

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
FRÉDÉRIC ST-CYR GIGUÈRE

LE RÉCEPTEUR 1 DE LA SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE (S1PR1) :
NOUVELLE PISTE POUR CONTRER L'HYPERPHOSPHORYLATION
DE LA PROTÉINE TAU DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

OCTOBRE 2018

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.

*Les seules limites qui existent
sont celles que l'on s'impose.*

REMERCIEMENTS

Un mémoire de maîtrise représente un accomplissement personnel important qui s'inscrit dans la durée, à l'aube de la maturité scientifique. Je veux remercier chaleureusement toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont assisté dans l'élaboration de ce mémoire, notamment mon directeur de recherche, le professeur Guy Massicotte. Merci pour la confiance que vous m'avez témoignée. Je vous en serai toujours reconnaissant. Votre intérêt et vos nombreux conseils furent indispensables non seulement durant la réalisation de ce projet de recherche mais également tout au long de la rédaction de ce mémoire. Bien sûr, la publication de ce travail expérimental sous forme d'article scientifique n'aurait pu se faire sans votre contribution inestimable.

Par ailleurs, ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier de votre laboratoire, du Groupe de recherche en signalisation cellulaire de l'UQTR et du laboratoire du professeur Michel Cyr. Conséquemment, les allocations de recherches et les aides financières qui m'ont été attribuées ont pu contribuer à l'élaboration, à la réalisation et à la rédaction de mon travail de maîtrise.

Évidemment, ce travail en neurobiologie n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux que m'ont témoigné plusieurs acteurs des neurosciences à l'UQTR. Aux professeurs Michel Cyr et Marc Germain, merci pour vos commentaires constructifs qui à terme ont permis de bonifier, je l'espère, la présentation de cet ouvrage de recherche. Je tiens également à remercier Suzanne Attiori Essis pour son support

constant qui, de façon intégrale, a permis l'accomplissement de mon cheminement en matière de compétences techniques. J'ai évidemment une pensée toute particulière pour Madame Catarina Leote Franco Pio du Département de biologie médicale dont la contribution n'est pas étrangère au dépôt final de ce travail de recherche.

Au terme de ce parcours, je remercie celles et ceux qui me sont les plus chers. À vous, Tice et Jean, l'attention que vous portez à mon égard et les discussions que nous avons entretenues ont contribué à la réussite de ce travail expérimental. Évidemment, à ma famille, un énorme merci pour votre présence, votre soutien moral et votre confiance indéfectible en mon potentiel.

RÉSUMÉ

Des efforts considérables ont récemment été consacrés pour valider l'effet potentiellement neuroprotecteur du fingolimod (FTY720-P) dans le contexte de la pathologie Alzheimer. Or, les recherches récentes sur le sujet ont toutefois révélé que la molécule en question, apparentée à la sphingosine-1-phosphate (S1P), serait susceptible de mettre à mal les neurones vieillissants. Spécifiquement, le FTY720-P serait en mesure d'accroître la phosphorylation de la protéine Tau dans les neurones de l'hippocampe, un événement toxique et caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Depuis quelques années, plusieurs molécules apparentées au fingolimod ont été synthétisées par les laboratoires pharmaceutiques. Leurs effets dans le cerveau, notamment au niveau de la protéine Tau, sont toutefois méconnus à ce jour. En ce sens, le présent mémoire de maîtrise s'est efforcé d'évaluer les effets de deux analogues chimiques activant préférentiellement les récepteurs 1 (SEW2871) et 3 (CYM5541) de la S1P. Travaillant sur des tranches minces d'hippocampe de rats, on constate que le composé SEW2871 a pour effet de réduire la phosphorylation de la protéine Tau. Pour y parvenir, la molécule active d'abord la phosphatase PP2A, une enzyme qui, par son action, permet d'inhiber l'activité d'une protéine kinase phosphorylante nommée AMPK. Le tout conduit alors à une baisse significative du niveau de phosphorylation de la protéine Tau particulièrement sur un site (Ser262) se trouvant au sein du domaine de liaison aux microtubules. Rappelons que l'hyperphosphorylation de Tau à la Ser262 est un aspect distinctif de la phase initiale de la démence Alzheimer. Or, la perspective pragmatique des résultats obtenus nous invite à penser que l'activation sélective des récepteurs 1 de la S1P par le SEW2871 serait susceptible de réduire l'état d'hyperphosphorylation du site en question de la protéine chez les sujets Alzheimer.

Mots-clés : protéine Tau; épitope Tau-Ser262; sphingosine-1-phosphate; récepteurs; kinase; phosphatase; Alzheimer.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 La sphingosine-1-phosphate : caractéristiques, fonctions et analogues	2
1.1.1 Structure et métabolisme de la S1P	2
1.1.2 Grandes fonctions biologiques de la S1P	5
1.1.3 Expression et fonctions des récepteurs de la S1P	6
1.1.4 S1PRs, microglie et neurones.....	10
1.1.5 Effets thérapeutiques des analogues de la S1P.....	13
1.2 La protéine Tau : caractéristiques et fonctions	14
1.2.1 Isoformes et phosphorylation de Tau.....	14
1.2.2 Rôles de la protéine Tau dans l'initiation et le développement de la neurodégénérescence.....	18
CHAPITRE II	
HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	22
2.1 Est-ce que des analogues spécifiques de la S1P affectent les niveaux de phosphorylation de Tau dans l'hippocampe?	23
2.2 Est-ce que les analogues en question sont en mesure de moduler l'activité d'enzymes connues pour contrôler la phosphorylation de Tau?.....	23

CHAPITRE III	
ARTICLE SCIENTIFIQUE	25
3.1 Contribution des auteurs	25
3.2 Article scientifique	26
Introduction.....	27
Results	28
Tau phosphorylation is differentially regulated by S1PR agonists	28
Implications of AMPK α and PP2Ac	29
Discussion.....	31
Conclusion	35
Experimental procedures	36
Animal and ethic approvals	36
Pharmacological agents and antibodies (Abs)	36
Hippocampal slice preparation and pharmacological treatments.....	38
Tissue samples and Western blotting	38
Statistical analysis.....	39
Acknowledgments	40
Figure legends	41
Reference.....	54
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	61
4.1 La phosphorylation de la protéine Tau et ses influences	62
4.2 La signalisation induite en lien avec le S1PR1	66
CHAPITRE V	
CONCLUSION	71
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	73

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	La structure d'un sphingolipide.....	3
1.2	La biosynthèse, le transport et les S1PRs	4
1.3	Les rôles physiologiques des S1PRs.....	8
1.4	Les S1PRs et le système nerveux	12
1.5	Le gène et les isoformes de la protéine Tau.....	16
1.6	La protéine Tau hyperphosphorylée.....	20

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

A76	A-769662
ABC	Cassette se liant à l'ATP
AC	Adénylate cyclase
AKT	Protéine kinase B (PKB)
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	Protéine kinase dépendante de l'AMP
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
CaMKII	Protéine kinase calcium/calmoduline dépendante
CAN	Cantharidine
Cdk5	Kinase 5 dépendante de la cycline
CYM	CYM5541
ERK	Protéine kinase régulée par les signaux extra-cellulaires
FK	FK-506
Fyn	Protéine kinase appartenant à la famille des Src
GSK3	Kinase glycogène synthase 3
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Enzyme hydrolysant la guanosine triphosphate
HDAC	Histone déacétylase
HDL	Lipoprotéine de haute densité
IP3	Inositol triphosphate
JNK	Kinase de la c-Jun N-terminale
Leu	Leucine

M	Méthylation
MAPK	Protéine kinase associée aux microtubules
MAPT	Gène de la protéine Tau
MARK	Kinase régulant l'affinité des microtubules
MBD	Domaine de liaison aux microtubules
MFSD2B	Transporteur 2B de la superfamille majeure de facilitateurs
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
nSMase2	Spingomyélinase neutre de type 2
P	Phosphorylation
p38	Kinase appartenant à la famille des MAPKs
PAR-1	Kinase appartenant à la famille des MAPKs
PIK3	Kinase phosphoinositide 3
PLC	Phospholipase C
PP	Protéine phosphatase
PSD-95	Protéine 95 de la densité post-synaptique
PKA	Protéine kinase A
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PP2Ac	Sous-unité catalytique de la protéine kinase 2A
PP2B	Protéine phosphatase 2B
Rac	GTPase
Ras	GTPase
Rho	GTPase
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S1PRs	Récepteurs de la sphingosine-1-phosphate

Ser	Sérine
SEW	SEW2871
SNC	Système nerveux central
Spns	Protéine homologue spinster
Src	Protéine tyrosine kinase SRC (proto-oncogène)
Tau	Unité d'association aux microtubules
Thr	Thréonine
Tyr	Tyrosine

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies, les recherches sur la maladie d'Alzheimer ont permis d'affiner notre connaissance sur les causes biochimiques probables de cette terrible condition. Une grande attention a d'ailleurs été portée sur le rôle physiopathologique de la bêta-amyloïde, une protéine vraisemblablement toxique pour le cerveau (Wilcox et al., 2011). Au fil des ans, les essais thérapeutiques ciblant spécifiquement cette protéine se sont toutefois traduits par des échecs répétés et, conséquemment, plusieurs chercheurs remettent maintenant en cause la théorie en vigueur selon laquelle la protéine bêta-amyloïde serait l'ultime responsable de la maladie d'Alzheimer (Parsons and Rammes, 2017). Les études biochimiques actuelles, portant sur les cerveaux Alzheimer, laissent croire en effet à une seconde hypothèse voulant que l'hyperphosphorylation d'une protéine nommée Tau contribue, de façon précoce et indépendante, au développement de cette démence (Rub et al., 2017; Wu et al., 2017).

Les pharmacologues cherchent donc aujourd'hui à découvrir des molécules susceptibles de diminuer la phosphorylation de la protéine en question. Quant à eux, les neurobiologistes s'interrogent depuis peu sur les effets bénéfiques des analogues de la sphingosine-1-phosphate (S1P) dans le contexte du traitement de la maladie d'Alzheimer. Le travail réalisé dans le cadre du présent mémoire s'est de fait intéressé à l'influence de deux agonistes des récepteurs de la S1P sur les niveaux de phosphorylation de la protéine Tau dans l'hippocampe, une région du

cerveau particulièrement altérée lors du vieillissement prématuré de type Alzheimer.

On trouvera dans la première section de l'introduction des informations relatives aux effets cellulaires assurés par la S1P et ses récepteurs. La seconde portion s'évertuera quant à elle à présenter les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles de la protéine Tau ainsi que son implication dans le développement de maladies neurodégénératives.

1.1 La sphingosine-1-phosphate : caractéristiques, fonctions et analogues

1.1.1 Structure et métabolisme de la S1P

Les recherches sur la biochimie et la physiologie des sphingolipides ont progressé de manière fulgurante au cours des dernières décennies (Lahiri and Futerman, 2007; Merrill et al., 1997; Pralhada Rao et al., 2013; Proia and Hla, 2015; Wang et al., 2015). Ces lipides, retrouvés de façon ubiquitaire chez tous les eucaryotes et qui apparaissent indispensables à la survie des mammifères (Bartke and Hannun, 2009), désignent une famille de molécules complexes regroupant diverses substances telles que les gangliosides, les céramides, la sphingosine et la sphingosine-1-phosphate (S1P) (Figure 1.1).

La S1P se distingue des autres sphingolipides par sa propension à contrôler divers mécanismes assurant le bon fonctionnement du système immunitaire et, plus particulièrement, le processus de l'inflammation (Aoki et al., 2016; Bryan and Del Poeta, 2018; Chi, 2011; Maceyka and Spiegel, 2014; Spiegel and Milstien, 2011). Fait intéressant, les données expérimentales récentes laissent présager que les analogues chimiques

de cette molécule sont à même d'accroître les processus de mémorisation (Hait et al., 2014; Miguez et al., 2015) et leur utilisation est présentement considérée pour le traitement de plusieurs affections neurologiques, notamment la maladie d'Alzheimer (Alesenko, 2013; Brunkhorst et al., 2014; Jesko et al., 2018).

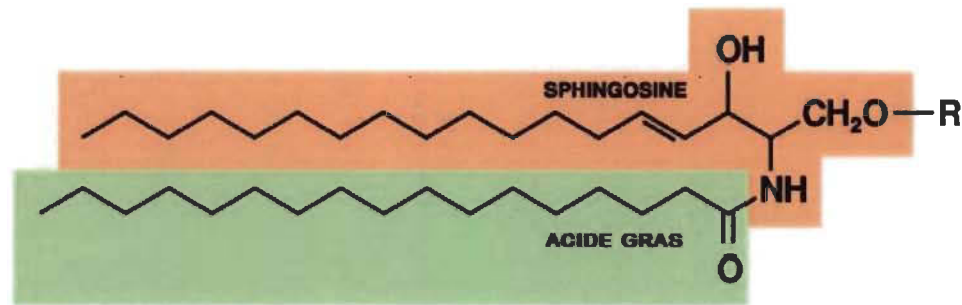


Figure 1.1 La structure d'un sphingolipide.

Les sphingolipides sont des lipides complexes résultant de l'amidification d'un acide gras sur la molécule de sphingosine. Sur la fonction alcool primaire de cette dernière peuvent s'ajouter différents substituants « R » comme un atome d'hydrogène, permettant ainsi la production de céramides

(Tirée de <https://fr.wikipedia.org/wiki/Sphingolipide>).

Sur le plan métabolique, la S1P est l'un des nombreux produits dérivant du métabolisme des sphingolipides. En réponse à plusieurs stimuli auxquels elles sont exposées, ces molécules se voient d'abord transformées par des enzymes endogènes en lipides céramides (Bartke and Hannun, 2009; Kunkel et al., 2013). Ces lipides sont ensuite hydrolysés sous l'action de céramidases pour former la sphingosine. On retrouve celle-ci dans divers compartiments de la cellule comme le lysosome, le réticulum endoplasmique ainsi que les membranes cellulaires (Spiegel and Milstien, 2003). La sphingosine se verra éventuellement transformée par d'autres enzymes, les sphingosines kinases (Sphks), lesquelles assurent la formation de la S1P (Pulkoski-Gross et al., 2015; Tirodkar and Voelkel-Johnson, 2012) (Figure 1.2).

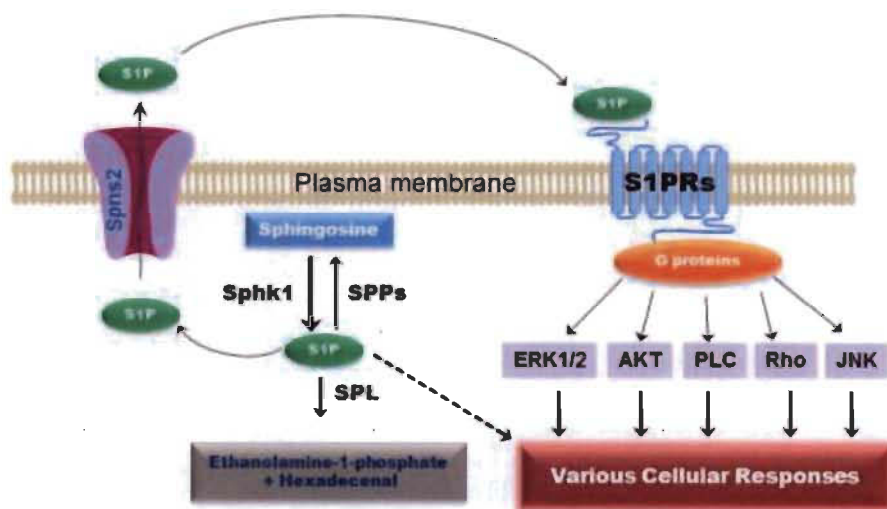


Figure 1.2 La biosynthèse, le transport et les S1PRs.

La S1P est formée dans les compartiments intracellulaires et la membrane plasmique. Elle sera libérée dans le milieu extracellulaire par des transporteurs pour agir notamment sur des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (S1PRs). Ces derniers sont en mesure de moduler une pléiade d'effecteurs cellulaires tels que ERK1, AKT, PLC, Rho et JNK, entre autres (Tirée de Proia and Hla, 2015).

Les transporteurs membranaires spécifiques de ce dérivé sphingolipidique (Transporteurs MFSD2B, ABC et Spns) (Bradley et al., 2014; Donoviel et al., 2015; Kobayashi et al., 2018) assurent à terme la libération extracellulaire de la molécule. De fait, les concentrations de la S1P sont maintenues élevées dans le plasma ($\sim 1 \mu\text{M}$) et dans la lymphe ($\sim 100 \text{ nM}$) grâce à la capacité des globules rouges et d'autres cellules endothéliales à libérer ladite molécule. Une très grande partie de la S1P plasmatique se retrouve liée à des protéines de transport comme les HDL et l'albumine. Sur ce plan, des protéines accessoires interviennent afin de faciliter le transport de la molécule, par exemple, en augmentant sa solubilité et en limitant sa dégradation enzymatique par des lyases (Proia and Hla, 2015). Ainsi, présente dans le milieu extracellulaire, la S1P est à même d'activer des récepteurs se trouvant à la surface des membranes cellulaires, des récepteurs possédant des fonctions variées et faisant intervenir des voies de signalisation multiples. On y reviendra.

1.1.2 Grandes fonctions biologiques de la S1P

On sait depuis plusieurs décennies que la S1P intracellulaire constitue une molécule essentielle à l'organisation et le fonctionnement des membranes plasmiques, particulièrement au sein des structures complexes que sont les radeaux lipidiques (Tirodkar and Voelkel-Johnson, 2012). Par ailleurs, au sein des cellules, plusieurs rôles de seconds messagers ont également été attribués à la S1P (Blaho and Hla, 2014; Li et al., 2015b). À titre d'exemple, elle semble en mesure d'influencer la régulation de gènes spécifiques en régulant l'acétylation des histones par l'inhibition des HDAC (Hait et al., 2014). Elle serait également capable d'inhiber la destruction d'éléments structuraux de la cellule en favorisant l'activation de NF- κ B (Blaho and Hla, 2014).

Les biologistes s'intéressant à la fonction mitochondriale ont depuis quelques temps démontré que la S1P est susceptible de réguler la respiration mitochondriale par son interaction avec la prohibitine 2 (Strub et al., 2011). Il a également été démontré que la S1P a pour effet de diminuer la production de protéines β -amyloïdes (van Echten-Deckert et al., 2014), des protéines reconnues pour leur implication dans l'apparition des dommages de type Alzheimer au cerveau. On suspecte enfin que la S1P joue un rôle primordial dans la relâche des réserves intracellulaires d'ions calcium (Mattie et al., 1994; Seol et al., 2005; Strub et al., 2010) et de protons acides (Hoglinger et al., 2015). Ces derniers sont des acteurs biologiques souvent mis en cause dans le développement de maladies neurodégénératives impliquant, notamment, l'effet toxique du neurotransmetteur glutamate nommé « phénomène de neurotoxicité » (Lewerenz and Maher, 2015).

De nombreuses publications nous laissent croire que les substances dérivant du métabolisme sphingolipidique exercent des effets

physiologiques variés, pour ne pas dire contradictoires. Alors que l'accumulation de céramides et de sphingosine semble conduire à la mort des cellules, la S1P agirait quant à elle comme un agent mitogène inhibiteur du processus d'apoptose (Allende et al., 2013; Ratajczak et al., 2014; Rutherford et al., 2013; Spiegel and Milstien, 2011; Yester et al., 2011). En ce sens, des études récentes en biologie cellulaire ont mis en évidence que la S1P peut limiter les dommages aux cellules bêta du pancréas, un effet cellulaire qui nécessiterait vraisemblablement l'intervention de la protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK) (Ng et al., 2017).

Évidemment, les chercheurs s'intéressent de plus en plus aux maladies liées à des anomalies sphingolipidiques et aux influences (bonnes ou néfastes) de ces lipides sur la destinée intracellulaire de protéines pathologiques (Spiegel and Milstien, 2011). Sur ce plan, on suspecte qu'une augmentation anormalement élevée de la quantité de S1P favoriserait la prolifération cellulaire, un effet physiologique qui pourrait malheureusement contribuer à l'apparition de cancers et au développement de la résistance aux médicaments anticancéreux (Brizuela et al., 2012; Long et al., 2010; Maceyka et al., 2012). Inversement, une diminution intempestive des taux de S1P aurait quant à elle une influence sur le phénomène d'apoptose, un effet cellulaire qui pourrait enclencher la mort neuronale et, par conséquent, le développement de maladies neurodégénératives (Arish et al., 2017; Ceccom et al., 2014; Di Pardo et al., 2017).

1.1.3 Expression et fonctions des récepteurs de la S1P

Les données récentes sur les mécanismes d'action de la S1P indiquent que les effets de ce médiateur lipidique découlent entre autres de l'activation de récepteurs membranaires couplés aux protéines G

(RCPGs) (Blaho and Hla, 2014; Goetzl et al., 2004; Maceyka et al., 2012; Rosen et al., 2013). Ces derniers seraient d'ailleurs impliqués dans la mise en œuvre de plusieurs processus physiologiques tels que le trafic des lymphocytes, le développement vasculaire et l'inflammation (Maceyka et al., 2012; Payne et al., 2002; Rosen et al., 2013). Les récepteurs de la S1P (S1PRs) sont des récepteurs de surface appartenant à la famille des RCPGs de classe A.

À ce jour, cinq S1PRs ont été identifiés (Blaho and Hla, 2014; Rosen et al., 2013). Ces récepteurs ne s'expriment pas de manière homogène parmi tous les types de cellules du corps mais plutôt de façon différentielle, ce qui leur permet d'agir en synergie ou encore en antagonisme. Ils sont appelés à réguler une pléiade d'effecteurs cellulaires comme la phospholipase C (PLC), l'adénylate cyclase (AC), la kinase phosphoinositide 3 (PIK3) et certaines GTPases telles que Rho et Ras (Cuvillier, 2012). Par ailleurs, la stabilité évolutive des récepteurs de la S1P lui confère des fonctions importantes et distinctives dans l'organisme (Figure 1.3).

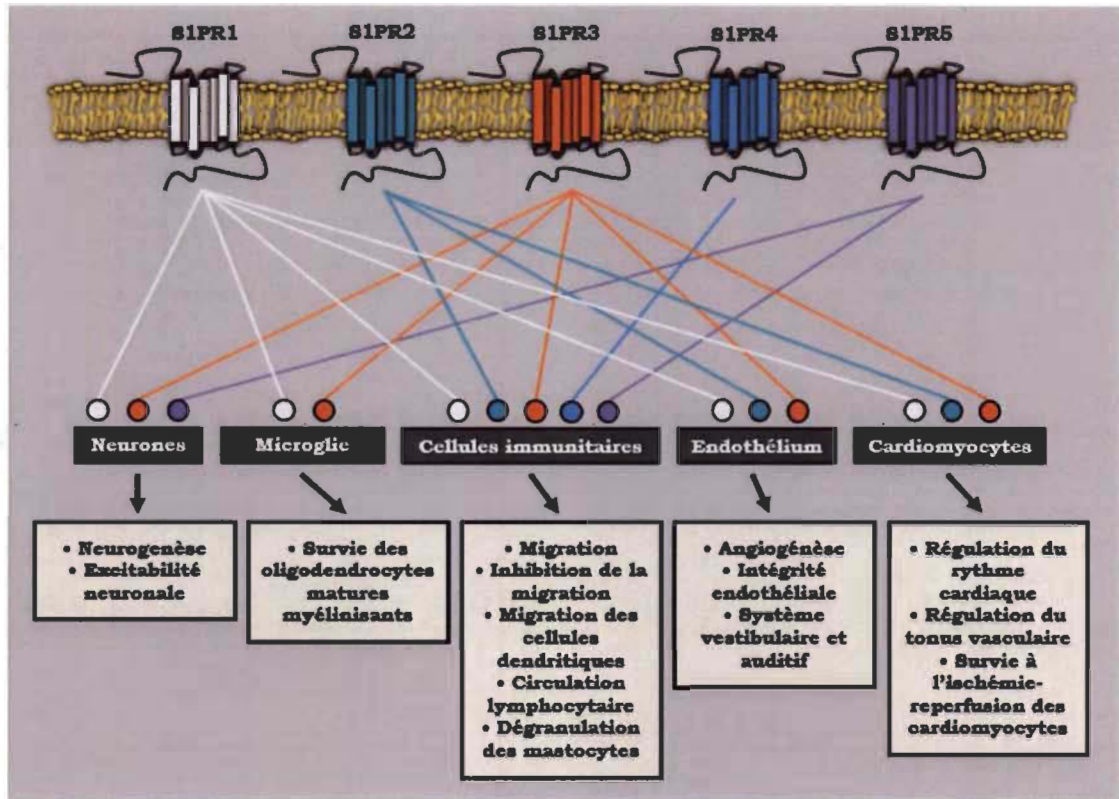


Figure 1.3 Les rôles physiologiques des S1PRs.

Il existe cinq récepteurs pouvant être activés par la S1P (S1PRs). Selon le type cellulaire, une production différentielle de ces récepteurs sera faite. De plus, chacun des S1PRs possède des rôles physiologiques distincts (Modifiée à partir de Cuvillier, 2012).

Le S1PR1 est exprimé abondamment dans la majorité des types cellulaires tels que les cellules endothéliales, musculaires, immunitaires et neuronales. Il possède une forte affinité pour son ligand endogène et est classiquement associé à la prolifération, la survie et la migration cellulaires (Guerrero et al., 2016). De plus, plusieurs de ses effets semblent consécutifs à une augmentation des taux intracellulaires en calcium (Hinkovska-Galcheva et al., 2008; Pimentel and Benaim, 2012; Spiegel and Milstien, 2003). Les études en lien avec la biologie moléculaire ont démontré que la délétion du gène codant pour le S1PR1 induit la mort de l'embryon. Ce phénotype de mortalité embryonnaire semble spécifique au récepteur 1 de la S1P puisque celui-ci n'est pas reproduit lors de la

délétion des autres S1PRs (Cuvillier, 2012). Des preuves solides montrent que le S1PR1 est également impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques faisant de lui une cible thérapeutique particulièrement intéressante. Par exemple, le récepteur paraît essentiel pour la sortie des lymphocytes T et B du thymus mais aussi des organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques (Cavone et al., 2015; Matloubian et al., 2004; Pulkoski-Gross et al., 2015). Des études démontrent également que ce récepteur possède un rôle important dans la protection des cellules myéloïdes contre l'apoptose (Gonzalez et al., 2017). De plus, selon toute vraisemblance, le S1PR1 jouerait un rôle capital dans le développement et l'organisation du réseau vasculaire (Mendelson et al., 2014).

Les études ont pu mettre en évidence que le S1PR2 s'associe, quant à lui, avec des protéines G susceptibles d'activer diverses voies de signalisation comme celle de la PLC engagée dans la production d'inositol phosphate (IP3) et l'augmentation du calcium cytoplasmique (Blaho and Hla, 2014). Les souris *knock-out* pour le gène de ce récepteur naissent sans défauts anatomiques ou physiologiques apparents. Cependant, ces dernières vont éventuellement présenter des convulsions sporadiques parfois létales entre trois et sept semaines de vie (MacLennan et al., 2001). Fait intéressant, on attribue au S1PR2 un rôle essentiel au fonctionnement normal des systèmes vestibulaires et auditifs, sa déficience entraînant la surdité des animaux étudiés (Kono et al., 2007; Romero-Guevara et al., 2015). Le récepteur intervient également dans la régulation de la réponse du cerveau à la suite d'une ischémie cérébrale (Kim et al., 2015). Contrairement au S1PR1, l'activation du S1PR2 est plutôt associée à l'inhibition de la prolifération et de la migration de nombreux types cellulaires (Adada et al., 2013).

Les chercheurs s'intéressant au S1PR3 ont démontré que ce dernier active diverses voies de signalisation faisant intervenir de petites GTPases telles que Rho et Rac afin de réguler la prolifération, la survie et la migration cellulaire ainsi que le tonus vasculaire via la libération de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales (Cuvillier, 2012). Il convient toutefois de souligner que les souris *knock-out* pour le gène de ce récepteur se développent normalement et ne présentent, à ce jour, aucune anomalie phénotypique évidente (Camprubi-Robles et al., 2013). Malgré tout, des expériences faites chez un modèle de souris sepsis *knock-out* pour ce récepteur ont permis de démontrer son importance dans l'efficacité des macrophages via la production de dérivés réactifs de l'oxygène (Hou et al., 2017). Le S1PR4 s'exprime quant à lui abondamment dans les cellules immunitaires (Olesch et al., 2017). Des études sur des animaux *knock-out* pour le gène S1PR4 ont révélé que ce récepteur pouvait affecter, de façon marginale, les fonctions des lymphocytes T et qu'il serait impliqué dans la migration des cellules dendritiques ainsi que dans la production de cytokines (Muller et al., 2017; Schulze et al., 2011). Les recherches indiquent finalement que les S1PR5 sont modérément exprimés dans les cellules du système immunitaire, notamment les cellules NK, dans lesquelles ils joueraient un rôle important dans leur mobilisation vers les sites inflammatoires (Cuvillier, 2012).

1.1.4 S1PRs, microglie et neurones

Les récepteurs de la S1P sont présents dans le cerveau où ils jouent des rôles déterminants (Figure 1.4) (Prager et al., 2015). De fait, ils apparaissent aujourd'hui comme des acteurs fondamentaux dans le développement du cerveau et le maintien des fonctions cérébrales (Ghasemi et al., 2016; Spiegel and Milstien, 2003). Les études sur la présence et la fonction de ces récepteurs dans le cerveau se sont d'abord

concentrées sur les cellules dites non-neuronales, c'est-à-dire les cellules gliales (Nishimura et al., 2010). Dans les oligodendrocytes formant la myéline des cellules du système nerveux central (SNC), les effets de la S1P semblent passer par l'activation de plusieurs sous-types de récepteurs. Par exemple, on sait que les S1PR1, 3 et 5 sont tous plus ou moins indispensables pour la survie des oligodendrocytes matures et lors du développement embryonnaire (Healy and Antel, 2015; Jaillard et al., 2005). Des observations en lien avec ce type cellulaire indiquent que le S1PR5 serait l'acteur indispensable pour la survie des oligodendrocytes (Novgorodov et al., 2007). Toutefois, il a été démontré que les souris *knock-out* pour le gène S1PR5 ne présentent aucun déficit apparent de myélinisation (Cuvillier, 2012).

Concernant les astrocytes, des cellules gliales spécialisées dans le soutien fonctionnel des neurones, l'activation conjointe des S1PR1 et S1PR3 stimule le métabolisme et ultimement la prolifération cellulaire (Farez and Correale, 2016). La microglie, qui constitue quant à elle environ 20 % des cellules gliales du cerveau, est également sous le contrôle des récepteurs de la S1P. Notamment, on sait que l'expression des S1PRs est susceptible de moduler l'état d'activation des cellules formant la microglie en augmentant la relâche de facteurs pro-inflammatoires ainsi que la production de monoxyde d'azote via les S1PR1 et 3 (Groves et al., 2013).

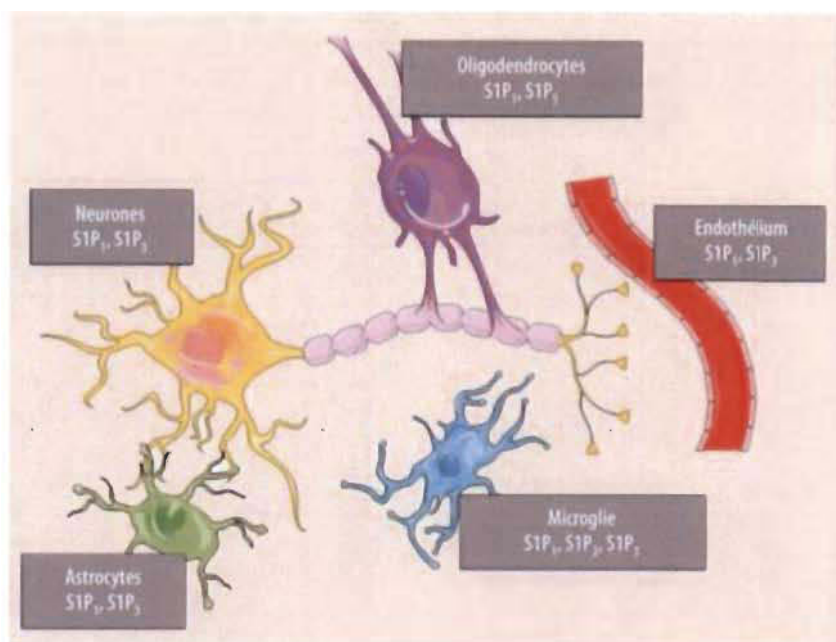


Figure 1.4 Les S1PRs et le système nerveux.

Les récepteurs de la S1P s'expriment de façon différentielle dans les cellules gliales et dans les neurones produisant des effets variés d'une cellule à l'autre (Tirée de http://www.edimark.fr/phototheque/galerie_detail.php?id_galerie=869).

Les neurobiologistes s'intéressent depuis quelques temps aux effets directs de la S1P sur les neurones. Les chercheurs ont d'ailleurs mis en évidence que l'activation des S1PRs pourrait être impliquée dans les mécanismes sous-jacents à l'extension et à la rétraction des axones lors du développement (Toman et al., 2004). De plus, les évidences expérimentales s'accumulent quant au rôle fonctionnel de la S1P. Il semble que ce dérivé lipidique est à même de réguler, via les S1PR1, la transmission synaptique en agissant sur l'excitabilité des membranes et la relâche de neurotransmetteurs (Kajimoto et al., 2007; Li et al., 2015a; Zhang et al., 2006). Dans les dernières années, Langeslag et ses collaborateurs ont démontré que l'activation des S1PR1 a pour effet d'accroître les courants dans des cellules sensorielles soumises à un traitement nociceptif (Camprubi-Robles et al., 2013), un résultat en faveur d'un rôle potentiel du S1PR1 dans le contrôle de la douleur.

La réponse des neurones sensoriels impliqués dans les mécanismes contrôlant la bronchoconstriction est également accentuée suivant l'activation du S1PR3 (Trankner et al., 2014).

1.1.5 Effets thérapeutiques des analogues de la S1P

La S1P et ses analogues chimiques font l'objet d'un grand nombre de recherches depuis déjà quelques décennies en raison de leur implication dans la signalisation, la survie et la prolifération cellulaires ainsi que l'immunité. Par exemple, le fingolimod (FTY720), un analogue structural de la sphingosine, possède un puissant effet immunosuppresseur. Cette molécule est d'abord connue pour prolonger la survie des greffons d'organes solides comme la prostate et le sein ainsi que 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). Actuellement, cette molécule est utilisée afin de réduire les symptômes de patients souffrant de la sclérose en plaques (Brinkmann et al., 2010; Chiba and Adachi, 2012; Chun and Hartung, 2010).

Les résultats publiés en 2017 par le chercheur Joshi et des collègues dans *Scientific Reports* ont suscité un réel espoir dans le traitement pharmacologique de la maladie d'Alzheimer (Joshi et al., 2017). Selon l'étude présentée, le composé fingolimod, un agoniste non spécifique activant quatre des cinq S1PRs, avait pour effet de réduire la charge amyloïde et d'améliorer les performances cognitives chez la souris, une observation mainte fois reproduite (Doi et al., 2013; Fukumoto et al., 2014; Hemmati et al., 2013; Ruiz et al., 2014). Hélas, des études récentes ont démontré que le médicament en question semble en mesure d'accroître le niveau de phosphorylation d'une protéine associée aux microtubules : la protéine Tau (unité d'association aux tubules).

L'hyperphosphorylation de la protéine Tau, on y reviendra, constitue un processus biochimique délétère pour les neurones. Ainsi, la découverte de molécules susceptibles de réduire la phosphorylation de cette protéine est mise à l'avant-scène dans la recherche en neuropharmacologie.

Les pharmacologues s'intéressent depuis peu aux effets d'agonistes agissant plus spécifiquement sur les sous-types de récepteurs de la S1P dans le contexte de la neuroprotection (Park and Im, 2017). Les composés SEW2871 et CYM5442, agissant respectivement sur les récepteurs 1 et 3 de la S1P, semblent donc prometteurs sur ce plan. De fait, le présent mémoire s'attarde à identifier l'influence de ces agonistes sur les niveaux de phosphorylation de la protéine Tau dans l'hippocampe, une région du cerveau précocement atteinte dans la maladie d'Alzheimer (Asle-Rousta et al., 2013; Doi et al., 2013; Hemmati et al., 2013; Takasugi et al., 2013). Voyons d'abord les caractéristiques biochimiques et cellulaires de la protéine Tau dans le système nerveux.

1.2 La protéine Tau : caractéristiques et fonctions

1.2.1 Isoformes et phosphorylation de Tau

La protéine Tau fut isolée pour la première fois en 1975 et décrite comme une protéine associée à la tubuline ayant la capacité de promouvoir la polymérisation et la stabilisation des microtubules *in vitro* (Cleveland et al., 1977; Grundke-Iqbal et al., 1986). Le gène codant pour la protéine Tau (MAPT) est localisé à la position 17q21.1. et contient 16 exons dont 11 sont impliqués dans la formation des principales isoformes (Buee et al., 2000). Les six isoformes majeures de Tau sont synthétisées par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 dans le cerveau adulte humain, ce qui permet la production d'isoformes différant par la présence ou l'absence d'un ou de deux inserts dans la partie N-terminale

(0N, 1N ou 2N) ainsi que par la présence de trois ou quatre domaines de liaison aux microtubules ou MBDs (3R ou 4R) situés dans la partie C-terminale (Figure 1.5). Tau se situe principalement dans les axones des neurones, mais également au niveau des compartiments somato-dendritiques des neurones, des cellules gliales et des astrocytes (Migheli et al., 1988; Papasozomenos and Binder, 1987).

Sous sa forme phosphorylée hautement soluble, la protéine Tau favorise la stabilisation et l'assemblage des microtubules nécessaires à la croissance et au transport axonal. Cependant, la phosphorylation des résidus Ser262, Ser293, Ser324 et Ser356 de Tau, situés à des positions équivalentes dans les MBDs, compromet fortement la liaison de la protéine avec les microtubules provoquant ainsi son détachement (Buee et al., 2000; Drewes et al., 1995; Hirokawa et al., 1988). La phosphorylation de Tau sur des sites n'étant pas compris dans les MBDs affecte également sa liaison (Ksiezak-Reding et al., 2003; Sengupta et al., 1998). Lorsque le transport axonal ne fonctionne pas normalement, il peut en découler des dysfonctions dans la neurotransmission des signaux qui peuvent provoquer des modifications dans l'organisation des synapses (Gendron and Petrucelli, 2009).

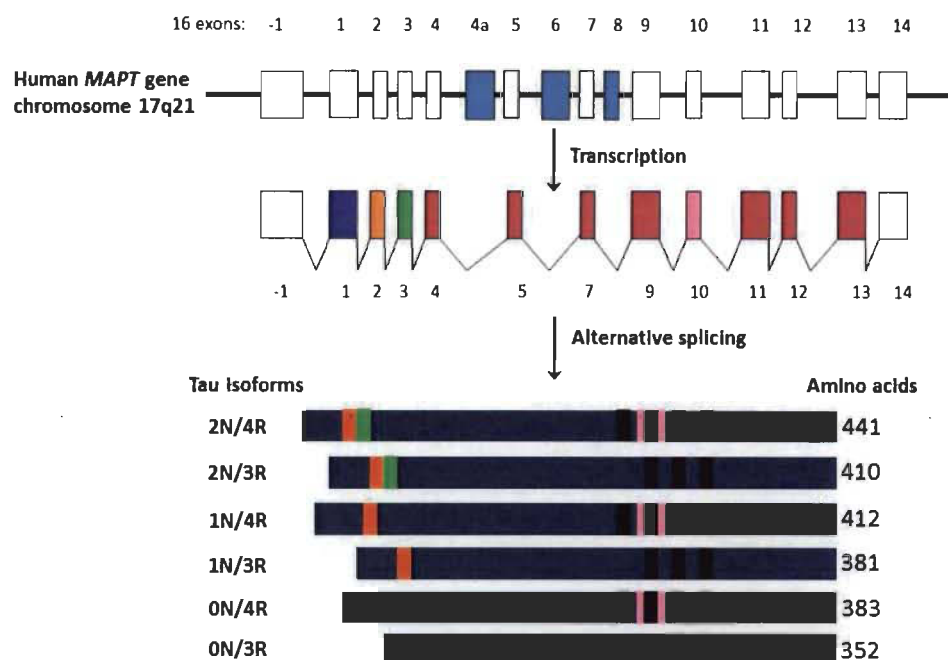


Figure 1.5 Le gène et les isoformes de la protéine Tau.

Le gène *MAPT* de Tau possède 16 exons. L'épissage alternatif de ce gène permettra la production de six isoformes dans le SNC (Tirée du livre *Understanding Alzheimer's Disease*).

C'est au milieu des années 80 que Tau fut définie comme étant une phosphoprotéine (Baudier et al., 1987; Ihara et al., 1986). Plus de 80 sites de phosphorylation potentiels possédant des résidus sérines, thréonines ou tyrosines ont été identifiés sur la plus longue isoforme de la protéine au niveau du SNC (Hanger et al., 2009). La phosphorylation de la protéine Tau est hautement contrôlée par la balance entre les effets exercés par des enzymes phosphorylantes (kinases) et déphosphorylantes (phosphatases) (Hanger et al., 2009). Plusieurs kinases sont reconnues pour cibler les protéines Tau. Parmi celles-ci, la kinase 5 dépendante de la cycline (Cdk5), les protéines kinases associées aux microtubules (MAPKs), la protéine kinase A (PKA), la kinase glycogène synthase (GSK) 3 α / β , la kinase dépendante de l'AMP (AMPK), la kinase calcium/calmoduline dépendante (CaMKII) ainsi que les protéines kinases spécifiques pour les résidus de tyrosines telles que Src et Fyn en

font partie (Domise et al., 2016; Hanger et al., 1992; Ittner et al., 2010; Kumar et al., 2015; Leroy et al., 2002; Martin et al., 2011; Noble et al., 2003; Pei et al., 1997; Reynolds et al., 2008; Wei et al., 2015; Zhu et al., 2000).

Sur le plan physiologique, la phosphorylation de Tau joue un rôle primordial dans la modulation de l'affinité de la protéine pour les microtubules et les membranes (Brandt et al., 1995). Les processus de phosphorylation et d'épissage alternatif jouent également un rôle clé au cours du développement. Dans les stades précoces, une seule isoforme de Tau est présente, celle-ci étant hautement phosphorylée (Goedert et al., 1989; Kosik et al., 1989). Dans le cerveau mature, on retrouve les six isoformes de Tau, et leurs niveaux de phosphorylation sont grandement diminués reflétant ainsi l'importance de la plasticité neuronale dans l'embryogénèse mais aussi dans la maturation, la différenciation et la genèse neuronales (Lazarov and Marr, 2010).

Comme on le sait, de nombreuses protéines phosphatases (PP) exercent des effets déphosphorylants. Parmi celles agissant sur Tau, la PP1, la PP2A, la PP2B et la PP5 (Braithwaite et al., 2012; Liu et al., 2005) en font partie. Les chercheurs ont testé l'efficacité de ces phosphatases dans différentes conditions expérimentales et la PP2A semble avoir davantage d'impact sur la protéine Tau (Gong et al., 2000a; Gong et al., 2000b), un résultat peu surprenant puisque cette enzyme semble assumer plus de 70 % de l'activité phosphatase cellulaire dans le cerveau (Liu et al., 2005).

Liu et des collègues ont démontré, par ailleurs, que l'activité enzymatique de PP2A chute considérablement dans les cerveaux Alzheimer (Liu et al., 2005), une observation qui laisse croire que l'inactivation de la PP2A pourrait malencontreusement favoriser l'action

de diverses kinases et, par conséquent, l'hyperphosphorylation de Tau dans le cerveau Alzheimer. Dans cette perspective, Park et ses collaborateurs ont démontré que l'activité de la kinase AMPK, connue pour cibler préférentiellement le site de phosphorylation Ser262 de Tau, peut être régulée par les enzymes phosphatases telles que la PP1 et la PP2A (Park et al., 2013). Les travaux récents de la chercheuse Manon Domise insistent d'ailleurs sur l'intérêt de poursuivre des recherches précises sur le lien existant entre l'activité AMPK et la phosphorylation de Tau sur des sites préférentiels comme la Ser262 (Domise et al., 2016; Kumar et al., 2015); un questionnement fondamental qui sera abordé dans le cadre du présent projet de maîtrise.

1.2.2 Rôles de la protéine Tau dans l'initiation et le développement de la neurodégénérescence

Il a été démontré que des modifications sur la protéine Tau diminuent sa capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules (Fulga et al., 2007; Martin et al., 2011; Minamide et al., 2000) et augmentent son agrégation sous forme d'enchevêtrements conférant ainsi un caractère toxique à la protéine (Kopke et al., 1993; von Bergen et al., 2000). L'implication de Tau dans la neurodégénérescence pourrait donc se produire via une combinaison de gain de fonctions toxiques, suite à des modifications de la protéine, et à une perte de fonctions normales provoquant des effets nocifs (Gendron and Petrucelli, 2009). Plusieurs modifications post-traductionnelles peuvent se produire sur Tau, mais la phosphorylation est de loin la mieux caractérisée et la plus susceptible de lui conférer un caractère toxique.

Les recherches actuelles démontrent que l'hyperphosphorylation de la protéine peut être la conséquence d'un déséquilibre des phosphatases et des kinases responsables de réguler son état de

phosphorylation (Wainaina et al., 2014). Une hyperphosphorylation de la protéine pourrait compromettre son rôle dans la stabilisation des microtubules et favoriser son agrégation. En effet, lorsque Tau devient anormalement phosphorylée, elle se détache des microtubules; un évènement qui provoque une dépolymérisation de ces derniers ainsi que la formation d'enchevêtrements de Tau hautement toxiques pour la cellule (Figure 1.6).

Il a également été démontré que, même en l'absence d'enchevêtrements, la phosphorylation de Tau provoque une désorganisation des composants du cytosquelette, un gonflement des axones ainsi qu'une présence anormale d'agrégats de mitochondries et de lysosomes dans l'axoplasme, reflétant une perte de fonctionnalité des microtubules pouvant mener à la neurodégénérescence (Ahlijanian et al., 2000; Bian et al., 2002). Les maladies neurodégénératives caractérisées par des modifications anormales de la protéine Tau sont regroupées sous le terme « tauopathies ». La plus commune d'entre elles est la maladie d'Alzheimer, caractérisée par la présence de plaques séniles constituées de β -amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires formés d'agrégats de la protéine Tau. On retrouve également dans ce groupe la paralysie supranucléaire progressive, la maladie de Pick, la démence frontotemporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (DFTP-17), la dégénérescence cortico-basale, le syndrome de Down, le parkinsonisme post-encéphalitique et d'autres tauopathies telles que la démence parkinsonienne, les maladies à prions et la sclérose latérale amyotrophique (Akwa et al., 2018; Caraci et al., 2017; Ferrer, 2018; Kovacs et al., 2018; Ludolph et al., 2009; Schweyer et al., 2018).

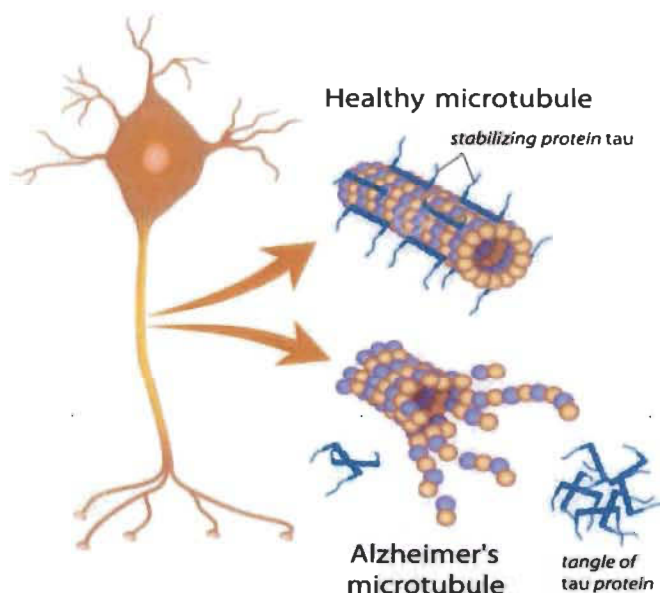


Figure 1.6 La protéine Tau hyperphosphorylée.

Elle jouerait un rôle dans le dysfonctionnement microtubulaire et la formation d'agrégats de Tau (Tirée de <https://fr.dreamstime.com>).

Enfin, sur le plan anatomique, Braak et des collègues ont démontré que la progression temporelle de la pathologie Tau suit un circuit de neurones interconnectés qui est défini et prévisible. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, les enchevêtrements neurofibrillaires sont initialement détectés dans le cortex transentorhinal. La pathologie progresse ensuite vers le cortex enthorinal – une région près de l'hippocampe qui intègre des informations d'origines diverses – en suivant les projections glutamatergiques, puis vers l'hippocampe, l'amygdale et le néocortex (Braak and Braak, 1991; Zhou et al., 2012). Le mécanisme impliqué dans cette progression pathologique n'est pas élucidé mais des expérimentations précliniques suggèrent qu'il pourrait être similaire à celui de la propagation de la protéine prion par transmission de cellule à cellule (Frost and Diamond, 2010).

Les études sur le sujet tendent, de fait, à démontrer que la propagation de la pathologie Alzheimer dans le cerveau implique une

dispersion de la protéine Tau par des organelles intracellulaires nommées exosomes. Selon toute vraisemblance, la sécrétion de ces derniers serait assurée par l'action de nombreuses enzymes comme la spingomyélinase neutre de type 2 (nSMase2), laquelle contribue normalement à régulariser les niveaux de céramides et de ses dérivés. Fait intéressant, il a été démontré que l'inhibition de cette enzyme constitue un moyen efficace pour freiner la sécrétion de Tau par les exosomes et, conséquemment, la propagation de la pathologie dans l'ensemble du cerveau chez la souris (Bilousova et al., 2018), une découverte thérapeutique potentiellement intéressante pour les chercheurs dans le domaine.

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

La recension des écrits scientifiques met bien en évidence la pertinence de l'utilisation d'analogues de la S1P dans le traitement de maladies neurodégénératives. C'est particulièrement incontestable pour la prise en charge pharmacologique des patients souffrant de la sclérose en plaques par le composé fingolimod. Cette molécule, qui s'inscrit dans la grande famille des analogues des récepteurs de la S1P, est toutefois enclin à favoriser l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, un phénomène délétère retrouvé lors du développement de la pathologie Alzheimer. Or, on le comprendra facilement, les chercheurs se questionnent sur la pertinence d'utiliser un tel agoniste dans des circonstances cliniques caractérisées par des niveaux élevés de phosphorylation de la protéine Tau. De fait, pour plusieurs, le traitement de la maladie d'Alzheimer devrait essentiellement s'évertuer à réduire l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans diverses régions du cerveau touchées par cette terrible affection comme l'hippocampe.

L'industrie pharmaceutique regorge de molécules analogues à la S1P qui agissent, au contraire du fingolimod, spécifiquement sur certains récepteurs membranaires. Or, comment positionner ces molécules dans le contexte de la thérapie Alzheimer? L'option que nous privilégions est de préciser les effets de certains de ces composés sur la phosphorylation de Tau. Émanant de cette démarche originale, deux objectifs principaux tenteront de répondre aux questions suivantes :

2.1 Est-ce que des analogues spécifiques de la S1P affectent les niveaux de phosphorylation de Tau dans l'hippocampe?

Rappelons-le, les études biochimiques conduisent à penser que l'activation globale des récepteurs de la S1P par le composé fingolimod peut contribuer à l'apparition de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, un processus pathologique contribuant vraisemblablement à la maladie d'Alzheimer. Ainsi, le premier volet expérimental de ce projet consistera à évaluer si cet effet indésirable sur Tau peut être évité par l'utilisation d'analogues plus spécifiques pour ces récepteurs. Une emphase sera donc portée sur l'étude de deux molécules, le SEW2871 et le CYM5541, connues pour activer respectivement les sous-types 1 et 3 des récepteurs de la S1P.

Cette analyse s'attardera à estimer les effets de ces molécules sur des sites de la protéine Tau devenant hyperphosphorylés au cours de la pathologie Alzheimer. Les résidus étudiés sont localisés dans la région riche en proline (Ser199/202), dans l'un des domaines de liaison aux microtubules (Ser262) et dans la partie C-terminale (Ser396 et Ser404) de la protéine. Sur le plan expérimental, des tranches d'hippocampe de rats seront maintenues fonctionnelles dans une chambre d'incubation afin d'être traitées avec le SEW2871 ou le CYM5541. Les échantillons recueillis permettront l'analyse des niveaux de phosphorylation des sites choisis par la technique classique d'immunobuvardage de type Western Blot.

2.2 Est-ce que les analogues en question sont en mesure de moduler l'activité d'enzymes connues pour contrôler la phosphorylation de Tau?

Les recherches actuelles semblent démontrer que l'hyperphosphorylation de la protéine est la conséquence d'un

débalancement des phosphatases et des kinases responsables de réguler l'état de phosphorylation de Tau (Wainaina et al., 2014). Ainsi, ce deuxième volet permettra d'évaluer l'activité de certaines enzymes impliquées de près dans la régulation de l'état phosphorylé de la protéine Tau. Par les mêmes méthodes expérimentales utilisées dans le volet précédent, l'activité d'enzymes déphosphorylantes (phosphatases) et phosphorylantes (kinases) susceptibles d'agir sur Tau sera estimée. Une attention particulière sera portée sur la caractérisation de certains sites de modifications post-traductionnelles reconnus pour contrôler l'activité d'enzymes tels que la Tyr307 et la Leu309 de PP2A, la Thr286 de CaMKII, la Ser9 et la Tyr216 de GSK3- β et la Thr172 d'AMPK.

Peu importe les résultats obtenus, il est fort probable que la présente étude nous en apprenne davantage sur les effets des récepteurs de la S1P au niveau de la protéine Tau. Si l'hyperphosphorylation de Tau induite par le fingolimod est un effet malheureusement indésirable dans le contexte Alzheimer, l'étude proposée ici aura comme bénéfice potentiel de valider la pertinence de l'utilisation d'analogues plus spécifiques comme le SEW2871 et le CYM5541, des informations qui pourraient s'avérer importantes tant sur le plan pharmacologique que clinique.

CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE

3.1 Contribution des auteurs

Étant le premier auteur de ce manuscrit, j'ai rédigé l'article avec l'aide précieuse de mon directeur de recherche, le professeur Guy Massicotte. Le professeur Michel Cyr a contribué, avec mon directeur de recherche, à l'ébauche conceptuelle de ce projet. De plus, le professeur Marc Germain et Laure Chagniel ont permis d'interpréter les présentes observations avec une meilleure objectivité. Enfin, la mise au point des techniques requises pour la réalisation de la démarche expérimentale retenue s'est faite avec la précieuse contribution de ma collègue Suzanne Attiori Essis.

Le contenu du présent chapitre est présenté sous forme d'article en anglais qui a fait l'objet d'une publication pour la revue *Brain Research* en janvier 2017. La référence de cet article est la suivante :

DOI: 10.1016/j.brainres.2017.01.014

3.2 Article scientifique

The sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist SEW2871 reduces
Tau-Ser262 phosphorylation in rat hippocampal slices

Frédéric ST-CYR GIGUÈRE, Suzanne ATTIORI ESSIS, Laure CHAGNIEL,
Marc GERMAIN, Michel CYR and Guy MASSICOTTE

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

The authors declare that there is no conflict of interest regarding
the publication of this manuscript.

Number of pages: 26

Number of figures: 9

Number of words: 6,417

Corresponding author's address: Guy Massicotte, Ph.D.
Département de biologie médicale
UQTR
CP 500
Trois-Rivières, Québec
Canada G9A 5H7
Téléphone: (819) 376-5053
Fax: (819) 376-5084
E-mail: Guy.Massicotte@uqtr.ca

Introduction

First considered to be an intracellular second messenger (Mattie et al., 1994; Olivera and Spiegel, 1993), S1P was eventually found to work physiologically by activating extracellular G protein-coupled receptors (Guerrero et al., 2016; Kono et al., 2014). These receptors, divided into 5 subtypes (S1PR1-5), exhibit different cell specificities in a wide variety of tissues (Blaho and Hla, 2014), and a substantial volume of literature indicates that S1PRs can be activated by various agonists (Roberts et al., 2013). From a clinical perspective, the drug fingolimod (also called FTY720-P) is a global S1PR agonist capable of prompt lymphocyte sequestration in lymph nodes to prevent autoimmune reactions in multiple sclerosis (Choi et al., 2011; Di Menna et al., 2013; Doi et al., 2013; Janssen et al., 2015). This therapeutic action is generally thought to result from agonist-induced internalization, down-regulation and degradation of S1PR1 (Blumenfeld et al., 2016; Mullershausen et al., 2009).

FTY720-P may also exert additional pharmacological effects on central nervous system 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 Alzheimer's diseases (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). However, both *in vitro* and *in vivo* experiments have demonstrated that FTY720-P, 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-P can alter normal brain physiology via a mechanism involving hyperphosphorylation of Tau proteins (Attiori Essis

et al., 2015). Hyperphosphorylated Tau has been related to various brain pathologies (Kovacs, 2015; Murray et al., 2014), including AD (Brunden et al., 2009; Clausen et al., 2012), where it contributes to the formation of paired helical filaments and neurofibrillary tangles in brain lesions (Ballatore et al., 2007; Noble et al., 2011).

Over the years, numerous pharmacological agonists, acting more selectively on S1PR subtypes, have been developed (Guerrero et al., 2016). At this stage, however, it is not known to what extent these other drugs can alter Tau proteins. In this context, we compared the effects of SEW2871 and CYM5541 on Tau phosphorylation, two selective agonists of S1PR1 and S1PR3, respectively. Combining hippocampal slice preparation and Western blotting experiments we established that Tau phosphorylation at the Ser262 epitope is reduced after selective S1PR1 (but not S1PR3) activation. The relevance of this observation is discussed in the context of Tau-related pathologies.

Results

Tau phosphorylation is differentially regulated by S1PR agonists

It was recently reported that the global S1PR agonist FTY720-P selectively enhanced Tau phosphorylation at the Ser262 epitope (Attiori Essis et al., 2015). Here, the effects on Tau phosphorylation of SEW2871 and CYM5541, two potent and selective agonists acting respectively on S1PR1 and S1PR3 (for chemical structures, see Figures 1A and 3A) were compared. Acute hippocampal slices were treated for 3 h with either compound and then processed for Western blotting analysis. Initial experiments with antibody (Ab) recognizing phosphorylated (p)-Tau at Ser262 revealed 4 distinct isoforms with molecular weights ranging from 68 to 44 kDa (Fig. 1B).

As illustrated in Figure 1C, SEW2871 treatment (10 μ M) markedly reduced p-Tau-Ser262 levels. When normalized to total Tau, SEW2871 treatment significantly reduced p-Tau-Ser262 on all isoforms detected, an effect that was more pronounced on the 62 kDa isoform. Western blotting with Tau-5 indicated that the effect of SEW2871 on Ser262 phosphorylation cannot be attributed to changes in total Tau levels, compared to control slices (Fig. 1D). Further biochemical analysis showed that this effect on p-Tau-Ser262 was rather specific, as treatment of rat hippocampal slices with SEW2871 did not produce significant changes in the phosphorylation of other Tau residues, such as p-Ser199/202, p-Ser396 and p-Ser404 (Fig. 2). On the other hand, Western blotting indicated that p-Tau-Ser262 levels were not modified in slices pretreated with the S1PR3 agonist CYM5541 (3 h, 10 μ M) (Fig. 3). Here, again, it was seen that phosphorylation levels of other Tau epitopes (p-Ser199/202, p-Ser396 and p-Ser404) were not altered by CYM5541 treatments (data not shown).

Implications of AMPK α and PP2A

The influence of SEW2871 on the activity of kinases known to phosphorylate Tau proteins was explored to investigate putative mechanisms responsible for p-Tau regulation by S1PR1. The results obtained with 3 of them, glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β), calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and AMPK α , are reported in Figure 4. Pretreatment of rat hippocampal slices with the S1PR1 agonist SEW2871 did not significantly modify GSK3 β activity, as phosphorylation levels of both Ser9 and Tyr216 residues were unchanged (Fig. 4A). Similarly, preincubation of slices with SEW2871 had no significant effect on CaMKII levels phosphorylated at Thr286. However, reduction of AMPK α activity was detected by measurement of its phosphorylation at Thr172 (Fig. 4B), which was decreased by more than

70%. We performed experiments in slices treated with the AMPK activator A-769662 (A76; 10 μ M). As shown in Figure 5, both AMPK α -Thr172 (Fig. 5A) and Tau-Ser262 (Fig. 5B) phosphorylation were substantially increased in rat hippocampal slices after A76 treatment. In this set of experiments, we also observed that the ability of A76 to accentuate AMPK α and Tau phosphorylation was totally compromised in SEW2871-treated slices.

It is known that AMPK is an important target of PP2A. The present study further indicates that the ability of SEW2871 to dephosphorylate p-Tau-Ser262 is probably mediated by this phosphatase. While enhancement in PP2Ac methylation at Leu309 epitopes was detected following SEW2871 treatment, PP2Ac phosphorylation at Tyr307 residues was found to be reduced (Fig. 6A). When estimated in the same slices, the ratio of m-PP2Ac-Leu309 to p-PP2Ac-Tyr307 was augmented by 85% in slices treated with SEW2871 compared to the controls (Fig. 6B), which strongly suggests augmentation of PP2A activity. On that line, Western blotting revealed that in slices pretreated with the PP2A inhibitor cantharidin (CAN; 1 μ M) the effect of SEW2871 on p-Tau-Ser262 was totally prevented in comparison to control slices (Fig. 7A). If anything, we observed that SEW2871 treatment is inclined to enhance Tau-Ser262 phosphorylation in the presence of CAN, with the most potent effect noted for the 68 kDa isoform. In contrast to the PP2A inhibitor, the ability of SEW2871 to decrease Tau-Ser262 phosphorylation was not compromised by the PP2B inhibitor FK506 (FK; 1 μ M). When compared to Figure 1, the effect of SEW2871 on p-Tau-Ser262 appears to be even more pronounced in the presence of this PP2B inhibitor (Fig. 7B). We finally estimated the potential implication of PP2A in regulating AMPK activity after SEW2871 treatment. As shown in Figure 8 and, as expected, SEW2871-induced AMPK α -Thr172 dephosphorylation was also entirely prevented by the PP2A inhibitor CAN.

Discussion

In recent years, it has been proposed that S1PRs possess broad biological functions in cells, ranging from control of membrane receptors to the generation of signaling molecules affecting cell viability (Hannun and Obeid, 2008; Hannun and Obeid, 2011; Maceyka and Spiegel, 2014; Pyne and Pyne, 2013; van Echten-Deckert et al., 2014). Initial reports on the influence of S1PRs on Tau properties indicated that the global receptor agonist FTY720-P is inclined to increase Tau phosphorylation *in vitro* (Attiori Essis et al., 2015). In contrast, the present study suggests that p-Tau-Ser262 was reduced in rat hippocampal slices by the selective S1PR1 agonist SEW2871. This effect appears to be quite specific as the same compound was only slightly efficient in regulating p-Tau-Ser396 epitopes and totally incapable of modulating p-Ser199/202 and p-Ser404 residues. The influence of SEW2871 on kinases known to regulate Tau properties (Domise et al., 2016; Martin et al., 2013; Qian et al., 2010; Wei et al., 2015) was ascertained to identify the mechanisms underlying the effect on p-Tau-Ser262. The data suggest that both CaMKII and GSK3 β activities are probably not responsible for reducing Tau-Ser262 phosphorylation after SEW2871 treatments. It is noteworthy that the unchanged phosphorylation status of Tau-Ser199/202, a residue directly affected by GSK3 β activity (Lin et al., 2016; Qian et al., 2010), supports this observation.

It has been reported abundantly in the literature that Tau-Ser262 phosphorylation is linked preferentially to AMPK activation (Domise et al., 2016; Kumar et al., 2015; Thornton et al., 2011). On the basis of the present data, showing that SEW2871-treated slices exhibited decreased AMPK α phosphorylation at its Thr172 residue, it seems reasonable to suggest that Tau dephosphorylation is possibly mediated here by AMPK α inactivation. This view is consistent with recent observations that

endogenous AMPK activation in mouse primary neurons is prone to induce increased Tau phosphorylation at multiple sites, especially Ser262, whereas AMPK inhibition leads to rapidly decreased Tau phosphorylation. From a pathological perspective, it is noteworthy that AMPK α inactivation might be inclined to reduce Tau pathology in the PS19 mouse model of tauopathy (Domise et al., 2016). Although it is acknowledged that AMPK α can be composed of 2 different subunits (α 1 and α 2) (Liu and Chern, 2015), the present *in vitro* study did not identify the isoform involved. However, the potential importance of AMPK α 1 in AD development was recently supported by experiments indicating that amyloid- β (A β) oligomers, which are the core components of senile plaques (Marwarha and Ghribi, 2012), are likely to evoke AMPK α 1 activation (Mairet-Coello et al., 2013; Thornton et al., 2011). Of course, further experimentation is required to test whether selective S1PR1 stimulation by SEW2871 might indeed be effective in reducing A β -induced Tau hyperphosphorylation via a pathway involving AMPK α 1 inactivation.

The target molecular processes underlying AMPK α inhibition remain to be determined. Candidate mechanisms may include cellular disturbances that may culminate in dephosphorylation of the AMPK α -Thr172 epitope, for instance, after reduction of upstream kinase activities, such as liver kinase B1, calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 beta, transforming growth factor beta-activated kinase 1 and protein kinase A (PKA) (Hurley et al., 2006; Momcilovic et al., 2006; Ross et al., 2016). Several studies have revealed that AMPK activity can also be reduced by mechanisms involving protein phosphatases, especially PP1, PP2A and PP2C (Park et al., 2013). Here, increased PP2Ac activity was observed in SEW2871-treated slices, while the ability of this S1PR1 agonist to decrease both AMPK α and Tau phosphorylation was completely abrogated by the PP2A inhibitor

cantharidin (Swingle et al., 2007). Altogether, it appears that PP2A-mediated AMPK dephosphorylation may play a crucial role in SEW2871-induced Tau dephosphorylation at Ser262. A scenario which is consistent with the recent literature showing that S1PRs are linked to PP2A activation (Egom et al., 2016). The present study is contrasting with our previous observations indicating that global S1PR activation by the S1P analog FTY720-P is prone to induce Tau-Ser262 phosphorylation in rat hippocampal slices (Attiori Essis et al., 2015). The possible target mechanisms contributing to this differential regulation of Tau by S1PR agonists remain to be determined. Candidate scenarios may include differential regulation of receptor cycling and/or signaling. One possible explanation for this apparent discrepancy could be that phosphatase enzymes might display different patterns of regulation by non-selective versus selective S1PR agonists. A notion that would be consistent with a previous investigation performed with different FTY720-based compounds in dopaminergic cell systems (Vargas-Medrano et al., 2014). On the other hand, it was previously reported that Tau phosphorylation at the Ser262 epitope is preferentially targeted by CaMKII (Bennechib et al., 2001; Li et al., 2014). Therefore, it seems conceivable that non-selective activation of S1PRs by FTY720-P might be associated with strong CaMKII stimulation, an effect that would eventually lead to Tau-Ser262 phosphorylation in rat hippocampal slices.

It should be kept in mind that many other signaling pathways can control Tau-Ser262 phosphorylation without any link with AMPK activity. On that line, there is evidence that S1PR1 can directly suppress PKA activity (Jiang and Bajpayee, 2009), which is known to regulate directly Tau phosphorylation (Wang et al., 2007). Consequently, it seems reasonable to postulate that SEW2871-induced Tau dephosphorylation could be mediated by PKA inactivation. On the other hand, given that Tau-Ser262 phosphorylation is preferentially targeted by PP2A

(Braithwaite et al., 2012), we cannot yet exclude the possibility that a part of the effect of SEW2871 might be produced directly by this phosphatase (Fig. 9). From a functional perspective, it has been reported that, like other G protein-coupled receptors, pharmacological activation of S1PR1 is inclined to induce receptor desensitization by mechanisms involving receptor internalization (Taha et al., 2004). Consequently, downstream-coupled signaling pathways of S1PR1 can be inactivated during S1PR1 internalization, which could include extracellular signal-regulated kinases (ERKs). One can speculate that the ability of SEW2871 to reduce Tau phosphorylation might be attributable to ERK inactivation resulting from S1PR1 internalization. This would be consistent with the observations that Tau phosphorylation is controlled by ERKs (Qi et al., 2017). The implication of these additional scenarios will be a topic for further investigations.

Regardless of the processes responsible for reduction of Tau-Ser262 phosphorylation after SEW2871 treatment of hippocampal slices, the present results might be physiologically relevant. Tau is known to interact with cytoskeletal dynamics by transient binding and unbinding to microtubules, a process controlled in part by its phosphorylation (Kutter et al., 2016). In addition to microtubule stabilization, Tau proteins interact with many signaling pathways to regulate the intracellular trafficking of organelles and molecules involved in presynaptic and postsynaptic function of neurons (Ballatore et al., 2007; Shemesh et al., 2008). In this context, it is interesting that dephosphorylation of Ser262, a residue positioned in the microtubule-binding domain of Tau proteins, was previously shown to be associated with a shift from accumulation in the soma to co-distribution with tubulin in neurites (Chen et al., 2014). It will certainly be worthwhile to estimate the ability of SEW2871 to control Tau localization and synaptic functions, for instance long-term

depression, which is known to be dependent on Tau phosphorylation (Kimura et al., 2014).

Conclusion

The SEW2871-mediated effects on Tau phosphorylation reported here point to the following model: selective S1PR1 activation could lead to PP2A-mediated AMPK α inactivation in rat hippocampal slices, events that might eventually decrease Tau phosphorylation at Ser262 (Fig. 9). Many *in vivo* and *in vitro* studies have demonstrated that Tau site-specific phosphorylation is correlated with disease outcomes (Ando et al., 2016; Lauckner et al., 2003; Moszczynski et al., 2015; Stoothoff and Johnson, 2005). Precisely, Tau hyperphosphorylation at Ser262 appears to be an early Tau pathological event in AD, which is critical for A β -induced Tau toxicity (Iijima et al., 2010). It is envisioned that SEW2871-induced Tau dephosphorylation of Ser262 residue might be eventually beneficial to neurons, reducing the processes underlying pathological ageing of the hippocampus – a scenario which is in good agreement with the reported protective role of this agonist at the behavioral level in A β -treated animals (Asle-Rousta et al., 2013). It should be noted, furthermore, that S1PR1 activation by SEW2871 may be beneficial to neurons by acting on additional biological processes, including the production of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which is known to control Tau-Ser262 phosphorylation (Chen et al., 2012; Chen et al., 2014). It will certainly be interesting to test whether (or not) SEW2871 is inclined to dephosphorylate Tau-Ser262 in the hippocampus *in vivo* via a pathway involving BDNF and its receptors. Additional inquiries are needed to determine whether this compound and, other S1PR1 agonists, will also be inclined to regulate Tau properties in other brain regions and how

p-Tau-Ser262 is altered among the various cell types (neuronal vs non-neuronal).

Experimental procedures

Animal and ethic approval

Young male Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories (Montréal, QC, Canada) and housed in groups of 4, in a temperature-controlled room, with free access to laboratory chow and water. Animals selected for the experiments were acclimatized at least 1 week before treatment began. Animal protocols were reviewed by the Institutional Animal Care Committee of Université du Québec à Trois-Rivières and were in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Pharmacological agents and antibodies (Abs)

The active S1PR1 agonist SEW2871 (5-[4-phenyl-5-(trifluoromethyl)-2-thienyl]-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1,2,4-oxa-diazole) was purchased from Tocris (Burlington, ON, Canada). CYM5541 (N,N-dicyclohexyl-5-cyclopropyl-3-isoxazolecarboxamide), an active S1PR3 agonist, was obtained from Cayman Chemical (Burlington, ON, Canada). The PP inhibitors cantharidin (1,2-dimethyl-3,6-epoxyperhydrophthalic anhydride) and FK506 (tacrolimus) were sourced from Tocris (Burlington, ON, Canada). The allosteric AMPK activator A-769662 (6,7-Dihydro-4-hydroxy-3-(2'-hydroxy[1,1'-biphenyl]-4-yl)-6-oxo-thieno[2,3-b]pyridine-5-carbonitrile) was also provided from Tocris. All Abs reacting with Tau proteins, GSK3 β and CaMKII were bought from Abcam (Toronto, ON, Canada), while Abs reacting with AMPK α and the catalytic subunit of protein phosphatase 2A (PP2Ac) were procured from Cell Signaling

Technology (Beverly, MA, USA). Abs reacting with p-Tyr307 and methylated (m)-Leu309 residues of PP2Ac were from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) and Abcam (Toronto, ON, Canada), respectively.

The mouse polyclonal Ab Tau-5 (dilution 1:1,000) served to estimate total Tau protein levels in hippocampal extracts, along with rabbit polyclonal Abs recognizing p-Tau at Ser199/202 (dilution 1:1,000); Ser262 (dilution 1:1,000), Ser396 (dilution 1:10,000) and Ser404 (dilution 1:1,000) residues. The mouse polyclonal Ab GSK3 β (dilution 1:1,000) served to estimate total GSK3 β protein levels, while rabbit polyclonal Abs recognizing p-GSK3 β at Ser9 (dilution 1:1,000) and Tyr216 (dilution 1:1,000) residues were portrayed GSK3 β activity. CaMKII activity was estimated with a mouse polyclonal Ab recognizing p-CaMKII at Thr286 (dilution 1:2,000) residues, along with a rabbit polyclonal Ab (dilution 1:20,000) that ascertained total CaMKII protein levels. PP2A activity was assessed with a rabbit polyclonal Ab recognizing p-PP2Ac at Tyr307 (dilution 1:1,000) and a mouse polyclonal Ab recognizing m-PP2Ac at Leu309 (dilution 1:100) residues. Total PP2Ac protein levels were estimated with the rabbit polyclonal Ab PP2Ac (dilution 1:1,000). Rabbit polyclonal antibody AMPK α (dilution 1:1,000) served to estimate total protein levels, while a rabbit polyclonal Ab recognizing AMPK α phosphorylated at Thr172 (dilution 1:1,000) was considered to measure AMPK α activity.

For loading controls, Abs recognizing beta-actin (β -actin; dilution 1:500) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; dilution 1:5,000) were purchased from Abcam. Finally, goat anti-rabbit and goat anti-mouse peroxidase-conjugated Abs (dilution 1:5,000) as well as SuperSignal chemiluminescent substrate kits came from Pierce Chemical (Rockford, IL, USA).

Hippocampal slice preparation and pharmacological treatments

For hippocampal slice preparation, young male rats (37-45 days old) were anesthetized by isoflurane inhalation (Baxter Corp.; Toronto, ON, Canada) and decapitated. Their brains were quickly removed and placed in ice-cold cutting buffer containing 126 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 1,2 mM NaH₂PO₄, 2,3 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ and 11 mM glucose, saturated with 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7.4). Hippocampi were dissected, and transverse 350 μ m slices were prepared with a McIlwain tissue chopper. Slices were placed on nylon mesh in a liquid-gas interface recording chamber with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,25 mM KH₂PO₄, 3 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 26 mM NaHCO₃ and 10 mM glucose (De Montigny et al., 2013; Laurier-Laurin et al., 2014). S1PR agonists were dissolved in dimethyl sulfoxide (0.1%, final concentration) on the day of experimentation and were mixed in aCSF to obtain the desired final concentration of 10 μ M. At this concentration, preliminary data indicate that the S1PR1 agonist SEW2871 produced robust and time-dependent effects on Tau-Ser262 phosphorylation, with a maximal regulation observed after a 3 h incubation in rat hippocampal slices. Consequently, all experiments reported in the current study were realized at this incubation period.

Tissue samples and Western blotting

After pharmacological treatment, hippocampal slices were homogenized in ice-cold radioimmunoprecipitation assay lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate and 1 mM EDTA supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (cOmplete and PhosSTOP, Sigma-Aldrich; Oakville, ON, Canada). Protein levels were measured by Bradford assay (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) and, in most experiments, protein

lysates (40 μ g) were electrophoresed on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. Separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, and nonspecific binding sites were blocked by incubation for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (pH 7.4) containing 5% bovine serum albumin (BSA fraction V) purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Primary Abs were added for overnight incubation at 4 °C. After several washes with 0.1% Tween 20, blots were incubated for 1 h at room temperature in specific secondary peroxidase-conjugated Ab solution. Both primary and secondary Abs were diluted in Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20 and 1% BSA. Immunoreactivity was visualized by chemiluminescence reactions, membranes were processed for densitometry scanning with Vision Work LS software (UVP Bioimaging; Upland, CA, USA) and band intensity was quantified by Image J software (W.S. Rasband, National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA). Densitometry data were expressed as relative optical density. In all experiments, β -actin (or GAPDH) was labeled routinely to ensure identical protein loading on blots.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. In most cases, variations in protein and phosphorylation levels were compared by 1-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keul's post hoc test (GraphPad Software; San Diego, CA, USA). Conventional criteria of statistical significance were set at $p < 0.05$ values.

Acknowledgments

The present research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada: Grant 105942 to Guy Massicotte and Grant 311763 to Michel Cyr. The authors thank Ovid Da Silva for editing this manuscript and declare that they have no conflicts of interest with its content.

Figure legends

Figure 1. Tau phosphorylation at the Ser262 epitope is reduced by the S1PR1 agonist SEW2871

Levels of p-Tau-Ser262 were estimated by Western blotting on cell extracts obtained from hippocampal slices treated or not with the S1PR1 agonist SEW2871 (SEW; 10 μ M, 3 h). **(A)** Chemical structure of SEW2871. **(B)** Four Tau isoforms were consistently distinguished in immunoblots with Abs directed against p-Tau-Ser262 and total Tau (Tau-5). **(C)** Summary data on p-Ser262 levels were expressed relative to total Tau levels and shown in the bar graph (means \pm SEM of 6 different experiments). For statistical analysis, 1-way ANOVA was followed by Newman-Keul's post hoc test. **P < 0.01, ***P < 0.001, SEW2871 (closed bars) versus controls (open bars). **(D)** The ability of SEW2871 to reduce p-Tau-Ser262 was not dependent on reduction of total Tau levels.

Figure 2. Tau phosphorylation of other epitopes is not altered by SEW2871

As in Figure 1, except that immunoblotting was performed with Abs directed against other phosphoepitopes (Ser199/202, Ser396 and Ser404) and total Tau (Tau-5). Summary data on p-Ser199/202 **(A)**, p-Ser396 **(B)** and p-Ser404 **(C)** were expressed relative to total Tau levels **(D)** and shown in the bar graph (means \pm SEM of 5 different experiments). For statistical analysis, 1-way ANOVA was followed by Newman-Keul's post hoc test. SEW2871 (closed bars) versus the controls (open bars).

Figure 3. Tau phosphorylation at the Ser262 epitope is not altered by the S1PR3 agonist CYM5541

Total Tau and p-Tau-Ser262 levels were estimated by Western blotting on cell extracts obtained from hippocampal slices treated or not with the S1PR3 agonist CYM5541 (CYM; 10 μ M, 3 h). The chemical structure of

this compound is presented in panel **(A)** with immunoblots in panel **(B)**. **(C)** Summary data on p-Ser262 levels were expressed relative to total Tau **(D)** and shown in the bar graph (means \pm SEM of 4 different experiments). For statistical analysis, 1-way ANOVA was followed by Newman-Keul's post hoc test. CYM5541 (closed bars) versus the controls (open bars).

Figure 4. AMPK α phosphorylation at Thr172 is reduced by SEW2871 treatment

As in Figure 1, except that immunoblotting was performed with Abs directed against different kinases **(A)** p-GSK3 β -Ser9 and -Tyr216; **(B)** p-CaMKII-Thr286 and p-AMPK α -Thr172. Summary data are expressed relative to total protein levels and shown in the bar graph (means \pm SEM of 6 different experiments). For statistical analysis, 1-way ANOVA was followed by Newman-Keul's post hoc test. **P < 0.01, SEW2871 (closed bars) versus the controls (open bars). Note the strong ability of SEW2871 to reduce AMPK α phosphorylation.

Figure 5. SEW2871 treatment reduced A76-induced AMPK α -Thr172 and Tau-Ser262 phosphorylation

Levels of p-AMPK α -Thr172 **(A)** and p-Tau-Ser262 **(B)** were estimated by Western blotting on cell extracts obtained from hippocampal slices treated or not with the AMPK activator A-769662 (A76; 10 μ M, 3 h). Summary data on p-AMPK α -Thr172 and p-Tau-Ser262 (62 kDa isoform) levels were expressed relative to total protein levels and shown in the bar graph (means \pm SEM of 4 different experiments). For statistical analysis, 1-way ANOVA was followed by Newman-Keul's post hoc test. **P < 0.01, A76 (closed bars) versus the controls (open bars). Note the ability of SEW2871 (10 μ M) to prevent A76-induced AMPK α and Tau phosphorylation in rat hippocampal slices.

Figure 6. PP2Ac activity is increased by SEW2871 treatment

As in Figure 1, except that immunoblotting was performed with Abs directed against **(A)** p-Tyr307 and m-Leu309 of PP2Ac. Summary data of optical density are expressed relative to total protein levels and shown in the bar graph (means \pm SEM of 4 different experiments). For statistical analysis, 1-way ANOVA was followed by Newman-Keul's post hoc test. * $P < 0.05$, SEW2871 (closed bars) versus the controls (open bars). **(B)** Note the strong ability of SEW2871 to enhance m-Leu309/p-Tyr307 ratio. Here, statistical significance was estimated by conventional unpaired t-test. ** $P < 0.01$.

Figure 7. SEW2871-induced Tau-Ser262 dephosphorylation is dependent on PP2Ac activation

As in Figure 1, except that SEW2871-treated slices (10 μ M) were preincubated for 3 h without or with **(A)** the PP2A inhibitor cantharidin (CAN; 1 μ M) or **(B)** the PP2B inhibitor FK506 (FK; 1 μ M). Summary data are expressed relative to total Tau and shown in the bar graph (means \pm SEM of 4 different experiments). For statistical analysis, 1-way ANOVA was followed by Newman-Keul's post hoc test. Panel **(A)** * $P < 0.05$, SEW2871 + CAN (closed bars) versus SEW2871 alone (open bars); Panel **(B)** ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, SEW2871 + FK (closed bars) versus SEW2871 alone (open bars).

Figure 8. SEW2871-induced AMPK α -Thr172 dephosphorylation is dependent on PP2Ac activation

Total AMPK α and p-AMPK α -Thr172 levels were estimated by Western blotting on cell extracts obtained from SEW2871-treated slices (10 μ M, 3 h). In parallel experiments, hippocampal slices were preincubated with both SEW2871 and cantharidin (CAN; 1 μ M). Summary data are expressed relative to total AMPK α levels and shown in the bar graph (means \pm SEM of 4 different experiments). Statistical significance was

estimated by conventional unpaired t-test. $**P < 0.01$, SEW2871 (closed bars) versus the controls (open bars).

Figure 9. Diagram depicting reduction of Tau phosphorylation by the S1PR1 agonist SEW2871

SEW2871 is recognized as a potent S1PR1 agonist. Here, this S1PR1 activator was found to reduce Tau phosphorylation at its Ser262 epitope through a pathway involving AMPK α -Thr172 dephosphorylation. The results suggest that this effect might be mediated by PP2Ac activation (pathway in blue). Additional scenarios might include PKA inactivation or more direct dephosphorylation of Tau by PP2A (pathways in red). Because of its action on p-Tau-Ser262, it is speculated that SEW2871 could impact brain function and the treatment of Tau-related pathologies.

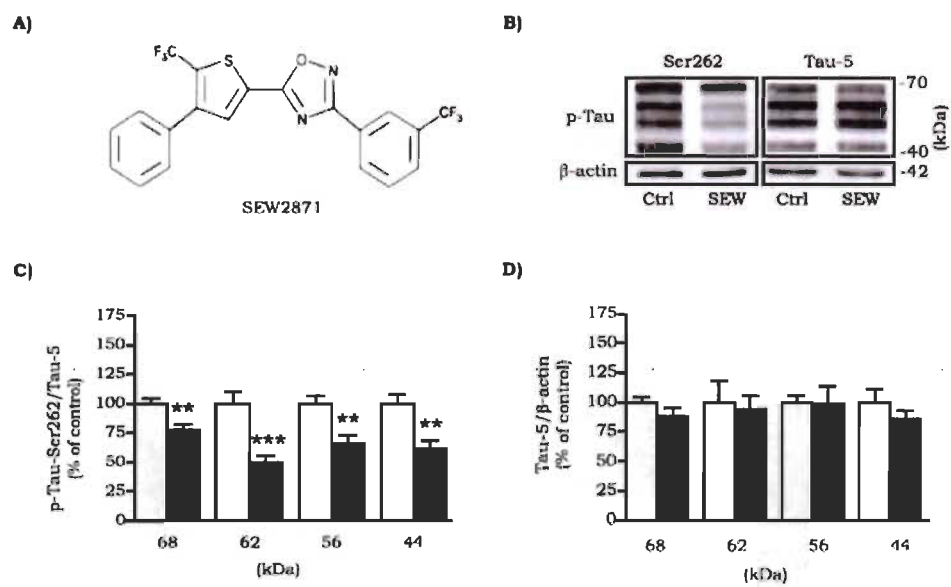


Figure 1 (St-Cyr Giguère et al., 2017)

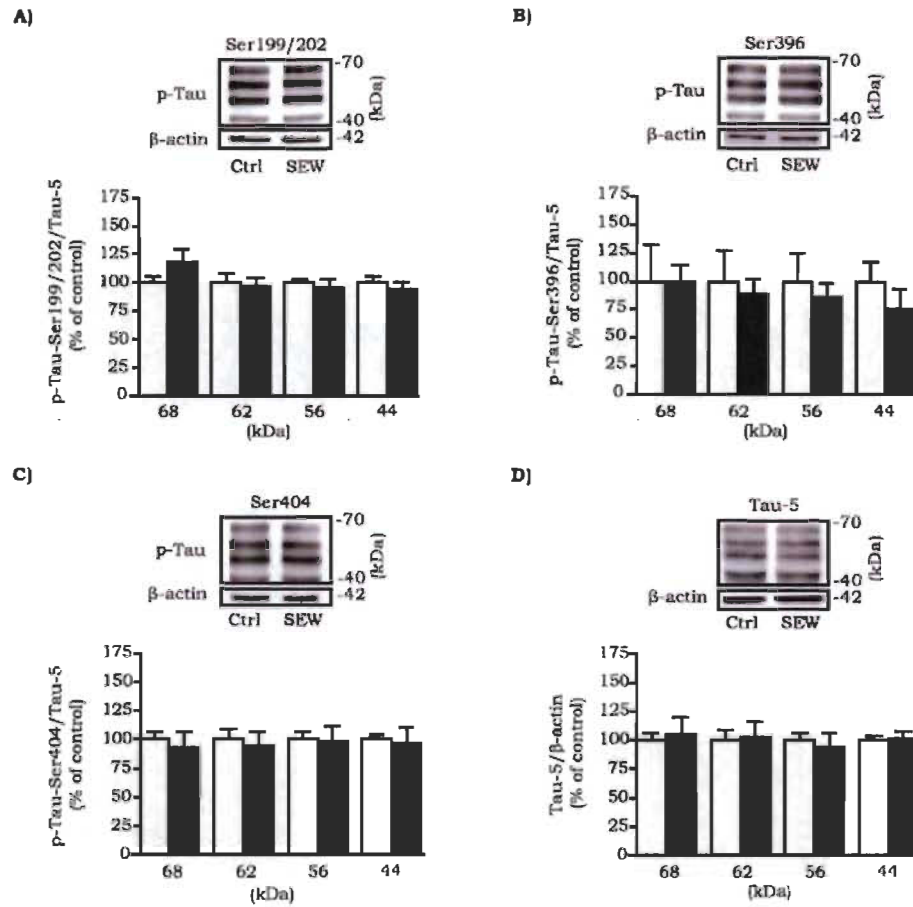


Figure 2 (St-Cyr Giguère et al., 2017)

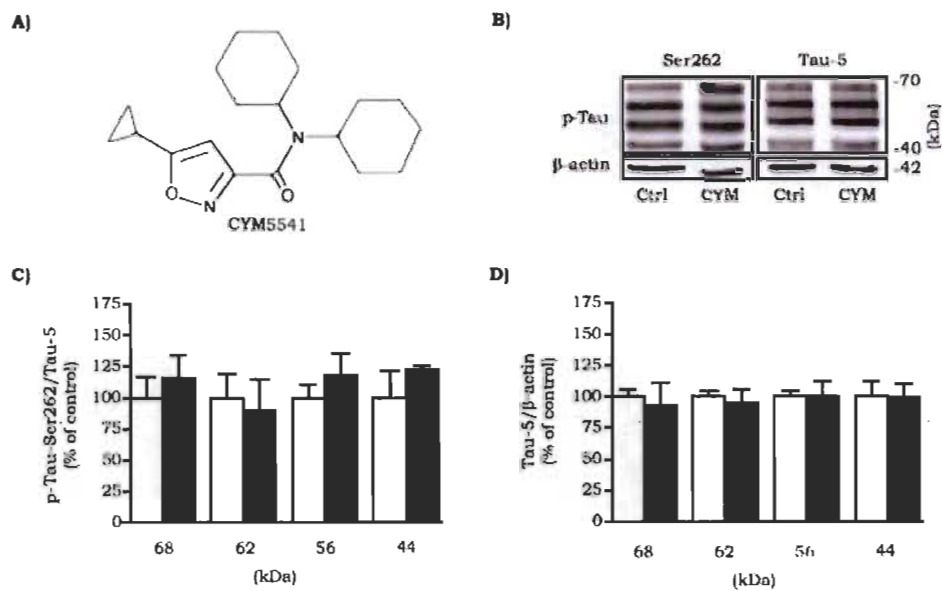


Figure 3 (St-Cyr Giguère et al., 2017)

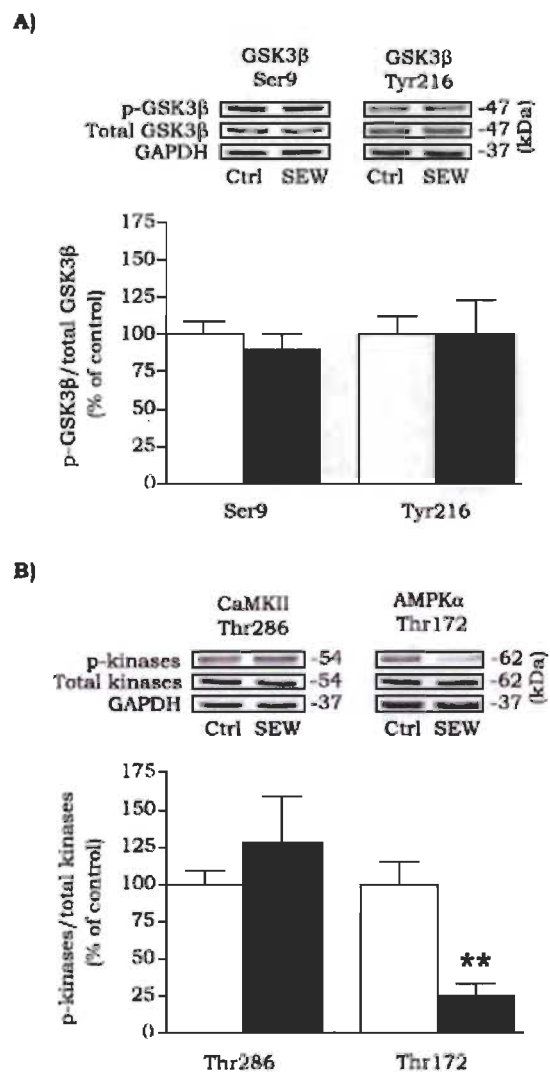


Figure 4 (St-Cyr Giguère et al., 2017)

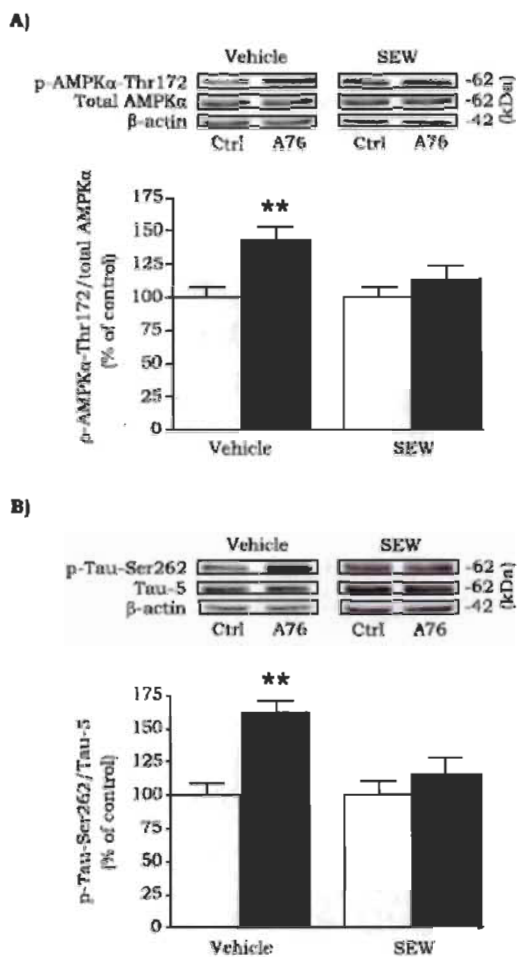


Figure 5 (St-Cyr Giguère et al., 2017)

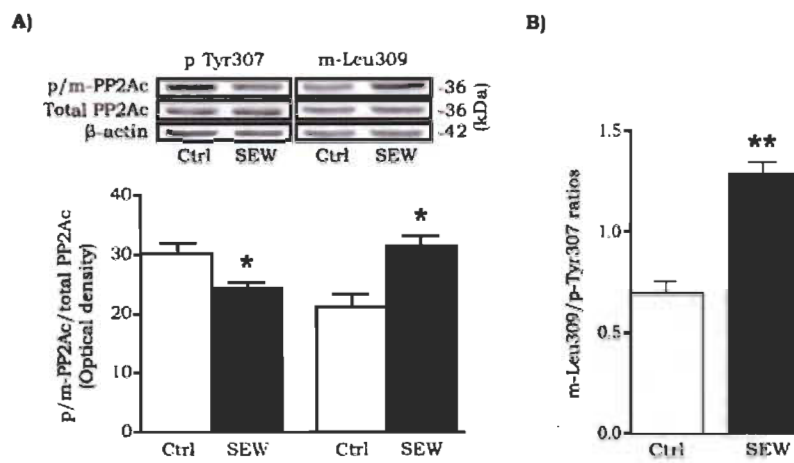


Figure 6 (St-Cyr Giguère et al., 2017)

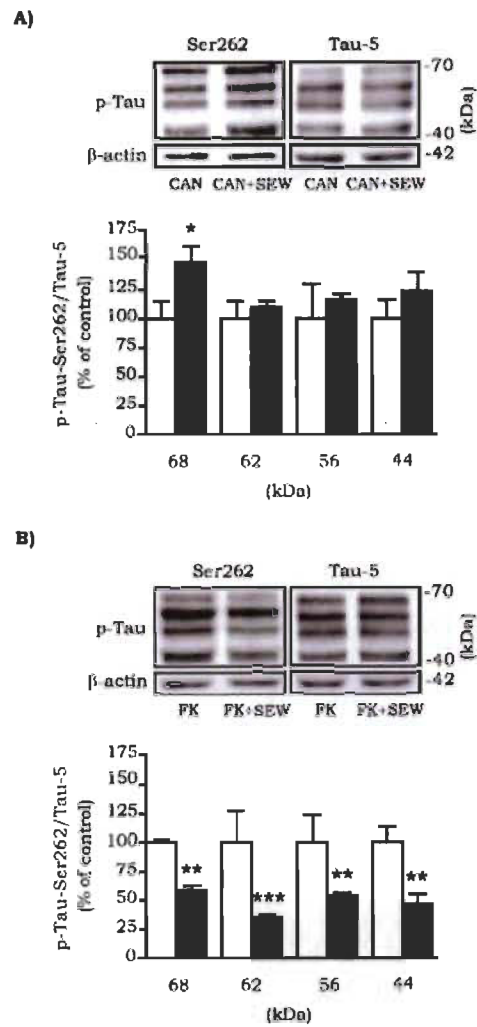


Figure 7 (St-Cyr Giguère et al., 2017)

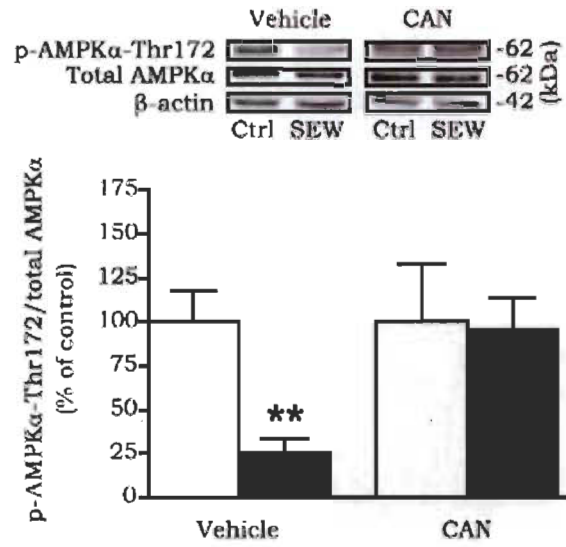


Figure 8 (St-Cyr Giguère et al., 2017)

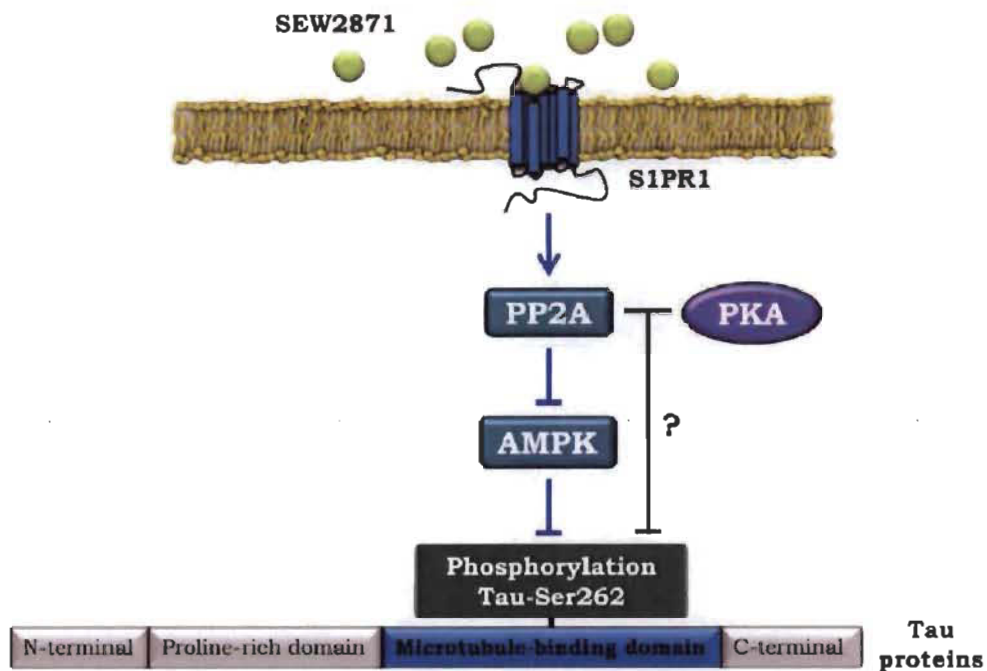


Figure 9 (St-Cyr Giguère et al., 2017)

Reference

- Ando, K., Maruko-Otake, A., Ohtake, Y., Hayashishita, M., Sekiya, M., Iijima, K.M., 2016. Stabilization of Microtubule-Unbound Tau via Tau Phosphorylation at Ser262/356 by Par-1/MARK Contributes to Augmentation of AD-Related Phosphorylation and Abeta42-Induced Tau Toxicity. *PLoS Genet.* 12, e1005917.
- Asle-Rousta, M., Oryan, S., Ahmadiani, A., Rahnema, M., 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., Laurier-Laurin, M.E., Pepin, E., Cyr, M., Massicotte, G., 2015. GluN2B-containing NMDA receptors are upregulated in plasma membranes by the sphingosine-1-phosphate analog FTY720P. *Brain Res.* 1624, 349-358.
- Aytan, N., Choi, J.K., Carreras, I., Brinkmann, V., Kowall, N.W., Jenkins, B.G., Dedeoglu, A., 2016. Fingolimod modulates multiple neuroinflammatory markers in a mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 6, 24939.
- Ballatore, C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8, 663-672.
- Bennecib, M., Gong, C.X., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2001. Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett.* 490, 15-22.
- Blaho, V.A., Hla, T., 2014. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res.* 55, 1596-1608.
- Blumenfeld, S., Staun-Ram, E., Miller, A., 2016. Fingolimod therapy modulates circulating B cell composition, increases B regulatory subsets and production of IL-10 and TGFbeta in patients with Multiple Sclerosis. *J Autoimmun.* 70, 40-51.
- Braithwaite, S.P., Stock, J.B., Lombroso, P.J., Nairn, A.C., 2012. Protein phosphatases and Alzheimer's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 106, 343-379.

- Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2009. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov.* 8, 783-793.
- Brunkhorst, R., Vutukuri, R., Pfeilschifter, W., 2014. Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives. *Front Cell Neurosci.* 8, 283.
- Chen, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, Y.W., Zhong, M., Xu, S.C., Chen, C.H., Li, L., Yu, Z.P., 2012. Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochem Int.* 60, 233-242.
- Chen, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Xu, S., Chen, C., Yu, Z., 2014. The cellular distribution and Ser262 phosphorylation of tau protein are regulated by BDNF in vitro. *PLoS One.* 9, e91793.
- Choi, J.W., Gardell, S.E., Herr, D.R., Rivera, R., Lee, C.W., Noguchi, K., Teo, S.T., Yung, Y.C., Lu, M., Kennedy, G., Chun, J., 2011. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 751-756.
- Clausen, A., Xu, X., Bi, X., Baudry, M., 2012. Effects of the superoxide dismutase/catalase mimetic EUK-207 in a mouse model of Alzheimer's disease: protection against and interruption of progression of amyloid and tau pathology and cognitive decline. *J Alzheimers Dis.* 30, 183-208.
- Di Menna, L., Molinaro, G., Di Nuzzo, L., Rizzo, B., Zappulla, C., Pozzilli, C., Turrini, R., Caraci, F., Copani, A., Battaglia, G., Nicoletti, F., Bruno, V., 2013. Fingolimod protects cultured cortical neurons against excitotoxic death. *Pharmacol Res.* 67, 1-9.
- Di Pardo, A., Amico, E., Favellato, M., Castrataro, R., Fucile, S., Squitieri, F., Maglione, V., 2014. FTY720 (fingolimod) is a neuroprotective and disease-modifying agent in cellular and mouse models of Huntington disease. *Hum Mol Genet.* 23, 2251-2265.
- Doi, Y., Takeuchi, H., Horiuchi, H., Hanyu, T., Kawanokuchi, J., Jin, S., Parajuli, B., Sonobe, Y., Mizuno, T., Suzumura, A., 2013. Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid beta-induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PLoS One.* 8, e61988.

- Domise, M., Didier, S., Marinangeli, C., Zhao, H., Chandakkar, P., Buee, L., Viollet, B., Davies, P., Marambaud, P., Vingtdoux, V., 2016. AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo. *Sci Rep.* 6, 26758.
- Egom, E.E., Bae, J.S., Capel, R., Richards, M., Ke, Y., Pharithi, R.B., Maher, V., Kruzliak, P., Lei, M., 2016. Effect of sphingosine-1-phosphate on L-type calcium current and Ca(2+) transient in rat ventricular myocytes. *Mol Cell Biochem.* 419, 83-92.
- Fukumoto, K., Mizoguchi, H., Takeuchi, H., Horiuchi, H., Kawanokuchi, J., Jin, S., Mizuno, T., Suzumura, A., 2014. Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid beta-induced memory impairment. *Behav Brain Res.* 268, 88-93.
- Guerrero, M., Urbano, M., Roberts, E., 2016. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 agonists: a patent review (2013-2015). *Expert Opin Ther Pat.* 26, 455-470.
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 139-150.
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2011. Many ceramides. *J Biol Chem.* 286, 27855-27862.
- Hurley, R.L., Barre, L.K., Wood, S.D., Anderson, K.A., Kemp, B.E., Means, A.R., Witters, L.A., 2006. Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J Biol Chem.* 281, 36662-36672.
- Iijima, K., Gatt, A., Iijima-Ando, K., 2010. Tau Ser262 phosphorylation is critical for Abeta42-induced tau toxicity in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 19, 2947-2957.
- Janssen, S., Schlegel, C., Gudi, V., Prajeeth, C.K., Skripuletz, T., Trebst, C., Stangel, M., 2015. Effect of FTY720-phosphate on the expression of inflammation-associated molecules in astrocytes in vitro. *Mol Med Rep.* 12, 6171-6177.
- Jiang, M., Bajpayee, N.S., 2009. Molecular mechanisms of go signaling. *Neurosignals.* 17, 23-41.

- Kimura, T., Whitcomb, D.J., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., Brown, C., Hashikawa, T., Murayama, M., Seok, H., Sotiropoulos, I., Kim, E., Collingridge, G.L., Takashima, A., Cho, K., 2014. Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369, 20130144.
- Kono, M., Tucker, A.E., Tran, J., Bergner, J.B., Turner, E.M., Proia, R.L., 2014. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 reporter mice reveal receptor activation sites in vivo. *J Clin Invest.* 124, 2076-2086.
- Kovacs, G.G., 2015. Invited review: Neuropathology of tauopathies: principles and practice. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 41, 3-23.
- Kumar, P., Jha, N.K., Jha, S.K., Ramani, K., Ambasta, R.K., 2015. Tau phosphorylation, molecular chaperones, and ubiquitin E3 ligase: clinical relevance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 43, 341-361.
- Kutter, S., Eichner, T., Deaconescu, A.M., Kern, D., 2016. Regulation of Microtubule Assembly by Tau and not by Pin1. *J Mol Biol.* 428, 1742-1759.
- Lauckner, J., Frey, P., Geula, C., 2003. Comparative distribution of tau phosphorylated at Ser262 in pre-tangles and tangles. *Neurobiol Aging.* 24, 767-776.
- Li, L., Fothergill, T., Hutchins, B.I., Dent, E.W., Kalil, K., 2014. Wnt5a evokes cortical axon outgrowth and repulsive guidance by tau mediated reorganization of dynamic microtubules. *Dev Neurobiol.* 74, 797-817.
- Lin, C.H., Hsieh, Y.S., Wu, Y.R., Hsu, C.J., Chen, H.C., Huang, W.H., Chang, K.H., Hsieh-Li, H.M., Su, M.T., Sun, Y.C., Lee, G.C., Lee-Chen, G.J., 2016. Identifying GSK-3beta kinase inhibitors of Alzheimer's disease: Virtual screening, enzyme, and cell assays. *Eur J Pharm Sci.* 89, 11-19.
- Liu, Y.J., Chern, Y., 2015. AMPK-mediated regulation of neuronal metabolism and function in brain diseases. *J Neurogenet.* 29, 50-58.
- Maceyka, M., Spiegel, S., 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature.* 510, 58-67.

- Mairet-Coello, G., Courchet, J., Pieraut, S., Courchet, V., Maximov, A., Polleux, F., 2013. The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of Abeta oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron*. 78, 94-108.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M., Magnaudeix, A., Perrin, M.L., Terro, F., 2013. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing Res Rev*. 12, 39-49.
- Martin, R., Sospedra, M., 2014. Sphingosine-1 phosphate and central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol*. 378, 149-170.
- Marwarha, G., Ghribi, O., 2012. Leptin signaling and Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis*. 1, 245-265.
- Mattie, M., Brooker, G., Spiegel, S., 1994. Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J Biol Chem*. 269, 3181-3188.
- Momcilovic, M., Hong, S.P., Carlson, M., 2006. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem*. 281, 25336-25343.
- Moszczynski, A.J., Gohar, M., Volkening, K., Leystra-Lantz, C., Strong, W., Strong, M.J., 2015. Thr175-phosphorylated tau induces pathologic fibril formation via GSK3beta-mediated phosphorylation of Thr231 in vitro. *Neurobiol Aging*. 36, 1590-1599.
- Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D., Seuwen, K., 2009. Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nat Chem Biol*. 5, 428-434.
- Murray, M.E., Kouri, N., Lin, W.L., Jack, C.R., Jr., Dickson, D.W., Vemuri, P., 2014. Clinicopathologic assessment and imaging of tauopathies in neurodegenerative dementias. *Alzheimers Res Ther*. 6, 1.
- Noble, W., Pooler, A.M., Hanger, D.P., 2011. Advances in tau-based drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 6, 797-810.
- Olivera, A., Spiegel, S., 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*. 365, 557-560.

- Park, S., Scheffler, T.L., Rossie, S.S., Gerrard, D.E., 2013. AMPK activity is regulated by calcium-mediated protein phosphatase 2A activity. *Cell Calcium*. 53, 217-223.
- Pyne, S., Pyne, N.J., 2013. New perspectives on the role of sphingosine 1-phosphate in cancer. *Handb Exp Pharmacol*. 55-71.
- Qi, H., Despres, C., Prabakaran, S., Cantrelle, F.X., Chambraud, B., Gunawardena, J., Lippens, G., Smet-Nocca, C., Landrieu, I., 2017. The Study of Posttranslational Modifications of Tau Protein by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Phosphorylation of Tau Protein by ERK2 Recombinant Kinase and Rat Brain Extract, and Acetylation by Recombinant Creb-Binding Protein. *Methods Mol Biol*. 1523, 179-213.
- Qian, W., Shi, J., Yin, X., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Gong, C.X., Liu, F., 2010. PP2A regulates tau phosphorylation directly and also indirectly via activating GSK-3beta. *J Alzheimers Dis*. 19, 1221-1229.
- Roberts, E., Guerrero, M., Urbano, M., Rosen, H., 2013. Sphingosine 1-phosphate receptor agonists: a patent review (2010-2012). *Expert Opin Ther Pat*. 23, 817-841.
- Ross, F.A., Jensen, T.E., Hardie, D.G., 2016. Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different gamma subunit isoforms. *Biochem J*. 473, 189-199.
- Shemesh, O.A., Erez, H., Ginzburg, I., Spira, M.E., 2008. Tau-induced traffic jams reflect organelles accumulation at points of microtubule polar mismatching. *Traffic*. 9, 458-471.
- Stoothoff, W.H., Johnson, G.V., 2005. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta*. 1739, 280-297.
- Swingle, M., Ni, L., Honkanen, R.E., 2007. Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods Mol Biol*. 365, 23-38.
- Taha, T.A., Argraves, K.M., Obeid, L.M., 2004. Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim Biophys Acta*. 1682, 48-55.

- Thornton, C., Bright, N.J., Sastre, M., Muckett, P.J., Carling, D., 2011. AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid beta-peptide exposure. *Biochem J.* 434, 503-512.
- van Echten-Deckert, G., Hagen-Euteneuer, N., Karaca, I., Walter, J., 2014. Sphingosine-1-phosphate: boon and bane for the brain. *Cell Physiol Biochem.* 34, 148-157.
- Vargas-Medrano, J., Krishnamachari, S., Villanueva, E., Godfrey, W.H., Lou, H., Chinnasamy, R., Arterburn, J.B., Perez, R.G., 2014. Novel FTY720-Based Compounds Stimulate Neurotrophin Expression and Phosphatase Activity in Dopaminergic Cells. *ACS Med Chem Lett.* 5, 782-786.
- Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2007. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci.* 25, 59-68.
- Wei, Y., Han, C., Wang, Y., Wu, B., Su, T., Liu, Y., He, R., 2015. Ribosylation triggering Alzheimer's disease-like Tau hyperphosphorylation via activation of CaMKII. *Aging Cell.* 14, 754-763.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Depuis déjà plusieurs décennies, la démence de type Alzheimer fait l'objet d'intenses recherches mettant à l'avant-plan les possibles causes biochimiques de cette maladie qui prend souvent naissance dans l'hippocampe et ses régions proximales. L'idée selon laquelle l'amyloïde- β serait un acteur moléculaire obligatoire dans le développement de la maladie d'Alzheimer est généralement bien reçue. Les thérapies développées en ce sens se sont toutefois avérées inefficaces. Il est donc évident que d'autres scénarios doivent être actuellement envisagés. De fait, de nombreux chercheurs pensent que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau est à l'origine des anomalies initiatrices de la pathologie Alzheimer (Pickett et al., 2017; Uematsu et al., 2018). De plus, le lien existant entre l'accumulation des diverses isoformes de la protéine et les différents stades de l'Alzheimer démontre clairement l'importance de l'hyperphosphorylation de Tau dans la propagation de la maladie (Hara et al., 2013; Valachova et al., 2018). La conviction implicite qui s'en dégage est celle d'une grande confiance que les molécules pharmacologiques susceptibles de déphosphoryler Tau seraient à même de ralentir la détérioration des fonctions cognitives chez les sujets Alzheimer.

C'est dans le contexte d'une science moléculaire pointue que les neuropharmacologues ont démontré que certains analogues de la S1P semblent exercer des effets sur l'état de phosphorylation de la protéine Tau (Attiori Essis et al., 2015). Or, le présent ouvrage met en lumière la capacité du SEW2871 à induire une diminution importante de la phosphorylation au résidu Ser262 de Tau dans l'hippocampe.

Précisément, la diminution de phosphorylation de ce résidu, induite par l'activation spécifique du S1PR1 par le SEW2871, semble dépendre d'une baisse marquée d'activité de la kinase AMPK induite par l'action de la protéine phosphatase PP2A. On comprend qu'il s'agit ici d'une observation intéressante qui permet d'envisager les S1PR1 en tant que cible thérapeutique pour le traitement de la maladie d'Alzheimer et, bien entendu, des autres tauopathies.

4.1 La phosphorylation de la protéine Tau et ses influences

Dans les cerveaux *post mortem* de sujets Alzheimer, l'un des principaux marqueurs de la maladie est l'accumulation d'agrégats intraneuronaux nommés « enchevêtrements neurofibrillaires ». Ces apparitions toxiques sont décrites, depuis un certain nombre d'années, comme étant majoritairement constituées de protéines Tau hyperphosphorylées (Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986). Parmi les acides aminés qui composent la protéine et qui sont propices à une phosphorylation excessive, la Ser262 fait partie de ceux affectés au tout début de la maladie (Augustinack et al., 2002; Iijima et al., 2010). On sait, par ailleurs, que la phosphorylation de cette sérine influence fortement la régulation de la liaison de Tau avec les microtubules (Buee et al., 2000; Hanger et al., 2009). En effet, lorsque ce site est phosphorylé, la protéine Tau se détache des microtubules, ce qui l'empêche de jouer son rôle stabilisateur des microtubules (Drewes et al., 1995). La protéine Tau se retrouve alors libre dans le cytoplasme des neurones. Il en résulte, du coup, un processus d'auto-agrégation de la protéine et, ultimement, la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (Kopke et al., 1993; von Bergen et al., 2000).

Il semble donc pertinent de cibler moléculairement la phosphorylation de la Ser262 puisque cela permettrait de rétablir la fonction stabilisatrice de la protéine. De fait, des études récentes laissent présager que l'action pharmacologique sur ce site de phosphorylation de Tau permettrait de ralentir l'apparition des enchevêtrements neurofibrillaires et de diminuer les troubles de la mémoire chez les personnes Alzheimer (Kang et al., 2017). Or, le présent ouvrage propose que la diminution de la phosphorylation de la Ser262 de Tau est physiologiquement possible par l'activation du S1PR1 par le SEW2871. D'ailleurs, la molécule en question permet non seulement de diminuer la phosphorylation de la protéine Tau, mais également d'améliorer les troubles de la mémoire spatiale chez le rat et de réduire la charge amyloïde (Asle-Rousta et al., 2013), l'autre marqueur biochimique de la maladie d'Alzheimer.

Au-delà de ces observations, il nous reste à préciser les conséquences fonctionnelles de la déphosphorylation de Tau au site Ser262. Or, l'utilisation de techniques cellulaires comme l'analyse par microscopie de fluorescence serait appropriée pour décrire, notamment, les répercussions de la déphosphorylation observée sur la liaison de Tau avec les microtubules. Ce type de techniques permettrait également de nous informer sur la possible relocalisation de la protéine et sur ses interactions avec d'autres composants cellulaires tels que les protéines kinases Fyn et ERK.

Dans cette optique, notre équipe de recherche a publié des résultats concernant un autre analogue de la S1P, le fingolimod, et sa capacité à moduler la phosphorylation de la Ser262. Précisément, ces résultats démontrent que la modulation de la phosphorylation de Tau permet l'interaction entre la protéine et la kinase Fyn. Ainsi, par cette interaction, le complexe Tau/Fyn est relocalisé à la membrane post-synaptique, ce qui

a pour conséquence la hausse du nombre de récepteurs NMDA (Attiori Essis et al., 2015). En prenant en compte les effets médiés par le fingolimod, il paraît intéressant de se questionner sur la capacité du SEW2871 à promouvoir lui-même, par l'intermédiaire de Tau, des interactions et des relocalisations avec certaines protéines. De la même façon, on peut également s'interroger sur la capacité de la molécule à influencer le nombre de récepteurs NMDA, des récepteurs qui sont essentiels à l'établissement des souvenirs (Martin et al., 2000).

Une étude plus récente réalisée en Italie par l'équipe de Verderio a, pour sa part, permis de préciser que l'enrichissement des récepteurs NMDA provoqué par le fingolimod se concentre précisément dans la région synaptique, ce qui a pour effet d'améliorer les performances cognitives chez un modèle de souris Alzheimer (Joshi et al., 2017). Quant à eux, les récepteurs situés dans la région extra-synaptique ont la capacité d'induire la dégénérescence et la mort neuronale via Tau et la protéine ERK, une protéine impliquée dans la survie cellulaire (Sun et al., 2016). Par conséquent, il s'avérera indispensable de caractériser l'influence du SEW2871 sur la présence des récepteurs NMDA situés de part et d'autre de la membrane post-synaptique.

Selon toute vraisemblance, il se pourrait bien que la diminution du niveau de phosphorylation de Tau induite par le composé SEW2871 puisse contribuer à l'élimination des récepteurs NMDA toxiques et enclencher, du coup, un mécanisme neuroprotecteur endogène, une théorie que nous verrons à valider dans l'avenir. Dans ce contexte, rappelons l'existence du lien entre l'hyperphosphorylation de Tau et la diminution de la production de BDNF (Atasoy et al., 2017), une molécule impliquée non seulement dans la survie des neurones mais également dans la croissance et la différenciation des nouveaux neurones (Acheson et al., 1995; Huang and Reichardt, 2001). Or, puisque le SEW2871

conduit à la diminution de la phosphorylation de la protéine Tau, l'hypothèse voulant que la production de BDNF soit *a contrario* augmentée devra être investiguée.

Le SEW2871 semble *a priori* contrer la phosphorylation de Tau au site Ser262, une observation intéressante sur le plan thérapeutique. Il faut savoir cependant que d'autres résidus de la protéine sont également propices à une hyperphosphorylation néfaste dans la maladie d'Alzheimer. À titre d'exemple, la phosphorylation de la Ser422 est reconnue pour ses effets très négatifs sur les neurones. Dans des conditions pathologiques, une kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire – la MAPK4 – est activée, ce qui provoque la phosphorylation de la sérine en question. Ainsi, cela a pour conséquence d'empêcher l'élimination de Tau par autophagie via la caspase 3 et de conduire à la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (Voss et al., 2011). Il serait donc évidemment important de vérifier si l'activation des récepteurs 1 de la S1P par divers analogues chimiques est en mesure de contrer l'hyperphosphorylation de ce site. Dans ce contexte, nous nous intéressons actuellement à vérifier l'effet du SEW2871 sur un autre acide aminé précocement phosphorylé dans le cerveau, la Thr231, un site qui, comme la Ser262, régule la dissociation de la protéine des microtubules (Sengupta et al., 1998).

Rappelons que la phosphorylation de Tau est un processus hautement régulé et qu'elle ne conduit pas nécessairement à un état pathologique. À ce sujet, une étude menée par Ittner et ses collaborateurs indique que la phosphorylation de la Thr205 de Tau permet de réduire les déficits de mémoire chez un modèle de souris Alzheimer. Plus précisément, il semblerait que, lorsque phosphorylé par la kinase p38 γ , ce site perturbe le complexe PSD-95/Tau/Fyn, ce qui prévient l'excitotoxicité et la toxicité β -amyloïde (Ittner et al., 2016). De plus amples

recherches seront évidemment nécessaires afin de valider l'influence potentielle des analogues de la S1P sur cette interaction complexe.

4.2 La signalisation induite en lien avec le S1PR1

L'importance de la Ser262 et de sa phosphorylation aberrante dans les tauopathies est bien documentée. Néanmoins, sa phosphorylation ne permet pas à elle seule d'engendrer des déficits de mémoire. Majd et des collègues soutiennent au contraire qu'une combinaison de sites phosphorylés est requise, résultant elle-même d'une combinaison d'activité de kinases et de phosphatases. En effet, dans les cerveaux Alzheimer humains disséqués, il a été démontré que la Ser262 hyperphosphorylée soit présente lorsque l'activité d'AMPK est augmentée et celle de PP2A est diminuée (Majd et al., 2016). De fait, cette observation semble appuyer la présente hypothèse voulant que l'effet du SEW2871 sur Tau passe par le tandem enzymatique PP2A/AMPK.

La littérature montrant le lien probable entre la phosphorylation de la Ser262 de Tau et l'activité de la kinase AMPK est claire (Domise et al., 2016; Kumar et al., 2015). En analysant les effets du SEW2871 sur des tranches d'hippocampe, notre étude suggère que la déphosphorylation de Tau au site Ser262 par l'analogue chimique en question requiert l'inactivation de l'enzyme AMPK, une observation démontrant effectivement l'étroite relation entre Tau et AMPK. Il faut mentionner également que de nombreuses études suggèrent que le contrôle de la phosphorylation de Tau nécessite essentiellement l'action de l'enzyme PP2A (Braithwaite et al., 2012), une découverte intéressante puisqu'il a été démontré que cette enzyme est la seule phosphatase capable de promouvoir la déphosphorylation de protéines Tau hyperphosphorylées dans les cerveaux de type Alzheimer (Hu et al., 2016; Wang et al., 2007;

Wang and Liu, 2008). Ainsi, la présente suggestion voulant que PP2A fasse partie de la signalisation conduisant à la déphosphorylation de la Ser262 de Tau semble corrélérer avec la littérature actuelle. Un autre scénario possible pourrait impliquer la réduction d'activité du tandem kinase PAR-1/MARK qui semble, quant à lui, induire la toxicité de Tau en augmentant la phosphorylation des sites Ser262 et Ser356. Fait intéressant, cette phosphorylation provoque à son tour l'augmentation de la Thr231 (Ando et al., 2016), un résidu hyperphosphorylé et retrouvé dans les pré-enchevêtrements neurofibrillaires de cerveaux Alzheimer (Luna-Munoz et al., 2007). D'autres kinases comme Cdk5, PKA et Src, également connues pour leur régulation de la protéine, pourront aussi faire l'objet d'investigations éventuelles (Martin et al., 2011).

Sur le plan mécanistique, on connaît encore très peu de choses sur les étapes moléculaires assurant la déphosphorylation de la protéine Tau par le composé SEW2871. De nombreuses études laissent toutefois croire que les effets de la S1P et de ses analogues pharmacologiques impliquent, dans une certaine mesure, un processus de désensibilisation des récepteurs membranaires. En effet, on sait que la S1P possède une forte affinité pour les S1PR1 (Oo et al., 2011) et qu'elle est susceptible de favoriser l'internalisation de ces récepteurs après leur activation via la phosphorylation du résidu Tyr143 (Chavez et al., 2015; Pyne and Pyne, 2017), un phénomène caractéristique des récepteurs couplés aux protéines G. Dans cet optique, des études ont également démontré que l'internalisation des S1PR1 dans les cellules du système immunitaire accompagne les bienfaits cliniques du FTY720-P (Sykes et al., 2014). Plus précisément, certains effets du fingolimod découlent d'une action activatrice qui conduit ultimement à l'inactivation des récepteurs, un processus antagoniste dit fonctionnel (Brinkmann et al., 2010).

Selon toute vraisemblance, le processus d'internalisation des S1PR1 par des endosomes implique la liaison de la protéine G_i avec la protéine cytosolique β -arrestine, un complexe qui interagit, quant à lui, avec plusieurs acteurs moléculaires tels que le proto-oncogène c-Src et les protéines kinases ERK-1/2 (Pyne and Pyne, 2017). Toutefois, rappelons-le, rare est la littérature traitant de l'activation des récepteurs 1 de la S1P par le SEW2871 et les étapes moléculaires qui en dépendent. De fait, de nombreuses études seront requises pour évaluer si la déphosphorylation de Tau par cet analogue chimique requiert effectivement un processus de désensibilisation impliquant le site Tyr143 du récepteur.

Cela dit, on ne pourrait passer sous silence le fait que l'activation des récepteurs de la S1P par des analogues chimiques implique des réponses cellulaires variées, voir redondantes. Par exemple, selon les doses utilisées, le composé FTY720-P est en mesure de réguler différemment la perméabilité vasculaire cérébrale en contrôlant la dégradation intracellulaire des S1PR1 (Oo et al., 2011). Par ailleurs, les études tendent à démontrer que l'effet antagoniste du composé AUY954 requiert la dégradation du S1PR1 alors que le composé W146 induit son effet antagoniste par un mécanisme indépendant de la dégradation (Pan et al., 2006). S'agissant du composé SEW2871, on ignore toujours si son action sur la protéine Tau corrèle (ou non) avec la dégradation du récepteur. De plus, si la modulation de la phosphorylation de Tau par l'analogue SEW2871 est ici bien démontrée, les effets potentiels de molécules apparentées n'ont pas encore été estimés. En effet, les molécules comme le ponesimod (Bolli et al., 2010), le CS-0777 (Moberly et al., 2012) et l'amiselimod (Chaudhry et al., 2017) sont également des substances connues pour activer les S1PR1.

Au fil du temps, l'attention portée à la bêta-amyloïde en tant que cible thérapeutique essentielle pour le traitement de la maladie

d'Alzheimer a quelque peu minimisé l'intérêt pour la protéine Tau hyperphosphorylée. Toutefois, la présente recherche laisse penser que des médicaments activateurs des S1PR1 seraient éventuellement capable de freiner les ravages de cette maladie en limitant la phosphorylation de Tau à son site Ser262. Notre étude révèle que ce mécanisme de déphosphorylation de Tau pourrait intéresser la structure hippocampique, une région du cerveau très vulnérable à la pathologie Alzheimer. Mais qu'en est-il des autres structures du cerveau comme le cortex et le cervelet? On comprend par ailleurs que la déphosphorylation de Tau induite par le composé SEW2871 s'avère efficace dans le tissu sain. De cette observation, peut-on déduire que l'effet du SEW2871 serait effectivement reproduit sur des cerveaux affectés par la pathologie Alzheimer? La réalisation d'expériences qui prendraient avantage de l'utilisation de modèles animaux transgéniques pourrait nous aiguiller sur cette question.

Enfin, beaucoup de chercheurs s'intéressent au rôle de l'inflammation en tant que mécanisme initiateur de la démence Alzheimer (Parbo et al., 2018). Des résultats récents laissent présager que les effets bénéfiques du SEW2871 impliquent une action sur la cascade inflammatoire (Kim and Tabata, 2017). En effet, lorsqu'elle se lie aux S1PR1, la molécule en question induit un phénotype anti-inflammatoire (Hughes et al., 2008). Mais quelle serait le lien entre l'effet anti-inflammatoire du SEW2871 et la déphosphorylation de Tau?

La possibilité que la déphosphorylation de Tau par des analogues de la S1P fasse grand bien au cerveau Alzheimer est certes une hypothèse qui pourrait relever de l'évidence. L'ennui, c'est qu'on dispose actuellement de données qui montrent que la déphosphorylation de Tau pourrait s'accompagner d'une sécrétion de la protéine dans le milieu extracellulaire via les exosomes (Kellett and Hooper, 2015; Pooler et al.,

2013; Wang et al., 2017). En ce sens, les observations tendent à démontrer que la protéine Tau sécrétée serait toxique pour le cerveau. Ne faudrait-il pas s'inquiéter de cette possibilité? De plus, serait-il plus judicieux d'opter pour la neutralisation de Tau hyperphosphorylée par des anticorps plutôt que pour sa déphosphorylation (Gibbons et al., 2018)? L'avenir nous le dira bien.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Il n'existe encore aucun traitement permettant de guérir la maladie d'Alzheimer ou d'en freiner sa progression. Se manifestant d'abord par des troubles de la pensée et de la mémoire, la maladie d'Alzheimer provoque peu à peu chez la personne touchée une atteinte des facultés cognitives qui se traduira progressivement par une difficulté à effectuer les tâches quotidiennes comme s'habiller et faire sa toilette. Éventuellement, cette personne ne pourra plus s'occuper d'elle-même et communiquer verbalement. Elle devra donc être prise en charge par ses pairs. Au bout du compte, il y aura non seulement atteinte des facultés cognitives, mais également atteinte des facultés physiques qui, peu à peu, s'aggraveront et laisseront place à la mort.

Rappelons que la maladie d'Alzheimer fait partie des formes de démences les plus connues. Selon les statistiques rendues publiques en 2016 par la Société Alzheimer du Canada, 564 000 Canadiens sont atteints de cette maladie ou d'une maladie apparentée, un nombre qui s'élèvera à 937 000 dans 15 ans. Les coûts engendrés par ces problèmes de santé sont actuellement estimés à 10,4 milliards de dollars par année et, en 2031, cette somme bondira à 16,4 milliards de dollars. Il faut savoir que le plus grand facteur de risque de la maladie d'Alzheimer est l'âge, un fait qui apparaît non négligeable et à considérer étant donné le phénomène du vieillissement démographique probant que font face notre société et bien d'autres, comme le Bureau du recensement des États-Unis l'indique.

Manipuler pharmacologiquement les neurones du cerveau dans un but thérapeutique requiert la compréhension des processus moléculaires qui engagent la pathologie humaine. S'agissant de la maladie d'Alzheimer, la théorie amyloïde a longtemps confié la responsabilité des dommages engendrés à cette protéine agglomérée en plaques. Or, après de multiples tentatives thérapeutiques, les chercheurs sont à considérer d'autres mécanismes moléculaires dans l'initiation du processus pathologique. Plusieurs recherches actuelles tendent ainsi à impliquer la protéine Tau hyperphosphorylée comme mécanisme précoce de la pathogénèse Alzheimer. De fait, les observations effectuées dans le cadre du présent travail expérimental laissent envisager qu'un traitement préventif par des analogues de la S1P comme le SEW2871 pourrait freiner les dommages causés par la protéine Tau hyperphosphorylée. Une histoire à suivre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acheson, A., Conover, J.C., Fandl, J.P., DeChiara, T.M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S.P., Yancopoulos, G.D., Lindsay, R.M., 1995. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*. 374, 450-453.
- Adada, M., Canals, D., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2013. Sphingosine-1-phosphate receptor 2. *FEBS J*. 280, 6354-6366.
- Ahlijanian, M.K., Barrezueta, N.X., Williams, R.D., Jakowski, A., Kowsz, K.P., McCarthy, S., Coskran, T., Carlo, A., Seymour, P.A., Burkhardt, J.E., Nelson, R.B., McNeish, J.D., 2000. Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 2910-2915.
- Akwa, Y., Gondard, E., Mann, A., Capetillo-Zarate, E., Alberdi, E., Matute, C., Marty, S., Vaccari, T., Lozano, A.M., Baulieu, E.E., Tampellini, D., 2018. Synaptic activity protects against AD and FTD-like pathology via autophagic-lysosomal degradation. *Mol Psychiatry*. 23, 1530-1540.
- Alesenko, A.V., 2013. [The potential role for sphingolipids in neuropathogenesis of Alzheimer's disease]. *Biomed Khim*. 59, 25-50.
- Allende, M.L., Sipe, L.M., Tuymetova, G., Wilson-Henjum, K.L., Chen, W., Proia, R.L., 2013. Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 regulates keratinocyte differentiation and epidermal homeostasis. *J Biol Chem*. 288, 18381-18391.
- Ando, K., Maruko-Otake, A., Ohtake, Y., Hayashishita, M., Sekiya, M., Iijima, K.M., 2016. Stabilization of Microtubule-Unbound Tau via Tau Phosphorylation at Ser262/356 by Par-1/MARK Contributes to Augmentation of AD-Related Phosphorylation and Abeta42-Induced Tau Toxicity. *PLoS Genet*. 12, e1005917.
- Aoki, M., Aoki, H., Ramanathan, R., Hait, N.C., Takabe, K., 2016. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential. *Mediators Inflamm*. 2016, 8606878.

- Arish, M., Alaidarous, M., Ali, R., Akhter, Y., Rub, A., 2017. Implication of sphingosine-1-phosphate signaling in diseases: molecular mechanism and therapeutic strategies. *J Recept Signal Transduct Res.* 37, 437-446.
- Asle-Rousta, M., Kolahdooz, Z., Oryan, S., Ahmadiani, A., Dargahi, L., 2013. FTY720 (fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide (A β 42)-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *J Mol Neurosci.* 50, 524-532.
- Atasoy, I.L., Dursun, E., Gezen-Ak, D., Metin-Armagan, D., Ozturk, M., Yilmazer, S., 2017. Both secreted and the cellular levels of BDNF attenuated due to tau hyperphosphorylation in primary cultures of cortical neurons. *J Chem Neuroanat.* 80, 19-26.
- Attiori Essis, S., Laurier-Laurin, M.E., Pepin, E., Cyr, M., Massicotte, G., 2015. GluN2B-containing NMDA receptors are upregulated in plasma membranes by the sphingosine-1-phosphate analog FTY720P. *Brain Res.* 1624, 349-358.
- Augustinack, J.C., Schneider, A., Mandelkow, E.M., Hyman, B.T., 2002. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 103, 26-35.
- Bartke, N., Hannun, Y.A., 2009. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res.* 50 Suppl, S91-96.
- Baudier, J., Lee, S.H., Cole, R.D., 1987. Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinase C. *J Biol Chem.* 262, 17584-17590.
- Bian, F., Nath, R., Sobocinski, G., Booher, R.N., Lipinski, W.J., Callahan, M.J., Pack, A., Wang, K.K., Walker, L.C., 2002. Axonopathy, tau abnormalities, and dyskinesia, but no neurofibrillary tangles in p25-transgenic mice. *J Comp Neurol.* 446, 257-266.
- Bilousova, T., Elias, C., Miyoshi, E., Alam, M.P., Zhu, C., Campagna, J., Vadivel, K., Jagodzinska, B., Gylys, K.H., John, V., 2018. Suppression of tau propagation using an inhibitor that targets the DK-switch of nSMase2. *Biochem Biophys Res Commun.* 499, 751-757.

- Blaho, V.A., Hla, T., 2014. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res.* 55, 1596-1608.
- Bolli, M.H., Abele, S., Binkert, C., Bravo, R., Buchmann, S., Bur, D., Gatfield, J., Hess, P., Kohl, C., Mangold, C., Mathys, B., Menyhart, K., Muller, C., Nayler, O., Scherz, M., Schmidt, G., Sippel, V., Steiner, B., Strasser, D., Treiber, A., Weller, T., 2010. 2-imino-thiazolidin-4-one derivatives as potent, orally active S1P1 receptor agonists. *J Med Chem.* 53, 4198-4211.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239-259.
- Bradley, E., Dasgupta, S., Jiang, X., Zhao, X., Zhu, G., He, Q., Dinkins, M., Bieberich, E., Wang, G., 2014. Critical role of Spns2, a sphingosine-1-phosphate transporter, in lung cancer cell survival and migration. *PLoS One.* 9, e110119.
- Braithwaite, S.P., Stock, J.B., Lombroso, P.J., Nairn, A.C., 2012. Protein phosphatases and Alzheimer's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 106, 343-379.
- Brandt, R., Leger, J., Lee, G., 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol.* 131, 1327-1340.
- Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S., Burtin, P., 2010. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* 9, 883-897.
- Brizuela, L., Ader, I., Mazerolles, C., Bocquet, M., Malavaud, B., Cuvillier, O., 2012. First evidence of sphingosine 1-phosphate lyase protein expression and activity downregulation in human neoplasm: implication for resistance to therapeutics in prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 11, 1841-1851.
- Brunkhorst, R., Vutukuri, R., Pfeilschifter, W., 2014. Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives. *Front Cell Neurosci.* 8, 283.
- Bryan, A.M., Del Poeta, M., 2018. Sphingosine-1-phosphate receptors and innate immunity. *Cell Microbiol.* 20, e12836.

- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R., 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 33, 95-130.
- Camprubi-Robles, M., Mair, N., Andratsch, M., Benetti, C., Beroukas, D., Rukwied, R., Langeslag, M., Proia, R.L., Schmelz, M., Ferrer Montiel, A.V., Haberberger, R.V., Kress, M., 2013. Sphingosine-1-phosphate-induced nociceptor excitation and ongoing pain behavior in mice and humans is largely mediated by S1P3 receptor. *J Neurosci.* 33, 2582-592.
- Caraci, F., Iulita, M.F., Pentz, R., Flores Aguilar, L., Orciani, C., Barone, C., Romano, C., Drago, F., Cuello, A.C., 2017. Searching for new pharmacological targets for the treatment of Alzheimer's disease in Down syndrome. *Eur J Pharmacol.* 817, 7-19.
- Cavone, L., Felici, R., Lapucci, A., Buonvicino, D., Pratesi, S., Muzzi, M., Hakiki, B., Maggi, L., Peruzzi, B., Caporale, R., Annunziato, F., Amato, M.P., Chiarugi, A., 2015. Dysregulation of sphingosine 1 phosphate receptor-1 (S1P1) signaling and regulatory lymphocyte-dependent immunosuppression in a model of post-fingolimod MS rebound. *Brain Behav Immun.* 50, 78-86.
- Ceccom, J., Loukh, N., Lauwers-Cances, V., Touriol, C., Nicaise, Y., Gentil, C., Uro-Coste, E., Pitson, S., Maurage, C.A., Duyckaerts, C., Cuvillier, O., Delisle, M.B., 2014. Reduced sphingosine kinase-1 and enhanced sphingosine 1-phosphate lyase expression demonstrate deregulated sphingosine 1-phosphate signaling in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2, 12.
- Chaudhry, B.Z., Cohen, J.A., Conway, D.S., 2017. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics.*
- Chavez, A., Schmidt, T.T., Yazbeck, P., Rajput, C., Desai, B., Sukriti, S., Giantsos-Adams, K., Knezevic, N., Malik, A.B., Mehta, D., 2015. S1PR1 Tyr143 phosphorylation downregulates endothelial cell surface S1PR1 expression and responsiveness. *J Cell Sci.* 128, 878-887.
- Chi, H., 2011. Sphingosine-1-phosphate and immune regulation: trafficking and beyond. *Trends Pharmacol Sci.* 32, 16-24.

- Chiba, K., Adachi, K., 2012. Discovery of fingolimod, the sphingosine 1-phosphate receptor modulator and its application for the therapy of multiple sclerosis. *Future Med Chem.* 4, 771-781.
- Chun, J., Hartung, H.P., 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol.* 33, 91-101.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W., 1977. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 116, 207-225.
- Cuvillier, O., 2012. [Sphingosine 1-phosphate receptors: from biology to physiopathology]. *Med Sci (Paris).* 28, 951-957.
- Di Pardo, A., Amico, E., Basit, A., Armirotti, A., Joshi, P., Neely, M.D., Vuono, R., Castaldo, S., Digilio, A.F., Scalabri, F., Pepe, G., Elifani, F., Madonna, M., Jeong, S.K., Park, B.M., D'Esposito, M., Bowman, A.B., Barker, R.A., Maglione, V., 2017. Defective Sphingosine-1-phosphate metabolism is a druggable target in Huntington's disease. *Sci Rep.* 7, 5280.
- Doi, Y., Takeuchi, H., Horiuchi, H., Hanyu, T., Kawanokuchi, J., Jin, S., Parajuli, B., Sonobe, Y., Mizuno, T., Suzumura, A., 2013. Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid beta-induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PLoS One.* 8, e61988.
- Domise, M., Didier, S., Marinangeli, C., Zhao, H., Chandakkar, P., Buee, L., Viollet, B., Davies, P., Marambaud, P., Vingtdeux, V., 2016. AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo. *Sci Rep.* 6, 26758.
- Donoviel, M.S., Hait, N.C., Ramachandran, S., Maceyka, M., Takabe, K., Milstien, S., Oravec, T., Spiegel, S., 2015. Spinster 2, a sphingosine-1-phosphate transporter, plays a critical role in inflammatory and autoimmune diseases. *FASEB J.* 29, 5018-5028.
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H.E., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 1995. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem.* 270, 7679-7688.

- Farez, M.F., Correale, J., 2016. Sphingosine 1-phosphate signaling in astrocytes: Implications for progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 361, 60-65.
- Ferrer, I., 2018. Oligodendroglial pathology in neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates: the forgotten partner. *Prog Neurobiol.*
- Frost, B., Diamond, M.I., 2010. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 11, 155-159.
- Fukumoto, K., Mizoguchi, H., Takeuchi, H., Horiuchi, H., Kawanokuchi, J., Jin, S., Mizuno, T., Suzumura, A., 2014. Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid beta-induced memory impairment. *Behav Brain Res.* 268, 88-93.
- Fulga, T.A., Elson-Schwab, I., Khurana, V., Steinhilb, M.L., Spires, T.L., Hyman, B.T., Feany, M.B., 2007. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol.* 9, 139-148.
- Gendron, T.F., Petrucelli, L., 2009. The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 4, 13.
- Ghasemi, R., Dargahi, L., Ahmadiani, A., 2016. Integrated sphingosine-1 phosphate signaling in the central nervous system: From physiological equilibrium to pathological damage. *Pharmacol Res.* 104, 156-164.
- Gibbons, G.S., Banks, R.A., Kim, B., Changolkar, L., Riddle, D.M., Leight, S.N., Irwin, D.J., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., 2018. Detection of Alzheimer Disease (AD)-Specific Tau Pathology in AD and NonAD Tauopathies by Immunohistochemistry With Novel Conformation-Selective Tau Antibodies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 77, 216-228.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A., 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* 3, 519-526.
- Goetzl, E.J., Wang, W., McGiffert, C., Huang, M.C., Graler, M.H., 2004. Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system. *J Cell Biochem.* 92, 1104-1114.

- Gong, C.X., Lidsky, T., Wegiel, J., Zuck, L., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2000a. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 275, 5535-5544.
- Gong, C.X., Wegiel, J., Lidsky, T., Zuck, L., Avila, J., Wisniewski, H.M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2000b. Regulation of phosphorylation of neuronal microtubule-associated proteins MAP1b and MAP2 by protein phosphatase-2A and -2B in rat brain. *Brain Res.* 853, 299-309.
- Gonzalez, L., Qian, A.S., Tahir, U., Yu, P., Trigatti, B.L., 2017. Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1, Expressed in Myeloid Cells, Slows Diet-Induced Atherosclerosis and Protects against Macrophage Apoptosis in Ldlr KO Mice. *Int J Mol Sci.* 18.
- Groves, A., Kihara, Y., Chun, J., 2013. Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy. *J Neurol Sci.* 328, 9-18.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., Binder, L.I., 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 4913-4917.
- Guerrero, M., Urbano, M., Roberts, E., 2016. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 agonists: a patent review (2013-2015). *Expert Opin Ther Pat.* 26, 455-470.
- Hait, N.C., Wise, L.E., Allegood, J.C., O'Brien, M., Avni, D., Reeves, T.M., Knapp, P.E., Lu, J., Luo, C., Miles, M.F., Milstien, S., Lichtman, A.H., Spiegel, S., 2014. Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nat Neurosci.* 17, 971-980.
- Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P., Anderton, B.H., 1992. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett.* 147, 58-62.
- Hanger, D.P., Anderton, B.H., Noble, W., 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med.* 15, 112-119.

- Hara, M., Hirokawa, K., Kamei, S., Uchihara, T., 2013. Isoform transition from four-repeat to three-repeat tau underlies dendrosomatic and regional progression of neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol.* 125, 565-579.
- Healy, L.M., Antel, J.P., 2015. Sphingosine-1-Phosphate Receptors in the Central Nervous and Immune Systems. *Current Drug Targets.* 18.
- Hemmati, F., Dargahi, L., Nasoohi, S., Omidbakhsh, R., Mohamed, Z., Chik, Z., Naidu, M., Ahmadiani, A., 2013. Neurorestorative effect of FTY720 in a rat model of Alzheimer's disease: comparison with memantine. *Behav Brain Res.* 252, 415-421.
- Hinkovska-Galcheva, V., VanWay, S.M., Shanley, T.P., Kunkel, R.G., 2008. The role of sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate in calcium homeostasis. *Curr Opin Investig Drugs.* 9, 1192-1205.
- Hirokawa, N., Shiomura, Y., Okabe, S., 1988. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol.* 107, 1449-1459.
- Hoglinger, D., Haberkant, P., Aguilera-Romero, A., Riezman, H., Porter, F.D., Platt, F.M., Galione, A., Schultz, C., 2015. Intracellular sphingosine releases calcium from lysosomes. *Elife.* 4.
- Hou, J., Chen, Q., Wu, X., Zhao, D., Reuveni, H., Licht, T., Xu, M., Hu, H., Hoeft, A., Ben-Sasson, S.A., Shu, Q., Fang, X., 2017. S1PR3 Signaling Drives Bacterial Killing and Is Required for Survival in Bacterial Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 196, 1559-1570.
- Hu, W., Zhang, X., Tung, Y.C., Xie, S., Liu, F., Iqbal, K., 2016. Hyperphosphorylation determines both the spread and the morphology of tau pathology. *Alzheimers Dement.* 12, 1066-1077.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 24, 677-736.
- Hughes, J.E., Srinivasan, S., Lynch, K.R., Proia, R.L., Ferdek, P., Hedrick, C.C., 2008. Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circ Res.* 102, 950-958.

- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., Ogawara, M., 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem.* 99, 1807-1810.
- Iijima, K., Gatt, A., Iijima-Ando, K., 2010. Tau Ser262 phosphorylation is critical for Abeta42-induced tau toxicity in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 19, 2947-2957.
- Ittner, A., Chua, S.W., Bertz, J., Volkerling, A., van der Hoven, J., Gladbach, A., Przybyla, M., Bi, M., van Hummel, A., Stevens, C.H., Ippati, S., Suh, L.S., Macmillan, A., Sutherland, G., Kril, J.J., Silva, A.P., Mackay, J., Poljak, A., Delerue, F., Ke, Y.D., Ittner, L.M., 2016. Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid-beta toxicity in Alzheimer's mice. *Science.* 354, 904-908.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wolfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., Gotz, J., 2010. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell.* 142, 387-397.
- Jaillard, C., Harrison, S., Stankoff, B., Aigrot, M.S., Calver, A.R., Duddy, G., Walsh, F.S., Pangalos, M.N., Arimura, N., Kaibuchi, K., Zalc, B., Lubetzki, C., 2005. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci.* 25, 1459-1469.
- Jesko, H., Wencel, P.L., Lukiw, W.J., Strosznajder, R.P., 2018. Modulatory Effects of Fingolimod (FTY720) on the Expression of Sphingolipid Metabolism-Related Genes in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.*
- Joshi, P., Gabrielli, M., Ponzoni, L., Pelucchi, S., Stravalaci, M., Beeg, M., Mazzitelli, S., Braidà, D., Sala, M., Boda, E., Buffo, A., Gobbi, M., Gardoni, F., Matteoli, M., Marcello, E., Verderio, C., 2017. Fingolimod Limits Acute Abeta Neurotoxicity and Promotes Synaptic Versus Extrasynaptic NMDA Receptor Functionality in Hippocampal Neurons. *Sci Rep.* 7, 41734.
- Kajimoto, T., Okada, T., Yu, H., Goparaju, S.K., Jahangeer, S., Nakamura, S., 2007. Involvement of sphingosine-1-phosphate in glutamate secretion in hippocampal neurons. *Mol Cell Biol.* 27, 3429-3440.

- Kang, S.W., Kim, S.J., Kim, M.S., 2017. Oxidative stress with tau hyperphosphorylation in memory impaired 1,2-diacetylbenzene-treated mice. *Toxicol Lett.* 279, 53-59.
- Kataoka, H., Sugahara, K., Shimano, K., Teshima, K., Koyama, M., Fukunari, A., Chiba, K., 2005. FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration. *Cell Mol Immunol.* 2, 439-448.
- Kellett, K.A., Hooper, N.M., 2015. The Role of Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Neurodegenerative Diseases: Alzheimer's Disease in the Focus. *Subcell Biochem.* 76, 363-374.
- Kim, G.S., Yang, L., Zhang, G., Zhao, H., Selim, M., McCullough, L.D., Kluk, M.J., Sanchez, T., 2015. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in the disruption of cerebrovascular integrity in experimental stroke. *Nat Commun.* 6, 7893.
- Kim, Y.H., Tabata, Y., 2017. Enhancement of wound closure by modifying dual release patterns of stromal-derived cell factor-1 and a macrophage recruitment agent from gelatin hydrogels. *J Tissue Eng Regen Med.* 11, 2999-3013.
- Kobayashi, N., Kawasaki-Nishi, S., Otsuka, M., Hisano, Y., Yamaguchi, A., Nishi, T., 2018. MFSD2B is a sphingosine 1-phosphate transporter in erythroid cells. *Sci Rep.* 8, 4969.
- Kono, M., Belyantseva, I.A., Skoura, A., Frolenkov, G.I., Starost, M.F., Dreier, J.L., Lidington, D., Bolz, S.S., Friedman, T.B., Hla, T., Proia, R.L., 2007. Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *J Biol Chem.* 282, 10690-10696.
- Kopke, E., Tung, Y.C., Shaikh, S., Alonso, A.C., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 1993. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 268, 24374-24384.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., Selkoe, D.J., 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 4044-4048.

- Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., Neve, R.L., 1989. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron*. 2, 1389-1397.
- Kovacs, G.G., Kwong, L.K., Grossman, M., Irwin, D.J., Lee, E.B., Robinson, J.L., Suh, E., Van Deerlin, V.M., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2018. Tauopathy with hippocampal 4-repeat tau immunoreactive spherical inclusions: a report of three cases. *Brain Pathol*. 28, 274-283.
- Ksiezak-Reding, H., Pyo, H.K., Feinstein, B., Pasinetti, G.M., 2003. Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1639, 159-168.
- Kumar, P., Jha, N.K., Jha, S.K., Ramani, K., Ambasta, R.K., 2015. Tau phosphorylation, molecular chaperones, and ubiquitin E3 ligase: clinical relevance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 43, 341-361.
- Kunkel, G.T., Maceyka, M., Milstien, S., Spiegel, S., 2013. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 12, 688-702.
- Lahiri, S., Futerman, A.H., 2007. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci*. 64, 2270-2284.
- Lazarov, O., Marr, R.A., 2010. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp Neurol*. 223, 267-281.
- Leroy, K., Boutajangout, A., Authelet, M., Woodgett, J.R., Anderton, B.H., Brion, J.P., 2002. The active form of glycogen synthase kinase-3beta is associated with granulovacuolar degeneration in neurons in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 103, 91-99.
- Lewerenz, J., Maher, P., 2015. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Front Neurosci*. 9, 469.
- Li, C., Li, J.N., Kays, J., Guerrero, M., Nicol, G.D., 2015a. Sphingosine 1-phosphate enhances the excitability of rat sensory neurons through activation of sphingosine 1-phosphate receptors 1 and/or 3. *J Neuroinflammation*. 12, 70.

- Li, Q., Chen, B., Zeng, C., Fan, A., Yuan, Y., Guo, X., Huang, X., Huang, Q., 2015b. Differential activation of receptors and signal pathways upon stimulation by different doses of sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *Exp Physiol.* 100, 95-107.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Rossie, S., Gong, C.X., 2005. Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 280, 1790-1796.
- Long, J.S., Fujiwara, Y., Edwards, J., Tannahill, C.L., Tigyi, G., Pyne, S., Pyne, N.J., 2010. Sphingosine 1-phosphate receptor 4 uses HER2 (ERBB2) to regulate extracellular signal regulated kinase-1/2 in MDA-MB-453 breast cancer cells. *J Biol Chem.* 285, 35957-35966.
- Ludolph, A.C., Kassubek, J., Landwehrmeyer, B.G., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M., Burn, D.J., Caparros-Lefebvre, D., Frey, K.A., de Yebenes, J.G., Gasser, T., Heutink, P., Höglinger, G., Jamrozik, Z., Jellinger, K.A., Kazantsev, A., Kretschmar, H., Lang, A.E., Litvan, I., Lucas, J.J., McGeer, P.L., Melquist, S., Oertel, W., Otto, M., Paviour, D., Reum, T., Saint-Raymond, A., Steele, J.C., Tolnay, M., Tumani, H., van Swieten, J.C., Vanier, M.T., Vonsattel, J.P., Wagner, S., Wszolek, Z.K., Reisenburg Working Group for Tauopathies With, P., 2009. Tauopathies with parkinsonism: clinical spectrum, neuropathologic basis, biological markers, and treatment options. *Eur J Neurol.* 16, 297-309.
- Luna-Munoz, J., Chavez-Macias, L., Garcia-Sierra, F., Mena, R., 2007. Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 12, 365-375.
- Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S., Spiegel, S., 2012. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* 22, 50-60.
- Maceyka, M., Spiegel, S., 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature.* 510, 58-67.
- MacLennan, A.J., Carney, P.R., Zhu, W.J., Chaves, A.H., Garcia, J., Grimes, J.R., Anderson, K.J., Roper, S.N., Lee, N., 2001. An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur J Neurosci.* 14, 203-209.

- Majd, S., Power, J.H., Koblar, S.A., Grantham, H.J., 2016. Early glycogen synthase kinase-3beta and protein phosphatase 2A independent tau dephosphorylation during global brain ischaemia and reperfusion following cardiac arrest and the role of the adenosine monophosphate kinase pathway. *Eur J Neurosci.* 44, 1987-1997.
- Martin, L., Latypova, X., Terro, F., 2011. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 58, 458-471.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G., 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 23, 649-711.
- Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., Cyster, J.G., 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature.* 427, 355-360.
- Mattie, M., Brooker, G., Spiegel, S., 1994. Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J Biol Chem.* 269, 3181-3188.
- Mendelson, K., Evans, T., Hla, T., 2014. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development.* 141, 5-9.
- Merrill, A.H., Jr., Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A., Wang, E., 1997. Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol.* 142, 208-225.
- Migheli, A., Butler, M., Brown, K., Shelanski, M.L., 1988. Light and electron microscope localization of the microtubule-associated tau protein in rat brain. *J Neurosci.* 8, 1846-1851.
- Miguez, A., Garcia-Diaz Barriga, G., Brito, V., Straccia, M., Giralt, A., Gines, S., Canals, J.M., Alberch, J., 2015. Fingolimod (FTY720) enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in Huntington's disease by preventing p75NTR up-regulation and astrocyte-mediated inflammation. *Hum Mol Genet.* 24, 4958-4970.

- Minamide, L.S., Striegl, A.M., Boyle, J.A., Meberg, P.J., Bamburg, J.R., 2000. Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat Cell Biol.* 2, 628-636.
- Moberly, J.B., Ford, D.M., Zahir, H., Chen, S., Mochizuki, T., Truitt, K.E., Vollmer, T.L., 2012. Pharmacological effects of CS-0777, a selective sphingosine 1-phosphate receptor-1 modulator: results from a 12-week, open-label pilot study in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 246, 100-107.
- Muller, J., von Bernstorff, W., Heidecke, C.D., Schulze, T., 2017. Differential S1P Receptor Profiles on M1- and M2-Polarized Macrophages Affect Macrophage Cytokine Production and Migration. *Biomed Res Int.* 2017, 7584621.
- Nishimura, H., Akiyama, T., Irei, I., Hamazaki, S., Sadahira, Y., 2010. Cellular localization of sphingosine-1-phosphate receptor 1 expression in the human central nervous system. *J Histochem Cytochem.* 58, 847-856.
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahlijanian, M., Lau, L.F., Duff, K., 2003. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron.* 38, 555-565.
- Novgorodov, A.S., El-Alwani, M., Bielawski, J., Obeid, L.M., Gudz, T.I., 2007. Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. *FASEB J.* 21, 1503-1514.
- Olesch, C., Ringel, C., Brune, B., Weigert, A., 2017. Beyond Immune Cell Migration: The Emerging Role of the Sphingosine-1-phosphate Receptor S1PR4 as a Modulator of Innate Immune Cell Activation. *Mediators Inflamm.* 2017, 6059203.
- Oo, M.L., Chang, S.H., Thangada, S., Wu, M.T., Rezaul, K., Blaho, V., Hwang, S.I., Han, D.K., Hla, T., 2011. Engagement of S1P(1)-degradative mechanisms leads to vascular leak in mice. *J Clin Invest.* 121, 2290-2300.

- Pan, S., Mi, Y., Pally, C., Beerli, C., Chen, A., Guerini, D., Hinterding, K., Nuesslein-Hildesheim, B., Tuntland, T., Lefebvre, S., Liu, Y., Gao, W., Chu, A., Brinkmann, V., Bruns, C., Streiff, M., Cagnet, C., Cooke, N., Gray, N., 2006. A monoselective sphingosine-1-phosphate receptor-1 agonist prevents allograft rejection in a stringent rat heart transplantation model. *Chem Biol.* 13, 1227-1234.
- Papasozomenos, S.C., Binder, L.I., 1987. Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton.* 8, 210-226.
- Parbo, P., Ismail, R., Sommerauer, M., Stokholm, M.G., Hansen, A.K., Hansen, K.V., Amidi, A., Schaldemose, J.L., Gottrup, H., Braendgaard, H., Eskildsen, S.F., Borghammer, P., Hinz, R., Aanerud, J., Brooks, D.J., 2018. Does inflammation precede tau aggregation in early Alzheimer's disease? A PET study. *Neurobiol Dis.* 117, 211-216.
- Park, S., Scheffler, T.L., Rossie, S.S., Gerrard, D.E., 2013. AMPK activity is regulated by calcium-mediated protein phosphatase 2A activity. *Cell Calcium.* 53, 217-223.
- Park, S.J., Im, D.S., 2017. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators and Drug Discovery. *Biomol Ther (Seoul).* 25, 80-90.
- Parsons, C.G., Rammes, G., 2017. Preclinical to phase II amyloid beta (A β) peptide modulators under investigation for Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 26, 579-592.
- Payne, S.G., Milstien, S., Spiegel, S., 2002. Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett.* 531, 54-57.
- Pei, J.J., Tanaka, T., Tung, Y.C., Braak, E., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 1997. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56, 70-78.
- Pickett, E.K., Henstridge, C.M., Allison, E., Pitstick, R., Pooler, A., Wegmann, S., Carlson, G., Hyman, B.T., Spires-Jones, T.L., 2017. Spread of tau down neural circuits precedes synapse and neuronal loss in the rTgTauEC mouse model of early Alzheimer's disease. *Synapse.* 71.

- Pimentel, A.A., Benaim, G., 2012. [Ca²⁺ and sphingolipids as modulators for apoptosis and cancer]. *Invest Clin.* 53, 84-110.
- Pooler, A.M., Phillips, E.C., Lau, D.H., Noble, W., Hanger, D.P., 2013. Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep.* 14, 389-394.
- Prager, B., Spampinato, S.F., Ransohoff, R.M., 2015. Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood-brain barrier. *Trends Mol Med.* 21, 354-363.
- Pralhada Rao, R., Vaidyanathan, N., Rengasamy, M., Mammen Oommen, A., Somaiya, N., Jagannath, M.R., 2013. Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases. *J Lipids.* 2013, 178910.
- Proia, R.L., Hla, T., 2015. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. In: *J Clin Invest.* 125, 1379-1387.
- Pulkoski-Gross, M.J., Donaldson, J.C., Obeid, L.M., 2015. Sphingosine-1-phosphate metabolism: A structural perspective. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 50, 298-313.
- Pyne, N.J., Pyne, S., 2017. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Signaling in Mammalian Cells. *Molecules.* 22.
- Ratajczak, M.Z., Suszynska, M., Borkowska, S., Ratajczak, J., Schneider, G., 2014. The role of sphingosine-1 phosphate and ceramide-1 phosphate in trafficking of normal stem cells and cancer cells. *Expert Opin Ther Targets.* 18, 95-107.
- Reynolds, C.H., Garwood, C.J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P.W., Varndell, I.M., Hanger, D.P., Anderton, B.H., 2008. Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem.* 283, 18177-18186.
- Romero-Guevara, R., Cencetti, F., Donati, C., Bruni, P., 2015. Sphingosine 1-phosphate signaling pathway in inner ear biology. New therapeutic strategies for hearing loss? *Front Aging Neurosci.* 7, 60.

- Rosen, H., Stevens, R.C., Hanson, M., Roberts, E., Oldstone, M.B., 2013. Sphingosine-1-phosphate and its receptors: structure, signaling, and influence. *Annu Rev Biochem.* 82, 637-662.
- Rub, U., Stratmann, K., Heinsen, H., Seidel, K., Bouzrou, M., Korf, H.W., 2017. Alzheimer's Disease: Characterization of the Brain Sites of the Initial Tau Cytoskeletal Pathology Will Improve the Success of Novel Immunological Anti-Tau Treatment Approaches. *J Alzheimers Dis.* 57, 683-696.
- Ruiz, A., Joshi, P., Mastrangelo, R., Francolini, M., Verderio, C., Matteoli, M., 2014. Testing A β toxicity on primary CNS cultures using drug-screening microfluidic chips. *Lab Chip.* 14, 2860-2866.
- Rutherford, C., Childs, S., Ohotski, J., McGlynn, L., Riddick, M., MacFarlane, S., Tasker, D., Pyne, S., Pyne, N.J., Edwards, J., Palmer, T.M., 2013. Regulation of cell survival by sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 via reciprocal ERK-dependent suppression of Bim and PI-3-kinase/protein kinase C-mediated upregulation of Mcl-1. *Cell Death Dis.* 4, e927.
- Schulze, T., Golfier, S., Tabeling, C., Rabel, K., Graler, M.H., Witzernath, M., Lipp, M., 2011. Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P(4)) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model. *FASEB J.* 25, 4024-4036.
- Schweyer, K., Levin, J., Hoglinger, G.U., 2018. [Current therapy studies in atypical Parkinson syndromes]. *Fortschr Neurol Psychiatr.*
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1998. Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys.* 357, 299-309.
- Seol, G.H., Kim, M.Y., Liang, G.H., Kim, J.A., Kim, Y.J., Oh, S., Suh, S.H., 2005. Sphingosine-1-phosphate-induced intracellular Ca²⁺ mobilization in human endothelial cells. *Endothelium.* 12, 263-269.
- Spiegel, S., Milstien, S., 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 397-407.
- Spiegel, S., Milstien, S., 2011. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol.* 11, 403-415.

- Strub, G.M., Maceyka, M., Hait, N.C., Milstien, S., Spiegel, S., 2010. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol.* 688, 141-155.
- Strub, G.M., Paillard, M., Liang, J., Gomez, L., Allegood, J.C., Hait, N.C., Maceyka, M., Price, M.M., Chen, Q., Simpson, D.C., Kordula, T., Milstien, S., Lesnefsky, E.J., Spiegel, S., 2011. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *FASEB J.* 25, 600-612.
- Sun, X.Y., Tuo, Q.Z., Liuyang, Z.Y., Xie, A.J., Feng, X.L., Yan, X., Qiu, M., Li, S., Wang, X.L., Cao, F.Y., Wang, X.C., Wang, J.Z., Liu, R., 2016. Extrasynaptic NMDA receptor-induced tau overexpression mediates neuronal death through suppressing survival signaling ERK phosphorylation. *Cell Death Dis.* 7, e2449.
- Sykes, D.A., Riddy, D.M., Stamp, C., Bradley, M.E., McGuinness, N., Sattikar, A., Guerini, D., Rodrigues, I., Glaenzel, A., Dowling, M.R., Mullershausen, F., Charlton, S.J., 2014. Investigating the molecular mechanisms through which FTY720-P causes persistent S1P1 receptor internalization. *Br J Pharmacol.* 171, 4797-4807.
- Takasugi, N., Sasaki, T., Ebinuma, I., Osawa, S., Isshiki, H., Takeo, K., Tomita, T., Iwatsubo, T., 2013. FTY720/fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid-beta production in neurons. *PLoS One.* 8, e64050.
- Tirodkar, T.S., Voelkel-Johnson, C., 2012. Sphingolipids in apoptosis. *Exp Oncol.* 34, 231-242.
- Toman, R.E., Payne, S.G., Watterson, K.R., Maceyka, M., Lee, N.H., Milstien, S., Bigbee, J.W., Spiegel, S., 2004. Differential transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors modulates NGF-induced neurite extension. *J Cell Biol.* 166, 381-392.
- Trankner, D., Hahne, N., Sugino, K., Hoon, M.A., Zuker, C., 2014. Population of sensory neurons essential for asthmatic hyperreactivity of inflamed airways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, 11515-11520.

- Uematsu, M., Nakamura, A., Ebashi, M., Hirokawa, K., Takahashi, R., Uchihara, T., 2018. Brainstem tau pathology in Alzheimer's disease is characterized by increase of three repeat tau and independent of amyloid beta. *Acta Neuropathol Commun.* 6, 1.
- Valachova, B., Brezovakova, V., Bugos, O., Jadhav, S., Smolek, T., Novak, P., Zilka, N., 2018. A comparative study on pathological features of transgenic rat lines expressing either three or four repeat misfolded tau. *J Comp Neurol.* 526, 1777-1789.
- van Echten-Deckert, G., Hagen-Euteneuer, N., Karaca, I., Walter, J., 2014. Sphingosine-1-phosphate: boon and bane for the brain. *Cell Physiol Biochem.* 34, 148-157.
- von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 2000. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 5129-5134.
- Voss, K., Koren, J., 3rd, Dickey, C.A., 2011. The earliest tau dysfunction in Alzheimer's disease? Tau phosphorylated at s422 as a toxic seed. *Am J Pathol.* 179, 2148-2151.
- Wainaina, M.N., Chen, Z., Zhong, C., 2014. Environmental factors in the development and progression of late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 30, 253-270.
- Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2007. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci.* 25, 59-68.
- Wang, J.Z., Liu, F., 2008. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol.* 85, 148-175.
- Wang, S.Y., Zhang, J.L., Zhang, D., Bao, X.Q., Sun, H., 2015. [Recent advances in study of sphingolipids on liver diseases]. *Yao Xue Xue Bao.* 50, 1551-1558.

- Wang, Y., Balaji, V., Kaniyappan, S., Kruger, L., Irsen, S., Tepper, K., Chandupatla, R., Maetzler, W., Schneider, A., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M., 2017. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener.* 12, 5.
- Wei, Y., Han, C., Wang, Y., Wu, B., Su, T., Liu, Y., He, R., 2015. Ribosylation triggering Alzheimer's disease-like Tau hyperphosphorylation via activation of CaMKII. *Aging Cell.* 14, 754-763.
- Wilcox, K.C., Lacor, P.N., Pitt, J., Klein, W.L., 2011. Aβ oligomer-induced synapse degeneration in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol.* 31, 939-948.
- Wu, X.L., Pina-Crespo, J., Zhang, Y.W., Chen, X.C., Xu, H.X., 2017. Tau-mediated Neurodegeneration and Potential Implications in Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease. *Chin Med J (Engl).* 130, 2978-2990.
- Yester, J.W., Tizazu, E., Harikumar, K.B., Kordula, T., 2011. Extracellular and intracellular sphingosine-1-phosphate in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 30, 577-597.
- Zhang, J., Zhang, Z.G., Li, Y., Ding, X., Shang, X., Lu, M., Elias, S.B., Chopp, M., 2015. Fingolimod treatment promotes proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol Dis.* 76, 57-66.
- Zhang, Y.H., Fehrenbacher, J.C., Vasko, M.R., Nicol, G.D., 2006. Sphingosine-1-phosphate via activation of a G-protein-coupled receptor(s) enhances the excitability of rat sensory neurons. *J Neurophysiol.* 96, 1042-1052.
- Zhou, J., Gennatas, E.D., Kramer, J.H., Miller, B.L., Seeley, W.W., 2012. Predicting regional neurodegeneration from the healthy brain functional connectome. *Neuron.* 73, 1216-1227.
- Zhu, X., Rottkamp, C.A., Boux, H., Takeda, A., Perry, G., Smith, M.A., 2000. Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59, 880-888.