de l'effet potentiel du FTY720 et du SEW2871 sur l'activité gliale de la substance noire sera étudiée en la comparant à une région normalement épargnée par la MP, le VTA.

2.4 Qu'en est-il de la survie neuronale dopaminergique chez les souris traitées aux analogues de la S1P ?

On sait depuis fort longtemps que la physiopathologie du Parkinson trouve son origine dans la disparition progressive des neurones dopaminergiques de la substance

noire et de leurs projections vers le striatum. La mise au point de techniques biochimiques permettant de mesurer l'enzyme tyrosine hydroxylase et le transporteur à la dopamine rend possible l'évaluation de l'intégrité des neurones dopaminergiques chez les souris MPTP. De fait, en utilisant la microscopie par épifluorescence et la technique d'immunobuvardage de type Western, ce volet s'est intéressé aux effets bénéfiques des analogues de la S1P sur la déplétion dopaminergique induite par le MPTP dans la substance noire et le striatum.

2.5 Quel est le potentiel des analogues de la S1P sur le plan locomoteur ?

Finalement, il convient de s'interroger sur les bénéfices comportementaux des analogues de la S1P avant de conclure un quelconque espoir thérapeutique des molécules étudiées (FTY720 et SEW2871). Pour évaluer cette possibilité, nous avons d'abord estimé les dérèglements locomoteurs en réponse au traitement MPTP et ensuite apprécié la capacité des analogues de la S1P à freiner le développement des anomalies motrices. Dans le cadre de ces analyses, on verra à vérifier notamment, la vitesse et l'harmonie d'exécution de tâches motrices via le *pole* et le *beam* tests, reconnues pour être affectées dans divers modèles animaux déplétés en dopamine.

CHAPITRE III

SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE RECEPTORS MODULATORS DECREASE NEUROINFLAMMATION AND PREVENT PARKINSON'S DISEASE SYMPTOMS IN THE MPTP MOUSE MODEL

Le contenu de ce chapitre fera l'objet d'une publication en anglais dans la revue « Frontiers in Pharmacology ».

3.1 Contribution des auteurs

Les travaux présentés ont été réalisés par Élise Pépin, sous la supervision de ses directeurs de recherche, les Drs Guy Massicotte et Michel Cyr. La création du projet et des expériences a été réalisée par Élise Pépin sous l'expertise des Drs Guy Massicotte et Michel Cyr. Les expériences ont été réalisées par Élise Pépin avec l'aide technique pour la microscopie de Tim Jalinier (stagiaire CRSNG) et pour les expériences *in vivo* de Guillaume L. Lemieux (collègue étudiant à la maîtrise). Le matériel et les produits ont été fournis par les laboratoires des Drs Guy Massicotte et Michel Cyr. L'analyse et l'interprétation des résultats ont été réalisées par Élise Pépin sous la supervision des Drs Guy Massicotte et Michel Cyr. Élise Pépin a écrit le manuscrit en collaboration avec les Drs Guy Massicotte et Michel Cyr.

3.2 Article scientifique

Sphingosine-1-phosphate receptors modulators decrease neuroinflammation and prevent Parkinson's disease symptoms in the MPTP mouse model

Élise Pépin, Tim Jalinier, Guillaume L Lemieux, Guy Massicotte and Michel Cyr

Groupe de recherche en signalisation cellulaire, Département de biologie médicale,
Université du Québec à Trois-Rivières, 3351, boul. des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières
(QC) G9A 5H7

Corresponding author:

Michel Cyr, PhD

Cellular Signalisation Research Group

Université du Québec à Trois-Rivières

3351, boul des Forges, C.P. 500

Trois-Rivières (QC) Canada G9A 5H7

Phone: 819-376-5011 Ext 3301

michel.cyr@uqtr.ca

Abstract

Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a potent bioactive lipid mediator that acts as a natural ligand upon binding to five different receptors that are located in astrocytes, oligodendrocytes, microglial and neuronal cells. Recently, global activation of these receptors by FTY720 (Fingolimod) has been suggested to provide neuroprotection in animal model of Parkinson's disease (PD). Among S1P receptors, the subtype 1 (S1P1R) has been linked to features of neuroprotection and, using the selective agonist SEW2871, the present investigation assessed potential benefits (and mechanisms) of this receptor subtype in an established animal model of PD. We demonstrated that oral treatments with SEW2871 are able to provide protection to the same levels than FTY720 against loss of dopamine neurons and motor deficits in the MPTP (30 mg/kg, i.p., 5 days) mouse model of PD. At the molecular level, we observed that the beneficial effects of both S1PR agonists were not associated with alterations in ERK and Akt levels, two markers of molecular adaptations in the striatum neurons. However, these compounds have the capacity to fully prevent neuroinflammation such as the activation of astrocytes and glial cells, as well as MPTP-incuded reduction of BDNF levels in key regions of the brain implicated in motor functions. These findings suggest that selective S1P1R modulation has the ability to attenuate devastating brain inflammation and provide neuroprotection in response to MPTP neurotoxicity. Targeting S1P1R in PD therapy may represent a prominent candidate for treatment of this neurodegenerative conditions.

Keywords

S1P receptors; FTY720; SEW2871; MPTP; Neuroinflammation; Neuroprotection

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a common age-related neurodegenerative condition, characterized by progressive loss of the nigrostriatal dopamine pathway and erosion of several neurological functions. Biochemical studies performed on postmortem brains suggest that pathogenic factors most likely contributing to PD include a progressive neuroinflammatory reaction involving microglial activation and subsequent formation of pro-inflammatory cytokines such as the tumor necrosis factor (TNF- α) (Nagatsu and Sawada 2007). Reduction in neurotrophins synthesis such as brain-derived nerve growth factor (BDNF) is another important feature associated with PD pathology (Shen *et al.* 2018). In support to this theory, several *in vitro* and *in vivo* studies propose that BDNF depletion occurring in various neuropathological conditions is mediated by the release of pro-inflammatory cytokines (Calabrese *et al.* 2014).

Although symptomatic improvement can be achieved by pharmacologically restoring dopaminergic transmission, the development of neuroprotective treatments that prevent or halt PD pathogenic processes is still awaiting. Emerging evidence have established that Fingolimod (FTY720), a non selective sphingosine 1-phosphate receptors (S1PRs) modulator approved for the treatment of multiple sclerosis, can provide significant protection in mouse models of neurodegenerative conditions including two recent studies on PD (Aytan *et al.* 2016; Zhao *et al.* 2017). These later studies suggest that neuroprotective properties of FTY720 in a murine model of PD require direct effects of the drug on neuronal cells, which are presumably dependent on ERK activity. However, which specific S1PRs is responsible for these beneficial effects and whether non-neuronal mechanisms such as neuroinflammation are associated with brain damages is still unknown.

The present study will examine the efficacy of an oral treatment with the non selective agonist FTY720 to subtype 1, 3 and 5 of S1PRs, or the selective agonist SEW2871 to subtype 1 of S1PRs (S1P1R), to prevent the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) induced nigrostriatal loss and motor deficits in mice. In

addition, potential mechanisms of action that include neuronal signaling, BDNF synthesis and neuroinflammatory pathways will be investigated.

Materials and Methods

Animals

Twelve week-old male C57BL/6j mice (Charles River Laboratories, QC, CAN) were individually housed in a controlled room under a 14h light/10h dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. This study was carried out in accordance with the Canadian Council on Animal Care as well as with the recommendations of the UQTR Institutional Animal Care and Use Committee.

Pharmacological treatments

The experimental design is detailed in Figure 1 (**Fig. 1**). FTY720 and SEW2871 (5-(4-Phenyl-5-trifluoromethylthiophen-2-yl)-3-(3-trifluoromethylphenyl)-1,2,4oxadiazole) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) and MPTP hydrochloride from Toronto Research Chemicals (North York, ON, CAN). All mice ($n = 24$) were orally treated with either vehicle (10% DMSO and 25% Tween 20 v/v dissolved in saline 0.9% sodium chloride), 1 mg/kg FTY720 (dissolved in vehicle) (Yazdi *et al.* 2015) or 20 mg/kg SEW2871 (dissolved in vehicle) (Dong *et al.* 2014) daily for 14 days. Mice were also intraperitoneally (i.p.) injected with saline or 30 mg/kg MPTP (dissolved in saline) (Xiao-Feng *et al.* 2016) once a day for five consecutive days. Our experimental groups were defined as follow: (1) Vehicle + saline, $n = 3$ mice; (2) FTY720 + saline, $n = 3$; (3) SEW2871 + saline, $n = 3$; (4) Vehicle + MPTP, $n = 5$; (5) FTY720 + MPTP, $n = 5$; and (6) SEW2871 + MPTP, $n = 5$.

Behavioral assessments

Motor behavior was assessed using the pole and beam tests, as previously described (Chagniel *et al.* 2016; Bergeron *et al.* 2017). Briefly, at the pole test, mice were placed at the upper end of a vertical pole (diameter: 1.5 cm; length: 50 cm). The time required for each mouse to turn down and reach the base of the pole was recorded for three trials. The balance beam assessed two mouse abilities: the first one is the time taken to go across a narrow beam (width: 6 mm; length: 100 cm) to reach a dark goal box whereas the second one measured the stepping errors, i.e. foot-faults, occurring during the same trial. Mouse performances were recorded for three trials. A foot-fault was considered each time a paw fell under the beam midline. In all tests, mice were pre-trained three consecutive periods to remove the learning variables and a maximum time of 60 s was allowed to execute the tasks.

Protein levels quantification

Mice were sacrificed by decapitation and brains were divided in half. The posterior part of the brain was immediately processed for immunofluorescence analyses. In the anterior part of the brain, we rapidly dissected out the striatum structure in both hemispheres and immediately freeze them on powdered dry ice. The striatum were pooled together and stored at -80 °C until we performed protein extractions for Western blot analysis. Samples were homogenized in ice-cold RIPA lysis buffer containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche, Indianapolis, IN, USA). Protein concentrations were quantified by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of proteins (30-40 µg) were separated on SDS/PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Immunoblots were performed overnight using the following primary antibodies: mouse monoclonal antibody against tyrosine hydroxylase (TH; 1:2000; Millipore, Bellerica, MA, USA), rabbit polyclonal antibody against dopamine transporter (DAT; 1:1000; Millipore), rabbit polyclonal antibody against sphingosine 1-phosphate receptor 1 (EDG-1; 1:10 000; Abcam, Cambridge, MA, USA), rabbit polyclonal antibody against phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2; Thr202/Tyr204; 1:1000; Cell Signaling Technology, Whitby, ON, CAN), mouse monoclonal antibody against p44/42 MAPK (ERK1/2; 1:2000; Cell Signaling Technology), rabbit monoclonal

antibody against protein kinase B (p-Akt-Thr308; 1:1000; Cell Signaling Technology), rabbit monoclonal antibody against total protein kinase B (Akt; 1:1000; Cell Signaling Technology), rabbit polyclonal antibody against BDNF (1:400; Abcam), mouse monoclonal antibody against tumor necrosis factor alpha (TNF- α ; 1:2000; Abcam), mouse monoclonal antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:1000; Cell Signaling Technology), and mouse monoclonal antibody against GAPDH (1:10 000; Abcam). Membranes were washed in TBS-Tween 0.1% and incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000; Thermo Scientific, Ottawa, ON, CAN). To visualize protein bands, chemiluminescence reactions were performed (SuperSignal West Femto chemiluminescence kit, Pierce Chemical Co, IL, USA). Densitometry analysis were achieved using the VisionWorks LS software (UVP Bioimaging Upland, Upland, CA, USA) and expressed as relative optical density.

Immunofluorescence analysis

Posterior part of the brain was post-fixed overnight at 4 °C in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, overnight in 10% and then overnight in 30 % sucrose/4% paraformaldehyde (wt/vol). They were frozen in isopentane and stored at -80 °C. Coronal brain sections (60 μ m) containing the substantia nigra pars compacta (SNc) and the ventral tegmental area (VTA) (-2.92 to -3.64 mm from the Bregma; Paxinos and Franklin, 2001) were sliced using a Leica CM3050S cryostat (Leica, Richmond Hill, ON, Canada) and kept at 4°C in PBS. For free-floating immunofluorescence, sections were incubated in permeabilizing solution containing 1.2% Triton X-100 in PBS followed by blocking solution containing 10% normal goat serum in PBS to avoid non-specific binding. They were then incubated with primary antibodies: rabbit polyclonal antibody or mouse monoclonal antibody against TH (1:500; Millipore), mouse monoclonal antibody against neuronal nuclear antigen (NeuN; 1:200; Millipore), mouse monoclonal antibody against GFAP (1:300; Cell Signaling Technology) and rabbit monoclonal antibody against ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1; 1:100; Abcam). The sections were rinsed in PBS and incubated in appropriate secondary antibody: goat anti-mouse conjugated with FITC or DyLight 594-conjugated goat anti-rabbit (1:500; Cell Signaling

Technology), diluted in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 2% NGS for 1 h at room temperature. After several washes in PBS, they were incubated with Hoescht 33342 (1:10 000/PBS, Invitrogen, Burlington, ON, CAN) for 15 min. Finally, the sections were rinsed several times in PBS and mounted in Vectashield medium on Superfrost slides for visualization under a confocal spinning disk microscope (MBF Bioscience, Williston, VT, USA).

TH and NeuN positive cells were determined by unbiased stereological quantification using the optical fractionator of Stereo Investigator software (MBF Bioscience, Vermont, USA). Three coronal sections containing the SNc and VTA of both hemispheres were considered per animal: -3.16, -3.28 and -3.40 mm from the Bregma. Borders of the SNc and VTA were defined using TH-immunostaining from a random starting point with 2X objective. Inside these borders, positive cells were counted with a 60X PlanApo oil-immersion objective and 1.4 numerical aperture attached to an Olympus BX51 microscope. A systematic sampling of the outlined area was made from a random starting point. Counts were recorded at predetermined intervals ($x=250$, $y=150$) and a counting frame ($50 \times 50 \mu\text{m}$) was superimposed on the live image of each tissue section. Section thickness was measured by focusing on the top of the section, zeroing the z-axis and focusing on bottom of the section (average section thickness was $60 \mu\text{m}$ with a range of $58.9 - 61.1 \mu\text{m}$). The dissector height was set at $50 \mu\text{m}$. Immunolabeled neurons were counted only if the first recognizable profile came into focus within the counting frame. This method certified a uniform, random and systematic cell count. Focusing through the z-axis revealed that NeuN and TH antibodies penetrated the full depth of tissue sections. Positive cell counts were expressed as total number/ mm^3 .

Semiquantitative optical densitometry measurements in the SNc and VTA structures were also conducted to evaluate Iba-1 and GFAP immunofluorescences. Three sections of both hemispheres were considered per animal: -3.16, -3.28 and -3.40 mm from Bregma. To delineate SNc and VTA, coronal midbrain sections labelled with Iba-1 or GFAP were co-immunostained with TH. Images of Iba-1 and GFAP immunolabeling were captured

bilaterally with 2X objective using Olympus BX51 microscope and optical densitometry measurements were obtained using ImageJ software (NIH, USA).

Data analysis

The data were analysed using the Graph Pad Prism software (version 5.0, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) to perform one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls *post hoc* tests. Data were reported as mean \pm SEM. and statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

S1PRs modulators reduced MPTP-induced inflammation and BDNF depletion without interfering with S1PIR in striatum homogenates

We first examined the manifestation of neuroinflammation in the striatum by the determination of GFAP and TNF- α levels using Western blot analyses. While the SEW2871 and FTY720 treatments alone have no effect, they were able to prevent the surge of striatal GFAP (**Fig. 2A**; $F(5,23) = 5.31$, $P < 0.01$) and TNF- α (**Fig. 2B**; $F(5,23) = 8.20$, $P < 0.001$) levels induced by MPTP. In parallel, expression levels of BDNF proteins have also been investigated and we observed a significant decrease of its protein levels after MPTP administrations, an effect that was totally prevented by SEW2871 and FTY720 treatments (**Fig. 2C**; $F(5,23) = 10.77$, $P < 0.01$).

The biochemical integrity of S1PIR was estimated by Western blot analysis in the striatum of mice treated with MPTP or S1PIR modulators. In fact, statistical analyses did not revealed any difference between all groups (**Fig. 3A**; $F(5,23) = 0.20$, $P > 0.05$). Levels of phosphorylated ERK1/2 and Akt proteins were also investigated by Western blot in order to assess adaptive response to neuronal activation. We observed that in addition to total ERK1/2 and total Akt, levels of phospho-Thr202-ERK1 (**Fig. 3B**; $F(5,23) = 1.62$,

$P > 0.05$) and phospho-Thr308-Akt (**Fig. 3C**; $F(5,23) = 1.69$, $P > 0.05$) were not altered by the different treatments.

S1PRs modulators reduced MPTP-induced astrogliosis and microgliosis in the SNc

Because MPTP injections were associated with signs of inflammation in the striatum, we next examined astrocytic and microglial activation in the two major midbrain DAergic centers, the SNc and VTA, using immunofluorescence technique. The inflammatory markers of astrocytic and microglial activation were, respectively, GFAP and Iba-1. We observed the occurrence of faint immunostaining of Iba-1 positive microglia and GFAP positive astrocytes in the SNc of vehicle-treated mice (**Fig. 4A**). However, in the SNc of MPTP-treated mice, an augmentation in the staining of Iba-1 as well as GFAP were observed, phenotypes known to be reminiscent of reactive microglia and astrocytes, respectively (**Fig. 4A**). FTY720 and SEW2871 were able to prevent the occurrence of microgliosis and astrocytosis as the staining of Iba-1 and GFAP were similar to vehicle-treated mice (**Fig. 4A**). In order to quantify these observations, we performed semi-quantitative optical densitometry measurements in the SNc and VTA of mice treated with MPTP and S1PR modulators. These analyses confirmed our qualitative observations and revealed that FTY720 and SEW2871 treatments prevented the robust increase of Iba-1 (**Fig. 4B**; $F_{(5,23)} = 48.66$, $P < 0.001$) and GFAP (**Fig. 4D**; $F_{(5,23)} = 11.43$, $P < 0.001$) staining in the SNc of mice after MPTP treatments. No effect of FTY720 and SEW2871 treatments alone were noticed in the SNc and no signs of reactive microglia (**Fig. 4C**; $F_{(5,23)} = 0.24$, $P > 0.05$) or astrocytes (**Fig. 4E**; $F_{(5,23)} = 0.19$, $P > 0.05$) were observed in the VTA following the different treatments.

S1PRs modulators protects against MPTP-induced nigrostriatal cellular loss

The extent of MPTP-induced midbrain DAergic denervation was estimated by immunofluorescence techniques using two independent antibodies, one raised against the neuronal marker NeuN and the second raised against TH. This rate-limiting enzyme for DA synthesis is widely used as a marker of dopaminergic depletion (Chagniel *et al.* 2012).

In the SNc of MPTP-treated mice, our stereological method revealed a reduction in TH immunopositive cells that was totally prevented by the SEW2871 and FTY720 treatments (**Fig. 5B**; $F_{(5,23)} = 5.31$, $P < 0.01$). In contrast, no effect of either MPTP, SEW2871 or FTY720 administration was observed on TH immunopositive cells of the VTA (**Fig. 5C**; $F_{(5,23)} = 0.13$, $P > 0.05$). These data were replicated using the NeuN marker in the SNc (**Fig. 5D**; $F_{(5,23)} = 3.57$, $P < 0.05$) and the VTA (**Fig. 5E**; $F_{(5,23)} = 0.15$, $P > 0.05$).

In addition to the VTA and SNc, we also investigated the detrimental effects of MPTP on striatal dopamine terminals by using Western blot analysis. Two well-known markers of DA neuron terminals were employed and robust decreases in TH (**Fig. 6A**; $F_{(5,23)} = 5.92$, $P < 0.001$) and DAT (**Fig. 6B**; $F_{(5,23)} = 3.98$, $P < 0.01$) levels were observed after MPTP injections. SEW2871 and FTY720 administrations were both able to prevent this effect of MPTP (**Fig. 6A and 6B**).

Motor abilities were preserved with FTY720 and SEW2871 administrations

To assess the effect of treatments on motor abilities, we performed two behavioral tests, namely the pole and beam tests. In particular, the pole test estimated bradykinesia and motor coordination whereas the beam test analyzed skilled walking and overall coordination. It is noteworthy that mice were pre-trained in order to remove the learning variables associated to these tests. We observed that while SEW2871 or FTY720 treatments alone were without effects on motor behaviors, they prevented the MPTP-induced motor deficits in all tasks. We observed impaired performances of MPTP treated mice at the pole test (**Fig. 7A**; $F_{(5,23)} = 3.47$, $P < 0.05$) as well as an increase in the time taken to go across the beam (**Fig. 7B**; $F_{(5,23)} = 2.81$, $P < 0.05$) and in the number of stepping errors at the beam test (**Fig. 7C**; $F_{(5,23)} = 13.48$, $P < 0.001$). The time required to perform the pole test and the beam test, as well as the average foot-faults were returning to control values when MPTP mice received either SEW2871 or FTY720 administrations. Note that statistical significance was not reached for the time required to perform the beam test in both groups.

Discussion

The present study demonstrates that oral treatments with FTY720 and SEW2871 provide protection against loss of dopaminergic neurons and motor deficits in a mouse model of PD. In addition to PD, FTY720 was known to exert several beneficial pharmacological effects on central nervous system (CNS) cells contributing to the treatment of various neuropathological conditions, such as stroke (Brunkhorst *et al.* 2014), Huntington's (Di Pardo *et al.* 2014) and Alzheimer's diseases (AD) (Martin and Sospedra 2014). However, this study is the first to demonstrate such CNS positive outcomes for the S1P1R-selective agonist SEW2871. In addition, we provide evidence that FTY720 and SEW2871 treatments have the capacity to fully prevent activation of astrocytes and glial cells, as well as increase BDNF levels in regions of the brain involved in the control of motor functions. Our findings propose that drugs acting via the S1P1R have the capacity to attenuate neuroinflammation and provide neuroprotection to the detrimental effects of MPTP treatments.

At this point it is important to point out that the MPTP treatment (5 days, 30 mg/kg, once daily) used in this mouse study is a well validated model and that the results obtained in our experiments are in line with previous observations (Jackson-Lewis *et al.* 2012; Wang *et al.* 2015). The loss of nigrostriatal DA neurons is parallel by a robust increase of glial and astrocyte reactivity in the SNc and striatum, in addition to impaired motor behavior. It is interesting that no alteration at the levels of phosphorylated ERK and Akt in the striatum, two markers of molecular adaptations of striatal spiny projection neurons, are observed after MPTP treatments. This finding was somewhat expected as variation in the activity of these striatal kinases is associated with high DA depletion; observed for instance in unilateral 6-OHDA treated mice (Zhao *et al.* 2017) or more severe MPTP mouse model (Motyl *et al.* 2018). In our study, the degree of DA depletion is of 50%, as evaluated by TH levels in the striatum of MPTP mice, which is reminiscent a mild DA-depletion.

Treatments with FTY720 and SEW2871 did not alter the levels of phosphorylated ERK or Akt in the striatum of MPTP treated mice. In model cell lines transfected with the S1P1R subtype, the natural ligand S1P, FTY720 and SEW2871 appear to activate ERK and Akt pathways (Jo *et al.* 2005). In mouse models of PD, two recent studies have respectively reported that FTY720 increases levels of p-ERK or p-Akt in the striatum of 6-OHDA or MPTP treated mice (Zhao *et al.* 2017; Motyl *et al.* 2018). Again, the mild DA depletion in our MPTP mice may be responsible for the divergence with previous findings. However, we believe that this particular question would necessitate further research as only few studies have addressed this topic and the effect of SEW2871 is not assessed *in vivo* or in the context of PD. It is however clear from our data that activation of ERK and Akt pathways would play a minor role in the beneficial effects of FTY720 and SEW2871 on DA neuronal survival and neuroinflammation. On the other hand, both treatments have the capacity to prevent the reduction of BDNF levels observed in the striatum of MPTP mice. The link between FTY720, increased BDNF levels and neuroprotection has been well described in cell cultured and animal models of Rett syndrome (Deogracias *et al.* 2012), HD (Miguez *et al.* 2015), AD (Doi *et al.* 2013; Fukumoto *et al.* 2014) and PD (Giasson *et al.* 2002). For instance, in cultured neurons, FTY720 increases BDNF levels and counteracts NMDA-induced neuronal death in a BDNF-dependent manner (Di Menna *et al.* 2013; Cipriani *et al.* 2015).

One striking original finding in our study is the demonstration that SEW2871 and FTY720 prevent the occurrence of neuroinflammation associated with MPTP treatments in mice. In particular, we establish that the SEW2871 and FTY720 treatments have the capacity to prevent in totality the robust increase in GFAP and TNF- α expression levels in the striatum as well as the increased expression of GFAP and Iba-1 of the SNc observed in the MPTP treated mice. While the mechanism of action is still unclear, some multiple sclerosis studies performed *in vitro* and in animal models have demonstrated that FTY720 reduced microglia mediated inflammation and also diminished astrocyte activation in association to the neuronal protection (O'Sullivan *et al.* 2018; Choi *et al.* 2011; Rothhammer *et al.* 2017; Miguez *et al.* 2015). Whether the ongoing astrogliosis and microgliosis in the brain of our MPTP treated mice is responsible for the DA neuronal

loss is unknown, this question is still under extensive debate in PD field (Kaur *et al.* 2017). However, in the VTA, a region where no effect of the MPTP treatment on DA neurons is noticed, no signs of astrogliosis or microgliosis are observed. This is at least one evidence showing that neuroinflammation is selectively detected in brain regions where neuronal death is observed (Mosharov *et al.* 2009). Our data support a new role for S1P1R agonists in mediating anti-inflammatory effects in the MPTP mouse model of PD.

Despite that our study raised the interesting possibility that prevention of neuroinflammation and striatal BDNF levels recovery, rather than striatal Akt and ERK signaling modulation, are responsible for the neuroprotective effects of FTY720 and SEW2871 in the MPTP mouse model, the exact target mechanisms remain to be determined. For instance, we cannot exclude that brain inflammation could rely on peripheral mechanisms. Yang *et al.*, (2018) demonstrate that lymphocyte infiltration contributes to brain neurodegeneration in the MPTP mouse model. On that line and, given the ability of FTY720 and SEW2871 to produce lymphopenia (Sanna *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2005), we cannot exclude that the neuroprotection we observed from these drugs in the MPTP-treated mice is dependent on reduced neuroinflammatory processes subsequent to peripheral mechanisms. Of course, the precise contributions of central and peripheral mechanisms to the benefit of FTY720 and SEW2871 in PD pathology warrants further investigations.

Our results show that similar beneficial effects observed with either SEW2871 or FTY720 treatments in the MPTP mouse model of PD suggest a crucial role for the subtype 1 of S1PRs. The specificity of SEW2871 to bind to S1P1R is undeniably well recognized (Bolick *et al.* 2005; Blaho and Hla 2014). On the other hand, FTY720 is less selective to that particular S1PR. FTY720 need to be phosphorylated *in vivo* by sphingosine kinase-2 to form the active moiety FTY720-phosphate known to bind subtypes -1, -3, -4, and -5 (Brinkmann *et al.* 2002; Soliven *et al.* 2011). At the exception of S1PR4, all S1PRs subtypes are expressed in the central nervous system and S1P1R and 3 levels are substantially high in the brain (MacLennan *et al.* 1994; Zhang *et al.* 1999). Interestingly, S1P1R is located on astrocytes, oligodendrocytes, microglial and neuronal cells

throughout the brain, including region of the brain associated with the control of motor function (Aktas *et al.* 2010; Chae *et al.* 2004). For instance, our finding confirmed SIP1R protein expression in the striatum structure. Whether SIP1R is exclusively responsible for the neuroprotection we report using SEW2871 or FTY720 treatments is undetermined, but some evidence are supporting this contention in the literature. For instance, the role of SIP1R in the beneficial action of FTY720 is reported in animal models of stroke and PD (Dev *et al.* 2008; Imeri *et al.* 2014; Hasegawa *et al.* 2010; Sun *et al.* 2016; Zhao *et al.* 2017; Motyl *et al.* 2018; Brunkhorst *et al.* 2014). These studies all demonstrate that the effect of FTY720 is largely mediated by the SIP1R.

Consistent with other investigations, we observed that FTY720 could exert beneficial effects in PD mouse model (Zhao *et al.* 2017; Motyl *et al.* 2018). This drug has been shown to exert several pharmacological effects on CNS cells which may contribute to the treatment of various neuropathological conditions, such as stroke (Brunkhorst *et al.* 2014) Huntington's (Di Pardo *et al.* 2014) and AD (Martin and Sospedra 2014). In that line, it was recently found to reduce the density of pathological plaques and decreased the number of pro-inflammatory cells in animal models of AD (Aytan *et al.* 2016; Fukumoto *et al.* 2014). Unfortunately, both in vitro and in vivo experiments have demonstrated that FTY720, accumulating above a certain threshold in the brain, becomes less effective (Aytan *et al.* 2016) and even neurotoxic (van Echten-Deckert *et al.* 2014). In fact, studies have documented the possibility that FTY720 can alter normal brain physiology via a mechanism involving hyperphosphorylation of Tau proteins (Attiori Essis *et al.* 2015).

In conclusion, we observed that pharmacological targeting of SIP1R with the specific agonist SEW2871 conferred strong resistance to MPTP-induced DA depletion, inflammation processes and motor dysfunctions. From a clinical perspective, it seems thus plausible that selective activation of SIP1R by SEW2871 (or other chemical analogs) might be more effective and probably safer, knowing that this drug is not prone to induce Tau hyperphosphorylation (St-Cyr Giguere *et al.* 2017). In addition, many adverse events, including hypertension, macular edema, pulmonary toxicity, and hepatotoxicity, have been associated with FTY720, because of its off-target interactions with other SIPRs

subtypes, particularly with S1P3R. The activation of S1P3R by FTY720 was at least partially responsible for its side effects on the cardiovascular system and organ fibrosis, which may cause prominent safety issues (Cohen and Chun 2011). Several drugs acting more selectively on S1PRs subtypes have been developed in recent years (Guerrero *et al.* 2016) and future experimentation are required to test for their efficiencies and safety in the context of PD.

Fundings and disclosure

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant #2017-06411). É.P is the holder of a Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) studentship.

References

- Aktas, O., P. Kury, B. Kieseier and H. P. Hartung (2010). "Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis." Nat Rev Neurol 6(7): 373-382.
- Attiori Essis, S., M. E. Laurier-Laurin, E. Pepin, M. Cyr and G. Massicotte (2015). "GluN2B-containing NMDA receptors are upregulated in plasma membranes by the sphingosine-1-phosphate analog FTY720P." Brain Res 1624: 349-358.
- Aytan, N., J. K. Choi, I. Carreras, V. Brinkmann, N. W. Kowall, B. G. Jenkins and A. Dedeoglu (2016). "Fingolimod modulates multiple neuroinflammatory markers in a mouse model of Alzheimer's disease." Sci Rep 6: 24939.
- Bergeron, Y., G. Bureau, M. E. Laurier-Laurin, E. Asselin, G. Massicotte and M. Cyr (2017). "Genetic Deletion of Akt3 Induces an Endophenotype Reminiscent of Psychiatric Manifestations in Mice." Front Mol Neurosci 10: 102.
- Blaho, V. A. and T. Hla (2014). "An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors." J Lipid Res 55(8): 1596-1608.
- Bolick, D. T., S. Srinivasan, K. W. Kim, M. E. Hatley, J. J. Clemens, A. Whetzel, N. Ferger, T. L. Macdonald, M. D. Davis, P. S. Tsao, K. R. Lynch and C. C. Hedrick (2005). "Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor- α -mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol 25(5): 976-981.
- Brinkmann, V., M. D. Davis, C. E. Heise, R. Albert, S. Cottens, R. Hof, C. Bruns, E. Prieschl, T. Baumruker, P. Hiestand, C. A. Foster, M. Zollinger and K. R. Lynch (2002). "The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors." J Biol Chem 277(24): 21453-21457.

Brunkhorst, R., R. Vutukuri and W. Pfeilschifter (2014). "Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives." Front Cell Neurosci 8: 283.

Calabrese, F., A. C. Rossetti, G. Racagni, P. Gass, M. A. Riva and R. Molteni (2014). "Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity." Front Cell Neurosci 8: 430.

Chae, S. S., R. L. Proia and T. Hla (2004). "Constitutive expression of the S1P1 receptor in adult tissues." Prostaglandins Other Lipid Mediat 73(1-2): 141-150.

Chagniel, L., Y. Bergeron, G. Bureau, G. Massicotte and M. Cyr (2016). "Correction: Regulation of Tyrosine Phosphatase STEP61 by Protein Kinase A during Motor Skill Learning in Mice." PLoS One 11(3): e0150220.

Chagniel, L., C. Robitaille, C. Lacharite-Mueller, G. Bureau and M. Cyr (2012). "Partial dopamine depletion in MPTP-treated mice differentially altered motor skill learning and action control." Behav Brain Res 228(1): 9-15.

Choi, J. W., S. E. Gardell, D. R. Herr, R. Rivera, C. W. Lee, K. Noguchi, S. T. Teo, Y. C. Yung, M. Lu, G. Kennedy and J. Chun (2011). "FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation." Proc Natl Acad Sci U S A 108(2): 751-756.

Cipriani, R., J. C. Chara, A. Rodriguez-Antiguedad and C. Matute (2015). "FTY720 attenuates excitotoxicity and neuroinflammation." J Neuroinflammation 12: 86.

Cohen, J. A. and J. Chun (2011). "Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis." Ann Neurol 69(5): 759-777.

Deogracias, R., M. Yazdani, M. P. Dekkers, J. Guy, M. C. Ionescu, K. E. Vogt and Y. A. Barde (2012). "Fingolimod, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, increases

BDNF levels and improves symptoms of a mouse model of Rett syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A 109(35): 14230-14235.

Dev, K. K., F. Mullershausen, H. Mattes, R. R. Kuhn, G. Bilbe, D. Hoyer and A. Mir (2008). "Brain sphingosine-1-phosphate receptors: implication for FTY720 in the treatment of multiple sclerosis." Pharmacol Ther 117(1): 77-93.

Di Menna, L., G. Molinaro, L. Di Nuzzo, B. Rizzo, C. Zappulla, C. Pozzilli, R. Turrini, F. Caraci, A. Copani, G. Battaglia, F. Nicoletti and V. Bruno (2013). "Fingolimod protects cultured cortical neurons against excitotoxic death." Pharmacol Res 67(1): 1-9.

Di Pardo, A., E. Amico, M. Favellato, R. Castrataro, S. Fucile, F. Squitieri and V. Maglione (2014). "FTY720 (fingolimod) is a neuroprotective and disease-modifying agent in cellular and mouse models of Huntington disease." Hum Mol Genet 23(9): 2251-2265.

Doi, Y., H. Takeuchi, H. Horiuchi, T. Hanyu, J. Kawanokuchi, S. Jin, B. Parajuli, Y. Sonobe, T. Mizuno and A. Suzumura (2013). "Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid beta-induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons." PLoS One 8(4): e61988.

Dong, J., H. Wang, G. Wu, J. Zhao, L. Zhang, L. Zuo, W. Zhu, J. Gong, Y. Li, L. Gu and J. Li (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(1): 94-101.

Fukumoto, K., H. Mizoguchi, H. Takeuchi, H. Horiuchi, J. Kawanokuchi, S. Jin, T. Mizuno and A. Suzumura (2014). "Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid beta-induced memory impairment." Behav Brain Res 268: 88-93.

Giasson, B. I., J. E. Duda, S. M. Quinn, B. Zhang, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2002). "Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein." Neuron 34(4): 521-533.

Guerrero, M., M. Urbano and E. Roberts (2016). "Sphingosine 1-phosphate receptor 1 agonists: a patent review (2013-2015)." Expert Opin Ther Pat 26(4): 455-470.

Hasegawa, Y., H. Suzuki, T. Sozen, W. Rolland and J. H. Zhang (2010). "Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats." Stroke 41(2): 368-374.

Hou, H., R. Cao, J. Miao, Y. Sun, X. Liu, X. Song and L. Guo (2016). "Fingolimod ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting Akt-mTOR axis in mice." Int Immunopharmacol 30: 171-178.

Imeri, F., D. Fallegger, A. Zivkovic, S. Schwalm, G. Enzmann, K. Blankenbach, D. Meyer zu Heringdorf, T. Homann, B. Kleuser, J. Pfeilschifter, B. Engelhardt, H. Stark and A. Huwiler (2014). "Novel oxazolo-oxazole derivatives of FTY720 reduce endothelial cell permeability, immune cell chemotaxis and symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice." Neuropharmacology 85: 314-327.

Jackson-Lewis, V., J. Blesa and S. Przedborski (2012). "Animal models of Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord 18 Suppl 1: S183-185.

Jo, E., M. G. Sanna, P. J. Gonzalez-Cabrera, S. Thangada, G. Tigyi, D. A. Osborne, T. Hla, A. L. Parrill and H. Rosen (2005). "S1P1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate." Chem Biol 12(6): 703-715.

Kaur, K., J. S. Gill, P. K. Bansal and R. Deshmukh (2017). "Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease." J Neurol Sci 381: 308-314.

MacLennan, A. J., C. S. Browe, A. A. Gaskin, D. C. Lado and G. Shaw (1994). "Cloning and characterization of a putative G-protein coupled receptor potentially involved in development." Mol Cell Neurosci 5(3): 201-209.

Martin, R. and M. Sospedra (2014). "Sphingosine-1 phosphate and central nervous system." Curr Top Microbiol Immunol 378: 149-170.

Miguez, A., G. Garcia-Diaz Barriga, V. Brito, M. Straccia, A. Giralt, S. Gines, J. M. Canals and J. Alberch (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(17): 4958-4970.

Morris, M.A., D.R. Gibb, F. Picard, V. Brinkmann, M. Straume, and K. Ley K (2005) "Transient T cell accumulation in lymph nodes and sustained lymphopenia in mice treated with FTY720." Eur J Immunol 35(12): 3570-80

Mosharov, E. V., K. E. Larsen, E. Kanter, K. A. Phillips, K. Wilson, Y. Schmitz, D. E. Krantz, K. Kobayashi, R. H. Edwards and D. Sulzer (2009). "Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons." Neuron 62(2): 218-229.

Motyl, J., L. Przykaza, P. M. Boguszewski, P. Kosson and J. B. Strosznajder (2018). "Pramipexole and Fingolimod exert neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease by activation of sphingosine kinase 1 and Akt kinase." Neuropharmacology 135: 139-150.

Nagatsu, T. and M. Sawada (2007). "Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects." J Neural Transm Suppl(72): 113-120.

O'Sullivan, S. A., C. O'Sullivan, L. M. Healy, K. K. Dev and G. K. Sheridan (2018). "Sphingosine 1-phosphate receptors regulate TLR4-induced CXCL5 release from astrocytes and microglia." J Neurochem 144(6): 736-747.

Rothhammer, V., J. E. Kenison, E. Tjon, M. C. Takenaka, K. A. de Lima, D. M. Borucki, C. C. Chao, A. Wilz, M. Blain, L. Healy, J. Antel and F. J. Quintana (2017). "Sphingosine 1-phosphate receptor modulation suppresses pathogenic astrocyte activation and chronic progressive CNS inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A 114(8): 2012-2017.

Sanna, M.G., J. Liao, E. Jo, C. Alfonso, M.Y. Ahn, M.S. Peterson, B. Webb, S. Lefebvre, J. Chun, N. Gray, and H. Rosen (2004). "Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. " J Biol Chem 279(14):13839-13848

Shen, T., Y. You, C. Joseph, M. Mirzaei, A. Klistorner, S. L. Graham and V. Gupta (2018). "BDNF Polymorphism: A Review of Its Diagnostic and Clinical Relevance in Neurodegenerative Disorders." Aging Dis 9(3): 523-536.

Soliven, B., V. Miron and J. Chun (2011). "The neurobiology of sphingosine 1-phosphate signaling and sphingosine 1-phosphate receptor modulators." Neurology 76(8 Suppl 3): S9-14.

St-Cyr Giguere, F., S. Attiori Essis, L. Chagniel, M. Germain, M. Cyr and G. Massicotte (2017). "The sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist SEW2871 reduces Tau-Ser262 phosphorylation in rat hippocampal slices." Brain Res 1658: 51-59.

Sun, N., Y. Shen, W. Han, K. Shi, K. Wood, Y. Fu, J. Hao, Q. Liu, K. N. Sheth, D. Huang and F. D. Shi (2016). "Selective Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Modulation Attenuates Experimental Intracerebral Hemorrhage." Stroke 47(7): 1899-1906.

van Echten-Deckert, G., N. Hagen-Euteneuer, I. Karaca and J. Walter (2014). "Sphingosine-1-phosphate: boon and bane for the brain." Cell Physiol Biochem 34(1): 148-157.

Wang, Q., Y. Liu and J. Zhou (2015). "Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target." Transl Neurodegener 4: 19.

Xiao-Feng, L., Z. Wen-Ting, X. Yuan-Yuan, L. Chong-Fa, Z. Lu, R. Jin-Jun and W. Wen-Ya (2016). "Protective role of 6-Hydroxy-1-H-Indazole in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease." Eur J Pharmacol 791: 348-354.

Yang X., H. Ren, K. Wood, M. Li, S. Qiu, F.D. Shi, C. Ma, and Q. Liu (2018). "Depletion of microglia augments the dopaminergic neurotoxicity of MPTP." FASEB J. 32(6): 3336-3345.

Yazdi, A., H. Baharvand and M. Javan (2015). "Enhanced remyelination following lysolecithin-induced demyelination in mice under treatment with fingolimod (FTY720)." Neuroscience 311: 34-44.

Zhang, L., H. Wang, J. Zhu, K. Ding and J. Xu (2014). "FTY720 reduces migration and invasion of human glioblastoma cell lines via inhibiting the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K signaling pathway." Tumour Biol 35(11): 10707-10714.

Zhang, Q., O. Peyruchaud, K. J. French, M. K. Magnusson and D. F. Mosher (1999). "Sphingosine 1-phosphate stimulates fibronectin matrix assembly through a Rho-dependent signal pathway." Blood 93(9): 2984-2990.

Zhao, P., X. Yang, L. Yang, M. Li, K. Wood, Q. Liu and X. Zhu (2017). "Neuroprotective effects of fingolimod in mouse models of Parkinson's disease." FASEB J 31(1): 172-179.

Figure legends

Fig. 1. Experimental design. Three days before MPTP injections, mice were pre-trained at the pole and beam tests by completing three trials within a day. Two days before MPTP injections, mice received an oral treatment with either vehicle (10% DMSO and 25% Tween 20 v/v dissolved in saline 0.9% sodium chloride), FTY720 (1 mg/kg) or SEW2871 (20 mg/kg) once a day for a total of 14 days. At day 0, saline or MPTP (30 mg/kg/day) treatments were administered i.p. during 5 days. Motor abilities at the pole and beam tests were evaluated 8 days after the first MPTP injections. On day 11, all mice were sacrificed. The experimental setting involved 6 groups: (1) Vehicle with saline treatments, $n = 3$; (2) FTY720 with saline treatments, $n = 3$; (3) SEW2871 with saline treatments, $n = 3$; (4) Vehicle with MPTP treatments, $n = 5$; (5) FTY720 with MPTP treatments, $n = 5$; (6) SEW2871 with MPTP treatments, $n = 5$.

Fig. 2. Levels of inflammatory markers are affected in the striatum. Levels of GFAP (A), TNF- α (B) and BDNF (C) were assessed by Western blot in the striatum of mice. The data, expressed relative to GAPDH, represent the mean of relative optical density in triplicate experiments of GFAP, TNF- α and BDNF (expressed as a percentage of control values) \pm S.E.M., $n = 3-5$ mice/group. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. Vehicle + saline; $\#p < 0.05$, $##p < 0.01$ vs. Vehicle + MPTP.

Fig. 3. Levels of neuronal activity markers were unaltered in the striatum. Protein levels were evaluated by Western blotting with proteins extracted (30-40 μ g of protein) from the mouse striatum. Levels of S1P1R (A), phospho-Thr202-ERK1 (B) and phospho-Thr308-Akt (C) were determined. GAPDH was used as loading control. Data represent the mean of relative optical density in triplicate experiments of S1P1R, phospho-Thr202-ERK1 and phospho-Thr308-Akt (expressed as a percentage of control values) \pm S.E.M. Values are respectively expressed relative to GAPDH, total ERK and total Akt, $n = 3-5$ mice/group.

Fig. 4. Signs of astrogliosis and microgliosis induced by MPTP are prevented by S1P1R modulators. (A) Representative examples of Iba-1 immunoreactive microglia (panel a1 to a4; red color), GFAP-positive astrocytes (panel a5 to a8; red color) and TH-positive neurons (panel a1 to a8; green color) using epifluorescence microscope (40X objective) in the mouse SNc. Bar equals 50 μ m. Fluorescence intensity of Iba-1 and GFAP were measured in the SNc (B, D) as well as in the VTA (C, E). The data represent the mean of Iba-1 and GFAP relative optical density (expressed as a percentage of control values) \pm S.E.M., $n = 3-5$ mice/group. *** $p < 0.001$ vs. Vehicle + saline; ### $p < 0.001$ vs. Vehicle + MPTP.

Fig. 5. S1PR modulators protect against MPTP-induced SNc cellular loss. Representative examples of TH-immunostaining (green) in mouse midbrain coronal sections (-3.16 mm from the Bregma). Bar equals 100 μ m (A). Stereological counts of TH- and NeuN-positive neurons in the SNc (B, D) and VTA (C, E). The data represent the mean of TH- and NeuN-positive cell numbers/mm³ (expressed as a percentage of control values) \pm S.E.M., $n = 3-5$ mice/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehicle + saline; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Vehicle + MPTP.

Fig. 6. Dopamine terminals were spared in the striatum following S1P1Rs modulators treatments. Levels of TH (A) and DAT (B) were determined in the mouse striatum by Western blot experiments. The data, expressed relative to GAPDH, represent the mean of relative optical density in triplicate experiments of TH and DAT (expressed as a percentage of control values) \pm S.E.M., $n = 3-5$ mice/group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Vehicle + saline; ## $p < 0.01$ vs. Vehicle + MPTP.

Fig. 7. Motor behavioral outcomes. Motor abilities on the pole and beam tests were evaluated. Data represent the mean time require to perform the pole (A) and beam (B) tests and the mean number of foot-faults occurring during the beam test (C) \pm S.E.M., $n = 3-5$ mice/group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. Vehicle + saline; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. Vehicle + MPTP.

Figures

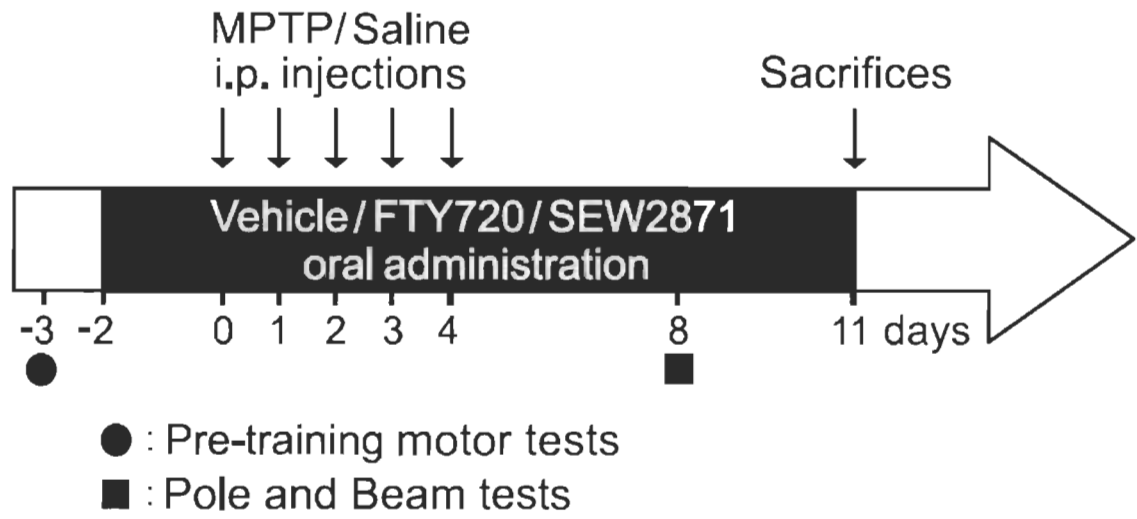


Figure 1

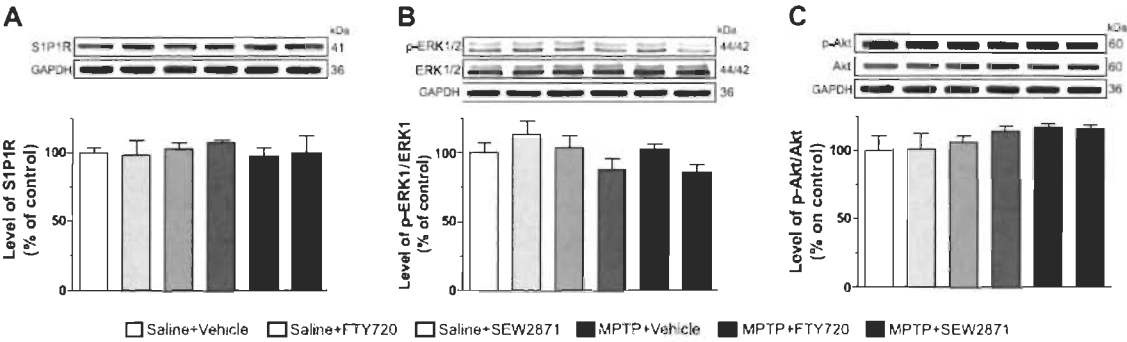


Figure 2

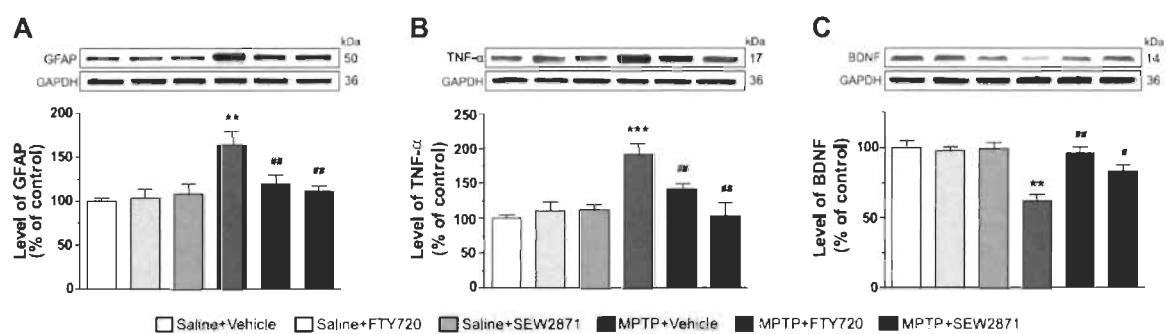


Figure 3

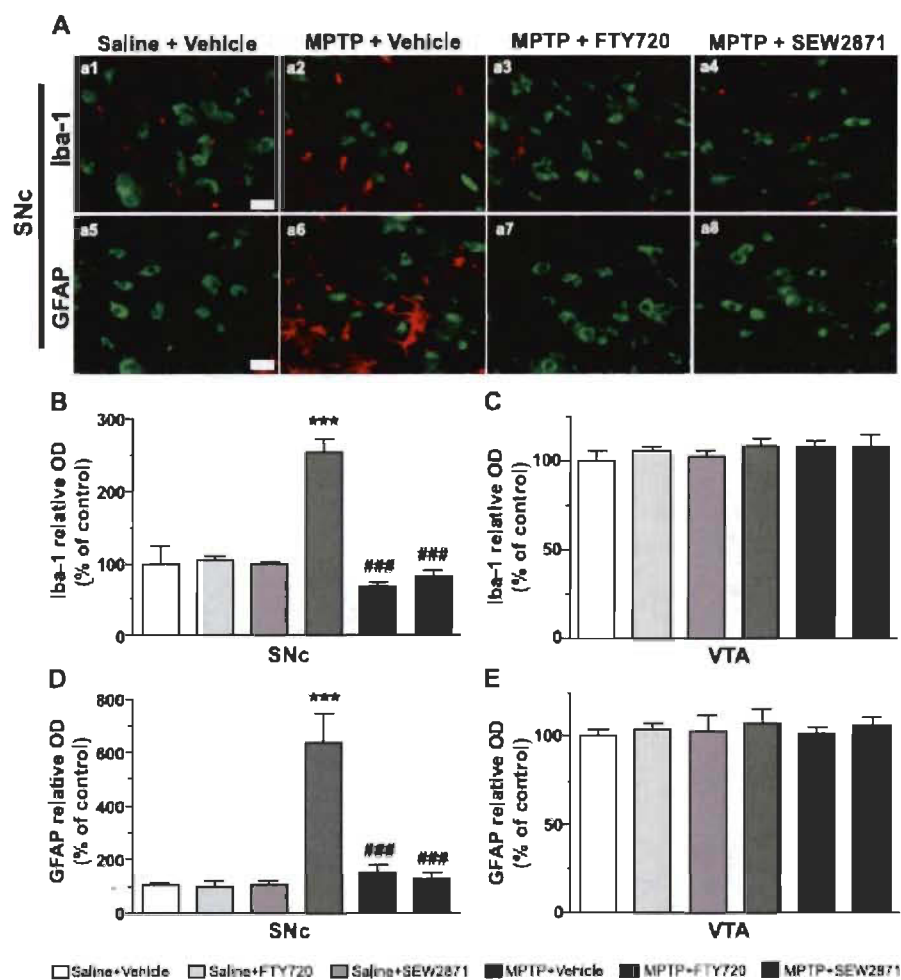


Figure 4

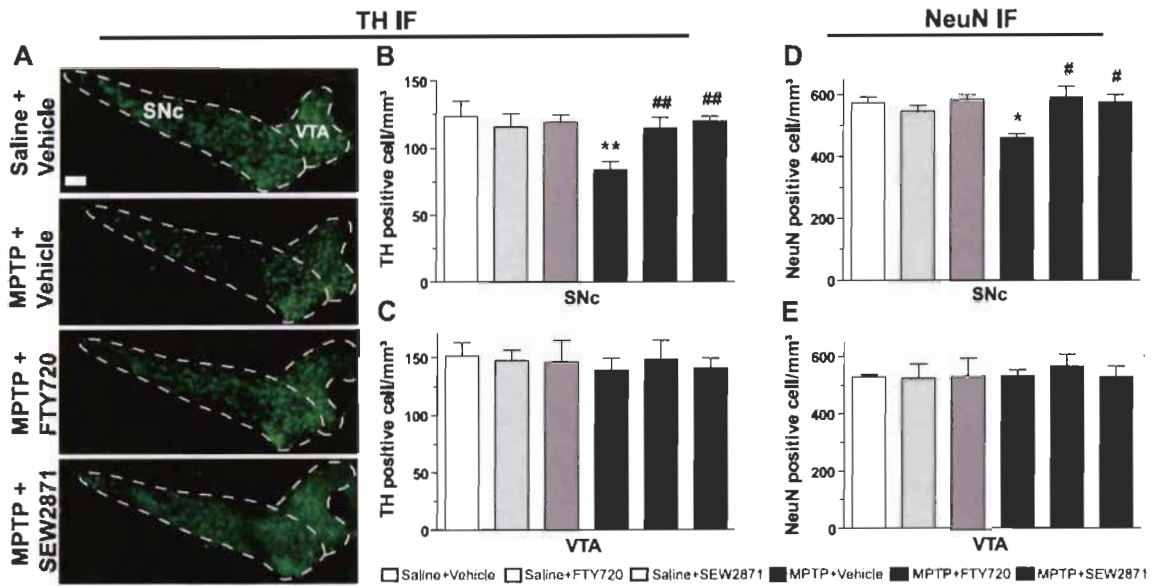


Figure 5

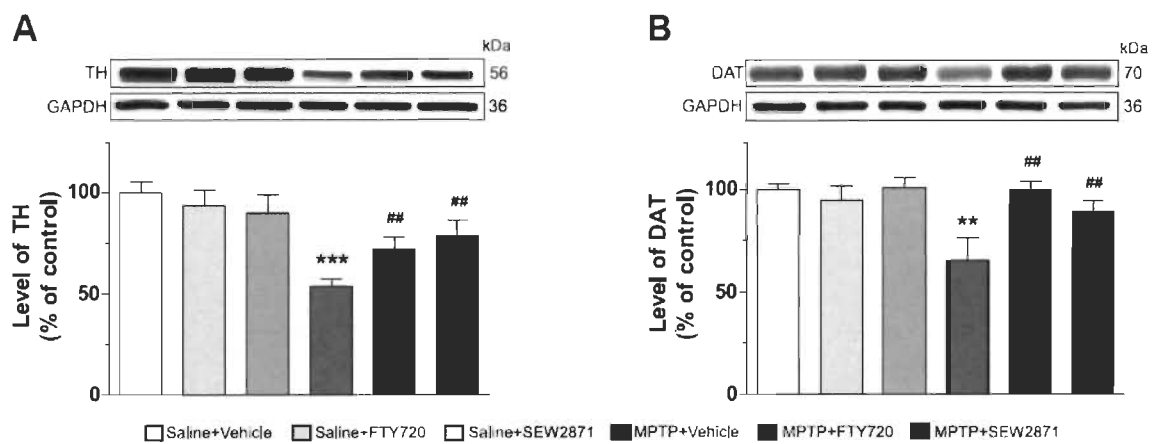


Figure 6

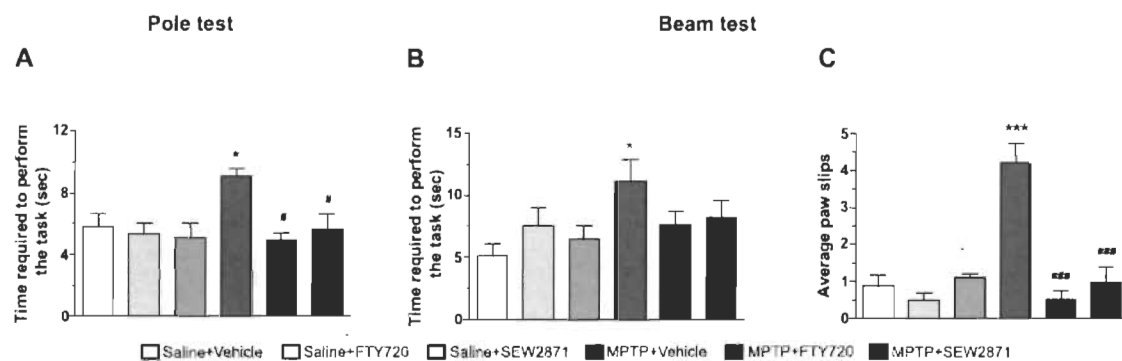


Figure 7

CHAPITRE IV

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux de recherche présentés dans cet ouvrage se sont intéressés à l'implication des S1PRs dans la pharmacothérapie de la MP. Plus particulièrement, ces travaux démontrent qu'un traitement oral avec le FTY720 et le SEW2871 est à même d'empêcher la mort des neurones dopaminergiques et les troubles moteurs qui y sont associés, dans un modèle murin de la MP induit pharmacologiquement par la neurotoxine MPTP. Ces travaux ont été présentés sous forme d'article scientifique au chapitre III.

4.1 Analogues de la S1P et la neuroinflammation

Une formidable découverte découlant de notre étude est la démonstration que le SEW2871 et le FTY720 inhibent la neuroinflammation associée aux injections du MPTP. Plus particulièrement, nous avons établi que les deux traitements sont à même de prévenir en entier l'augmentation des niveaux d'expression de GFAP et TNF- α au striatum des souris MPTP. Des études *in vitro* et *in vivo* dans un modèle animal modélisant la SEP ont aussi montré que le FTY720 réduit l'inflammation induite par l'activation des cellules gliales, avec pour résultante, une protection neuronale (Choi *et al.* 2011; Rothhammer *et al.* 2017; O'Sullivan *et al.* 2018). Toutefois, les mécanismes sous-jacents à ces effets restent à découvrir.

À titre d'exemple, nous ne pouvons exclure la possibilité que l'inflammation présente au cerveau puisse provenir de certains mécanismes induits par la périphérie. En effet, une équipe a démontré que l'infiltration des lymphocytes au SNC contribue grandement à la neurodégénération dans le modèle MPTP (Yang *et al.* 2018). De plus, le MPTP est reconnu pour altérer l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Garcia-

Dominguez *et al.* 2018), permettant ainsi l'invasion par la périphérie. Nous le savons, le FTY720 et le SEW2871 sont reconnus pour induire une lymphopénie (Sanna *et al.* 2004; Morris *et al.* 2005). De ce fait, il se peut que la neuroprotection observée dans nos souris MPTP via l'administration de nos deux agonistes soit en fait dépendante de l'activité anti-inflammatoire exercée sur la périphérie. De toute évidence, la contribution du SNC et de la périphérie au bénéfice du FTY720 et du SEW2871 dans un contexte parkinsonien nécessite davantage d'investigations.

Il est important de mentionner que notre régime d'administration du MPTP (30 mg/kg, i.p. pendant 5 jours) chez la souris reproduit les résultats expérimentaux retrouvés dans la littérature (Jackson-Lewis *et al.* 2012). En parallèle à la perte des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée, nous observons des signes connus pour être associés à une activation des cellules gliales de la SNc et du striatum, en plus de l'altération du comportement moteur chez l'animal. Étant de nature très lipophile, le MPTP passe aisément la barrière hémato-encéphalique et a ainsi l'avantage de ne pas activer les cellules gliales par injection directe ou par manipulation mécanique du SNC (Machado *et al.* 2016). Dans la cadre de nos travaux, nous suggérons donc que le MPTP est un modèle d'étude supérieure au modèle 6-OHDA, car cette dernière toxine doit être injectée directement dans le SNC des rongeurs et est ainsi susceptible d'enclencher directement les processus inflammatoires.

4.2 Modulation du facteur neurotrophique BDNF

Les facteurs neurotrophiques comme le BDNF, sont des protéines très importantes pour le cerveau sécrétées par les neurones eux-mêmes, leur territoire d'innervation ou des cellules extraneuronales. Elles régulent la croissance, la prolifération et la différenciation des cellules nerveuses et sont ainsi essentielles au développement du système nerveux dans son ensemble, ainsi qu'au maintien des fonctions cérébrales (Machado *et al.* 2016). Ces propriétés ont rapidement intéressé les équipes de recherche travaillant sur la MP,

même si elle ne s'explique pas, à priori, par un déficit d'un facteur neurotrophique spécifique (Obeso *et al.* 2017).

Les mécanismes régulateurs en réponse au FTY720 commencent à être élucidés 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 BDNF serait rapidement augmentée dans l'hippocampe à la suite d'un traitement au FTY720 (Fukumoto *et al.* 2014). Fait intéressant, une panoplie d'études conduisent à établir une relation entre le BDNF, la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Durany *et al.* 2000; Giasson *et al.* 2002; O'Bryant *et al.* 2009; Doi *et al.* 2013; Honea *et al.* 2013; Fukumoto *et al.* 2014). 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 FTY720 sur les récepteurs NMDA impliquent l'activation des récepteurs du facteur neurotrophique (Di Menna *et al.* 2013; Cipriani *et al.* 2015). 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. De plus, le BDNF est un modulateur critique impliqué dans le développement optimal du cerveau ainsi qu'à la survie neuronale du système dopaminergique. D'ailleurs, son potentiel neuroprotecteur dans la MP est à l'étude depuis plusieurs années. Afin d'explorer cette corrélation, certaines études ont démontré que la concentration en BDNF chute dans le sérum des patients parkinsoniens (Scalzo *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2019). L'expression de son ARN messager diminue également dans la SNc des patients (Howells *et al.* 2000). Or, dans notre modèle, l'administration en continu du FTY720 et du SEW2871 a permis de prévenir la réduction des niveaux de BDNF observée dans le striatum des souris MPTP. Le mécanisme sous-jacent à ce résultat nous est toutefois méconnu.

Nous venons de le voir, la réduction de la synthèse du BDNF est une caractéristique importante associée à la pathogenèse de la MP (Shen *et al.* 2018). En support à cette théorie, plusieurs études proposent que cette déplétion se produisant dans une variété de conditions neuropathologiques soit en fait médiée par la relâche intensive de cytokines pro-inflammatoires (Calabrese *et al.* 2014). Considérant la contribution positive du BDNF au SNC en contraste aux effets néfastes des molécules pro-inflammatoires, il est plausible d'imaginer que l'inflammation affecte les fonctions cérébrales via la modulation négative des niveaux de BDNF. Plusieurs études *in vivo* ont démontré que l'inflammation altère clairement l'expression de BDNF au cerveau. Plus particulièrement, il a été rapporté que l'administration de la toxine lipopolysaccharide (LPS), connue pour activer les cellules gliales, cause une réduction significative de l'expression du gène de BDNF. À titre d'exemple, les niveaux d'ARN messager sont réduits dans l'hippocampe d'un rat 4h après l'injection intrapéritonéale du LPS (Lapchak *et al.* 1993). Une réduction similaire est aussi observée au niveau protéique dans les régions corticales (Guan and Fang 2006; Schnydrig *et al.* 2007). Néanmoins, il y a un manque critique d'information concernant les effets de l'inflammation sur l'expression de BDNF et davantage d'études seront nécessaires afin de clarifier les mécanismes par lesquels le système immunitaire est en mesure de moduler les facteurs neurotrophiques comme le BDNF.

4.3 Analogues de la S1P et la microglie

La microglie possède deux états : M1 (pro-inflammatoire) ou M2 (anti-inflammatoire), selon la nature du stimulus. Dans l'état M1, les cellules se multiplient intensément et développent une activité phagocytaire élevée ainsi qu'une capacité migratoire dans le SNC : cette activation implique que la microglie réagit à la lésion ou à l'infection via l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de messagers chimiques du système immunitaire, comme le $\text{TNF-}\alpha$, et de chimiokines provoquant l'infiltration de leucocytes périphériques dans le but d'éliminer l'agent pathogène en question. Dans l'état M2, il se produit exactement l'inverse. Il y a production de cytokines anti-inflammatoires

qui facilitent la phagocytose des déchets cellulaires et favorisent la reconstruction de la matrice extracellulaire ainsi que la réparation des tissus (McGeer and McGeer 2008; Liu *et al.* 2011; Hirsch *et al.* 2012; Machado *et al.* 2016).

Sur ce plan, nous avons mis en évidence le niveau d'activation de la microglie par le marquage de Iba-1 dans la SNc des animaux traités au MPTP. Plus particulièrement, nous avons établi que nos deux traitements sont en mesure d'inhiber cet important processus inflammatoire. Au niveau biochimique, il aurait été intéressant d'étudier les effets de nos molécules sur les deux états de la microglie (M1 ou M2) et d'ainsi spéculer qu'un traitement chronique pourrait favoriser, par exemple, la transition vers une microglie à potentiel anti-inflammatoire (M2).

Malheureusement, il est encore à ce jour méconnu si les réactions inflammatoires observées chez un patient parkinsonien ou dans nos souris MPTP sont responsables de la mort des neurones dopaminergiques (Kaur *et al.* 2017). Nous avons étudié la spécificité de l'effet potentiel du FTY720 et du SEW2871 sur l'activité gliale de la substance noire en la comparant à une région normalement épargnée par la MP, le VTA. Nos résultats montrent qu'au VTA, région où l'intégrité des corps cellulaires dopaminergiques est demeurée intacte, aucun signe de microgliose ou d'astrocytose n'a été observé. De fait, nos résultats sont en concordance avec la littérature et nous mettons en évidence que la neuroinflammation est détectée spécifiquement dans les régions où il y a présence de mort neuronale (Mosharov *et al.* 2009). Nos recherches supportent le nouveau rôle des agonistes des S1PRs dans la médiation de leurs effets anti-inflammatoires sur le modèle MPTP de la MP.

4.4 La neuroprotection

On sait depuis fort longtemps que la physiopathologie de la MP trouve son origine dans la disparition progressive des neurones dopaminergiques de la SNc et de leurs projections vers le striatum (Carlsson *et al.* 1957; Carlsson 1959; Ehringer and

Hornykiewicz 1960). L'évaluation de l'intégrité des neurones dopaminergiques chez les souris MPTP est possible via la mesure de TH et DAT. De fait, en utilisant la microscopie par épifluorescence, nous observons dans la SNc des souris MPTP traitées avec les analogues de la S1P, le même nombre de neurones dopaminergiques que les souris contrôles. Au striatum, les niveaux d'expression de TH et DAT de ces mêmes souris sont à des niveaux basaux, démontrant l'effet neuroprotecteur du FTY720 et du SEW2871. Il est à mentionner que la diminution des niveaux protéiques de TH et DAT à la suite de l'injection du MPTP a tendance à être réversible chez les souris (Ho and Blum 1998; Mitsumoto *et al.* 1998; Bezard *et al.* 2000; Jakowec *et al.* 2004). En effet, chez les souris C57BL/6j, l'analyse du marquage de la TH en fonction du temps à la suite de l'injection du MPTP montre qu'au niveau de la SNc, la perte des neurones immunoréactifs pour la TH est équivalente à la perte neuronale sept jours après l'injection de MPTP. Cette équivalence reste stable jusqu'à 30 jours après l'injection (Jackson-Lewis *et al.* 1995). Au niveau du striatum, l'expression de TH et DAT mesurée par western blot augmente 30 jours après l'injection de la toxine. Bien que la TH et le DAT soient des marqueurs des neurones dopaminergiques, ces résultats mettent en évidence que leur marquage n'est pas nécessairement équivalent à la perte des neurones (Jackson-Lewis *et al.* 1995; Jakowec and Petzinger 2004).

Nous l'avons vu, l'activité fonctionnelle du sous-type 1 des S1PRs dépend du couplage spécifique et exclusif à la protéine Gi, qui par la suite est en mesure de réguler une pléiade d'effecteurs cellulaires. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés, entre autres, aux kinases Erk et Akt (Proia and Hla 2015). L'activation de Erk est reconnue comme étant un facteur clé dans la survie cellulaire via l'augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Hasegawa *et al.* 2010; Deogracias *et al.* 2012). De ce fait, la modulation de Erk pourrait alors contrer l'apoptose survenant à la suite de l'exposition des neurones dopaminergiques au MPTP (Zhao *et al.* 2017). En ce qui a trait à Akt, cette kinase est responsable de la phosphorylation de protéines associées à la régulation de la prolifération, migration et survie cellulaire (Motyl and Strosznajder 2018). Une réduction de son activité pourrait moduler à la baisse les cascades de signalisation nécessaires à la survie cellulaire dans la MP, alors que les composés connus

pour maintenir son activité à un niveau optimal seraient susceptibles d'être neuroprotecteurs (Manning and Cantley 2007). En effet, une diminution de l'expression d'Akt a été retrouvée dans la SNc de patients parkinsoniens et de souris MPTP (Timmons *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2016). Il est important de se rappeler qu'Akt est un effecteur direct de l'activation du S1P1R et S1P3R et participe également à la régulation de la synthèse de BDNF (Deogracias *et al.* 2012). En somme, la signalisation des S1PRs est largement dépendante de l'activité de Erk et Akt et nous croyons qu'il est primordial d'étudier leur activité chez la souris MPTP, en plus d'être deux excellents marqueurs d'adaptation moléculaire des neurones épineux du striatum.

Bien que des études *in vitro* et *in vivo* démontrent le contraire, c'est encore controversé. En effet, une variation dans l'activité de ERK et Akt semble être majoritairement associée à une forte déplétion en dopamine, retrouvée par exemple dans le modèle de souris 6-OHDA (Zhao *et al.* 2017) ou dans un régime d'administration plus sévère du MPTP (Motyl and Strosznajder 2018). À la suite de la mesure des niveaux de TH au striatum des souris MPTP, nous observons l'équivalent d'une déplétion de 50 % en dopamine. Nous suggérons que cette perte correspond davantage à un stade précoce de la maladie et pourrait expliquer pourquoi l'activité des deux kinases reste inchangée. Aussi, les traitements seuls au FTY720 et au SEW2871 n'ont pas altéré les niveaux de ERK et Akt au striatum des souris. En culture de cellules, la S1P, SEW2871 et FTY720 ont modulé l'activité des kinases (Jo *et al.* 2005). Dans un modèle murin de la MP, deux études récentes ont respectivement démontré que le FTY720 augmentait les niveaux de p-ERK et Akt au striatum de souris 6-OHDA ou traitées au MPTP (Zhao *et al.* 2017; Motyl and Strosznajder 2018). Nos niveaux de déplétion pourraient être responsables de la divergence observée avec les autres études. Étant donné que peu d'études ont adressé cette question et que les effets du SEW2871 n'ont jamais été observés dans un contexte parkinsonien, nous croyons que cette question nécessite davantage d'investigations. Toutefois, nos résultats suggèrent que l'activation de ERK et Akt n'influence pas les effets obtenus sur la protection des neurones dopaminergiques et la neuroinflammation.

Cette présente étude est la première à démontrer les effets pharmacologiques de l'agoniste sélectif des S1P1R, le SEW2871. De plus, nous suggérons qu'un traitement chronique au SEW2871 et au FTY720 a la capacité de prévenir entièrement l'activation des astrocytes et des cellules de la microglie ainsi que d'augmenter les niveaux de BDNF dans les régions du cerveau impliquées au niveau des fonctions motrices. Nous proposons que via l'activation du S1P1R, nos composés sont en mesure d'atténuer la neuroinflammation et de protéger les neurones contre les ravages du MPTP. Nous observons des effets bénéfiques similaires entre le SEW2871 et le FTY720 chez la souris MPTP, suggérant un rôle crucial pour le sous-type 1 des S1PRs. La spécificité avec laquelle se lie le SEW2871 au S1P1R est indéniable (Bolick *et al.* 2005; Blaho and Hla 2014). Le FTY720 a besoin d'être phosphorylé *in vivo* par la SPHK afin de produire sa forme active, le FTY720-P, capable de se lier au sous-type 1, 3, 4 et 5 (Brinkmann *et al.* 2002; Soliven *et al.* 2011). À l'exception du S1P4R, tous les autres récepteurs sont exprimés au CNS. D'ailleurs, le S1P1R et S1P3R sont majoritairement retrouvés au cerveau (MacLennan *et al.* 1994; Zhang *et al.* 1999). Fait intéressant, le S1P1R est localisé au niveau des astrocytes, oligodendrocytes, cellules microgliales et neuronales (Figure 1.8 p.31) incluant les régions associées au contrôle moteur (Chae *et al.* 2004; Aktas *et al.* 2010). Par exemple, nos résultats confirment que le S1P1R est bien exprimé au striatum. Toutefois, il reste encore à déterminer si la neuroprotection observée via l'administration du SEW2871 ou du FTY720 provient exclusivement de l'activation du S1P1R. Dans la littérature, quelques études ont démontré que c'était effectivement le cas, à la suite de l'utilisation du FTY720 dans un contexte d'ischémie et parkinsonien (Dev *et al.* 2008; Hasegawa *et al.* 2010; Brunkhorst *et al.* 2014; Imeri *et al.* 2014; Sun *et al.* 2016; Zhao *et al.* 2017; Motyl and Strosznajder 2018).

En accord avec d'autres investigations, nous observons que le FTY720 serait en mesure d'exercer des effets pharmacologiques potentiels dans un modèle animal de la MP (Zhao *et al.* 2017; Motyl and Strosznajder 2018). D'ailleurs, cette drogue a contribué au traitement d'une variété de conditions neuropathologiques au CNS, comme l'ischémie (Brunkhorst *et al.* 2014), la maladie d'Huntington (Di Pardo *et al.* 2014) et la maladie d'Alzheimer (Martin and Sospedra 2014). Sur ce plan, il a été récemment publié que le

FTY720 réduirait l'expression de molécules pro-inflammation dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer (Aytan *et al.* 2016). Nous devons toutefois considérer les effets secondaires associés à ce traitement. En effet, des expérimentations *in vitro* et *in vivo* suggèrent qu'en trop grande concentration au cerveau, le FTY720 serait moins efficace (Aytan *et al.* 2016) et même neurotoxique (van Echten-Deckert *et al.* 2014). Un des mécanismes pouvant être associé à ces effets indésirables serait possiblement l'implication de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau au cerveau (Attiori Essis *et al.* 2015). Nous supportons l'idée que de cibler pharmacologiquement le S1PR avec l'agoniste spécifique SEW2871, permet de contrer la toxicité du MPTP, la neuroinflammation et les dysfonctions motrices. D'un point de vue clinique, il semble donc possible d'imaginer que l'activation sélective du S1PR par le SEW2871, ou autres analogues, pourraient être plus efficace et plus sécuritaire, sachant que ce composé ne semble pas affecter la phosphorylation de Tau (St-Cyr Giguere *et al.* 2017). De plus, plusieurs effets indésirables du FTY720 sur le système cardiovasculaire par exemple, sont liés à son interaction avec le S1P3R (Cohen and Chun 2011). Plusieurs composés agissant de manière plus spécifique sur les différents sous-types de S1PRs ont été développés dans les dernières années (Guerrero *et al.* 2016) et de futures investigations sont requises dans l'optique de tester leur efficacité et la sécurité associée à leur administration dans le contexte de la MP.

Plusieurs évidences expérimentales ont démontré que l'effet thérapeutique du FTY720 est en partie dû à sa capacité de passer la barrière hémato-encéphalique. Toutefois, dû au manque d'étude sur le sujet, il nous est actuellement impossible de savoir si le SEW2871 pénètre au cerveau après une administration orale. Étant donné que les effets bénéfiques rapportés du SEW2871 sont similaires à ceux du FTY720 dans notre étude, il est raisonnable de spéculer que les deux drogues agissent via l'activation du S1PR1 au cerveau. De plus, ces interprétations seraient en accord avec une étude où lorsqu'administré de façon intrapéritonéale pour une période de deux semaines, le SEW2871 atténuerait la mort neuronale retrouvée dans l'hippocampe et la perte de mémoire associée au test du *Morris water maze* chez le rat (Asle-Rousta *et al.* 2013). Sur ce plan, les injections intrapéritonéales du SEW2871 ont également réussi à diminuer le

volume d'un infarctus après l'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne chez le rat (Hasegawa *et al.* 2010). De fait, nos résultats sont en parallèle avec la littérature et supportent l'idée que le SEW2871 agit directement sur les S1PR1 exprimés au niveau des cellules neuronales pour produire son effet neuroprotecteur.

En plus de recevoir des innervations glutamatergiques et dopaminergiques, le striatum intègre des connexions de plusieurs autres systèmes de neurotransmission qui peuvent aussi moduler son fonctionnement. En effet, les systèmes sérotoninergiques (Rylander 2012; Miguelez *et al.* 2014), cholinergiques (Muller and Bohnen 2013; Lim *et al.* 2014), noradrénergique (Brichta *et al.* 2013; Huot *et al.* 2013), adénosinergique (Brichta *et al.* 2013; Huot *et al.* 2013), endocannabinoïde (Di Filippo *et al.* 2008; Lovinger and Mathur 2012) et opioïde (Brichta *et al.* 2013; Huot *et al.* 2013) influencent également le fonctionnement du striatum associé à la fonction motrice. Nous ne pouvons donc exclure l'implication des autres systèmes dans l'effet neuroprotecteur de nos molécules au striatum. De plus, il nous est impossible ici d'émettre une hypothèse sur l'effet du MPTP sur ces différents systèmes et comment ces effets peuvent moduler nos résultats au niveau biochimique et comportemental.

4.5 Le potentiel des analogues de la S1P sur le plan locomoteur

Finalement, il convient de s'interroger sur les bénéfices comportementaux des analogues de la S1P avant de conclure un quelconque espoir thérapeutique des molécules étudiées. Pour évaluer cette possibilité, nous avons d'abord entraîné les souris à effectuer différentes tâches motrices avant de leur administrer la toxine MPTP. À la fin du protocole, nous avons apprécié la capacité du FTY720 et du SEW2871 à freiner le développement des anomalies motrices. De ce fait, la coordination motrice et la bradykinésie ont été étudiées via le *pole* test, le *wire* test a mesuré la force musculaire et la coordination des souris (non montré), le *beam* test a étudié la rapidité d'exécution ainsi que la coordination, puis le rotarod accéléré a permis de mesurer la motricité fine des

souris (non montré) (Chagniel *et al.* 2016; Bergeron *et al.* 2017). C'est connu, l'augmentation de l'expression de la TH peut provenir de la capacité des neurones restants à augmenter la synthèse de l'enzyme ou à régénérer spontanément des axones (Jakowec *et al.* 2004). Toutefois, afin que nos résultats ne soient pas biaisés par l'augmentation de l'expression de TH observée à la suite de l'administration du MPTP, les tests comportementaux ont été réalisés quatre jours suivant la dernière injection de la toxine, c'est-à-dire lorsque la perte des neurones est établie et qu'il n'y a plus d'effet sur la périphérie ce qui amène normalement des effets secondaires susceptibles d'affecter la performance motrice. De plus, les souris ont été sacrifiées sept jours après la dernière injection du MPTP, ce qui laisse le temps d'atteindre une déplétion optimale.

Des études démontrent que la perte d'innervation dopaminergique au niveau du striatum chez l'humain et le rongeur affecte les processus d'apprentissage et la mémorisation d'une tâche motrice (Harrington *et al.* 1990; Doyon *et al.* 1997; Doyon *et al.* 1998; Krebs *et al.* 2001; Carbon and Eidelberg 2006; Siegert *et al.* 2006; Muslimovic *et al.* 2007; Chagniel *et al.* 2012). Plus particulièrement, des études précédemment faites au laboratoire mettent en évidence que seulement une faible afférence dopaminergique est suffisante pour permettre l'apprentissage des habiletés motrices. En effet, l'apprentissage moteur est affecté lorsque les niveaux de TH, un marqueur des neurones dopaminergique, sont diminués de plus de 80 % dans le striatum (Chagniel *et al.* 2012). Le fait que les troubles d'apprentissage apparaissent seulement en présence d'une forte déplétion dopaminergique pourrait s'expliquer par la mise en place de mécanismes de compensation. Il a été montré que la perte des neurones dopaminergiques est associée à l'élaboration de mécanismes adaptatifs afin de pallier le manque de dopamine (Zigmond *et al.* 1990; Zigmond 1997; Bezard and Gross 1998; Pifl and Hornykiewicz 2006). La diminution de l'expression et de l'affinité du DAT permettant d'augmenter la disponibilité extracellulaire en dopamine (Lee *et al.* 2000; Sossi *et al.* 2007; Sossi *et al.* 2009; Afonso-Oamas *et al.* 2010) est un exemple de mécanismes adaptatifs retrouvés chez les patients parkinsoniens et les rongeurs modèles de la MP. Chagniel et son équipe montrent que la perte d'afférence dopaminergique est à même d'affecter l'apprentissage et la mémorisation d'une tâche motrice sans toutefois induire de sévères pertes motrices. Enfin,

leurs résultats suggèrent que les souris MPTP ayant une perte de 80 % et plus en TH ont des difficultés d'apprentissage et de mémorisation, mais pas de problèmes de capacité motrice (Chagniel *et al.* 2012).

Nos résultats montrent une perte de la TH d'environ 50 % au striatum ainsi que 30 % de mort des neurones dopaminergiques dans la SNc de nos souris MPTP. Dans cette présente étude, il nous est impossible de spéculer au sujet de l'effet du MPTP sur l'apprentissage moteur étant donné que la toxicité a été induite une fois les tâches bien mémorisées. Toutefois, il est intéressant de constater qu'avec des niveaux de déplétion simulant un stade précoce de la maladie (30 % et 50 %), nous avons été en mesure de détecter des anomalies motrices via le *beam* test. Plus particulièrement, nous démontrons que les souris MPTP ont tendance à faire beaucoup plus d'erreurs en traversant le *beam* et que leur vitesse d'exécution est plus lente que celle des souris contrôles. En ce qui a trait aux autres tests, aucun trouble moteur n'a été détecté. Dans ce contexte, il se pourrait que le *beam* soit un test moins sensible, permettant d'observer un trouble à un niveau précoce de la maladie ou bien qu'à ce niveau de déplétion, seulement cet aspect de la capacité motrice est altéré. De plus, les tests utilisés ne mettent peut-être pas en évidence l'altération de la performance motrice. En effet, même si la perte en dopamine induite par ce dosage spécifique du MPTP chez la souris est bien connue pour induire des troubles de motricité fine et de la difficulté à initier volontairement le mouvement (Katila *et al.* 2017; Xu *et al.* 2017), c'est extrêmement délicat de capter ces anomalies dues à la sensibilité et à la finesse des tests de performance. Nous pouvons toutefois apprécier la capacité de nos deux analogues à empêcher le développement de trouble moteur.

4.6 Conclusion et perspectives thérapeutiques

Il n'existe encore aucun traitement permettant de guérir la MP ou d'en freiner sa progression. À mesure que le taux de dopamine baisse, des tremblements peuvent se manifester, les mouvements des muscles deviennent plus lents et plus rigides, et les réflexes sont altérés, ce qui contribue à une perte d'équilibre. Les autres symptômes

peuvent inclure de la dépression, de l'anxiété, des changements émotionnels, une déficience cognitive, de la difficulté à avaler, à mâcher et à parler, l'expression figée du visage, des problèmes urinaires, de la constipation, de la fatigue et des troubles du sommeil. Éventuellement, cette personne ne pourra plus s'occuper d'elle-même et elle devra donc être prise en charge par ses pairs.

Rappelons que la maladie de Parkinson fait partie des formes de démences les plus connues. Selon Parkinson Canada, elle n'est pas une étape normale du vieillissement, mais son incidence augmente bel et bien avec l'âge. Chaque jour, 25 personnes reçoivent un diagnostic de la MP. De toutes les personnes chez qui cette affection est diagnostiquée, 85 % ont plus de 65 ans. Entre 2011 et 2031, le nombre de Canadiens atteints de cette maladie devrait doubler, il serait alors de plus de 163 700 personnes. La MP arrive au troisième rang des maladies ayant les coûts directs associés aux soins de santé les plus élevés par années (120 358 000 \$), tout juste après l'épilepsie (208 679 000 \$), ainsi que la maladie d'Alzheimer et autres démences (527 494 000 \$). Les personnes atteintes sont celles qui utilisent le plus de médicaments d'ordonnance par rapport aux autres pathologies neurologiques couvertes dans l'Étude nationale de la santé des populations relative aux maladies neurologiques.

Sur le plan thérapeutique, il n'existe malheureusement aucun traitement curatif s'attaquant au processus neurodégénératif des patients parkinsoniens. Toutefois, un espoir apparaît dans une direction plutôt inattendue, à savoir l'utilisation d'une nouvelle molécule appelée SEW2871, qui (1) augmente la quantité de molécules BDNF ayant le pouvoir de régénérer le cerveau, (2) évite le développement de troubles de la motricité et (3) prévient la dégénérescence neuronale. De plus, nos travaux suggèrent que c'est l'activation sélective des récepteurs de type 1 de la S1P, un médiateur lipidique bioactif, qui serait à l'origine des effets bénéfiques du SEW2871 et du FTY720. De fait, les observations effectuées dans le cadre du présent travail expérimental laissent envisager qu'un traitement préventif par ces deux composés pourraient freiner les ravages neuronaux observés dans la MP. Une histoire à suivre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdullah, R., I. Basak, K. S. Patil, G. Alves, J. P. Larsen and S. G. Moller (2015). "Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link." Exp Gerontol **68**: 33-38.

Afonso-Oramas, D., I. Cruz-Muros, P. Barroso-Chinea, D. Alvarez de la Rosa, J. Castro-Hernandez, J. Salas-Hernandez, T. Giraldez and T. Gonzalez-Hernandez (2010). "The dopamine transporter is differentially regulated after dopaminergic lesion." Neurobiol Dis **40**(3): 518-530.

Aktas, O., P. Kury, B. Kieseier and H. P. Hartung (2010). "Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis." Nat Rev Neurol **6**(7): 373-382.

Antzoulatos, E., M. W. Jakowec, G. M. Petzinger and R. I. Wood (2010). "Sex differences in motor behavior in the MPTP mouse model of Parkinson's disease." Pharmacol Biochem Behav **95**(4): 466-472.

Aoki, M., H. Aoki, R. Ramanathan, N. C. Hait and K. Takabe (2016). "Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential." Mediators Inflamm **2016**: 8606878.

Asle-Rousta, M., S. Oryan, A. Ahmadiani and M. Rahnema (2013). "Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by SEW2871 improves cognitive function in Alzheimer's disease model rats." EXCLI J **12**: 449-461.

Attiori Essis, S., M. E. Laurier-Laurin, E. Pepin, M. Cyr and G. Massicotte (2015). "GluN2B-containing NMDA receptors are upregulated in plasma membranes by the sphingosine-1-phosphate analog FTY720P." Brain Res **1624**: 349-358.

Aytan, N., J. K. Choi, I. Carreras, V. Brinkmann, N. W. Kowall, B. G. Jenkins and A. Dedeoglu (2016). "Fingolimod modulates multiple neuroinflammatory markers in a mouse model of Alzheimer's disease." Sci Rep **6**: 24939.

Bartke, N. and Y. A. Hannun (2009). "Bioactive sphingolipids: metabolism and function." J Lipid Res **50 Suppl**: S91-96.

Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." Pharmacol Rev **63**(1): 182-217.

Bergeron, Y., G. Bureau, M. E. Laurier-Laurin, E. Asselin, G. Massicotte and M. Cyr (2017). "Genetic Deletion of Akt3 Induces an Endophenotype Reminiscent of Psychiatric Manifestations in Mice." Front Mol Neurosci **10**: 102.

Bertran-Gonzalez, J., C. Bosch, M. Maroteaux, M. Matamales, D. Herve, E. Valjent and J. A. Girault (2008). "Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol." J Neurosci **28**(22): 5671-5685.

Bezard, E., S. Dovero, C. Imbert, T. Boraud and C. E. Gross (2000). "Spontaneous long-term compensatory dopaminergic sprouting in MPTP-treated mice." Synapse **38**(3): 363-368.

Bezard, E. and C. E. Gross (1998). "Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach." Prog Neurobiol **55**(2): 93-116.

Blaho, V. A. and T. Hla (2014). "An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors." J Lipid Res **55**(8): 1596-1608.

Blandini, F. and M. T. Armentero (2012). "Animal models of Parkinson's disease." FEBS J **279**(7): 1156-1166.

Blesa, J., S. Phani, V. Jackson-Lewis and S. Przedborski (2012). "Classic and new animal models of Parkinson's disease." J Biomed Biotechnol **2012**: 845618.

Blesa, J. and S. Przedborski (2014). "Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability." Front Neuroanat **8**: 155.

Block, M. L. and J. S. Hong (2007). "Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1127-1132.

Blum, D., S. Torch, N. Lambeng, M. Nissou, A. L. Benabid, R. Sadoul and J. M. Verna (2001). "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease." Prog Neurobiol **65**(2): 135-172.

Bolick, D. T., S. Srinivasan, K. W. Kim, M. E. Hatley, J. J. Clemens, A. Whetzel, N. Ferger, T. L. Macdonald, M. D. Davis, P. S. Tsao, K. R. Lynch and C. C. Hedrick (2005). "Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor- α -mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(5): 976-981.

Bourdain, F., M. Tir and J. M. Trocello (2013). "[Parkinsonian disorders: from clinical manifestations to diagnostic classification]." Rev Med Interne **34**(9): 528-537.

Bove, J., D. Prou, C. Perier and S. Przedborski (2005). "Toxin-induced models of Parkinson's disease." NeuroRx **2**(3): 484-494.

Braak, H., E. Ghebremedhin, U. Rub, H. Bratzke and K. Del Tredici (2004). "Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology." Cell Tissue Res **318**(1): 121-134.

Brichta, L., P. Greengard and M. Flajolet (2013). "Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems." Trends Neurosci **36**(9): 543-554.

Brinkmann, T., O. Daumke, U. Herbrand, D. Kuhlmann, P. Stege, M. R. Ahmadian and A. Wittinghofer (2002). "Rap-specific GTPase activating protein follows an alternative mechanism." J Biol Chem **277**(15): 12525-12531.

Brinkmann, V., A. Billich, T. Baumruker, P. Heining, R. Schmouder, G. Francis, S. Aradhye and P. Burtin (2010). "Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis." Nat Rev Drug Discov **9**(11): 883-897.

Brunkhorst, R., R. Vutukuri and W. Pfeilschifter (2014). "Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives." Front Cell Neurosci **8**: 283.

Calabrese, F., A. C. Rossetti, G. Racagni, P. Gass, M. A. Riva and R. Molteni (2014). "Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity." Front Cell Neurosci **8**: 430.

Caldeira, M. V., C. V. Melo, D. B. Pereira, R. F. Carvalho, A. L. Carvalho and C. B. Duarte (2007). "BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons." Mol Cell Neurosci **35**(2): 208-219.

Camprubi-Robles, M., N. Mair, M. Andratsch, C. Benetti, D. Beroukas, R. Rukwied, M. Langeslag, R. L. Proia, M. Schmelz, A. V. Ferrer Montiel, R. V. Haberberger and M. Kress (2013). "Sphingosine-1-phosphate-induced nociceptor excitation and ongoing pain behavior in mice and humans is largely mediated by S1P3 receptor." J Neurosci **33**(6): 2582-2592.

Carbon, M. and D. Eidelberg (2006). "Functional imaging of sequence learning in Parkinson's disease." J Neurol Sci **248**(1-2): 72-77.

Carlsson, A. (1959). "The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system." Pharmacol Rev **11**(2, Part 2): 490-493.

Carlsson, A., M. Lindqvist and T. Magnusson (1957). "3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists." Nature **180**(4596): 1200.

Cavone, L., R. Felici, A. Lapucci, D. Buonvicino, S. Pratesi, M. Muzzi, B. Hakiki, L. Maggi, B. Peruzzi, R. Caporale, F. Annunziato, M. P. Amato and A. Chiarugi (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., M. B. Delisle and O. Cuvillier (2014). "[Sphingosine 1-phosphate as a biomarker for Alzheimer's disease?]." Med Sci (Paris) **30**(5): 493-495.

- Cenci, M. A. (2007). "Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia." Trends Neurosci **30**(5): 236-243.
- Chae, S. S., R. L. Proia and T. Hla (2004). "Constitutive expression of the S1P1 receptor in adult tissues." Prostaglandins Other Lipid Mediat **73**(1-2): 141-150.
- Chagniel, L., Y. Bergeron, G. Bureau, G. Massicotte and M. Cyr (2016). "Correction: Regulation of Tyrosine Phosphatase STEP61 by Protein Kinase A during Motor Skill Learning in Mice." PLoS One **11**(3): e0150220.
- Chagniel, L., C. Robitaille, C. Lacharite-Mueller, G. Bureau and M. Cyr (2012). "Partial dopamine depletion in MPTP-treated mice differentially altered motor skill learning and action control." Behav Brain Res **228**(1): 9-15.
- Chen, J. J. and D. M. Swope (2007). "Pharmacotherapy for Parkinson's disease." Pharmacotherapy **27**(12 Pt 2): 161S-173S.
- Chi, H. (2011). "Sphingosine-1-phosphate and immune regulation: trafficking and beyond." Trends Pharmacol Sci **32**(1): 16-24.
- Chiba, K. and K. Adachi (2012). "Discovery of fingolimod, the sphingosine 1-phosphate receptor modulator and its application for the therapy of multiple sclerosis." Future Med Chem **4**(6): 771-781.
- Choi, J. W., S. E. Gardell, D. R. Herr, R. Rivera, C. W. Lee, K. Noguchi, S. T. Teo, Y. C. Yung, M. Lu, G. Kennedy and J. Chun (2011). "FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(2): 751-756.
- Chun, J. and H. P. Hartung (2010). "Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis." Clin Neuropharmacol **33**(2): 91-101.
- Cipriani, R., J. C. Chara, A. Rodriguez-Antiguedad and C. Matute (2015). "FTY720 attenuates excitotoxicity and neuroinflammation." J Neuroinflammation **12**: 86.
- Cohen, J. A. and J. Chun (2011). "Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis." Ann Neurol **69**(5): 759-777.
- Collingridge, G. (1987). "Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory." Nature **330**(6149): 604-605.
- Corbit, L. H., P. H. Janak and B. W. Balleine (2007). "General and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer: the effect of shifts in motivational state and inactivation of the ventral tegmental area." Eur J Neurosci **26**(11): 3141-3149.

Czubowicz, K., H. Jesko, P. Wencel, W. J. Lukiw and R. P. Strosznajder (2019). "The Role of Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders." Mol Neurobiol.

Davis, G. C., A. C. Williams, S. P. Markey, M. H. Ebert, E. D. Caine, C. M. Reichert and I. J. Kopin (1979). "Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues." Psychiatry Res **1**(3): 249-254.

de Lau, L. M. and M. M. Breteler (2006). "Epidemiology of Parkinson's disease." Lancet Neurol **5**(6): 525-535.

Deogracias, R., M. Yazdani, M. P. Dekkers, J. Guy, M. C. Ionescu, K. E. Vogt and Y. A. Barde (2012). "Fingolimod, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, increases BDNF levels and improves symptoms of a mouse model of Rett syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(35): 14230-14235.

Dev, K. K., F. Mullershausen, H. Mattes, R. R. Kuhn, G. Bilbe, D. Hoyer and A. Mir (2008). "Brain sphingosine-1-phosphate receptors: implication for FTY720 in the treatment of multiple sclerosis." Pharmacol Ther **117**(1): 77-93.

Di Filippo, M., B. Picconi, A. Tozzi, V. Ghiglieri, A. Rossi and P. Calabresi (2008). "The endocannabinoid system in Parkinson's disease." Curr Pharm Des **14**(23): 2337-2347.

Di Menna, L., G. Molinaro, L. Di Nuzzo, B. Riozzi, C. Zappulla, C. Pozzilli, R. Turrini, F. Caraci, A. Copani, G. Battaglia, F. Nicoletti and V. Bruno (2013). "Fingolimod protects cultured cortical neurons against excitotoxic death." Pharmacol Res **67**(1): 1-9.

Di Pardo, A., E. Amico, M. Favellato, R. Castrataro, S. Fucile, F. Squitieri and V. Maglione (2014). "FTY720 (fingolimod) is a neuroprotective and disease-modifying agent in cellular and mouse models of Huntington disease." Hum Mol Genet **23**(9): 2251-2265.

Doi, Y., H. Takeuchi, H. Horiuchi, T. Hanyu, J. Kawanokuchi, S. Jin, B. Parajuli, Y. Sonobe, T. Mizuno and A. Suzumura (2013). "Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid beta-induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons." PLoS One **8**(4): e61988.

Doyon, J., P. Bellec, R. Amsel, V. Penhune, O. Monchi, J. Carrier, S. Lehericy and H. Benali (2009). "Contributions of the basal ganglia and functionally related brain structures to motor learning." Behav Brain Res **199**(1): 61-75.

Doyon, J., D. Gaudreau, R. Laforce, Jr., M. Castonguay, P. J. Bedard, F. Bedard and J. P. Bouchard (1997). "Role of the striatum, cerebellum, and frontal lobes in the learning of a visuomotor sequence." Brain Cogn **34**(2): 218-245.

Doyon, J., R. Laforce, Jr., G. Bouchard, D. Gaudreau, J. Roy, M. Poirier, P. J. Bedard, F. Bedard and J. P. Bouchard (1998). "Role of the striatum, cerebellum and frontal lobes in

the automatization of a repeated visuomotor sequence of movements." Neuropsychologia **36**(7): 625-641.

Durany, N., T. Michel, J. Kurt, F. F. Cruz-Sanchez, J. Cervas-Navarro and P. Riederer (2000). "Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels in Alzheimer's disease brains." Int J Dev Neurosci **18**(8): 807-813.

Ehringer, H. and O. Hornykiewicz (1960). "[Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]." Klin Wochenschr **38**: 1236-1239.

Fahn, S. (2003). "Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome." Ann N Y Acad Sci **991**: 1-14.

Ferreira, M. and J. Massano (2017). "An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations." Acta Neurol Scand **135**(3): 273-284.

Fujino, M., N. Funeshima, Y. Kitazawa, H. Kimura, H. Amemiya, S. Suzuki and X. K. Li (2003). "Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment." J Pharmacol Exp Ther **305**(1): 70-77.

Fukumoto, K., H. Mizoguchi, H. Takeuchi, H. Horiuchi, J. Kawanokuchi, S. Jin, T. Mizuno and A. Suzumura (2014). "Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid beta-induced memory impairment." Behav Brain Res **268**: 88-93.

Ganguly, G., S. Chakrabarti, U. Chatterjee and L. Saso (2017). "Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." Drug Des Devel Ther **11**: 797-810.

Garcia-Dominguez, I., K. Vesela, J. Garcia-Revilla, A. Carrillo-Jimenez, M. A. Roca-Ceballos, M. Santiago, R. M. de Pablos and J. L. Venero (2018). "Peripheral Inflammation Enhances Microglia Response and Nigral Dopaminergic Cell Death in an in vivo MPTP Model of Parkinson's Disease." Front Cell Neurosci **12**: 398.

Gasser, T. (2005). "Genetics of Parkinson's disease." Curr Opin Neurol **18**(4): 363-369.

Gerfen, C. R., T. M. Engber, L. C. Mahan, Z. Susel, T. N. Chase, F. J. Monsma, Jr. and D. R. Sibley (1990). "D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons." Science **250**(4986): 1429-1432.

Giasson, B. I., H. Ischiropoulos, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2002). "The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases." Free Radic Biol Med **32**(12): 1264-1275.

Goedert, M., M. G. Spillantini, K. Del Tredici and H. Braak (2013). "100 years of Lewy pathology." Nat Rev Neurol **9**(1): 13-24.

Goetzl, E. J., W. Wang, C. McGiffert, M. C. Huang and M. H. Graler (2004). "Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system." J Cell Biochem **92**(6): 1104-1114.

Gong, S., C. Zheng, M. L. Doughty, K. Losos, N. Didkovsky, U. B. Schambra, N. J. Nowak, A. Joyner, G. Leblanc, M. E. Hatten and N. Heintz (2003). "A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes." Nature **425**(6961): 917-925.

Goto, Y., S. Otani and A. A. Grace (2007). "The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective." Neuropharmacology **53**(5): 583-587.

Grace, A. A. (1995). "The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function." Drug Alcohol Depend **37**(2): 111-129.

Graler, M. H. and E. J. Goetzl (2004). "The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors." FASEB J **18**(3): 551-553.

Guan, Z. and J. Fang (2006). "Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats." Brain Behav Immun **20**(1): 64-71.

Guerrero, M., M. Urbano and E. Roberts (2016). "Sphingosine 1-phosphate receptor 1 agonists: a patent review (2013-2015)." Expert Opin Ther Pat **26**(4): 455-470.

Hait, N. C., L. E. Wise, J. C. Allegood, M. O'Brien, D. Avni, T. M. Reeves, P. E. Knapp, J. Lu, C. Luo, M. F. Miles, S. Milstien, A. H. Lichtman and S. Spiegel (2014). "Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory." Nat Neurosci **17**(7): 971-980.

Harrington, D. L., K. Y. Haaland, R. A. Yeo and E. Marder (1990). "Procedural memory in Parkinson's disease: impaired motor but not visuoperceptual learning." J Clin Exp Neuropsychol **12**(2): 323-339.

Hasegawa, Y., H. Suzuki, T. Sozen, W. Rolland and J. H. Zhang (2010). "Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats." Stroke **41**(2): 368-374.

Hemmati, F., L. Dargahi, S. Nasoohi, R. Omidbakhsh, Z. Mohamed, Z. Chik, M. Naidu and A. Ahmadiani (2013). "Neurorestorative effect of FTY720 in a rat model of Alzheimer's disease: comparison with memantine." Behav Brain Res **252**: 415-421.

Hirsch, E. C. (2012). "[Future drug targets for Parkinson's disease]." Bull Acad Natl Med **196**(7): 1369-1377; discussion 1377-1369.

Hirsch, E. C. and S. Hunot (2009). "Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?" Lancet Neurol **8**(4): 382-397.

Hirsch, E. C., S. Vyas and S. Hunot (2012). "Neuroinflammation in Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **18 Suppl 1**: S210-212.

Ho, A. and M. Blum (1998). "Induction of interleukin-1 associated with compensatory dopaminergic sprouting in the denervated striatum of young mice: model of aging and neurodegenerative disease." J Neurosci **18**(15): 5614-5629.

Honea, R. A., C. Cruchaga, R. D. Perea, A. J. Saykin, J. M. Burns, D. R. Weinberger, A. M. Goate and I. Alzheimer's Disease Neuroimaging (2013). "Characterizing the role of brain derived neurotrophic factor genetic variation in Alzheimer's disease neurodegeneration." PLoS One **8**(9): e76001.

Horowitz, M. P. and J. T. Greenamyre (2010). "Gene-environment interactions in Parkinson's disease: the importance of animal modeling." Clin Pharmacol Ther **88**(4): 467-474.

Howells, D. W., M. J. Porritt, J. Y. Wong, P. E. Batchelor, R. Kalnins, A. J. Hughes and G. A. Donnan (2000). "Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra." Exp Neurol **166**(1): 127-135.

Hunter, S. F., J. D. Bowen and A. T. Reder (2016). "The Direct Effects of Fingolimod in the Central Nervous System: Implications for Relapsing Multiple Sclerosis." CNS Drugs **30**(2): 135-147.

Huot, P., T. H. Johnston, J. B. Koprach, S. H. Fox and J. M. Brotchie (2013). "The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease." Pharmacol Rev **65**(1): 171-222.

Imeri, F., D. Fallegger, A. Zivkovic, S. Schwalm, G. Enzmann, K. Blankenbach, D. Meyer zu Heringdorf, T. Homann, B. Kleuser, J. Pfeilschifter, B. Engelhardt, H. Stark and A. Huwiler (2014). "Novel oxazolo-oxazole derivatives of FTY720 reduce endothelial cell permeability, immune cell chemotaxis and symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice." Neuropharmacology **85**: 314-327.

Jackson-Lewis, V., J. Blesa and S. Przedborski (2012). "Animal models of Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **18 Suppl 1**: S183-185.

Jackson-Lewis, V., M. Jakowec, R. E. Burke and S. Przedborski (1995). "Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine." Neurodegeneration **4**(3): 257-269.

Jackson-Lewis, V. and S. Przedborski (2007). "Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease." Nat Protoc **2**(1): 141-151.

Jakowec, M. W., K. Nixon, E. Hogg, T. McNeill and G. M. Petzinger (2004). "Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration of the mouse nigrostriatal pathway." J Neurosci Res **76**(4): 539-550.

Jakowec, M. W. and G. M. Petzinger (2004). "1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned model of parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates." Comp Med **54**(5): 497-513.

Jankovic, J. (2008). "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **79**(4): 368-376.

Jankovic, J. and W. Poewe (2012). "Therapies in Parkinson's disease." Curr Opin Neurol **25**(4): 433-447.

Jellinger, K. A. (2012). "Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts." Mov Disord **27**(1): 8-30.

Jiang, L., H. Zhang, C. Wang, F. Ming, X. Shi and M. Yang (2019). "Serum level of brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease: a meta-analysis." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **88**: 168-174.

Jo, E., M. G. Sanna, P. J. Gonzalez-Cabrera, S. Thangada, G. Tigyi, D. A. Osborne, T. Hla, A. L. Parrill and H. Rosen (2005). "S1P1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate." Chem Biol **12**(6): 703-715.

Joel, D. and I. Weiner (2000). "The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum." Neuroscience **96**(3): 451-474.

Karni, A., G. Meyer, C. Rey-Hipolito, P. Jezard, M. M. Adams, R. Turner and L. G. Ungerleider (1998). "The acquisition of skilled motor performance: fast and slow experience-driven changes in primary motor cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(3): 861-868.

Kataoka, H., K. Sugahara, K. Shimano, K. Teshima, M. Koyama, A. Fukunari and K. Chiba (2005). "FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration." Cell Mol Immunol **2**(6): 439-448.

Katila, N., S. Bhurtel, S. Shadfar, S. Srivastav, S. Neupane, U. Ojha, G. S. Jeong and D. Y. Choi (2017). "Metformin lowers alpha-synuclein phosphorylation and upregulates neurotrophic factor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease." Neuropharmacology **125**: 396-407.

Kaur, K., J. S. Gill, P. K. Bansal and R. Deshmukh (2017). "Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease." J Neurol Sci **381**: 308-314.

Kharel, Y., S. Lee, A. H. Snyder, L. Sheasley-O'Neill S, M. A. Morris, Y. Setiady, R. Zhu, M. A. Zigler, T. L. Burcin, K. Ley, K. S. Tung, V. H. Engelhard, T. L. Macdonald, S. Pearson-White and K. R. Lynch (2005). "Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720." J Biol Chem **280**(44): 36865-36872.

Krebs, H. I., N. Hogan, W. Hening, S. V. Adamovich and H. Poizner (2001). "Procedural motor learning in Parkinson's disease." Exp Brain Res **141**(4): 425-437.

Kreitzer, A. C. (2009). "Physiology and pharmacology of striatal neurons." Annu Rev Neurosci **32**: 127-147.

Kunkel, G. T., M. Maceyka, S. Milstien and S. Spiegel (2013). "Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond." Nat Rev Drug Discov **12**(9): 688-702.

L'Episcopo, F., C. Tirolo, M. F. Serapide, S. Caniglia, N. Testa, L. Leggio, S. Vivarelli, N. Iraci, S. Pluchino and B. Marchetti (2018). "Microglia Polarization, Gene-Environment Interactions and Wnt/beta-Catenin Signaling: Emerging Roles of Glia-Neuron and Glia-Stem/Neuroprogenitor Crosstalk for Dopaminergic Neurorestoration in Aged Parkinsonian Brain." Front Aging Neurosci **10**: 12.

Lang, A. E. and A. M. Lozano (1998). "Parkinson's disease. First of two parts." N Engl J Med **339**(15): 1044-1053.

Langston, J. W. (2006). "The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg." Ann Neurol **59**(4): 591-596.

Langston, J. W., L. S. Forno, J. Tetud, A. G. Reeves, J. A. Kaplan and D. Karluk (1999). "Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure." Ann Neurol **46**(4): 598-605.

Lapchak, P. A., D. M. Araujo, K. D. Beck, C. E. Finch, S. A. Johnson and F. Hefti (1993). "BDNF and trkB mRNA expression in the hippocampal formation of aging rats." Neurobiol Aging **14**(2): 121-126.

Le Moine, C. and B. Bloch (1995). "D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum." J Comp Neurol **355**(3): 418-426.

Lee, C. S., M. A. Cenci, M. Schulzer and A. Bjorklund (2000). "Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease." Brain **123** (Pt 7): 1365-1379.

Lee, M. J., S. Thangada, C. H. Liu, B. D. Thompson and T. Hla (1998). "Lysophosphatidic acid stimulates the G-protein-coupled receptor EDG-1 as a low affinity agonist." J Biol Chem **273**(34): 22105-22112.

Lim, S. A., U. J. Kang and D. S. McGehee (2014). "Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects." Front Synaptic Neurosci **6**: 22.

Liu, C. H., S. Thangada, M. J. Lee, J. R. Van Brocklyn, S. Spiegel and T. Hla (1999). "Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1." Mol Biol Cell **10**(4): 1179-1190.

Liu, W., Y. Tang and J. Feng (2011). "Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system." Life Sci **89**(5-6): 141-146.

Lovinger, D. M. and B. N. Mathur (2012). "Endocannabinoids in striatal plasticity." Parkinsonism Relat Disord **18 Suppl 1**: S132-134.

Luchtman, D., R. Gollan, E. Ellwardt, J. Birkenstock, K. Robohm, V. Siffrin and F. Zipp (2016). "In vivo and in vitro effects of multiple sclerosis immunomodulatory therapeutics on glutamatergic excitotoxicity." J Neurochem **136**(5): 971-980.

Luscher, C. and R. C. Malenka (2012). "NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD)." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(6).

Maceyka, M., K. B. Harikumar, S. Milstien and S. Spiegel (2012). "Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease." Trends Cell Biol **22**(1): 50-60.

Maceyka, M. and S. Spiegel (2014). "Sphingolipid metabolites in inflammatory disease." Nature **510**(7503): 58-67.

Machado, V., T. Zoller, A. Attaai and B. Spittau (2016). "Microglia-Mediated Neuroinflammation and Neurotrophic Factor-Induced Protection in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease-Lessons from Transgenic Mice." Int J Mol Sci **17**(2).

MacLennan, A. J., C. S. Browe, A. A. Gaskin, D. C. Lado and G. Shaw (1994). "Cloning and characterization of a putative G-protein coupled receptor potentially involved in development." Mol Cell Neurosci **5**(3): 201-209.

Mandala, S., R. Hajdu, J. Bergstrom, E. Quackenbush, J. Xie, J. Milligan, R. Thornton, G. J. Shei, D. Card, C. Keohane, M. Rosenbach, J. Hale, C. L. Lynch, K. Rupprecht, W. Parsons and H. Rosen (2002). "Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists." Science **296**(5566): 346-349.

Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.

Marchetti, B. and M. P. Abbracchio (2005). "To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders?" Trends Pharmacol Sci **26**(10): 517-525.

Marchetti, B., F. L'Episcopo, M. C. Morale, C. Tirolo, N. Testa, S. Caniglia, M. F. Serapide and S. Pluchino (2013). "Uncovering novel actors in astrocyte-neuron crosstalk in Parkinson's disease: the Wnt/beta-catenin signaling cascade as the common final pathway for neuroprotection and self-repair." Eur J Neurosci **37**(10): 1550-1563.

Martin, R. and M. Sospedra (2014). "Sphingosine-1 phosphate and central nervous system." Curr Top Microbiol Immunol **378**: 149-170.

Matamales, M., J. Bertran-Gonzalez, L. Salomon, B. Degos, J. M. Deniau, E. Valjent, D. Herve and J. A. Girault (2009). "Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice." PLoS One **4**(3): e4770.

Matloubian, M., C. G. Lo, G. Cinamon, M. J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. L. Allende, R. L. Proia and J. G. Cyster (2004). "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1." Nature **427**(6972): 355-360.

McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2008). "Glial reactions in Parkinson's disease." Mov Disord **23**(4): 474-483.

Meredith, G. E., P. K. Sonsalla and M. F. Chesselet (2008). "Animal models of Parkinson's disease progression." Acta Neuropathol **115**(4): 385-398.

Meredith, G. E., S. Totterdell, J. A. Potashkin and D. J. Surmeier (2008). "Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol." Parkinsonism Relat Disord **14 Suppl 2**: S112-115.

Migueluez, C., T. Morera-Herreras, M. Torrecilla, J. A. Ruiz-Ortega and L. Ugedo (2014). "Interaction between the 5-HT system and the basal ganglia: functional implication and therapeutic perspective in Parkinson's disease." Front Neural Circuits **8**: 21.

Miguez, A., G. Garcia-Diaz Barriga, V. Brito, M. Straccia, A. Giralt, S. Gines, J. M. Canals and J. Alberch (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**(17): 4958-4970.

Mitsumoto, Y., A. Watanabe, A. Mori and N. Koga (1998). "Spontaneous regeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons in MPTP-treated C57BL/6 mice." Biochem Biophys Res Commun **248**(3): 660-663.

Mizugishi, K., T. Yamashita, A. Olivera, G. F. Miller, S. Spiegel and R. L. Proia (2005). "Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development." Mol Cell Biol **25**(24): 11113-11121.

More, S. V., H. Kumar, I. S. Kim, S. Y. Song and D. K. Choi (2013). "Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease." Mediators Inflamm **2013**: 952375.

Morris, M. A., D. R. Gibb, F. Picard, V. Brinkmann, M. Straume and K. Ley (2005). "Transient T cell accumulation in lymph nodes and sustained lymphopenia in mice treated with FTY720." Eur J Immunol **35**(12): 3570-3580.

Mosharov, E. V., K. E. Larsen, E. Kanter, K. A. Phillips, K. Wilson, Y. Schmitz, D. E. Krantz, K. Kobayashi, R. H. Edwards and D. Sulzer (2009). "Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons." Neuron **62**(2): 218-229.

Motyl, J. and J. B. Strosznajder (2018). "Sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate receptors dependent signalling in neurodegenerative diseases. The promising target for neuroprotection in Parkinson's disease." Pharmacol Rep **70**(5): 1010-1014.

Muller, M. L. and N. I. Bohnen (2013). "Cholinergic dysfunction in Parkinson's disease." Curr Neurol Neurosci Rep **13**(9): 377.

Muslimovic, D., B. Post, J. D. Speelman and B. Schmand (2007). "Motor procedural learning in Parkinson's disease." Brain **130**(Pt 11): 2887-2897.

Nagahara, A. H., D. A. Merrill, G. Coppola, S. Tsukada, B. E. Schroeder, G. M. Shaked, L. Wang, A. Blesch, A. Kim, J. M. Conner, E. Rockenstein, M. V. Chao, E. H. Koo, D. Geschwind, E. Masliah, A. A. Chiba and M. H. Tuszynski (2009). "Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease." Nat Med **15**(3): 331-337.

Nazari, M., S. Keshavarz, A. Rafati, M. R. Namavar and M. Haghani (2016). "Fingolimod (FTY720) improves hippocampal synaptic plasticity and memory deficit in rats following focal cerebral ischemia." Brain Res Bull **124**: 95-102.

Norden, D. M., P. J. Trojanowski, E. Villanueva, E. Navarro and J. P. Godbout (2016). "Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge." Glia **64**(2): 300-316.

Novgorodov, A. S., M. El-Alwani, J. Bielawski, L. M. Obeid and T. I. Gudz (2007). "Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration." FASEB J **21**(7): 1503-1514.

Numakawa, T., S. Suzuki, E. Kumamaru, N. Adachi, M. Richards and H. Kunugi (2010). "BDNF function and intracellular signaling in neurons." Histol Histopathol **25**(2): 237-258.

O'Bryant, S. E., V. Hobson, J. R. Hall, S. C. Waring, W. Chan, P. Massman, L. Lacritz, C. M. Cullum, R. Diaz-Arrastia and C. Texas Alzheimer's Research (2009). "Brain-derived neurotrophic factor levels in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **17**(2): 337-341.

O'Sullivan, S. A., C. O'Sullivan, L. M. Healy, K. K. Dev and G. K. Sheridan (2018). "Sphingosine 1-phosphate receptors regulate TLR4-induced CXCL5 release from astrocytes and microglia." J Neurochem **144**(6): 736-747.

Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, B. Benitez-Temino, F. J. Blesa, J. Guridi, C. Marin and M. Rodriguez (2008). "Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease." Mov Disord **23 Suppl 3**: S548-S559.

Obeso, J. A., M. Stamelou, C. G. Goetz, W. Poewe, A. E. Lang, D. Weintraub, D. Burn, G. M. Halliday, E. Bezard, S. Przedborski, S. Lehericy, D. J. Brooks, J. C. Rothwell, M. Hallett, M. R. DeLong, C. Marras, C. M. Tanner, G. W. Ross, J. W. Langston, C. Klein, V. Bonifati, J. Jankovic, A. M. Lozano, G. Deuschl, H. Bergman, E. Tolosa, M. Rodriguez-Violante, S. Fahn, R. B. Postuma, D. Berg, K. Marek, D. G. Standaert, D. J. Surmeier, C. W. Olanow, J. H. Kordower, P. Calabresi, A. H. V. Schapira and A. J. Stoessl (2017). "Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy." Mov Disord **32**(9): 1264-1310.

Olanow, C. W. and A. H. Schapira (2013). "Therapeutic prospects for Parkinson disease." Ann Neurol **74**(3): 337-347.

Oo, M. L., S. Thangada, M. T. Wu, C. H. Liu, T. L. Macdonald, K. R. Lynch, C. Y. Lin and T. Hla (2007). "Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor." J Biol Chem **282**(12): 9082-9089.

Parent, A. and L. N. Hazrati (1995). "Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop." Brain Res Brain Res Rev **20**(1): 91-127.

Park, S. J. and D. S. Im (2017). "Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators and Drug Discovery." Biomol Ther (Seoul) **25**(1): 80-90.

Pawlak, V., B. J. Schupp, F. N. Single, P. H. Seeburg and G. Kohr (2005). "Impaired synaptic scaling in mouse hippocampal neurones expressing NMDA receptors with reduced calcium permeability." J Physiol **562**(Pt 3): 771-783.

Payne, S. G., S. Milstien and S. Spiegel (2002). "Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions." FEBS Lett **531**(1): 54-57.

Perry, V. H. and J. Teeling (2013). "Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration." Semin Immunopathol **35**(5): 601-612.

Phani, S., J. D. Loike and S. Przedborski (2012). "Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **18 Suppl 1**: S207-209.

Pifl, C. and O. Hornykiewicz (2006). "Dopamine turnover is upregulated in the caudate/putamen of asymptomatic MPTP-treated rhesus monkeys." Neurochem Int **49**(5): 519-524.

Poewe, W., P. Mahrknecht and J. Jankovic (2012). "Emerging therapies for Parkinson's disease." Curr Opin Neurol **25**(4): 448-459.

Prager, B., S. F. Spampinato and R. M. Ransohoff (2015). "Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood-brain barrier." Trends Mol Med **21**(6): 354-363.

Pringsheim, T., N. Jette, A. Frolkis and T. D. Steeves (2014). "The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis." Mov Disord **29**(13): 1583-1590.

Proia, R. L. and T. Hla (2015). "Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy." J Clin Invest **125**(4): 1379-1387.

Przedborski, S. (2017). "The two-century journey of Parkinson disease research." Nat Rev Neurosci **18**(4): 251-259.

Przedborski, S., V. Jackson-Lewis, A. B. Naini, M. Jakowec, G. Petzinger, R. Miller and M. Akram (2001). "The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety." J Neurochem **76**(5): 1265-1274.

Pulkoski-Gross, M. J., J. C. Donaldson and L. M. Obeid (2015). "Sphingosine-1-phosphate metabolism: A structural perspective." Crit Rev Biochem Mol Biol **50**(4): 298-313.

Ratajczak, M. Z., M. Suszyska, S. Borkowska, J. Ratajczak and G. Schneider (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**(1): 95-107.

Redgrave, P., M. Rodriguez, Y. Smith, M. C. Rodriguez-Oroz, S. Lehericy, H. Bergman, Y. Agid, M. R. DeLong and J. A. Obeso (2010). "Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease." Nat Rev Neurosci **11**(11): 760-772.

Rosen, H. and E. J. Goetzl (2005). "Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network." Nat Rev Immunol **5**(7): 560-570.

Rosen, H., R. C. Stevens, M. Hanson, E. Roberts and M. B. Oldstone (2013). "Sphingosine-1-phosphate and its receptors: structure, signaling, and influence." Annu Rev Biochem **82**: 637-662.

Rothhammer, V., J. E. Kenison, E. Tjon, M. C. Takenaka, K. A. de Lima, D. M. Borucki, C. C. Chao, A. Wilz, M. Blain, L. Healy, J. Antel and F. J. Quintana (2017). "Sphingosine 1-phosphate receptor modulation suppresses pathogenic astrocyte activation and chronic progressive CNS inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(8): 2012-2017.

Rudnicka, J., M. Czerwec, E. Grywalska, D. Siwicka-Gieroba, M. Walankiewicz, A. Grafka, M. Zgurski, A. Surdacka, H. Bartosik-Psujek and J. Rolinski (2015). "Influence of fingolimod on basic lymphocyte subsets frequencies in the peripheral blood of multiple sclerosis patients - preliminary study." Cent Eur J Immunol **40**(3): 354-359.

Rylander, D. (2012). "The serotonin system: a potential target for anti-dyskinetic treatments and biomarker discovery." Parkinsonism Relat Disord **18 Suppl 1**: S126-128.

Samii, A., J. G. Nutt and B. R. Ransom (2004). "Parkinson's disease." Lancet **363**(9423): 1783-1793.

Sanna, M. G., J. Liao, E. Jo, C. Alfonso, M. Y. Ahn, M. S. Peterson, B. Webb, S. Lefebvre, J. Chun, N. Gray and H. Rosen (2004). "Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate." J Biol Chem **279**(14): 13839-13848.

Scalzo, P., A. Kummer, T. L. Bretas, F. Cardoso and A. L. Teixeira (2010). "Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease." J Neurol **257**(4): 540-545.

Schnydrig, S., L. Korner, S. Landweer, B. Ernst, G. Walker, U. Otten and D. Kunz (2007). "Peripheral lipopolysaccharide administration transiently affects expression of brain-derived neurotrophic factor, corticotropin and proopiomelanocortin in mouse brain." Neurosci Lett **429**(1): 69-73.

Schultz, W. (2010). "Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data." Behav Brain Funct **6**: 24.

Sedelis, M., K. Hofele, G. W. Auburger, S. Morgan, J. P. Huston and R. K. Schwarting (2000). "MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences." Behav Genet **30**(3): 171-182.

Shen, T., Y. You, C. Joseph, M. Mirzaei, A. Klistorner, S. L. Graham and V. Gupta (2018). "BDNF Polymorphism: A Review of Its Diagnostic and Clinical Relevance in Neurodegenerative Disorders." Aging Dis **9**(3): 523-536.

Siebert, R. J., K. D. Taylor, M. Weatherall and D. A. Abernethy (2006). "Is implicit sequence learning impaired in Parkinson's disease? A meta-analysis." Neuropsychology **20**(4): 490-495.

Soliven, B., V. Miron and J. Chun (2011). "The neurobiology of sphingosine 1-phosphate signaling and sphingosine 1-phosphate receptor modulators." Neurology **76**(8 Suppl 3): S9-14.

Sossi, V., R. de la Fuente-Fernandez, M. Schulzer, A. R. Troiano, T. J. Ruth and A. J. Stoessl (2007). "Dopamine transporter relation to dopamine turnover in Parkinson's disease: a positron emission tomography study." Ann Neurol **62**(5): 468-474.

Sossi, V., K. Dinelle, G. J. Topping, J. E. Holden, D. Doudet, M. Schulzer, T. J. Ruth, A. J. Stoessl and R. de la Fuente-Fernandez (2009). "Dopamine transporter relation to levodopa-derived synaptic dopamine in a rat model of Parkinson's: an in vivo imaging study." J Neurochem **109**(1): 85-92.

Spampinato, S. F., B. Obermeier, A. Coteleur, A. Love, Y. Takeshita, Y. Sano, T. Kanda and R. M. Ransohoff (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**(7): e0133392.

Spiegel, S. and S. Milstien (2003). "Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(5): 397-407.

Spiegel, S. and S. Milstien (2011). "The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity." Nat Rev Immunol **11**(6): 403-415.

Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes and M. Goedert (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." Nature **388**(6645): 839-840.

St-Cyr Giguere, F., S. Attiori Essis, L. Chagniel, M. Germain, M. Cyr and G. Massicotte (2017). "The sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist SEW2871 reduces Tau-Ser262 phosphorylation in rat hippocampal slices." Brain Res **1658**: 51-59.

Streit, W. J. (2002). "Microglia and the response to brain injury." Ernst Schering Res Found Workshop(39): 11-24.

Strub, G. M., M. Maceyka, N. C. Hait, S. Milstien and S. Spiegel (2010). "Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate." Adv Exp Med Biol **688**: 141-155.

Sun, N., Y. Shen, W. Han, K. Shi, K. Wood, Y. Fu, J. Hao, Q. Liu, K. N. Sheth, D. Huang and F. D. Shi (2016). "Selective Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Modulation Attenuates Experimental Intracerebral Hemorrhage." Stroke **47**(7): 1899-1906.

Surmeier, D. J., L. Carrillo-Reid and J.argas (2011). "Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies." Neuroscience **198**: 3-18.

Surmeier, D. J., J. N. Guzman, J. Sanchez-Padilla and J. A. Goldberg (2011). "The origins of oxidant stress in Parkinson's disease and therapeutic strategies." Antioxid Redox Signal **14**(7): 1289-1301.

Surmeier, D. J., W. J. Song and Z. Yan (1996). "Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons." J Neurosci **16**(20): 6579-6591.

Takabe, K., S. W. Paugh, S. Milstien and S. Spiegel (2008). "'Inside-out' signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets." Pharmacol Rev **60**(2): 181-195.

Takasugi, N., T. Sasaki, I. Ebinuma, S. Osawa, H. Isshiki, K. Takeo, T. Tomita and T. Iwatsubo (2013). "FTY720/fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid-beta production in neurons." PLoS One **8**(5): e64050.

Tansey, M. G. and M. S. Goldberg (2010). "Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention." Neurobiol Dis **37**(3): 510-518.

Taylor, J. M., B. S. Main and P. J. Crack (2013). "Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease." Neurochem Int **62**(5): 803-819.

Timmons, S., M. F. Coakley, A. M. Moloney and O. N. C (2009). "Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease." Neurosci Lett **467**(1): 30-35.

Tirodkar, T. S. and C. Voelkel-Johnson (2012). "Sphingolipids in apoptosis." Exp Oncol **34**(3): 231-242.

Tolwani, R. J., M. W. Jakowec, G. M. Petzinger, S. Green and K. Waggle (1999). "Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models." Lab Anim Sci **49**(4): 363-371.

Ungerleider, L. G., J. Doyon and A. Karni (2002). "Imaging brain plasticity during motor skill learning." Neurobiol Learn Mem **78**(3): 553-564.

Valjent, E., J. Bertran-Gonzalez, D. Herve, G. Fisone and J. A. Girault (2009). "Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice." Trends Neurosci **32**(10): 538-547.

van Echten-Deckert, G., N. Hagen-Euteneuer, I. Karaca and J. Walter (2014). "Sphingosine-1-phosphate: boon and bane for the brain." Cell Physiol Biochem **34**(1): 148-157.

Voorn, P., L. J. Vanderschuren, H. J. Groenewegen, T. W. Robbins and C. M. Pennartz (2004). "Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum." Trends Neurosci **27**(8): 468-474.

Webb, M., C. S. Tham, F. F. Lin, K. Lariosa-Willingham, N. Yu, J. Hale, S. Mandala, J. Chun and T. S. Rao (2004). "Sphingosine 1-phosphate receptor agonists attenuate relapsing-remitting experimental autoimmune encephalitis in SJL mice." J Neuroimmunol **153**(1-2): 108-121.

Whitton, P. S. (2007). "Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease." Br J Pharmacol **150**(8): 963-976.

Wood, H. (2015). "Neurodegenerative disease: Could fingolimod provide cognitive benefits in patients with Huntington disease?" Nat Rev Neurol **11**(8): 426.

Xu, Y. D., C. Cui, M. F. Sun, Y. L. Zhu, M. Chu, Y. W. Shi, S. L. Lin, X. S. Yang and Y. Q. Shen (2017). "Neuroprotective Effects of Loganin on MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice: Neurochemistry, Glial Reaction and Autophagy Studies." J Cell Biochem **118**(10): 3495-3510.

Yang, X., H. Ren, K. Wood, M. Li, S. Qiu, F. D. Shi, C. Ma and Q. Liu (2018). "Depletion of microglia augments the dopaminergic neurotoxicity of MPTP." FASEB J **32**(6): 3336-3345.

Zemann, B., B. Kinzel, M. Muller, R. Reuschel, D. Mechtcheriakova, N. Urtz, F. Bornancin, T. Baumruker and A. Billich (2006). "Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720." Blood **107**(4): 1454-1458.

Zhang, G., J. J. Contos, J. A. Weiner, N. Fukushima and J. Chun (1999). "Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate." Gene **227**(1): 89-99.

Zhang, J., Z. G. Zhang, Y. Li, X. Ding, X. Shang, M. Lu, S. B. Elias and M. Chopp (2015). "Fingolimod treatment promotes proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis." Neurobiol Dis **76**: 57-66.

Zhang, Y., X. G. Gong, Z. Z. Wang, H. M. Sun, Z. Y. Guo, J. H. Hu, L. Ma, P. Li and N. H. Chen (2016). "Overexpression of DJ-1/PARK7, the Parkinson's disease-related protein, improves mitochondrial function via Akt phosphorylation on threonine 308 in dopaminergic neuron-like cells." Eur J Neurosci **43**(10): 1379-1388.

Zhao, P., X. Yang, L. Yang, M. Li, K. Wood, Q. Liu and X. Zhu (2017). "Neuroprotective effects of fingolimod in mouse models of Parkinson's disease." FASEB J **31**(1): 172-179.

Zigmond, M. J. (1997). "Do compensatory processes underlie the preclinical phase of neurodegenerative disease? Insights from an animal model of parkinsonism." Neurobiol Dis **4**(3-4): 247-253.

Zigmond, M. J., E. D. Abercrombie, T. W. Berger, A. A. Grace and E. M. Stricker (1990). "Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications." Trends Neurosci **13**(7): 290-296.