



HAL
open science

Etude de l'immunité innée dans la pathogénèse de la sclérose latérale amyotrophique

Roxane Crabé

► **To cite this version:**

Roxane Crabé. Etude de l'immunité innée dans la pathogénèse de la sclérose latérale amyotrophique. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTT079 . tel-03608157

HAL Id: tel-03608157

<https://theses.hal.science/tel-03608157>

Submitted on 14 Mar 2022

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

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

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

En Neurosciences

École doctorale CBS2

Unité de recherche INSERM U1298 – Institut des Neurosciences de Montpellier

**Etude de l'immunité innée dans la pathogénèse de
la sclérose latérale amyotrophique**

Présentée par Roxane Crabé

Le 10 Septembre 2021

Sous la direction de Cédric Raoul

Devant le jury composé de

Séverine BOILLEE, CRCN, Institut du cerveau et de la moelle épinière

Philippe Saas, PU, Etablissement français du sang

Florence PERRIN, PU, Université de Montpellier

Cédric RAOUL, DR, Institut des Neurosciences de Montpellier

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

« La science n'a pas de patrie, parce que le savoir est le patrimoine de l'humanité » - Louis Pasteur

« L'écologie sans lutte des classes, c'est du jardinage » - *Chico Mendes*

REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse n'auraient jamais été possibles sans les accompagnements pédagogique, financier, technique et moral dont j'ai eu la chance de bénéficier tout au long de ce projet. Je tiens donc à remercier dans ce manuscrit toutes les personnes qui m'ont épaulée pendant ces quatre années. Tout d'abord, je remercie mon directeur de thèse et chef d'équipe, Cédric Raoul, de m'avoir donné ma chance en stage de Master puis en doctorat. Je n'avais pas le meilleur dossier, j'ai eu des moments difficiles, mais sa direction et sa confiance m'ont permis de relever de nombreux défis durant ces années et d'acquérir une force de caractère qui ne me quittera plus. Il est également important pour moi de remercier chaleureusement les experts scientifiques qui ont acceptés de donner de leur temps pour m'écouter et me conseiller au cours des différents Comités de Suivi Individuels de thèse ayant eu lieu chaque année : Pr Thierry Vincent, Dr Sophie Ugolini et Pr Florence Perrin. Je remercie doublement Pr Perrin qui m'a toujours montré beaucoup de bienveillance et qui m'a également fait l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinatrice. Je remercie dans le même temps les deux rapporteurs de mon jury, qui ont passé beaucoup de temps sur mon manuscrit et m'ont permis d'échanger de façon extrêmement constructive sur ce projet durant ma soutenance : Dr Séverine Boillée et Pr Philippe Saas. Je tiens à présent à remercier l'Ecole Doctorale CBS2 qui a financé mes trois premières années de thèse ainsi que l'Association pour la Recherche sur la SLA (ARSLA), qui a non seulement financé ma quatrième année de thèse mais également une partie du coût de fonctionnement de ce projet. Je remercie toutes les plateformes techniques et leur personnel, qui m'ont formé et sans lesquels aucun projet de recherche n'aboutirait. De même, je remercie l'ensemble du personnel de l'Institut des Neurosciences de Montpellier, administratif et en charge du fonctionnement du bâtiment, qui m'ont accueilli chaleureusement dès le premier jour. A présent, il m'est indispensable de remercier le noyau dur qui a fait cette thèse ce qu'elle est, je pense ainsi à tous les membres de l'équipe motoneurone dont Céline Salsac, Frédérique Scamps et tous les jeunes doctorants et chercheurs : Claire Soulard, Salim Benlefki, Aleksandra Chudinova, Richard Younès, Laëtitia They, Philippe Gosset, Sarah Ourghani. Merci également au personne qui ont rendues les journées plus facile par des petites blagues, un café ou de simple petites pintes en terrasse après de longue heures de labo : Angéline Rogliardo, Maxime Thouaye, Adrien Tassou, Lucile du Trieu, Benoit Gautier et beaucoup, beaucoup d'autres. Je tiens à remercier également les personnes qui m'ont portée sur la fin de ce voyage de la thèse et qui, à certains moments de ce long parcours, étaient la seule raison pour laquelle je me levais le matin : Ma famille, mon ami Philippe, mon compagnon et mon repère Rémi. « *Ain't no mountain high enough* ».

RÉSUMÉ

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative mortelle et incurable qui affecte progressivement les motoneurons du cerveau et de la moelle épinière. Beaucoup de données ont permis de démontrer des mécanismes non cellule-autonome dans la SLA, portés par la glie réactive, les cellules immunitaires infiltrantes et l'activation immunitaire périphérique. Le rôle des lymphocytes Natural Killer dans la SLA reste peu exploré, et les données disponibles divergent. Nous avons entrepris d'étudier le rôle de ces lymphocytes dans le modèle de souris SLA *SOD1^{G93A}* exprimant un rapporteur GFP sous le contrôle du promoteur du gène *Ncr1*, marqueur adapté à l'étude de ces cellules. Nos travaux ont permis de conclure que dans notre modèle SLA, les lymphocytes NK n'infiltrent pas, ou marginalement, la moelle épinière, et ne subissent pas de modification phénotypique ou d'activation. L'ablation de leur récepteur cytotoxique *Ncr1* n'a pas d'effet sur l'apparition ou l'évolution de la maladie *in vivo*. Nous avons également étudié le rôle de la properdine, une glycoprotéine circulante principalement produite par les leucocytes, dans le modèle de souris SLA *SOD1^{G93A}*. Très étudiée pour son rôle dans l'activation du système du complément, la properdine peut également reconnaître et induire l'élimination des lymphocytes T apoptotiques et nécrotiques par un processus appelé opsonisation. Nous avons mis en évidence que la properdine s'accumule sous la forme de larges agrégats dans la moelle épinière de souris *SOD1^{G93A}* à un stade symptomatique. Ces agrégats colocalisent avec les agrégats de la forme humaine mutée de la protéine SOD1 et sont souvent retrouvés au niveau de la microglie phagocytaire CD68⁺. Nous avons également constaté que la properdine est associée à des cellules que nous avons identifiées comme étant une sous-population d'astrocytes extrêmement toxique appelée aberrant astrocytes (Aba). L'ensemble de ces données suggèrent que la properdine joue un rôle dans l'opsonisation d'éléments pro-inflammatoires tels que des agrégats protéiques et des astrocytes en dégénérescence. À ce jour, nous ne connaissons pas les voies moléculaires impliquées dans la reconnaissance de la properdine par les phagocytes et son élimination sous forme de complexe.

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease affecting upper and lower motoneurons. ALS leads to muscle atrophy, progressive paralysis and death within 3 years post diagnosis. A vast amount of data demonstrated the non-cell autonomous mechanisms in ALS, driven by reactive glia, infiltrating immune cells and peripheral immune activation. The role of NK cells in ALS remains poorly understood, and available data lacks consistency. Our aim was to investigate the role of these lymphocytes in an ALS mouse model *SOD1 G93A* expressing a GFP marker under the control of the *Ncr1* promoter, a marker suited for NK cells studies. Our work shows that in our ALS model, NK lymphocytes do not, or marginally, infiltrate the spinal cord, do not undergo modifications regarding phenotype or activation and that ablation of the cytotoxic receptor *Ncr1* has no effect on disease occurrence or progression *in vivo*. We also studied the role of Properdin, a circulating glycoprotein mainly produced by leukocytes, in the *SOD1^{G93A}* ALS mouse model. While its role in the complement system is predominantly studied, Properdin can also serve as a recognition protein for apoptotic and necrotic cells to trigger their clearance through a process called opsonization. We established that Properdin accumulates in the spinal cord of our symptomatic *SOD1^{G93A}* mice in the form of large aggregates. These aggregates colocalize with aggregates of the misfolded form of the human SOD1 protein and are often wrapped by CD68⁺ phagocytic microglial cells. In addition, we also find Properdin associated with chromatin-decondensed cells, identified as the highly toxic subpopulation of astrocytes known as Aba astrocytes. Put together, our findings suggest a role of Properdin in the opsonization and clearance of pro-inflammatory elements such as aggregated proteins and degenerating astrocytes. To this day, we do not know the molecular pathways involved in the recognition of Properdin by phagocytes and in its elimination as a complex.

RÉSUMÉ DE THÈSE VULGARISÉ

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative rare et fatale induisant la mort spécifique des neurones responsables de l'activité musculaire, appelés motoneurons. La SLA se manifeste en premier lieu par une perte de la masse musculaire qui évolue rapidement vers une paralysie généralisée. La mort du patient survient en moyenne 3 ans après le diagnostic. Il a été montré que différents types de cellules participent activement à la maladie. Notre laboratoire s'intéresse tout particulièrement au rôle joué par le système immunitaire dans la SLA. Dans mon projet de thèse, j'ai étudié les lymphocytes Natural Killer (NK) ainsi que la protéine properdine, produite et sécrétée par certaines cellules immunitaires. Nous avons été capables de montrer que, contrairement aux conclusions d'autres études, la population des NK ne subit pas de modifications et ne semble pas impliquée dans la maladie. Nous avons également montré que la properdine s'accumule et s'agrège de façon anormale dans la moelle épinière de modèle de souris SLA et colocalise avec des particules toxiques SOD1 et des cellules en dégénérescence appelées Aba.

VULGARIZED THESIS ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rare and fatal neurodegenerative disease inducing the selective death of neurons in charge of muscle activity, referred to as motoneurons. ALS first begins by the loss of muscle mass and quickly evolves towards a complete paralysis. Death of patients generally occurs within 3 years post diagnosis. Although ALS is a motoneuron disease, research has demonstrated that other cell types actively participate to the disease. Our lab focuses on the role of the immune system in ALS. In my thesis project, I studied Natural Killer (NK) lymphocytes as well as the protein Properdin, produced and secreted by a group of immune cells. We were able to show that, contrary to other studies, the NK population doesn't seem to be modified nor play a significant role in the disease. We also showed that Properdin accumulates and aggregates abnormally in the spinal cord of the ALS mouse model and colocalizes with toxic SOD1 particles and degenerating cells called Aba.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	5
Résumé	7
Abstract	7
Résumé de thèse vulgarisé	8
Vulgarized thesis abstract.....	8
Table des matières	9
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	14
ABRÉVIATIONS	15
Avant-Propos.....	17
Introduction	18
I. La Sclérose latérale amyotrophique, une maladie du motoneurone	18
1. Introduction générale à la SLA.....	18
1.1. Histoire de la SLA.....	18
1.2. Épidémiologie de la SLA	18
1.3. Étiologie de la SLA	18
1.3.1. Génétique de la SLA	19
1.3.2. Les causes environnementales de SLA	20
2. Clinique de la SLA	21
2.1. Symptômes cliniques.....	21
2.1.1. Symptômes physiques	21
2.1.2. Symptômes cognitifs	22
2.1.1. Méthode de diagnostic.....	22
2.2. Prise en charge et traitements actuels	23
3. Le modèle SLA de souris <i>SOD1^{G93A}</i>	25
4. Le motoneurone dans la SLA	26
4.1. Le système moteur.....	27
4.2. Le motoneurone.....	29
4.2.1. Spécificités cellulaires	29
4.2.2. Les motoneurons spinaux	30
4.2.3. Les motoneurons α	30
4.3. La dégénérescence des motoneurons dans la SLA	30
4.3.1. Pathologie du motoneurone dans la SLA	31
II. Mécanismes non-cellules autonomes dans la SLA : rôle de l'activation immunitaire et gliale dans la neuroinflammation	35
1. L'immunité dans la SLA	35

1.1.	Le système immunitaire	35
1.1.1.	L'immunité innée	37
	• Les cellules effectrices du système immunitaire inné	37
	• Le système du complément	42
1.1.2.	L'immunité adaptative.....	45
1.1.3.	L'immunité à médiation cellulaire : les lymphocytes T	45
1.1.4.	L'immunité à médiation humorale : les lymphocytes B.....	46
1.2.	Les modulations immunitaires dans la SLA.....	46
1.2.1.	Le système du complément dans la SLA.....	46
1.2.2.	L'infiltration immunitaire dans la SLA	48
1.2.3.	L'activation périphérique dans la SLA.....	50
2.	La glie réactive, acteur clef de SLA	52
2.1.	La microglie	52
2.1.1.	Physiologie de la microglie	52
2.1.2.	Les fonctions microgliales.....	52
2.1.3.	Activation microgliale dans la SLA	54
2.2.	L'astrocyte.....	58
2.2.1.	Physiologie de l'astrocyte.....	58
2.2.2.	Fonctions astrocytaires	58
2.2.3.	Activation astrocytaire dans la SLA	59
III.	Projets de thèse.....	64
1.	L'étude des cellules NK et du récepteur de cytotoxicité naturelle Ncr1 dans la SLA	64
1.1.	Les cellules Natural Killer.....	64
1.1.1.	Origine embryonnaire, différenciation et maturation	64
1.1.2.	Marqueurs des NK et sous-population	64
1.1.3.	Fonctions des cellules NK.....	64
	• Cytotoxicité : la balance entre signaux inhibiteurs et activateurs.....	65
1.2.	Le récepteur de cytotoxicité naturelle NCR1	67
1.2.1.	Protéine NCR1.....	67
1.2.2.	Génétique.....	67
1.3.	Les cellules NK dans la SLA.....	69
1.4.	Objectif du projet de thèse.....	70
2.	L'étude du rôle du facteur P du complément properdine dans la SLA	70
2.1.	Protéine.....	70
2.1.1.	Origine cellulaire et sécrétion.....	70
2.1.1.	Domaines peptidiques et interactions	70
2.1.1.	Modifications post-traductionnelles	71

2.1.2.	Oligomérisation	72
2.2.	Génétique.....	73
2.2.1.	Gène humain.....	73
2.2.2.	Maladies génétiques liées à <i>CFP</i>	73
2.2.3.	Gène et protéine chez <i>Mus musculus</i>	74
2.3.	Fonction dans la voie alterne du système du complément	75
2.3.1.	La stabilisation des C3 et C5 convertases de la voie alterne du complément	75
2.3.2.	La reconnaissance de motifs moléculaires	75
2.4.	Objectifs du projet de thèse	78
MATERIELS, METHODES & Résultats		79
I.	Le rôle des cellules Natural killer et du récepteur Ncr1 dans la SLA	79
II.	Le rôle de properdine dans la SLA.....	111
1.	Matériels et méthodes.....	111
1.1.	Création du double mutant souris <i>SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}</i>	111
1.2.	Analyses histologiques	112
1.2.1.	Anticorps primaires	112
1.2.2.	Anticorps secondaires.....	112
1.2.3.	Quantifications	112
2.	Résultats	113
2.1.	La properdine s'accumule progressivement dans la moelle épinière de souris SLA et colocalise avec des déterminants pathologiques spécifiques.....	113
2.2.	La properdine colocalise avec des déterminants pathologiques et pourrait participer à leur élimination par la microglie.....	113
2.3.	La properdine ne semble pas jouer un rôle déterminant sur les caractéristiques tardives de la SLA.....	120
Discussion		123
I.	Le rôle des cellules Natural killer et du récepteur NCR1 dans la SLA	123
II.	Le rôle de properdine dans la SLA.....	124
1.	La properdine s'accumule dans la corne ventrale des souris <i>SOD1^{G93A}</i> au cours de la pathologie.....	124
2.	La properdine colocalise avec des pathogènes spécifiques dans la moelle épinière de souris modèle SLA.....	125
2.1.	La properdine et les agrégats de mSOD1	125
2.2.	La properdine et les astrocytes en dégénérescence.....	126
Publications ANNEXES.....		128
I.	Revue de la littérature : « How Degeneration of Cells Surrounding Motoneurons Contributes to Amyotrophic Lateral Sclerosis » - Crabé et al., 2020	128
II.	Article « Cytotoxic CD8 + T lymphocytes expressing ALS-causing SOD1 mutant selectively trigger death of spinal motoneurons » - Coque et al., 2019.....	147

Références bibliographiques 154

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 « : Chronologie de la découverte des gènes causatifs de la SLA » : page 19
- Figure 2 « Représentation schématique du continuum génétique SLA-DFT » : page 23
- Figure 3 « Chronologie des évènements pathologiques chez la souris *SOD1^{G93A}* » : page 26
- Figure 4 « Organisation du système moteur volontaire » : page 28
- Figure 5 « Les acteurs du réflexe myotatique et des unités motrices α dans la moelle épinière » : page 29
- Figure 6 « Les voies des récepteurs de morts mises en jeu dans l'induction de l'apoptose des motoneurons mutants SLA » : page 34
- Figure 7 « Etapes de différenciation des cellules sanguines dérivées des cellules souches hématopoïétiques » : page 36
- Figure 8 « Les grandes étapes de la phagocytose » : page 40
- Figure 9 « Les trois voies du système du complément » : page 44
- Figure 10 « La toxicité microgliale M1 envers le motoneurone dans la SLA » : page 56
- Figure 11 « Facteurs déterminants dans l'induction de la microglie associée à la maladie (DAM) » : page 57
- Figure 12 « Figure 12 : La toxicité astrocytaire dans la SLA et l'influence de la microglie M1 sur ce phénotype délétère » : page 62
- Figure 13 « Les étapes de maturation des cellules NK chez la souris et les marqueurs de surfaces associés, du stade de précurseur pré-NKP au stade complètement mature F » : page 65
- Figure 14 « La balance inhibitrice/activatrice des fonctions effectrices de la cellule NK » : page 66
- Figure 15 « Voie de signalisation canonique du récepteur NCR1 (NKp46) impliquée dans l'activation de la cellule NK » : page 68
- Figure 16 « Schématisation de l'organisation du gène *CFP* et du monomère de properdine qui en découle » : page 73
- Figure 17 « Schématisation de l'organisation du gène *Cfp* et du monomère de properdine qui en découle » : page 74
- Figure 18 « Les différentes voies d'action de la properdine » : page 77
- Figure 19 « Immunohistofluorescence montrant la localisation différentielle de la properdine (marquage rouge) dans la moelle épinière de souris *SOD1G93A* symptomatique (140j) » : page 78
- Figure 20 « Schématisation de l'organisation du gène *Cfp* chez la souris *Cfp^{-/-}* » : page 111
- Figure 21 « La properdine s'accumule principalement dans la corne ventrale de la moelle épinière de souris modèle SLA *SOD1^{G93A}* » : page 113
- Figure 22 « Properdine colocalise avec les gros agrégats de mSOD1 et avec la microglie / macrophage CD45+ » : page 114
- Figure 23 « Properdine s'accumule progressivement dans la corne ventrale de la moelle épinière (ME) à partir du début des symptômes cliniques » : page 115
- Figure 24 « Les amas de properdine sont internalisés par des macrophages / microglies phagocytaires CD45+ et CD68+ » : page 116
- Figure 25 « Properdine colocalise avec des cellules apoptotiques Gfap+ dans la moelle épinière de souris *SOD1^{G93A}* » : page 118
- Figure 26 « Properdine colocalise avec des astrocytes en dégénérescence, également internalisés par la microglie / macrophage CD45+ dans la moelle épinière de souris *SOD1^{G93A}* » : page 119
- Figure 27 « L'absence de properdine n'a pas d'impact sur la survie des motoneurons chez les souris *SOD1^{G93A}* à un stade symptomatique » : page 120
- Figure 28 « L'absence de properdine n'a pas d'effet sur le nombre de cellules gliales présentes dans la corne ventrale des souris *SOD1G93A* symptomatiques » : page 121

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 « Les voies motrices descendantes » : page 27
- Tableau 2 « Liste des récepteurs de phagocytose membranaires humains les plus étudiés » : page 38
- Tableau 3 « Récapitulatif des modulations du système du complément observées chez le patient SLA et chez les modèles de souris SLA » : page 47
- Tableau 4 « Principaux récepteurs de phagocytose exprimés par les cellules microgliales » : page 54
- Tableau 5 « Liste des sources connues de properdine » : page 71
- Tableau 6 « Fonctions et interactions moléculaires attribuées aux domaines protéiques et motifs d'acides aminés présents dans un monomère de properdine » : page 72

ABRÉVIATIONS

AAV2 : virus adéno-associés 2	GM-CSF : Facteur de stimulation de colonie des granulocytes et macrophages
Aba : Astrocyte aberrant	GTPase : Hydrolase de la guanosine triphosphate
AbGC : Cellule aberrante Gfap positive	Hb9 : Gène homéobox 9
ADN : Acide désoxyribonucléique	ICT : Irradiation corporelle totale
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	IFN- γ : Interféron- γ
ALSFSRS-R : Critères révisés de l'échelle d'évaluation fonctionnelle de la sclérose latérale amyotrophique	IGF-1 : Facteur de croissance de type insuline 1
AMPA : Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique	IgG : Immunoglobuline de type G
APP : Protéine précurseur de l'amyloïde β	IL-12 : Interleukine 12
ARN : Acide ribonucléique	ILC : Cellule lymphoïde innée
ARNm : Acide ribonucléique messenger	iNOS : Isoforme inductible de la synthase de monoxyde d'azote
ARNsi : Petit acide ribonucléique interférant	JNK : Kinase N-terminale de c-Jun
ASK1 : Kinase de régulation du signal apoptotique 1	JNM : Jonction neuromusculaire
ATP : Adénosine trisphosphate	Kb : kilo-base
A β : Amyloïde β	KIF5A : Membre 5A de la famille des kinésines
BCR : Récepteur des cellules B	LCR : Liquide céphalo-rachidien
BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau	LIGHT : Membre 14 des facteur de nécrose tumorale
BHE : Barrière hémato-encéphalique	LPS : Lipopolysaccharides
BMAA : Cyanotoxine β -N-méthylamino-L-alanine	LT- β R : récepteur de la lymphotoxine β
C9ORF72 : Cadre de lecture ouvert 72 du chromosome 9	MAC : Complexe d'attaque membranaire
CCL2 : Chimiokine ligand 2	MAPK : Kinase des protéines associées aux microtubules
ChAT : Choline acétyltransférase	MASP-1 /MASP-2 : Sérines protéases associées aux lectines de liaison au mannose -1 /-2
Cl casp-3 : Forme clivée de la caspase-3	MBL : lectines de liaison au mannose
CLP : Progéniteur lymphoïde commun	MCP : protéine cofacteur de membrane
CMP : Progéniteur myéloïde commun	mCRP : protéines membranaires régulatrices du complément
CPA : Cellule présentatrice d'antigène	CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CSF-1 : Facteur de stimulation de colonie 1	MN : Motoneurone
CSF1R : Récepteur au facteur de stimulation de colonie 1	mSOD1 : SOD1 mutante
Cx43 : Connexine 43	NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
DAF : Facteur accélérateur de dégradation	Ncr1 : Récepteur de cytotoxicité naturelle 1
DAM : Microglie associée à la maladie	NGF : Facteur de croissance nerveuse
DAMP : Motifs moléculaires associés aux lésions	NK : Natural Killer
Daxx : Protéine associée au domaine de mort 6	NMDA : N-méthyl-D-aspartate
DFT : Démence fronto-temporale	nNOS : Synthase de monoxyde d'azote neuronale
EAAT1/EAAT2 : Transporteur d'acide aminé excitateur 1 / 2	NO : Monoxyde d'azote
EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale	NTF : Facteur neurotrophique
EMG : Electromyogramme	p75 ^{NTR} : récepteur de faible affinité à la neurotrophine
FADD : Domaine de mort associé à Fas	PAMP : motifs moléculaires associés aux pathogènes
FasL : Ligand de Fas	Prop : Properdine
FITC : Fluorescéine isothiocyanate	PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs
fMLP : N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine	qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative
FUS : Protéine de liaison à l'ARN FUS	RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
GABA : Acide γ - aminobutyrique	RNAse : Ribonucléase
GAGs : Glycosaminoglycanes	ROS : Espèce réactive oxygène (ou radicaux libres)
GFAP : Protéine acide fibrillaire gliale	SIRP α : Protéine de régulation de signal α
GFP : Protéine fluorescente verte	
GLUT-1 : Transporteur au glucose 1	

SLA : Sclérose latérale amyotrophique
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
SOA : sondes oligonucléotidiques anti-sens
SOD1 : Superoxyde dismutase 1
TARDBP : Protéine de liaison à l'ADN TAR
TARF3 : Facteur associé au récepteur de TNF 3
TCR : Récepteur des cellules T
TDP-43 : Protéine de liaison à l'ADN TAR 43
TGF- β : Facteur de croissance transformant β
TLR : Récepteur de type Toll
TNF α : Facteur de nécrose tumorale α
TRADD : Domaine de mort associé au récepteur du TNF
TREM2 : Récepteur activateur exprimé par les cellules myéloïdes 2
TRIF : Adaptateur inducteur d'interféron β contenant un domaine TIR
TrkA : Kinase A des récepteurs à la tropomyosine

TrkB : Kinase B des récepteurs à la tropomyosine
TSR : Séquence de répétition thrombospondine type I
TYROBP : Transmembrane Immune Signaling Adaptor
WXXW : Tryptophane – Acide aminé variable – Acide aminé variable – Tryptophane
YFP : Protéine fluorescente jaune

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été effectuée entre octobre 2017 et septembre 2021 sous la direction du Dr Cédric Raoul, chef de l'équipe « Maladie du motoneurone : neuroinflammation et thérapies » à l'Institut des Neurosciences de Montpellier. Ces travaux sont rattachés à l'école doctorale CBS2 et à l'Université de Montpellier. Ils ont été financés par le Ministère de l'Éducation Supérieure et de la Recherche ainsi que par l'Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique.

INTRODUCTION

I. La Sclérose latérale amyotrophique, une maladie du motoneurone

Aussi appelée maladie de Charcot, maladie de Lou Gehrig ou encore maladie du motoneurone, la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie dévastatrice et à ce jour incurable. La recherche sur la SLA est un domaine très actif, en France et dans le monde, motivé par le désir de rallonger et d'améliorer la qualité de la vie des patients. La base de données Pubmed montre ainsi qu'au cours de l'année 2020, plus de 2600 publications concernent la SLA.

1. Introduction générale à la SLA

La SLA est une maladie neurodégénérative rare et fatale, qualifiée de maladie du neurone moteur (motoneurone) de l'adulte. Cette maladie progresse rapidement vers une paralysie généralisée, induite par la mort des motoneurones supérieurs et inférieurs.

1.1. Histoire de la SLA

La SLA a été caractérisée pour la première fois par le neurologue français Jean-Martin Charcot en 1869 (Jay, 2000). La dégénérescence des axones moteurs descendants dans la moelle épinière, appelés axones cortico-spinaux, confère un aspect rigide et cicatriciel au tissu nerveux, ainsi qualifié de scléreux. Le terme amyotrophie réfère quant à lui à l'une des répercussions les plus visibles de la maladie : la diminution drastique du volume musculaire, conséquence directe de sa dénervation.

1.2. Épidémiologie de la SLA

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, une maladie est qualifiée de rare lorsque sa prévalence est inférieure à 1/2000 personnes. Les données sur le nombre de personnes atteintes de la SLA en France varient entre 6000 et 7000, ce qui en fait la maladie rare la moins rare. Les estimations épidémiologiques disponibles en France font état d'une incidence d'environ 2,72/100 000 personnes par an (Kab et al., 2017), représentant des statistiques assez homogènes avec les données disponibles au niveau mondial (Chiò et al., 2013).

La SLA est une maladie de l'adulte en milieu de vie et apparaît typiquement entre 55 et 65 ans (Traxinger et al., 2013). Le sexe ratio homme/femme en France est estimé à ~1,53, ce qui est en accord avec les données sur le reste des cas de SLA dans le monde, à l'exception du continent africain où ce ratio peut atteindre 2,9 dans certaines régions (Longinetti & Fang, 2019 ; Luna et al., 2019).

Il semblerait donc qu'à l'exception de foyers très localisés, la SLA présente des caractères épidémiologiques assez homogènes : c'est une maladie rare de l'adulte, touchant légèrement plus d'homme que de femmes dans le monde.

1.3. Étiologie de la SLA

Bien que la SLA se manifeste par des symptômes assez stéréotypés entre les patients, il est clair que les perturbations à l'origine de la pathologie sont de sources multiples, ce qui rend la recherche pour une thérapie universelle difficile. L'origine génétique concerne une part non-négligeable des patients. Des sources vraisemblablement environnementales ont également été reportées concernant des populations d'individus très spécifiques.

1.3.1. Génétique de la SLA

Les formes familiales, c'est-à-dire présentant une hérédité, concernent environ 10% des patients. Les cas qui n'ont pas encore à ce jour présenté d'hérédité sont appelés sporadiques et représentent donc la majorité des cas de SLA. Les mutations génétiques à l'origine d'environ 66% des formes familiales et 10 à 23% des cas sporadiques ont été identifiés (Renton et al., 2014). En moins de 30 ans, plus de 25 gènes ont été identifiés chez les patients SLA, notamment grâce à l'apparition des nouvelles technologies d'étude pangénomique (Marangi & Traynor, 2015). La dernière découverte, sur le gène *KIF5A*, date de 2019 (Nicolas et al., 2019) (Figure 1). Il est admis que les formes familiales et sporadiques de la maladie sont cliniquement indissociables. Il existe cependant des nuances dans la pathologie qui sont attribuées à certains variants génétiques, comme le variant A4V du gène *SOD1*, associé à une espérance de vie plus courte (Millecamps et al., 2010 ; Cudkowicz et al., 1997).

Comme vous pouvez le voir sur la figure 1, les mutations identifiées comme causatives de la SLA sont localisées sur des gènes impliqués dans 3 grands systèmes cellulaires : (1) l'homéostasie protéique (2) l'homéostasie des ARN (Gray & Woulfe, 2013) (3) la dynamique du cytosquelette. Les mutations les plus fréquentes chez les patients atteints de SLA familiale sont localisées au niveau du gène *C9ORF72* (~35-40%) et consistent en une expansion de répétitions hexanucléotidiques dans une zone intronique (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Par ordre de fréquence, les gènes les plus représentés dans les cas de SLA familiales sont les gènes *SOD1* (~15 %), *TARDBP* (~ 5%) et *FUS* (~5 %) (Rosen et al., 1993 ; Kabashi et al., 2008 ; Kwiatkowski et al., 2009). De manière intéressante, les mutations de ces 4 gènes induisent la formation d'inclusions cellulaires par agrégation protéique. Dans le cas de la protéine TDP-43, produit d'expression du gène *TARDBP*, les inclusions protéiques sont retrouvées dans les tissus de 95% des patients SLA, qu'ils soient mutés ou non au niveau du gène *TARDBP*, et qu'ils soient de formes familiales ou sporadiques (Neumann et al., 2006 ; Tan et al., 2007 ; Chen et al., 2016). C'est également le cas des inclusions de protéines *SOD1*, de façon toutefois beaucoup moins fréquente.

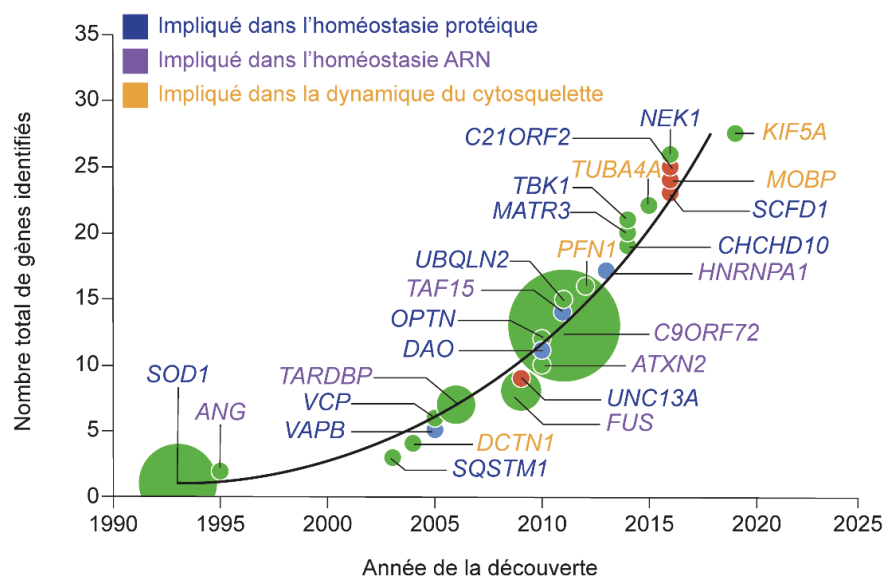


Figure 1 : Chronologie de la découverte des gènes causatifs de la SLA, depuis la découverte du gène *SOD1* en 1993. Chaque gène est représenté par un cercle. La taille des cercles représente la proportion du gène retrouvée dans le total de cas de SLA familiales. Les cercles verts correspondent aux gènes mutants identifiés dans les formes de SLA familiale et sporadique. Les cercles rouges correspondent aux gènes exclusivement identifiés dans des cas de SLA sporadique. Les cercles bleus indiquent les gènes jusqu'ici retrouvés exclusivement dans des cas de SLA familiale. Les rôles liés aux gènes représentés sont liés à 3 grandes fonctions cellulaires. D'après Brown & Al-Chalabi, 2017.

- Les variants du gène *SOD1*

Les premières mutations causatives de la SLA ont été identifiées sur le gène *SOD1* en 1993 (Rosen et al., 1993). Trente ans plus tard, près de 200 mutations du gène *SOD1* ont été répertoriées et identifiées comme possiblement pathogènes (Bernard et al., 2020). Les mutations de ce gène sont pour la plupart à transmission autosomique dominante, avec une forte pénétrance, et comptent ainsi parmi les plus fréquentes chez les patients SLA : elles représentent 12 à 20% des formes héréditaires et 1 à 2% des formes sporadiques (Millecamps et al., 2010).

La protéine encodée par ce gène est la Cu/Zn superoxyde dismutase 1 (SOD1), une métallo-enzyme ubiquitaire. A l'état physiologique, SOD1 est présente dans le cytosol et dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie sous la forme d'homodimère. L'absence de zinc et de cuivre au niveau de la protéine favorise son maintien à l'état monomérique, sa forme la moins stable (Hörnberg et al., 2007). Elle a pour fonction d'éliminer les radicaux libres (ROS), générés notamment par la chaîne respiratoire, en transformant deux anions superoxyde et deux ions hydrogène en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (McCord & Fridovich, 1969).

La toxicité des protéines SOD1 mutantes (mSOD1) envers le motoneurone dans la SLA est au cœur de beaucoup d'études. Dans la SLA, la toxicité liée à SOD1 ne semble pas être le fruit d'une perte de fonction, mais plutôt d'un gain de fonction toxique. En effet, aucune corrélation n'a pu être établie entre la sévérité de la maladie et l'activité enzymatique de mSOD1 (Cleveland et al., 1995). De plus, l'ablation du gène *Sod1* chez la souris n'induit pas de pathologie assimilable à la SLA, alors que l'expression transgénique du gène *SOD1* muté humain chez la souris génère un ensemble de symptômes très proches de ceux observés chez les patients SLA (Gurney et al., 1994 ; Reaume et al., 1996).

Comme TDP-43, cette protéine a une forte propension à perdre sa conformation tertiaire pour adopter des conformations de basse énergie dans certaines conditions environnementales, même sous sa forme native non mutée, notamment lorsqu'elle interagit avec d'autres protéines mal conformées (Ezzi et al., 2007 ; Pokrishevsky et al., 2012 ; Pace et al., 2018). Les monomères de SOD1 mal conformés ont par la suite tendance à s'agréger et peuvent former des fibres de type amyloïde, comme observées avec d'autres protéines dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Wang et al., 2002 ; Wang et al., 2008 ; Ivanova et al., 2014 ; Lang et al., 2015). Les mutants SOD1 sont toxiques pour le motoneurone, particulièrement sous une forme trimérique, et ont également un impact délétère sur les cellules environnantes telles que la microglie (Zhu et al., 2018 ; Roberts et al., 2013). Enfin, la protéine mSOD1 peut être transmise de cellule à cellule par transport vésiculaire ou en étant directement sécrétée dans l'espace extracellulaire (Silverman et al., 2016 ; Grad et al., 2014). Ces observations sur la transmission de la protéine mSOD1 et de son effet possible sur la SOD1 native sous-entendent l'existence d'un possible mécanisme de diffusion de type prion dans la SLA (Münch et al., 2011).

1.3.2. Les causes environnementales de SLA

L'implication de la cyanotoxine β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) dans le développement de SLA remonte à des études de 1987 faites sur l'île de Guam (Spencer et al., 1987). C'est le premier exemple rapporté de SLA environnementale, et cette toxine a également été mise en cause dans d'autres régions du globe comme dans le cas de vétérans américains ayant servi en Irak (Cox et al., 2009). Les études *in vitro* sur la toxicité de la BMAA suggèrent qu'elle induirait notamment une activation trop intense des récepteurs au neurotransmetteur exciteur glutamate au niveau neuronal et glial. Ce phénomène, appelé excitotoxicité, induit une hausse du calcium intracellulaire au niveau neuronal, et l'activation de voies de mort (Chiu et al., 2012 ; Chiu et al., 2013a).

L'exposition aux métaux lourds, le tabagisme, l'exercice physique régulier trop intense ont également été suggérés comme facteurs de risque dans la SLA, mais la rapidité de progression de la maladie rend l'étude de ces facteurs environnementaux difficile (Brown et Al-Chalabi, 2017).

D'autres foyers de populations très spécifiques sont concernés par une incidence de SLA plus élevée que la moyenne et suggèrent l'implication de facteurs environnementaux. Ainsi, le risque aux Etats-Unis de développer une SLA est plus élevé chez les hommes ayant effectué leur service militaire (Weisskopf et al., 2005) ou bien chez les athlètes professionnels susceptibles d'être exposés à des traumatismes crâniens répétés, comme c'est le cas pour les joueurs de football américain, de football, de hockey sur glace, de rugby ainsi que chez les boxeurs (McKee et al., 2015). Bien que les pistes pouvant expliquer ces cas de SLA soient nombreuses, les mécanismes sous-jacents ne sont pour autant toujours pas clairement identifiés.

2. Clinique de la SLA

La SLA est souvent difficile à distinguer d'autres maladies du motoneurone telles que la sclérose latérale primaire, qui implique une dégénérescence des motoneurons supérieurs uniquement, ou l'atrophie musculaire progressive, qui touche essentiellement les motoneurons inférieurs (Brown & Al-Chalabi, 2017). La confirmation d'un diagnostic SLA survient généralement tard dans la maladie, environ 12 mois, notamment en l'absence de précédents familiaux ou de la détection de l'expression d'un variant pathogène connu. L'état avancé de la maladie à l'établissement du diagnostic est l'une des raisons pour lesquelles il est très difficile de développer un traitement curatif et pourquoi il est crucial d'identifier des biomarqueurs précoces de la SLA.

2.1. Symptômes cliniques

Principalement deux formes de SLA existent, déterminées par la première région du SNC atteinte : (1) Les formes bulbaires, où les motoneurons du tronc cérébral dégénèrent en premier (2) Les formes spinales, où les motoneurons de la moelle épinière sont les premiers touchés et qui concerne environ deux tiers des patients.

2.1.1. Symptômes physiques

Les troubles moteurs et la faiblesse musculaire font partis des premiers symptômes de la maladie. En fonction des formes de SLA, les signes peuvent être plutôt concentrés au niveau : (1) des muscles faciaux pour les formes bulbaires, pouvant aller des troubles de la parole aux problèmes respiratoires ou de déglutition (2) des muscles des membres pour les formes spinales, pouvant induire des crampes ou des chutes.

Quelle que soit la forme d'apparition, la maladie finit par se répandre tout le long de l'axe cranio-caudal et les symptômes s'uniformisent. Parmi les symptômes musculaires les plus répandus se trouvent les fasciculations (la contraction et le relâchement involontaires du muscle), la fatigabilité puis l'atrophie, signes de la perte d'innervation par les motoneurons. La spasticité est définie comme une violente contraction involontaire d'un muscle qui subit une hypertonie prolongée. Cet autre dysfonctionnement observé chez les patients SLA est un symptôme invalidant et la source de douleurs. Il a longtemps été postulé que la spasticité est le résultat d'une perte d'inhibition par les motoneurons corticaux. De récentes études ont en fait démontré que ce symptôme est causé par la dégénérescence d'interneurones sérotoninergiques faisant synapse au niveau des motoneurons (El Oussini et al., 2017). Enfin, les patients SLA peuvent être sujets à des fibrillations du muscle de la langue, qui se contracte involontairement et prend un aspect en « sillons » (visible dans la figure 2 de Brown & Al-Chalabi, 2017).

L'évolution de la maladie vers un stade avancé s'accompagne d'une paralysie qui se généralise peu à peu et s'achève, dans la plupart des cas, à la suite d'une détresse respiratoire liée à la perte d'innervation au niveau du diaphragme (Gil et al., 2008). Certains muscles, ainsi que les motoneurons qui les innervent, sont épargnés jusqu'à un stade très avancé de la pathologie : le muscle extra-oculaire et les muscles contrôlant les sphincters.

La perte de poids est un autre symptôme majeur dans la SLA. Elle débute généralement avant les premières manifestations motrices de la maladie chez les patients atteints de SLA ainsi que dans certains modèles murins de SLA. Cette perte de poids n'est pas nécessairement un effet collatéral de problèmes de déglutition, et semblerait plutôt liée à une perte d'appétit ainsi qu'à un hypermétabolisme (Funalot et al., 2009 ; Mezoian et al., 2020). Bien que la malnutrition soit associée à une espérance de vie plus courte, les dernières études concernant l'utilisation de régime hypercalorique ne montrent pas d'effet chez la grande majorité des patients testés, malgré un effet de ce régime sur la souris (Dupuis et al., 2004 ; Ludolph et al., 2020).

2.1.2. Symptômes cognitifs

Les études cliniques estiment qu'entre 15 et 20% des personnes atteintes de SLA développent des pathologies cognitives (Brown et Al-Chalabi, 2017 ; Bang et al., 2015). Un rapprochement a été fait entre certaines mutations génétiques identifiées dans la SLA et certaines mutations mises en jeu dans les démences fronto-temporales (DFT). Les DFT sont un ensemble de maladies neurodégénératives touchant le cortex frontal et/ou temporal. Elle peut se manifester chez les patients sous deux formes en fonction des structures corticales atteintes : (1) une DFT à variante comportementale (vt-DFT), avec des changements dans la personnalité et les comportements sociaux et touchant principalement les lobes frontaux (2) une DFT à aphasia primaire progressive (PPA), qui s'accompagne d'une dégradation des capacités linguistiques et touchant les lobes temporaux et parfois d'autres structures.

Les comorbidités entre SLA et DFT sont plus ou moins forte en fonction du gène atteint de sorte qu'on les décrit à présent comme les deux extrémités d'un seul spectre pathologique SLA-DFT (Figure 2) (Clark & Forman, 2006 ; Devenney et al., 2019). D'autres mutations de gènes se trouvent à l'interface entre ces deux pathologies ce qui est par exemple le cas pour le gène *C9ORF72* (DeJesus-Hernandez et al., 2011 ; Prado et al., 2015).

2.1.1. Méthode de diagnostic

Il n'existe pas d'examen clinique unique permettant le diagnostic de la SLA. L'établissement d'un tel diagnostic dépend de l'observation d'un ensemble de symptômes ainsi que de l'exclusion d'autres pathologies pouvant causer des symptômes similaires à travers différents examens. La méthode de diagnostic de la SLA suit repose sur les révisions d'Airlie House établies en 2000 à partir des critères d'El Escorial (Brooks, 1994 ; Brooks et al., 2000).

L'examen électrophysiologique est un examen complémentaire nécessaire à l'établissement du diagnostic de la SLA. L'électromyogramme (EMG) permet d'étudier l'activité électrique musculaire et de confirmer une atteinte des motoneurons inférieurs et des processus de dénervation. Cet examen est réalisé en parallèle d'une étude de la conduction nerveuse motrice, qui permet d'exclure la possibilité d'autres pathologies du nerf périphérique dont les symptômes sont proches des symptômes de la SLA (Brooks et al., 2000 ; Bouche, 2008).

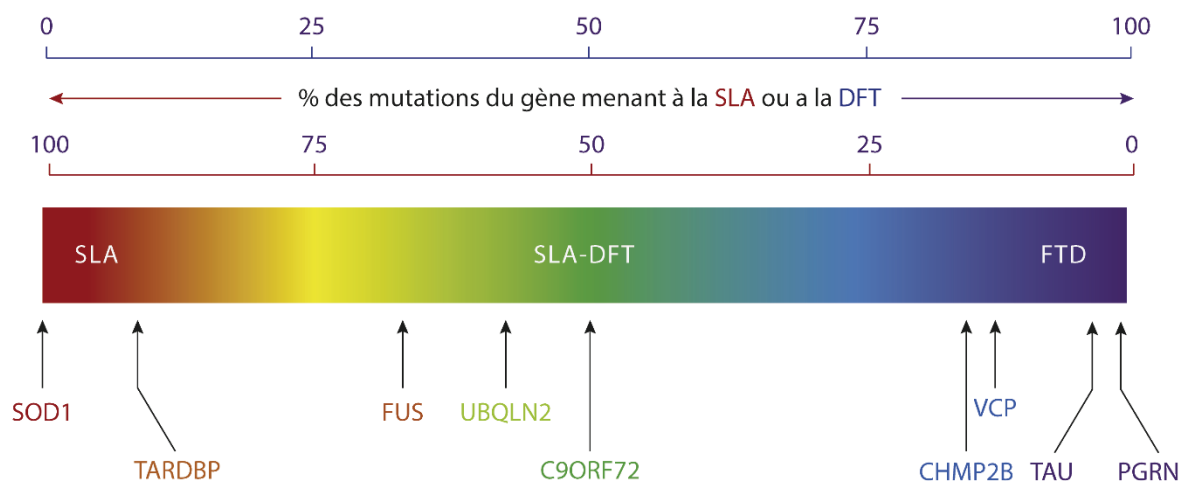


Figure 2 : Représentation schématique du continuum génétique SLA-DFT, avec quelques exemples de gènes dont les mutations peuvent être causatives d'une ou des deux pathologies. Les mutations du gène *SOD1* sont considérées comme exclusivement causatives de la SLA, alors que les mutations du gène *PGRN* (progranuline) sont exclusivement reliées à des cas de DFT. Les mutations du gène *C9ORF72* sont quant à elles réparties à part égale entre les cas de SLA et de DFT. D'après Ling et al., 2013.

2.2. Prise en charge et traitements actuels

Une fois le diagnostic établi, les performances fonctionnelles des patients sont régulièrement mesurées et classées selon les critères révisés de l'échelle d'évaluation fonctionnelle de la sclérose latérale amyotrophique (ALSFRS-R). Cette méthode de classification permet de suivre la progression de la pathologie, d'adapter les soins mais aussi d'uniformiser les cohortes d'essais cliniques (Cedarbaum et al., 1999 ; Lee & McCambridge, 2018)

La SLA est une maladie pour le moment incurable. L'accompagnement des patients et de l'entourage au cours de la maladie et dans la fin de vie est ainsi un aspect primordial de la prise en charge qui nécessite une approche multidisciplinaire (Hogden et al., 2017). L'atteinte des fonctions respiratoires est un évènement majeur dans l'avancée de la pathologie. Elle est mesurée chez les patients le plus souvent par un examen de spirométrie et le calcul de la capacité vitale forcée. Le déclin de ces fonctions impose la mise en place d'une ventilation non-invasive, consistant en un ventilateur et un masque à oxygène, plus ou moins tôt dans l'évolution de la maladie. En fonction des recommandations médicales de chaque pays et de la sévérité de la pathologie, certains patients peuvent subir une trachéotomie et être mis sous respirateur (Niedermeyer et al., 2019). Il est recommandé d'éviter d'avoir recours à cette méthode invasive et de prolongation de la vie en France dans le cas de maladie incurable comme la SLA (Adler et al., 2009).

Le nombre grandissant d'études concernant cette maladie a permis l'identification de nombreuses pistes thérapeutiques, dont la grande majorité a échoué à démontrer une efficacité au stade de l'essai clinique (Petrov et al., 2017), comme l'utilisation de la vitamine D (Trojsi et al., 2020 ; Blasco et al., 2015) ou de l'érythropoïétine (Lauria et al., 2015). Le régime hypercalorique a quant à lui montré une efficacité dans un groupe bien défini de patients présentant des formes de SLA agressive (Ludolph et al., 2020). A ce jour, quelques composés ont tout de même obtenu des autorisations de mises sur le marché et des traitements prometteurs sont en cours d'essai clinique.

En France, le seul traitement disponible est le 2-amino-6-trifluorométhoxy benzothiazole, appelé Riluzole et vendu sous le nom de Rilutek. Les mécanismes d'action du Riluzole ne sont pas complètement identifiés, mais il semblerait que cette drogue soit capable de bloquer la libération de

glutamate ainsi que de bloquer en post-synaptique l'activation des récepteurs au glutamate N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Jaiswal, 2019). Le Riluzole permet ainsi de protéger le motoneurone de l'excitotoxicité. Une première étude clinique de 1994 a montré que l'administration de cette molécule à une dose de 100 mg par jour permet de rallonger l'espérance de vie de deux à trois mois sur 12 mois de traitement, particulièrement dans les cas de forme bulbaire de SLA. Les auteurs montrent aussi un ralentissement de la dégradation des performances motrices (Bensimon et al., 1994). Plusieurs études ont depuis été effectuées concernant le Riluzole, confirmant une efficacité, modérée, et des effets secondaires réversibles et peu dangereux (Miller et al., 2012). Le Riluzole ne fait cependant toujours pas consensus et son utilisation récente dans plusieurs modèles SLA de souris n'a pas montré d'effets bénéfiques (Hogg et al., 2018).

Le traitement à la 3-méthyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, aussi appelée Edaravone et vendu commercialement sous le nom de Radicava, a récemment été approuvé pour une utilisation chez les patients SLA aux Etats-Unis et au Japon (Ito et al., 2008 ; Abe et al., 2014). Ce composé permet l'épuration des radicaux libres de l'organisme, combattant le stress oxydant, qui est également l'un des mécanismes potentiellement mis en jeu dans la pathogenèse de la SLA. L'étude clinique n'a cependant pas montré d'efficacité d'un traitement de 24 semaines à l'Edaravone sur la population globale de patients SLA comparé au traitement placebo, en termes de survie ou de score ALSFRS-R. Les analyses post-hoc de l'étude de 2014 suggèrent qu'un groupe de patients, aux critères d'inclusion bien défini, semblent retirer des bénéfices modérés de ce traitement, ce qui fut confirmé en 2017 (Abe et al., 2017). En France, il est commercialisé sous le nom de Radicut par une autorisation temporaire d'utilisation, et seul un groupe très restreint de patients entrants dans les critères d'action de cette molécule peuvent y avoir accès.

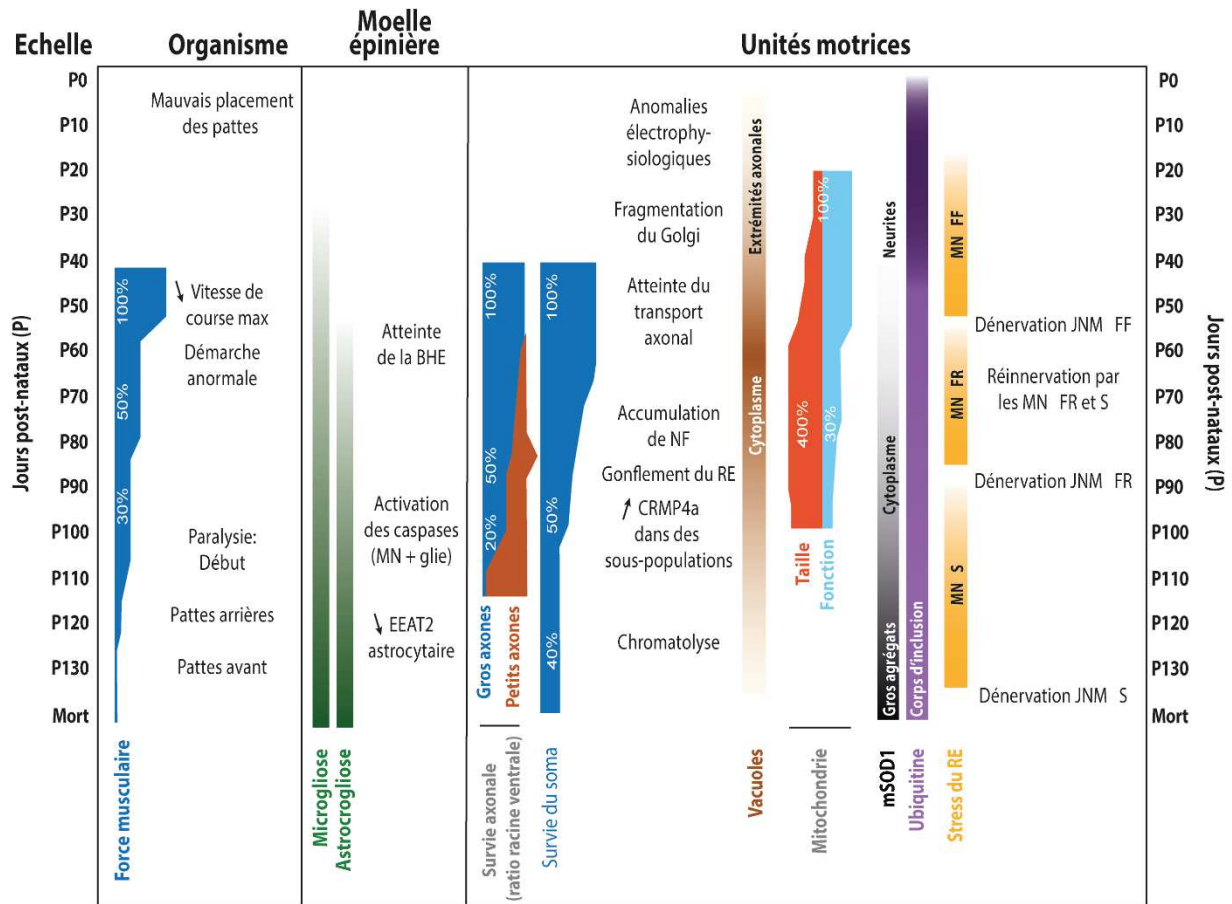
Plusieurs molécules ne sont pas encore commercialisées mais en cours de d'investigation clinique. Le Masitinib, un inhibiteur des tyrosine kinases, a par exemple montré une efficacité en complément du Riluzole dans une étude clinique de phase 2 (Mora et al., 2019). Ce double traitement permettait un ralentissement de l'atteinte fonctionnelle (ALSFRS-R) des patients traités de 27% comparé aux patients traités uniquement au Riluzole. L'émergence récente des thérapies géniques personnalisées, basées sur l'utilisation de sondes oligonucléotidiques anti-sens (SOA), représente un nouvel élan dans la recherche de traitement pour la SLA (Cappella et al., 2019 ; Abati et al., 2020). Les résultats obtenus utilisant ce type de composé dans le traitement de l'amyotrophie spinale ont par exemple abouti à une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis. Les SOA sont des inhibiteurs de l'ARNm, qui fonctionnent par hybridation grâce à leur séquence composée de paires de base complémentaires à l'ARNm cible. L'arrimage d'une SOA à l'ARNm permet d'empêcher sa traduction et de déclencher sa dégradation en activant les RNases H1. Des premières études visant à réguler l'expression de la protéine mSOD1 avaient mis en évidence un effet modéré des SOA sur les symptômes cliniques, mais une tolérance acceptable des traitements administrés par voie intrathécale (Miller et al., 2013). Les technologies plus avancées de synthèse de SOA apparues ces dernières années montrent un effet bénéfique beaucoup plus prononcé chez l'animal (McCampbell et al., 2018), que ces traitements ont un potentiel thérapeutique non négligeable pour les patients SLA, en ciblant l'ARNm mSOD1 ou mC9ORF72 (Jiang et al., 2016).

3. Le modèle SLA de souris *SOD1^{G93A}*

Un large éventail de modèles génétiques de la SLA est aujourd'hui disponible, dans des organismes simplifiés tels que le nématode, le poisson ou la drosophile mais aussi dans des modèles plus complexes tels la souris ou le rat. Le premier modèle animal fut créé à la suite de l'identification de la première mutation génétique de SLA par Rosen et collaborateurs et fut nommé G1 (aujourd'hui B6SJL-Tg(G93A-SOD1)2Gur/J) (Gurney et al., 1994). Ces souris expriment environ 18 copies d'un transgène composé du gène humain *SOD1* porteur de la mutation de substitution d'une Glycine par une Alanine en position 93. Le promoteur humain de *SOD1* est également présent et contrôle l'expression de la protéine humaine mutée. La lignée la plus caractérisée et également utilisée dans ces travaux de thèse se nomme B6SJL-Tg(G93A-SOD1)1Gur/J (initialement G1H), plus communément appelée *SOD1^{G93A}*. Elle possède un nombre de copies du transgène plus élevé que la lignée originelle, environ 25, et présente une forme accélérée et plus agressive de la maladie (Chiu et al., 1995).

Les premiers signes d'atteintes motrices dans le modèle *SOD1^{G93A}* ont été observés à 60 jours et consistent en un décalage du positionnement de la patte arrière par rapport au positionnement de la patte avant (Gerber et al., 2012). Au sein de notre laboratoire, les souris de la lignée *SOD1^{G93A}* présentent les premiers signes de paralysie musculaire vers 110 jours et ont une survie d'environ 165 jours (Coque et al., 2019 ; Soulard et al., 2020). D'un point de vue clinique, ces souris présentent un ensemble de symptômes très proches de ceux observés chez les patients SLA tels que la perte progressive de poids et de force musculaire. On note également l'apparition graduelle d'une atrophie musculaire et d'une paralysie, d'abord très localisée au niveau des membres inférieurs et qui se propage par la suite au reste du corps. Le modèle *SOD1^{G93A}* présente également de nombreuses similitudes histologiques avec les patients SLA, notamment les formes génétiques liées à des mutations du gène *SOD1*. On observe ainsi dans ce modèle (1) une dégénérescence des motoneurones, dont le nombre à un stade symptomatique avancé (140 jours) est évalué à environ 50% par rapport à une souris sauvage (2) une activation microgliale et astrocytaire (3) une infiltration immunitaire (4) une protéinopathie, avec la présence d'inclusions de protéine SOD1 agrégée dans le SNC (Picher-Martel et al., 2016) (Figure 3).

D'autres modèles de souris, basés sur l'expression de protéine humaine mSOD1, présentent des symptômes proches de ceux observés chez l'Homme, avec quelques variations observées dans chacun de ces modèles. La souris *SOD1^{G37R}* présente par exemple des déficits d'apprentissage et sensoriels en plus d'une atteinte motrice. Malgré les nombreuses similitudes entre ces modèles et le patient, la transposition de traitements efficaces chez la souris à l'homme est rarement observée, et il est important d'interpréter avec précaution les résultats obtenus à l'aide de ces modèles (Rothstein et al., 2003 ; Picher-Martel et al., 2016 ; Hogg et al., 2018).



4. Le motoneurone dans la SLA

Le système nerveux est constitué d'une variété de cellules très spécialisées, dont le neurone qui porte la fonction d'élaboration, de modulation et de conduction du message nerveux jusqu'aux effecteurs concernés. Le neurone est une cellule morphologiquement et fonctionnellement très singulière : il s'organise en un corps cellulaire, un prolongement axonal et un nombre plus ou moins élevé de prolongement dendritiques. Le neurone reçoit une multitude de signaux nerveux en provenance d'autres neurones au niveau de synapses (zone de contact) essentiellement dendritiques. Après avoir intégré les différents messages afférents, le neurone élabore ou non une réponse par la production de signaux électriques hautement régulés nommés potentiels d'actions. Les potentiels d'actions se propagent jusqu'au bout de l'axone, où le signal électrique est transformé en signal chimique via la libération de neurotransmetteurs, afin d'être transmis à travers une autre synapse au niveau des cibles du neurone.

4.1. Le système moteur

Le système moteur désigne l'ensemble des composants qui participent à la production et l'exécution des mouvements volontaires et involontaires. Les neurones à l'origine de l'initiation du mouvement, et responsables de l'acheminement de l'information jusqu'aux muscles, sont nommés neurones moteurs ou motoneurones. Le message nerveux du mouvement prend sa source au niveau du cortex moteur, composé de l'aire motrice primaire et de l'aire prémotrice, et se propage ensuite le long des voies descendantes. Les motoneurones sont divisés en motoneurones corticaux (ou supérieurs) et en motoneurones bulbaire et spinaux (ou inférieurs) et se distinguent par la localisation de leur corps cellulaire ainsi que par leurs cibles.

Les influx nerveux de mouvements involontaires sont propagés par les axones des motoneurones le long de la voie extrapyramidale. Les influx nerveux de mouvements volontaires sont conduits par les axones des motoneurones via la voie pyramidale. Les différents faisceaux composant ces voies ainsi que les actions qu'ils contrôlent sont listés dans le [tableau 1](#) et illustrés en partie dans la [figure 4](#). Au bout des voies descendantes, les axones des motoneurones corticaux font synapses avec les motoneurones spinaux, qui projettent leur axone au niveau des muscles.

Voies descendantes	Localisation MN supérieur	Localisation MN inférieur cible	Actions
Voie pyramidale (cortico-spinale) - Motricité volontaire – Contrôle fin des mouvements -			
Tractus cortico-bulbaire	Cortex moteur primaire	Noyaux des nerfs crâniens (tronc cérébral)	Commande volontaire des muscle squelettiques du visage
Tractus cortico-spinal latéral	Cortex moteur primaire	Corne ventrale de la moelle épinière	Commande volontaire des muscle squelettiques distaux
Tractus cortico-spinal antérieur (ventral)	Cortex moteur primaire	Corne ventrale de la moelle épinière	Commande volontaire des muscle squelettiques proximaux
Voie extra-pyramidale médiane - Motricité involontaire – Gestion des mouvements grossiers et du tonus musculaire -			
Tractus vestibulo-spinal	Noyau vestibulaire (tronc cérébral)	Corne ventrale de la moelle épinière	Contrôle inconscient de l'équilibre et de la tonicité musculaire
Tractus tecto-spinal	Tectum (colliculi supérieurs et inférieurs du mésencéphale)	Corne ventrale de la moelle épinière cervicale	Contrôle inconscient de la position des yeux, de la tête, du cou et des membres supérieurs en réponse aux stimuli auditifs et visuels
Tractus réticulo-spinal	Formations réticulées (tronc cérébral)	Corne ventrale de la moelle épinière	Contrôle inconscient des réflexes
Voie extra-pyramidale latérale - Motricité involontaire – Gestion des mouvements précis -			
Tractus rubro-spinal	Noyau rouge (Tronc cérébral)	Corne ventrale de la moelle épinière	Contrôle inconscient du tonus et du mouvement des muscles des membres supérieurs

Tableau 1 : Les voies motrices descendantes, peuvent être divisées en une voie pyramidale et une voie extra-pyramidale, responsables respectivement du contrôle des mouvements volontaires et involontaires des muscles squelettiques. Ces voies partent des motoneurones (MN) supérieurs, localisés dans le cortex cérébral ou le tronc cérébral, dont les axones se regroupent en différents tractus (ou faisceaux) descendants. En aval de ces voies, les MN supérieurs font relais avec les MN inférieurs, localisés dans le tronc cérébral ou la moelle épinière et qui projettent ensuite sur les muscles.

La zone de contact et d'échange d'information entre le motoneurone spinal et le muscle est une synapse particulière formée la jonction neuromusculaire (JNM) appartenant au motoneurone et la plaque motrice au niveau musculaire.

Le muscle est l'effecteur final de la commande motrice. Il est constitué de cellules musculaires multinuclées, appelées myocytes ou fibres musculaires. Les fibres musculaires dites extrafusales, qui forment la majeure partie des fibres musculaires contractiles, sont responsables de la réalisation du mouvement en se contractant (Figure 4). Au cœur du muscle se trouve le fuseau neuromusculaire, une capsule de collagène encerclant les fibres musculaires intrafusales. Ces fibres ont également une capacité contractile et permettent de transmettre des informations sur la position et l'état d'étirement du muscle lors de la contraction grâce à leur innervation par des neurones sensoriels.

Un motoneurone peut innerver plusieurs fibres musculaires d'un même muscle. Cet ensemble est appelé l'unité motrice. A l'inverse, une fibre musculaire adulte ne peut pas être innervée par plusieurs motoneurones.

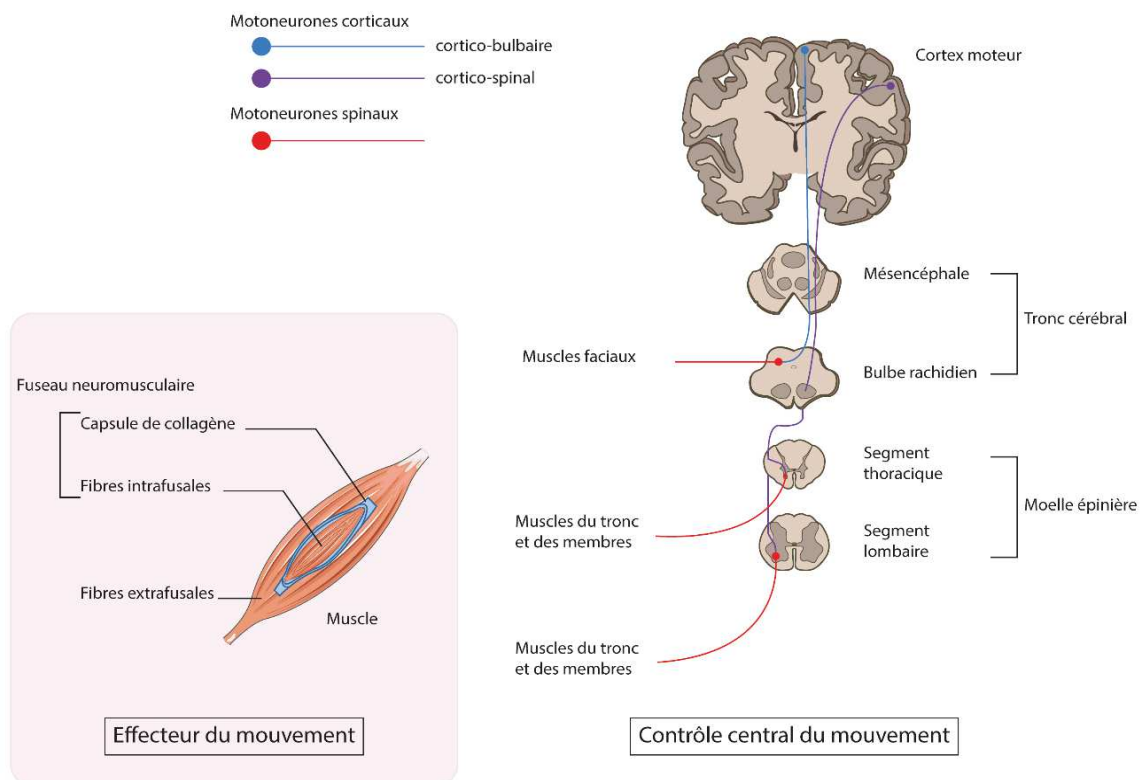


Figure 4 : Organisation du système moteur volontaire, composé d'un contrôleur central et d'effecteurs. Le contrôle central génère et module les ordres nerveux au niveau du cortex moteur et le transmet aux effecteurs via un relais motoneuronal le long des faisceaux cortico-bulbaires (bleu) et cortico-spinaux (violet). Les motoneurones spinaux (rouge) dont le corps cellulaire se trouve au niveau du tronc cérébral projettent sur les muscles faciaux. Les motoneurones spinaux dont le corps cellulaire se trouve au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière projettent sur les muscles faciaux. Le muscle effectue la contraction via les fibres extrafusales. Le maintien des informations proprioceptives lors de la contraction est assuré par le faisceau neuromusculaire, composé d'une capsule de collagène entourant les fibres intrafusales.

4.2. Le motoneurone

4.2.1. Spécificités cellulaires

Les motoneurones font partie des neurones au corps cellulaires les plus gros et possèdent un arbre dendritique très développé. Leur axone peut atteindre 1 mètre de long chez l'homme, nécessitant donc un apport énergétique important afin de maintenir son homéostasie. Chez les mammifères, les motoneurones sont des neurones cholinergiques : ils transmettent leur signal nerveux par libération d'acétylcholine au niveau de la synapse. Histologiquement, les marqueurs motoneuronaux les plus utilisés sont les facteurs de transcription Hb9, Islet-1/-2 pour les motoneurones spinaux au stade embryonnaire, et l'enzyme acétylcholine transférase (ChAT) à un stade embryonnaire plus tardif et en postnatal (Arber et al., 1999 ; Phelps et al., 1991).

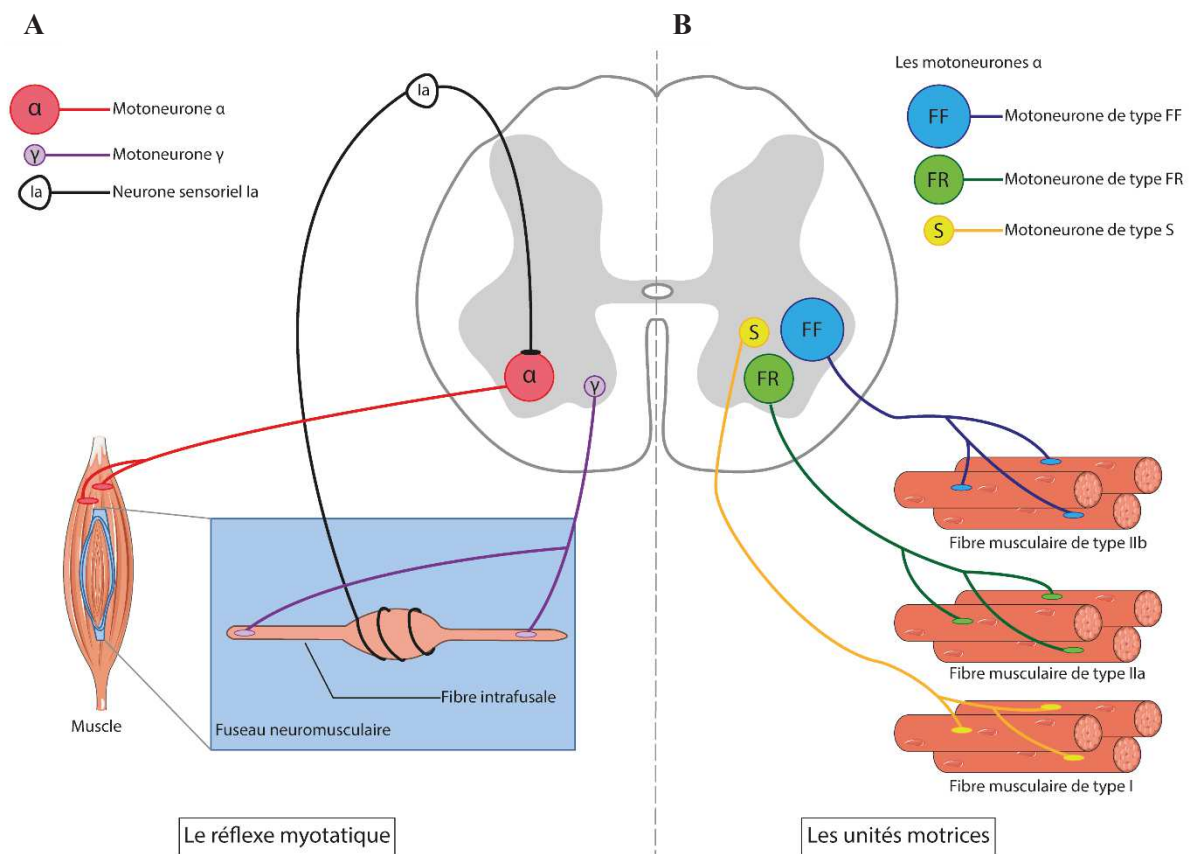


Figure 5 : Les acteurs du réflexe myotatique et des unités motrices α dans la moelle épinière. (A) Les neurones sensoriels proprioceptifs de type Ia projettent leur axone autour des fibres musculaires intrafusales, localisées dans le fuseau musculaire. Ils permettent de transmettre les informations relatives à la position et à l'étirement du muscle au SNC. Les motoneurones gamma projettent leur axone au niveau des fibres intrafusales et permettent le maintien de leur état tendu. Les neurones Ia font également synapse au niveau des motoneurones alpha, dont ils régulent l'activité. (B) Les axones des motoneurones alpha forment de multiples synapses au niveau des fibres musculaires extrafusales d'un même muscle et contrôlent leur contraction. Le motoneurone alpha et ses cibles forment ensemble l'unité motrice, qui peut être de type S, FR ou FF en fonction du type de fibre musculaire innervée.

4.2.2. Les motoneurones spinaux

Les corps cellulaires des motoneurones spinaux sont répartis sous forme de noyaux au niveau du tronc cérébral et tout le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière et forment une population hétérogène. Ils peuvent être catégorisés en trois grandes catégories selon leur rôle au niveau du muscle et du fuseau neuromusculaire : (1) Les motoneurones α innervent les fibres musculaires extrafusales et contrôlent leur contraction (2) Les motoneurones γ innervent les fibres musculaires intrafusales et permettent la continuité des signaux proprioceptifs au cours de la contraction du muscle en maintenant le fuseau neuromusculaire tendu (Figure 5) (3) Les motoneurones β innervent à la fois les fibres musculaires intrafusales et extrafusales et permettraient de moduler le signal proprioceptif au niveau du fuseau neuromusculaire. La difficulté à identifier et étudier les motoneurones β est en partie la raison pour laquelle leurs fonctions sont peu connues. Ils ne seront pas plus abordés dans la suite de cet exposé.

Les axones sensoriels présents au niveau des fibres musculaires intrafusales proviennent de neurones proprioceptifs appelés Ia, qui perçoivent l'état d'étirement du muscle via le fuseau neuromusculaire (Figures 4 et 5). Les motoneurones α reçoivent eux aussi des informations provenant des neurones sensoriels Ia. La boucle formée par les motoneurones et les fibres Ia permet le réflexe myotatique, mise en jeu lors de l'étirement d'un muscle.

4.2.3. Les motoneurones α

Les motoneurones α sont de très gros neurones qui peuvent également être subdivisés en fonction du type de fibres musculaires qu'ils innervent. La nature du métabolisme énergétique des fibres musculaires définit 3 types de fibres. Les fibres de type I sont des fibres à contraction lente et au métabolisme oxydatif (aérobie). Les fibres de types IIa sont également appelées fibres musculaires intermédiaires, et possèdent un métabolisme à la fois aérobie et anaérobie. Enfin les fibres de type IIb sont des fibres à contraction rapide, dépendant d'un métabolisme glycolytique (anaérobie). Chaque type de fibres musculaires est innervée par un type de motoneurones α distinct, formant ainsi un type d'unité motrice spécifique (Figure 5) : (1) Les motoneurones des unités motrices de type S, ou lentes résistantes à la fatigue, innervent les fibres I (2) Les motoneurones des unités motrices de type FF, ou rapides fatigables, innervent les fibres de type IIb (3) Les motoneurones participants aux unités motrices de type FR, ou rapides résistantes à la fatigue, innervent les fibres de type IIa (Burke et al., 1973). De par la nature différente de leur composant neuronal et musculaire, les unités motrices participent donc à différents types de mouvements. Les motoneurones α des unités S contrôlent ainsi les mouvements posturaux, nécessitant une contraction peu intense mais constante. A l'opposé, les motoneurones α des unités FF participent aux mouvements intenses, qui nécessitent une contraction forte mais transitoire. Les unités FR interviennent dans la production des mouvements intermédiaires, requérant une contraction moyennement forte mais maintenue dans le temps.

4.3. La dégénérescence des motoneurones dans la SLA

La SLA se différencie d'autres maladies du motoneurone par l'atteinte combinée des motoneurones spinaux et corticaux. Grâce aux modèles murins, il a été montré que les sous-populations de motoneurones spinaux présentent une vulnérabilité plus ou moins prononcée à la maladie, induisant une dégénérescence dite ordonnée des motoneurones. Les motoneurones α sont les premiers à être touchés : ceux faisant partie des unités motrices de type FF dégénèrent tôt dans la maladie, suivi des motoneurones du type FR. Les motoneurones des unités motrices de types S dégénèrent plus tard (Hegedus et al. 2008 ; Pun et al., 2006). Les motoneurones de type γ sont les derniers à dégénérer.

La façon dont meurent les motoneurones dans la SLA n'a pas toujours fait consensus. La majorité de la communauté scientifique s'accorde aujourd'hui sur un mode de dégénérescence rétrograde, c'est-à-dire débutant par un démantèlement de la jonction neuromusculaire, suivi de la dénervation du muscle puis de la dégradation de l'axone avant la mort définitive du motoneurone. Schaefer et collaborateur ont montré que les motoneurones tentent de compenser la dénervation musculaire par un processus de

pousse axonale appelé bourgeonnement. Celui-ci n'est cependant pas suffisant pour arrêter la progression de la maladie (Schaefer et al., 2005).

Tous les types de motoneurons sont atteints dans la SLA, à l'exception des motoneurons oculomoteurs des noyaux III, IV et VI du tronc cérébral et des motoneurons du noyau d'Onuf, localisés au niveau lombosacré. La vulnérabilité sélective, et plus ou moins précoce, des motoneurons partageant pourtant un même environnement avec les neurones environnants suggèrent l'influence de facteurs intrinsèques, appelés mécanismes cellule-autonome.

4.3.1. Pathologie du motoneurone dans la SLA

Chez la souris *SOD1^{G93A}*, les premiers signes de dysfonctionnement motoneuronaux sont observés dès P4 au niveau des motoneurons hypoglossaux. Ceux-ci présentent alors des anomalies électriques et sont dits hyperexcitables. Parmi les nombreuses altérations observées au niveau du motoneurone lors de l'installation et de la progression de la maladie (répertoriées de façon non exhaustive dans la **Figure 3**) on peut noter : (1) Une excitotoxicité (2) Un stress oxydatif, induit par une surcharge de radicaux libres par rapport aux capacités antioxydantes de la cellule (3) Un défaut mitochondrial, qui présentent des gonflements et des vacuoles (4) Un défaut de transport axonal, avec pour conséquence l'accumulation de matériel au niveau cytoplasmique, notamment de neurofilaments (5) Un dysfonctionnement du système protéolytique ubiquitine-protéasome et l'accumulation de protéines mSOD1 mal conformées (**Figure 3**) (Brown & Al-Chalabi, 2017 ; Nardo et al., 2013). En définitive, les différents dysfonctionnements ayant lieu au sein du motoneurone dans la SLA induisent sa mort par apoptose. Dans ce processus, aussi appelé mort cellulaire programmée, plusieurs voies de signalisation dépendantes des récepteurs de mort ont été identifiées.

- L'apoptose

De nombreuses formes de mort cellulaire ont été décrites dans la littérature. Parmi les plus courantes se trouvent la nécrose et l'apoptose, aujourd'hui placées aux extrémités d'un spectre commun de mort cellulaire partageant certains mécanismes (Zeiss, 2003). Ces deux types de mort ont pourtant longtemps été considérés comme diamétralement opposés. La nécrose est un processus subit par la cellule, incontrôlée et toxique. L'apoptose est quant à elle un processus actif et programmé. Sa fonction initiale est de se débarrasser de cellules réformées ou dysfonctionnelles de façon contrôlée afin d'éviter le déversement du contenu cellulaire, et donc de molécules endogènes pro-inflammatoires appelées « motifs moléculaires associés aux lésions » (DAMP), dans le milieu comme dans le cas de la nécrose (Savill & Fadok, 2000). Un dysfonctionnement dans l'exécution de l'apoptose ou dans l'élimination des cellules apoptotiques peut amener au développement d'une nécrose dite « secondaire ». L'apoptose fut décrite pour la première fois en 1972 (Kerr et al., 1972). Ce phénomène intervient naturellement durant le développement et tout le long de la vie pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Dans le cas d'une agression de l'organisme, l'apoptose peut également être mise en jeu, sous l'effet de la réaction immunitaire ou de dommages cellulaires trop importants.

Les cellules engagées dans ce processus adoptent une morphologie spécifique évoluent selon un schéma chronologique défini. On discerne ainsi l'apoptose précoce de l'apoptose tardive. Au stade d'apoptose précoce, les processus cellulaires se rétractent et la taille de la cellule diminue (Elmore, 2007). On observe une concentration du contenu cytoplasmique grâce à un rapprochement des organites ainsi que du noyau par condensation irréversible de la chromatine (Pycnose) (Kerr et al., 1972). À un stade plus avancé, le démantèlement du cytosquelette provoque le « bullement » ou « blebbing » de la membrane plasmique, qui forme des bulles de membrane plasmique appelées « blebs ». La séparation des « blebs » du reste de la cellule, emportant dans le même temps une petite quantité du contenu cellulaire, forme les corps apoptotiques. Les corps apoptotiques sont généralement engloutis par des cellules spécialisées par le biais d'un mécanisme biologique appelé efferocytose. L'élimination efficace et rapide des cellules en cours d'apoptose est assurée par la présentation de plusieurs étiquettes d'élimination cellulaire, telle que

l'exposition de phosphatidylsérine sur la face externe de la membrane plasmique, visant à encourager l'efferoctose (Kurosaka et al., 2003).

Il existe une variété de signaux initiateurs de l'apoptose, à l'état physiologique et pathologique, pouvant intervenir dans trois grandes voies appelées : (1) la voie intrinsèque, ou mitochondriale (2) la voie extrinsèque, ou des des récepteurs de mort, un groupe de protéines membranaires spécialisées dans l'induction de ce processus (3) la voie perforine-granzyme (pouvant être la voie Granzyme A ou Granzyme B), spécifique de l'apoptose induite par la libération de perforine-granzyme par les lymphocytes T et Natural Killer (NK). Ces voies d'activation aboutissent généralement à l'activation de cascades enzymatiques dépendantes de l'activation séquencée de protéines de la famille des caspases. Les caspases sont capables de cliver de nombreuses protéines, par exemple les protéines du cytosquelette, permettant ainsi le démantèlement de la cellule. A l'exception de la voie Granzyme A, les voies initiatrices convergent toutes vers une voie terminale appelée voie d'exécution, qui débute par l'activation de la caspase-3 par protéolyse.

- Les récepteurs de mort dans le motoneurone SLA

Parmi les récepteurs de mort dont l'activation a été mise en évidence dans le motoneurone SLA, on retrouve le récepteur Fas (Raoul et al., 2002), le récepteur de faible affinité à la neurotrophine (p75^{NTR}) (Pehar et al. 2004) et le récepteur de la lymphotoxine β (LT- β R) (Aebischer et al., 2011). Cette famille de récepteurs permet l'activation indirecte de la caspase-8 par association de leur domaine intracellulaire, appelé domaine de mort, et de molécules adaptatrices, les TRADD (*TNFR-associated death domain*) et les FADD (*Fas-associated death domain*) (Kruidering & Evan, 2000 ; Ashkenazi & Dixit, 1998) (Figure 6).

L'activation du récepteur Fas par liaison de son ligand FasL à la surface des motoneurons induit son oligomérisation et le recrutement de la procaspase-8 via l'interaction de son domaine de mort avec la protéine FADD. La procaspase-8 est alors capable de s'autoactiver et induit la libération de cytochrome c par la mitochondrie. Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome c est capable d'interagir avec la molécule Apaf-1, permettant de former l'apoptosome, nécessaire pour l'activation de la caspase-9. Une fois activée, la caspase-9 active à son tour la caspase-3, l'un des derniers acteurs dans la cascade d'induction de l'apoptose (Garrido et al., 2006). En parallèle de la voie des caspases, une voie spécifique au motoneurone est également déclenchée par le récepteur Fas, par association avec la protéine Daxx et l'activation de ASK1 (Raoul et al., 2006). L'activation de ces protéines cytoplasmiques permet l'activation par phosphorylation de la protéine kinase activée par les agents mitogènes (MAPK) p38 et l'augmentation de la production de la synthase de monoxyde d'azote (NO) neuronale (nNOS). Cette enzyme induit l'augmentation du NO intracellulaire et la production du composé toxique peroxy-nitrite (Raoul et al., 2002 ; Torrelles et al., 1999). Cette voie alternative de Fas semble être particulièrement active dans les motoneurons mutants SLA. D'un point de vue fonctionnel, l'inhibition *in vivo* de Fas par injection intrathécale continue de ARNsi (Petits acides ribonucléiques interférants) pendant 4 semaines entre 90j et 120j permet l'extension de la survie des souris *SOD1*^{G93A} ainsi que le retard de la perte des fonctions motrices (Locatelli et al., 2007).

Le récepteur principal des neurotrophine est le récepteur TrkA, qui agit avec l'aide de récepteurs auxiliaires tels que p75^{NTR}. Le récepteur p75^{NTR}, normalement uniquement exprimé par les motoneurons à un stade embryonnaire (Yan & Johnson, 1988), a été montré comme exprimé par les motoneurons mutants SLA. Il peut servir de récepteur aux neurotrophines telles que le facteur de croissance nerveuse NGF et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau BDNF, mais également aux protéines de type prion et à l'amyloïde β (A β) agrégée. Nous savons aujourd'hui qu'en l'absence de TrkA, la liaison du NGF à p75^{NTR} peut induire l'apoptose des motoneurons (Sedel et al. 1999). L'entrée dans la voie de l'apoptose passe par l'activation des kinases N-terminale de c-jun (JNK) qui d'un côté est capable d'induire la libération de cytochrome c par la mitochondrie, et de l'autre stimule l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que le gène du facteur de transcription c-jun. L'activation de p75^{NTR} induit également l'augmentation de la nNOS et sa toxicité par le peroxy-nitrite (Pehar et al., 2004).

L'inhibition de ce récepteur *in vivo* via l'utilisation de sondes oligonucléotidiques permet de repousser l'apparition des symptômes moteurs et rallonge la survie des souris *SOD1^{G93A}* (Turner et al., 2003).

LIGHT (TNFSF14) est une protéine sécrétée par plusieurs cellules du système immunitaire et intervient dans divers processus immunitaires tels que l'activation des lymphocytes T. En synergie avec l'interféron γ (IFN- γ), LIGHT peut induire l'apoptose de cellules tumorales mais aussi des motoneurones mutants SLA via son interaction avec le récepteur LT- β R (Aebischer et al., 2011). Des taux élevés de LIGHT et d'IFN- γ sont notamment observés dans la moelle épinière des patients SLA (Aebischer et al., 2012). La liaison de LIGHT à LT- β R recrute TARF3 (le facteur 3 associé au récepteur TNF) qui, à terme, serait capable d'induire la transcription de *c-Jun* ainsi que ASK1 (Rooney et al., 2000).

Les multiples altérations subies par le motoneurone dans la SLA ne semblent pourtant pas suffisantes à elles seules pour expliquer la maladie. Ainsi, l'expression de la protéine SOD1 humaine mutante *SOD1^{G37R}* restreinte aux neurones ne permet pas le développement d'une pathologie motrice (Pramatarova et al., 2001, Lino et al., 2002). De même, l'ablation de la protéine uniquement dans les motoneurones, par ablation génétique dirigée par le promoteur Islet-1 ou par injection intramusculaire d'AAV2 (Virus adéno-associé 2) délivrant des ARNsi anti-SOD1 humaine, n'est pas suffisante pour stopper la maladie dans les modèles de souris SLA (Boillée et al., 2006 ; Miller et al., 2005).

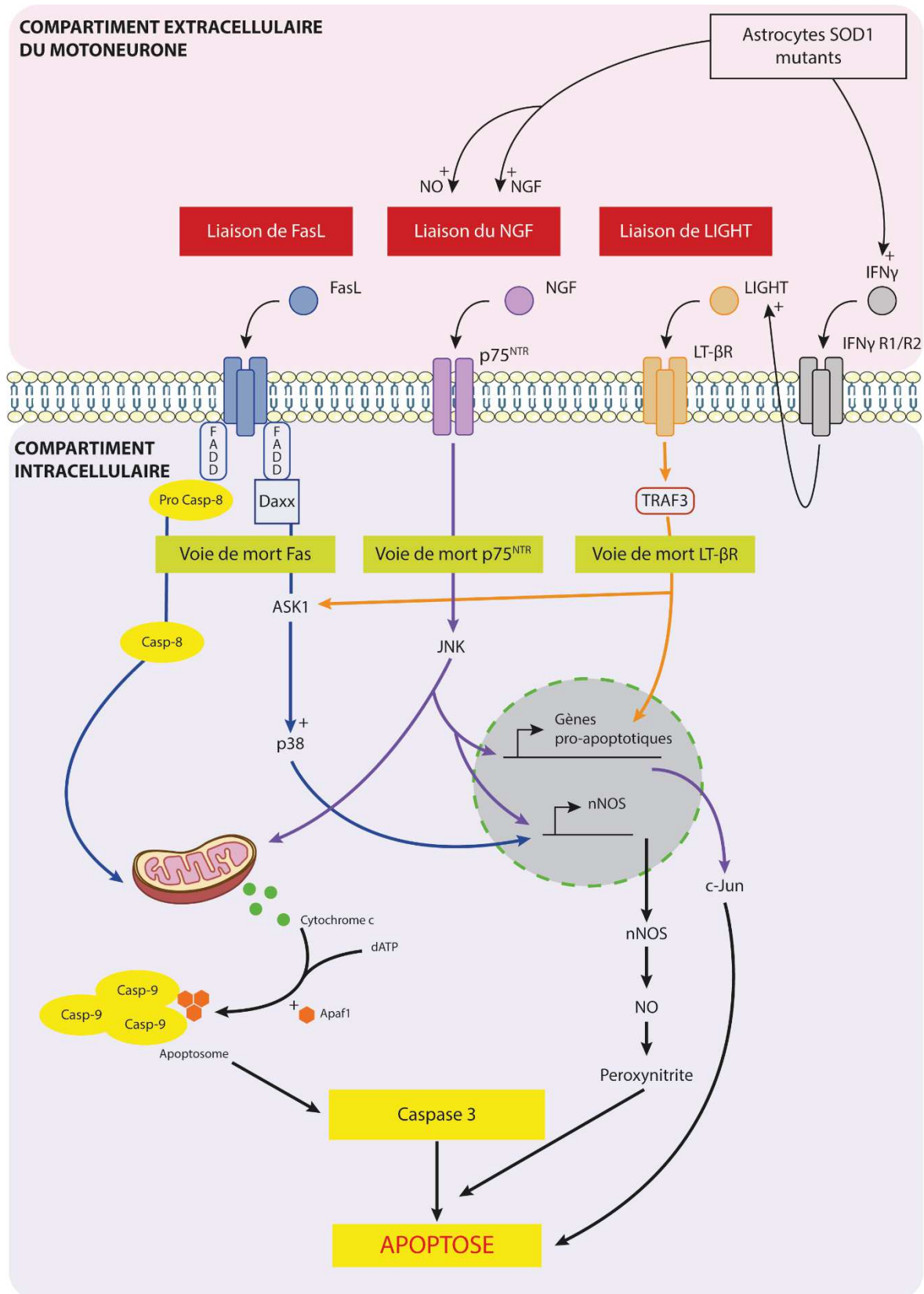


Figure 6 : Les voies des récepteurs de morts mises en jeu dans l'induction de l'apoptose des motoneurones mutants SLA. Au moins trois voies sont impliquées dans l'activation de la mort cellulaire programmée dans le motoneurone SLA, chacune représentée par un code couleur dans cette illustration. nNos = synthèse de monoxyde d'azote (NO) neuronale

II. Mécanismes non-cellules autonomes dans la SLA : rôle de l'activation immunitaire et gliale dans la neuroinflammation

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées en premier lieu par une mort cellulaire progressive, sélective ou non d'une population neuronale ou d'une région du SNC, aboutissant à des symptômes variés : Apparition d'une démence affectant la mémoire, le raisonnement et le comportement dans la maladie d'Alzheimer, altération du mouvement, avec une latence d'exécution (akinésie), des tremblements et une perte de l'équilibre, dans la maladie de Parkinson, atteinte des fonctions motrices et cognitives, avec apparition de troubles psychiatriques, dans la maladie de Huntington. D'autres particularités sont communément retrouvées dans ce type de pathologies, telles que l'agrégation protéique et l'inflammation chronique du tissu nerveux, baptisée neuroinflammation dans le cas précis des maladies neurodégénératives. La neuroinflammation dans la SLA, qui s'articule autour de la microglie activée, les astrocytes réactifs et l'infiltration de cellules immunitaires dans le SNC, est un acteur clefs dans la pathogenèse de cette maladie.

1. L'immunité dans la SLA

Le système immunitaire est un ensemble de cellules et de protéines qui ont la responsabilité de défendre l'organisme face à l'entrée de pathogènes exogènes (viraux, bactériens ou eucaryotes) ou face aux pathogènes endogènes tels que les cellules tumorales et les débris cellulaires. Son action repose notamment sur leur capacité à générer une inflammation, processus régulé permettant de reconnaître et éliminer les éléments dangereux ainsi que d'amorcer la guérison en stimulant la réparation tissulaire.

Un dysfonctionnement de ce système immunitaire hautement régulé peut amener à une immunodéficience, exposant les patients à des risques face à une infection, même bénigne. Son activation excessive ou aberrante peut également être la source de maladies auto-immunes graves telles que le lupus néphrétique au niveau du rein ou la sclérose en plaques au niveau du système nerveux.

1.1. Le système immunitaire

Les principales cellules mises en jeu dans le système immunitaire sont les leucocytes, des cellules différenciées issues des cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse (Figure 7). Elles circulent le plus souvent dans le sang et la lymphe, mais peuvent également être retrouvées dans au niveau de tissus spécifiques.

La défense immunitaire est composée de deux systèmes complémentaires appelés inné et adaptatif. Ils se différencient par leur rapidité d'action, leur spécificité de cible et par leurs effecteurs cellulaires et protéiques. Il existe cependant de nombreux ponts, tels que les anticorps, entre ces deux systèmes afin de les coordonner.

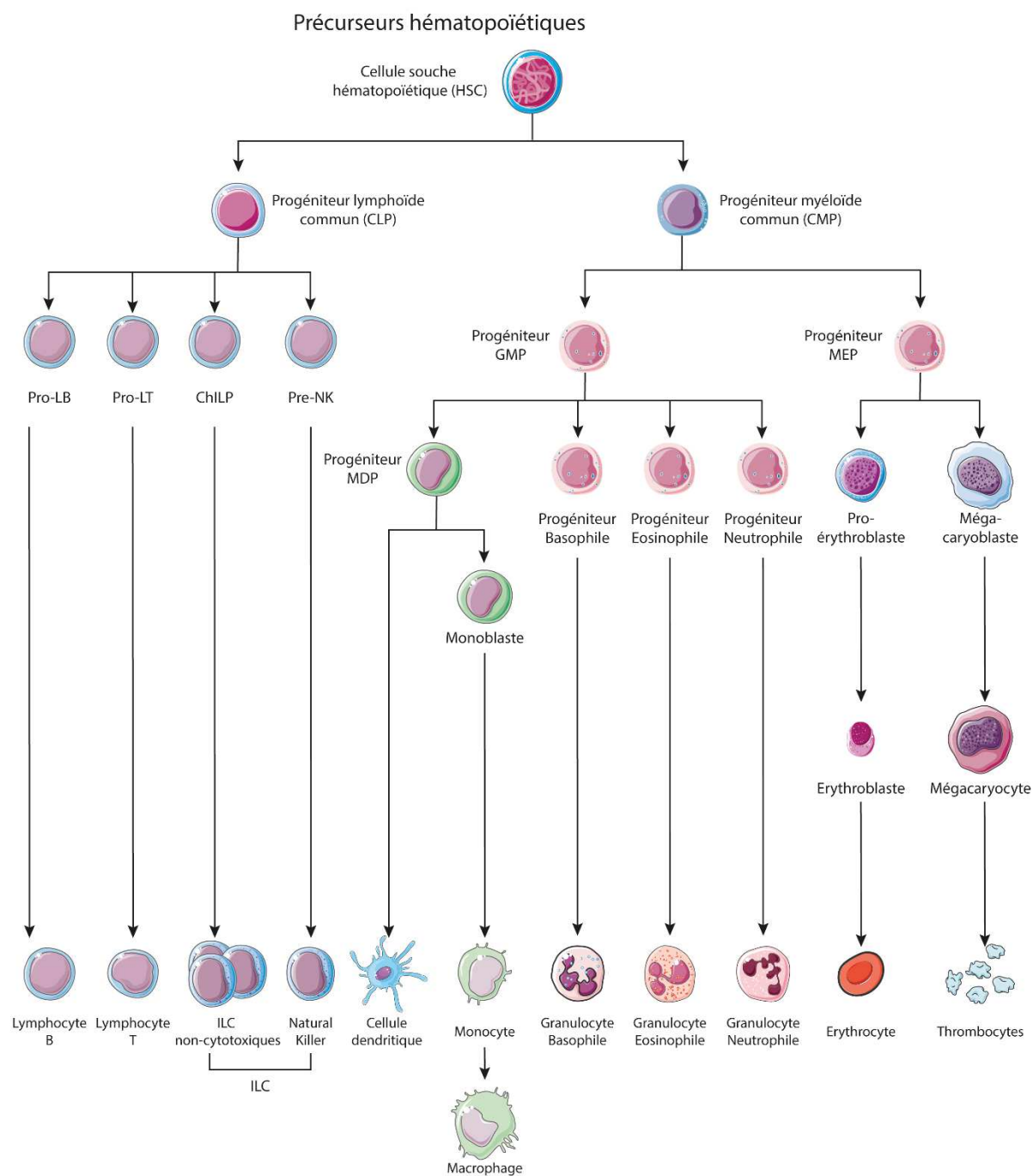


Figure 7 : Schéma simplifié des étapes de différenciation des cellules sanguines dérivées des cellules souches hématopoïétiques. Les voies principales de l'hématopoïèse sont représentées. Il est cependant important de noter qu'il existe des « ponts » mineurs entre ces voies, permettant par exemple la différenciation des CDP en cellules dendritiques. Certaines voies de différenciation spécifiques à des sous-populations de leucocytes ne sont pas représentées. Abréviations : Pro-LB = Progéniteur des lymphocytes B ; Pro-LT = Progéniteurs des lymphocytes T ; ChILP = Auxiliaire commun du précurseur des ILC ; ILC = Cellules innées lymphoïdes ; Pro-NK = Progéniteur des cellules Natural Killer ; GMP = Progéniteur des granulocytes-macrophages ; MEP = Progéniteur des mégacaryocytes-érythrocytes ; MDP = Progéniteur des monocytes-cellules dendritiques. D'après Rieger & Schroeder, 2012

1.1.1. L'immunité innée

Le système immunitaire inné est composé de cellules et facteurs circulants mobilisables immédiatement contre les pathogènes extérieurs, ce qui en fait la première ligne de défense de l'organisme en cas d'infection. Contrairement au système immunitaire adaptatif, les composants du système inné ne sont pas spécifiques d'un antigène. Le terme antigène (« anti-gén ») signifie générateur d'anticorps (aussi appelés immunoglobulines ou Ig), et fait référence aux molécules capables de déclencher une réponse immunitaire adaptative.

- Les cellules effectrices du système immunitaire inné

Les cellules du système inné sont des cellules effectrices capables de produire une réponse immunitaire rapide, ne nécessitant le plus souvent pas de signaux antigéniques. Certaines de ces cellules sont capables : (1) d'action cytotoxique, permettant d'éliminer des cibles pathogènes (2) de phagocytose (3) de recruter des cellules immunitaires sur les sites d'infection, par la production de chimiokines (4) de moduler la réponse immunitaire par la production de cytokines (5) d'activer la réponse immunitaire adaptative par la présentation d'antigènes aux lymphocytes T.

- Les granulocytes

Basophiles, neutrophiles et éosinophiles, différenciés par le contenu de leurs granules. Ils répondent rapidement aux infections et aux cellules tumorales. Ils permettent d'éliciter une forte inflammation et de faciliter l'arrivée d'autres leucocytes sur le site d'infection via la vasodilatation des vaisseaux sanguins et la production de chémokines.

- Les mastocytes

Ils sont capables de libérer rapidement des granules d'histamine et d'héparine en réponse à une infection, permettant d'initier la réponse inflammatoire et de promouvoir la cicatrisation.

- Les lymphocytes Natural Killer

Les Natural Killer (NK) sont des cellules apparentées aux cellules innées lymphoïdes ou ICL, une famille de cellules du système immunitaire inné dérivées du progéniteur lymphoïde commun (CLP) (Figure 7) mais dépourvues de récepteur antigène-spécifique. Les NK sont parfois catégorisées comme des ILC1 cytotoxiques (Ebbo et al., 2017). Elles sont en effet capables de déclencher la mort de leur cellule cible par la libération orientée du contenu de leurs granules dans la synapse immunitaire. La synapse immunitaire désigne le rapprochement physique des membranes d'un lymphocyte avec sa cible.

- La phagocytose et les phagocytes

La phagocytose est un processus biologique essentiel où une cellule armée pour effectuer cette tâche, appelée phagocyte, s'attache à une cible et l'absorbe pour s'en débarrasser. Elle représente l'une des voies utilisées par la cellule pour internaliser du matériel extracellulaire, mécanisme appelé endocytose. L'internalisation de cellules en dégénérescence, appelée efferocytose, est donc un type de phagocytose. La phagocytose est un processus hautement régulé, dépendant de la réorganisation du cytosquelette d'actine et médiée par des récepteurs permettant l'activation des Rho-GTPases (Conner & Schmid, 2003). Elle est utilisée pour l'endocytose de grosses particules (>0,5 µm), et s'est notamment spécialisée chez les organismes multicellulaires vers l'internalisation d'agents pathogènes et de cellules en dégénérescence (Aderem & Underhill, 1999 ; Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Récepteurs (autres noms d'usage)	Ligands [Organismes cibles]
Récepteurs non-opsoniques	
Dectine-1	β -glucane [Mycélium]
Mincle (ou CLEC4E)	Trehalose dimycolate [Mycobactérie]
MCL (ou CLEC4D ou Dectine-3)	Trehalose dimycolate [Mycobactérie] α -Mannan [Levures]
CD209	Glycans fucosylés / Glycans riches en mannose [Virus, champignons, bactéries]
Récepteur au mannose	Mannose
CD14	Protéine de liaison au LPS
CD68 (macrosialine)	<i>Plasmodium falciparum</i>
Récepteurs non-opsoniques	
TIM-1 (CD366)	Phosphatidylsérine
TIM-4	Phosphatidylsérine
Stabiline-2	Phosphatidylsérine
BAI-1 (ADGRB1)	Phosphatidylsérine
Intégrine α V β 3 (CD61 ou récepteur à vitronectine), en association avec MFG-E8 (Lactadhérine)	Phosphatidylsérine / Phosphatidyléthanolamine
Intégrine α V β 5, en association avec MFG-E8 (Lactadhérine)	Phosphatidylsérine
Récepteur charognard de classe B (CD36)	Lipides oxydés (ex: oxLDL) Phosphatidylsérine
CD14	Phosphatidylsérine
CD68 (macrosialine)	Phosphatidylsérine oxLDL
Récepteurs opsoniques	
Fc γ RI (CD64) / Fc γ RIIa (CD32a) / Fc γ RIIIa (CD16a)	IgG
Fc α RI (CD89)	IgA
CR1 (CD35)	MBL, C1q, C4b, C3b
CR3 (ou CD11b/CD18, Mac-1) / CR4 (ou CD11c / CD18)	iC3b
α 5 β 1 (ou CD49e/CD29)	Fibronectine Vitronectine

Tableau 2 : Liste non-exhaustive des récepteurs phagocytaires membranaires humains les plus étudiés. Abréviations : Mincle = Lectine de type C induite par les macrophages ; MCL = Lectine de type C des macrophages ; MARCO = Récepteur des macrophages à structure collagénique ; TIM-1 = Protéine membranaire 1 des cellules T ; TIM-4 = Protéine membranaire 4 des cellules T ; BAI-1 = Inhibiteur 1 de l'angiogénèse spécifique du cerveau ; MFG-E8 = Facteur de croissance épidermique 8 du globule gras du lait ; oxLDL = oxidized low-density lipoprotein. Adapté de Uribe-Querol & Rosales, 2020

La plupart des cellules sont capables d'effectuer la phagocytose, mais on distingue une classe particulière de cellules en partie dédiées à cette tâche, appelée de ce fait phagocytes « professionnels ». Cette classe de cellules rassemble les neutrophiles, les monocytes et macrophages, ainsi que les cellules dendritiques. La grande capacité phagocytaire de ces cellules est certainement liée au large éventail de récepteurs exprimés à leur surface pouvant stimuler ce phénomène (Tableau 2), tels que les récepteurs Fc (FcR) qui sont capables de lier la partie Fc (c'est-à-dire non-variable) des immunoglobulines ou encore les récepteurs charognars (« scavengers »), capables de se lier aux molécules polyanioniques telles que les lipides oxydés. Par exemple, la transfection d'ADNc de récepteurs Fc γ dans des cellules de type fibroblaste (lignée COS-1), peu phagocytiques, augmente drastiquement leur capacité de phagocytose, montrant ainsi l'importance des récepteurs membranaires dans ce processus (Indik et al., 1995). Les récepteurs de phagocytose peuvent être divisés en deux catégories : (1) les récepteurs opsoniques, qui reconnaissent les pathogènes via des protéines intermédiaires endogènes appelées opsonines, telle que le fragment C3b du complément (présenté dans la sous-partie suivante dédiée au complément) (2) les récepteurs non-opsoniques, aussi appelés récepteur de reconnaissance de motifs (ou PRR), capables d'identifier directement des motifs moléculaires à la surface du pathogène tels que le LPS, appelés PAMPs (pour « motifs moléculaires associés aux pathogènes ») (Tableau 2).

Après liaison avec leur ligand, une grande partie des récepteurs phagocytiques déclenche la phagocytose grâce à l'activation d'une enzyme clef de la famille des Src, la tyrosine kinase Syk (Tohyama & Yamamura, 2009). C'est notamment le cas des Fc γ R (Crowley et al., 1997), de CR3 et de la Dectine-1. La phagocytose et ses régulations forment un ensemble extrêmement complexe et encore partiellement inconnu. Les événements ayant lieu en amont ou en aval des récepteurs phagocytiques sont nombreux et les récepteurs eux-mêmes peuvent moduler leurs activités en s'associant entre eux. Au niveau des cellules myéloïdes par exemple (*i.e* dérivant du CMP, se référer à la figure 7), les récepteurs Mincle et MCL peuvent s'hétérodimériser pour augmenter l'efficacité de la phagocytose (Lobato-Pascual et al., 2013). Un autre exemple de coopération de ces différents récepteurs est illustré lors de la phagocytose de cibles volumineuses. La liaison du récepteur Fc γ RIIIa à un complexe anticorps-antigène à la surface d'un pathogène donné permet, via la voie Syk, l'activation de la GTPase Rap. Une fois activée, Rap peut à son tour activer le récepteur intégrine CR3 (Mac-1, CD11b/ CD18) en augmentant son affinité pour son ligand C3b, ayant opsonisé la surface du même pathogène (Jongstra-Bilen et al., 2003 ; Huang et al., 2011 ; Uribe-Querol & Rosales, 2020).

En plus des récepteurs phagocytiques, les récepteurs de type Toll (TLR) jouent un rôle auxiliaire fondamental dans le phénomène de phagocytose. Cette famille se compose de 11 récepteurs membranaires activés par la liaison de ligands pathogènes de type PAMP ou DAMP. Associés à différents co-récepteurs membranaires tels que CD14, TRIF et MyD88, ils assurent de nombreuses fonctions clef dans l'immunité, telles que la production de cytokines TNF α , IL-12 et l'orientation de la réponse adaptative vers la voie des lymphocytes CD4⁺ Th1 (Takeda & Akira, 2005). Leur ablation entraîne une dégradation de la réponse innée : (1) L'invalidation du gène *Tlr4* empêche la formation d'une réponse immunitaire en présence de LPS (Poltorak et al., 1998) (2) L'inhibition de l'expression du TLR2, TLR4 ou de leur molécule de signalisation intracellulaire MyD88 inhibe la phagocytose de bactéries telles qu'*Escherichia coli* en entravant la formation du phagosome (Blander & Medzhitov, 2004).

La phagocytose est donc un mécanisme très complexe, pouvant être influencé par le type cellulaire du phagocyte, le type de pathogène internalisé et donc le type de récepteur actionné, les stimuli externes tels que la matrice extracellulaire ou les médiateurs immunitaires. De grandes étapes dans ce processus sont néanmoins communes : (1) la liaison d'un ligand pathogène à un récepteur du phagocyte (2) La polymérisation du cytosquelette d'actine au point de contact, permettant l'internalisation du pathogène dans une vésicule appelée phagosome (3) La maturation du phagosome en phagolysosome, organelle cytoplasmique spécialisé dans la dégradation de composés notamment à travers l'action d'enzymes hydrolases fonctionnant à pH acide présentes dans sa lumière (Figure 8).

Les cibles des phagocytes peuvent être des cellules ou particules exogènes, mais également des cellules endogènes, du « soi » pouvant représenter un danger pour l'organisme. C'est par exemple le cas des cellules infectées par des virus, des cellules tumorales, des cellules en cours d'apoptose ou des débris cellulaires.

Les cellules apoptotiques exposent à leur surface des ligands spécifiques, telles que la phosphatidylsérine, qui sont reconnus par des ligands phagocytiques spécifiques (Tableau 2). Les mécanismes impliqués dans la régulation de la phagocytose de ces cellules sont nombreux et permettent entre autres d'éviter l'élimination de cellules endogènes saines, comme les lymphocytes B et T qui peuvent exposer la phosphatidylsérine à leur surface. Les travaux de Brown et collaborateurs ont permis d'identifier le récepteur CD31 comme l'un de ces régulateurs présents à la surface des phagocytes (Brown et al., 2002). Par le biais de ce récepteur, les phagocytes qui se lient à la surface des cellules du « soi » viables reçoivent l'ordre de se détacher. Les travaux effectués sur CD31 ont montré qu'à l'inverse, une cellule étant entrée dans la voie apoptotique perd sa capacité à activer CD31, donnant ainsi la possibilité au phagocyte d'entamer la phagocytose. Un autre exemple est le CD47, exprimé à la surface des cellules saines afin d'envoyer un signal inhibiteur de la phagocytose en se liant à son récepteur SIRP α (Protéine de régulation de signal α), présent à la surface des phagocytes. L'interaction CD47/SIRP α permet d'inhiber l'assemblage du cytosquelette d'actine, empêchant ainsi l'internalisation de la cellule (Tsai & Discher, 2008).

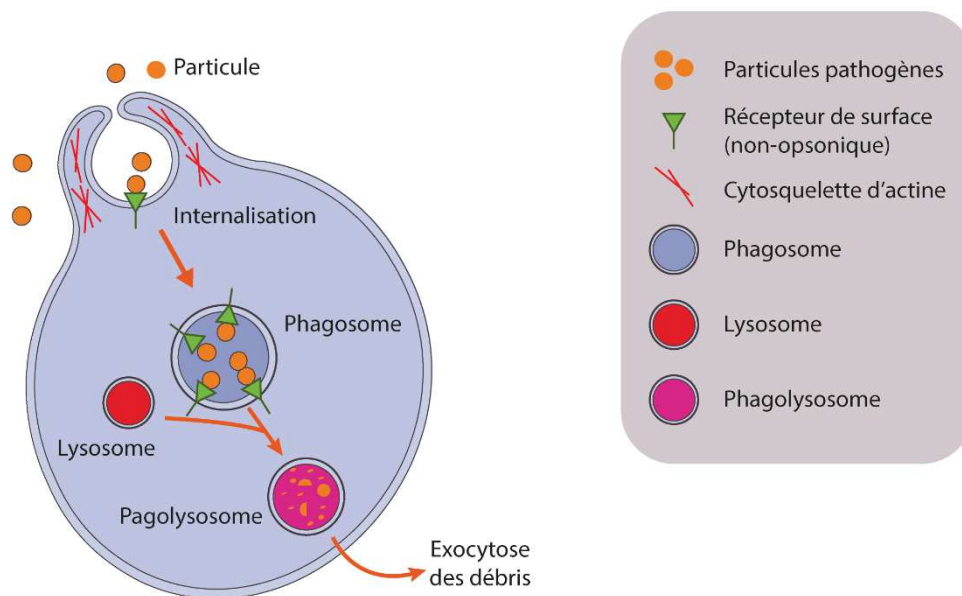


Figure 8 : Les grandes étapes de la phagocytose. Les particules ou cellules pathogènes sont reconnues par les récepteurs du phagocyte. L'interaction avec le récepteur induit une cascade de signalisation déclenchant la polymérisation du cytosquelette d'actine au point focal de membrane plasmique où se situe le récepteur, permettant la projection de bras cellulaires qui englobent la particule. S'ensuit la formation d'une vésicule de phagocytose appelée phagosome, qui fusionne avec le lysosome au cours de sa maturation pour former le phagolysosome. Là, les particules pathogènes sont digérées par les enzymes hydrolases. Les débris sont évacués de la cellule par exocytose.

- Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent environ 50% des leucocytes circulants. Ils ont pour rôle principal de tuer et phagocyter leurs cibles une activés par des molécules tels que les fragments C3a et C5a du complément ou le TNF- α . Ils sont également capables de sécréter des cytokines et des peptides antimicrobiens pour moduler la réponse inflammatoire. Récemment, il a été découvert que ces cellules sont capables de libérer leur contenu nucléaire dans l'espace extracellulaire par un phénomène appelé NETose. Le contenu, un mélange de protéines spécifiques et d'ADN, est déversé comme un « filet » pour capturer les pathogènes à proximité et est appelé « piège extracellulaire de neutrophile » ou NET (Brinkmann et al., 2004).

- Les monocytes

Les monocytes sont issus de la différenciation du progéniteur des monocytes et cellules dendritiques (MDP) (Figure 7). Ce sont des cellules circulantes capables de produire des cytokines inflammatoires et de phagocyter des cellules et des pathogènes. Sous l'influence de signaux spécifiques, les monocytes peuvent migrer dans les tissus et se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques.

- Les macrophages et les cellules dendritiques : les cellules présentatrices d'antigènes

À la suite de la phagocytose, certaines cellules sont capables d'exposer les fragments protéiques issus de la digestion des pathogènes à la surface de leur membrane. Ces cellules sont donc appelées cellules présentatrices d'antigènes ou CPA. Les peptides pathogènes sont liés à un récepteur spécifique appelé complexe d'histocompatibilité (MHC) II ou MHC-II, puis dirigée à la surface de la membrane plasmique. Après rencontre avec un agresseur potentiel et l'émission des signaux de danger (PAMP ou DAMP), la cellule CPA migre vers le ganglion lymphatique le plus proche afin de déclencher l'immunité adaptative, en activant les lymphocytes T naïfs. Même si d'autres cellules tels que les fibroblastes peuvent servir de CPA, les macrophages et les cellules dendritiques sont les CPA les plus efficaces (Kotsias et al., 2019).

Les macrophages peuvent être issus de la différenciation de monocytes après pénétration dans le tissu ou de la division de population de macrophage résidente du tissu. Les macrophages résidents sont des cellules disséminées dans l'ensemble des tissus sous la forme de différentes populations, adaptées à différentes situations immunitaires ou à des micro-environnements bien précis. Ils forment par exemple les cellules de Küpffer au niveau des sinusoides hépatiques, les cellules de Langerhans au niveau de l'épiderme, et la microglie dans le système nerveux central. Les macrophages ont une forte capacité de phagocytose et peuvent produire une réaction inflammatoire en sécrétant des cytokines et des chimiokines.

Les macrophages sont des cellules capables de changer rapidement de phénotype, par un processus appelé polarisation, afin de s'adapter aux signaux environnementaux (Viola et al., 2019). La polarisation des macrophages peut alors s'orienter vers tout un spectre de profils différents avec deux phénotypes extrêmes : (1) les macrophages de type 1 (M1), au phénotype pro-inflammatoire, inductibles par l'IFN- γ , et visibles par exemple en cas d'infection bactérienne (2) les macrophages de type 2 (M2) aux fonctions anti-inflammatoires (immunosuppressives), induits par des signaux de types IL-4 ou IL-13 (Nathan et al., 1983 ; Stein et al., 1992 ; Doyle et al., 1994). Ces cellules peuvent être recrutées sur des sites spécifiques par la présence dans le milieu de molécules chimiotactiques telles que le facteur de stimulation de colonie 1 (CSF-1), le facteur de stimulation de colonie des granulocytes et macrophages (GM-CSF) ou bien encore le chimiokine ligand 2 (CCL2).

Les cellules dendritiques « classiques » sont issues de la différenciation du progéniteur MDP (Figure 7). Ce sont les cellules CPA capables de potentialiser les lymphocytes T et de générer la réaction immunitaire adaptative de la façon la plus efficace.

- Le système du complément

Le système du complément a été mis en évidence pour la première fois grâce aux découvertes du chercheur Jules Bordet à la fin des années 1890. Ces travaux pionniers en immunologie lui valurent un Prix Nobel en 1915. Bien qu'il joue un rôle prépondérant dans l'immunité innée, il a été montré que ce système est également capable de réguler la réponse immunitaire adaptative.

Cet ensemble d'environ 40 protéines et petits peptides s'organise en trois cascades protéolytiques, aboutissant toutes à l'assemblage de l'enzyme C3 convertase : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (Figure 9). La C3 convertase a pour fonction de cliver la protéine C3, libérant les fragments C3a et C3b. La création du fragment C3b est le départ d'une voie commune d'activation protéique, amenant à la formation de la C5 convertase. L'enzyme C5 convertase permet d'un côté l'initiation de la réaction inflammatoire, et de l'autre l'activation de la voie lytique aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) (Merle et al., 2015).

Les trois cascades protéolytiques induisent la production d'effecteurs bien particuliers : (1) les anaphylatoxines, petits fragments peptidiques capables de moduler l'activité du système immunitaire, pouvant par exemple recruter des cellules immunitaires localement par chimiotaxie (2) les opsonines, protéines capables de se lier à la membrane de cellules cibles et aux complexes anticorps-antigène afin de faciliter leur élimination par les phagocytes. Ces cellules cibles peuvent être des pathogènes exogènes telles que des bactéries ou des cellules endogènes représentant un danger telles que des cellules infectées, cancéreuses, apoptotiques ou nécrotiques (également abordé dans le sous-chapitre sur la phagocytose). De même, les débris cellulaires sont également perçus comme des menaces pour l'organisme et leur élimination est en partie dépendante de leur prise en charge par le système du complément (Nauta et al., 2003).

- La voie classique

La voie classique du complément est mise en jeu dès lors que des immunoglobulines de type G (IgG) ou M (IgM) se lient à leurs antigènes. Les parties Fc de ces anticorps sont alors reconnues par la protéine C1 via sa sous-unité C1q (Diebold et al., 2014), permettant ainsi l'activation en cascade des sous-unités C1r puis C1s. De même, les molécules pentraxines peuvent se lier aux pathogènes et directement s'arrimer à C1q pour activer la voie classique. Le complexe C1qrs activé est alors capable de cliver la protéine C4, créant ainsi un fragment C4a qui libéré dans le sérum, et de l'opsonine C4b qui s'ancre à la surface de la cellule cible. La protéine C2 est également clivée par C1qrs, engendrant les fragments C2a et C2b (Haines & Lepow, 1964 ; Ziccardi, 1981). L'association du C4b membranaire et du fragment C2b est la dernière étape d'assemblage de la C3 convertase classique C4bC2b (ou C4b2b, anciennement appelée C4bC2a) (Figure 9).

- La voie des lectines

Les lectines sont des protéines ayant une haute affinité de liaison pour des glucides spécifiques. Comme la voie classique, la voie des lectines permet l'assemblage de la C3 convertase C4bC2b (Vorup-Jensen et al., 1998). Son mécanisme d'initiation est cependant différent puisqu'il dépend de la liaison entre des lectines de liaison au mannose (MBL) et des glucides bactériens membranaires via leur résidu mannose. L'association de sérine-protéases associées aux MBL (les MASPs) qui s'ensuit permet la formation du complexe MBL/MASP-1/MASP-2, équivalent au complexe C1qrs mis en jeu dans la voie classique. La formation de ce complexe permet le clivage de C4 et C2 et suit le même schéma d'activation que dans la voie classique décrite plus haut.

- La voie alterne

La voie alterne du complément se distingue des voies classiques et lectines car elle possède un niveau d'activation basal, mais faible, et qu'elle aboutit à la formation de C3 convertases moléculairement différentes mais de fonction identique. Cette auto-activation a lieu en phase fluide, *i.e* non lié à une surface, repose sur l'hydrolyse spontanée de la protéine C3 (sans clivage par la C3 convertase),

produisant le fragment C3(H₂O) (Pangburn & Müller-Eberhard, 1983). La liaison du facteur B (FB) à C3(H₂O) le rend vulnérable à la lyse par le facteur D (FD) et permet de générer le fragment Bb. Le complexe C3(H₂O)Bb résultant de cette lyse agit alors comme une C3 convertase libre dans le sérum et permet la production de nouveau C3b par clivage de la protéine C3. Lorsque C3b se lie à une surface cible, son interaction avec le facteur B est possible et l'action du facteur D permet l'assemblage d'une autre C3 convertase C3bBb. L'action de cette enzyme va permettre la création de nombreuses molécules C3b qui serviront à l'opsonisation de la cible une fois déposées à sa surface.

L'activation non régulée de la voie alterne à la surface des cellules endogènes, comme dans le cas du syndrome d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (Sun et al., 1999), est contrôlée grâce à deux niveaux de protection :

- (1) l'action de protéines inhibitrices spécifiques appelées facteur H (FH, aussi appelé globuline β1H) et facteur I (FI). Le FH s'associe aux motifs glycosaminoglycanes (GAGs) spécifiques de la membrane des cellules du soi et encourage la dissociation des sous-unités C3b et Bb (Whaley & Ruddy, 1976 ; Pangburn & Müller-Eberhard 1978). Il recrute également le FI, circulant, au niveau de la C3bBb membranaire. Une fois recruté, le FI est capable de dégrader C3b en un fragment « inactivé » iC3b (Cunnion et al., 2004).
- (2) la présence de protéines membranaires régulatrices du complément (mCRP) à la surface des cellules endogènes, promouvant l'action du FI et la dissociation du complexe C3 convertase. Les mCRP, composées du facteur d'accélération de la dégradation (DAF ou CD55), de la protéine cofacteur de membrane (MCP ou CD46) et de la protectine (CD59), sont des protéines ancrées à la membrane externe des cellules du soi et impliquées dans la régulation du complément (Sun et al., 1999).

Enfin, le mécanisme particulier d'activation de la voie alterne du complément est également rendu possible par la présence dans le sérum d'un agoniste spécifique, appelé facteur P (FP) ou properdine. La properdine est capable notamment de stabiliser les complexes C3bB et C3bBb membranaires en inhibant l'action du FH et du FI.

- La réaction inflammatoire C5-dépendante

Le dépôt de C3b nouvellement créé à proximité de C3 convertase, qu'il s'agisse de C4bC2b ou C3bBb, forme le complexe C5 convertase, capable de cliver la protéine C5 en un fragment chimioattractant C5a et un fragment C5b. A l'instar de C3a, le fragment C5a est une anaphylatoxine qui peut moduler la réponse immunitaire en se liant à des récepteurs spécifiques, de type C3aR ou C5aR, localisés en grande majorité au niveau des cellules du système immunitaire inné. Les fragments C3a et C5a ont un effet vasodilatateur, pro-inflammatoire et peuvent, en fonction du type de cellule immunitaire réceptrice, induire la libération d'histamine, de TNF-α, d'interleukine (IL)-1β et d'IL-6 (Klos et al., 2009) (Figure 9).

- La voie lytique et la formation du complexe d'attaque membranaire

Après l'insertion du fragment C5b à la membrane survient le recrutement des protéines C6 et C7, qui s'associe à C5b. La formation du complexe C5bC6C7 permet ensuite l'ancrage de la protéine C8 et de plusieurs sous-unités C9, finalisant ainsi la formation du MAC. Le MAC est organisé en pore à la membrane de la cellule cible, permettant sa lyse par choc osmotique (Podack et al., 1976).

- Le système du complément dans le SNC

La vaste majorité des protéines du complément sont synthétisées dans le foie. Le SNC étant isolé du reste de l'organisme par la BHE, membrane à perméabilité sélective, il ne perçoit pas d'apport extérieur en protéines du complément. Il a cependant été montré que certaines protéines du complément telles que C5a, C3 et C1q sont synthétisées *in situ* par des cellules nerveuses, neuronales et gliales (O'Barr et al., 2001 ; Schafer et al., 2012).

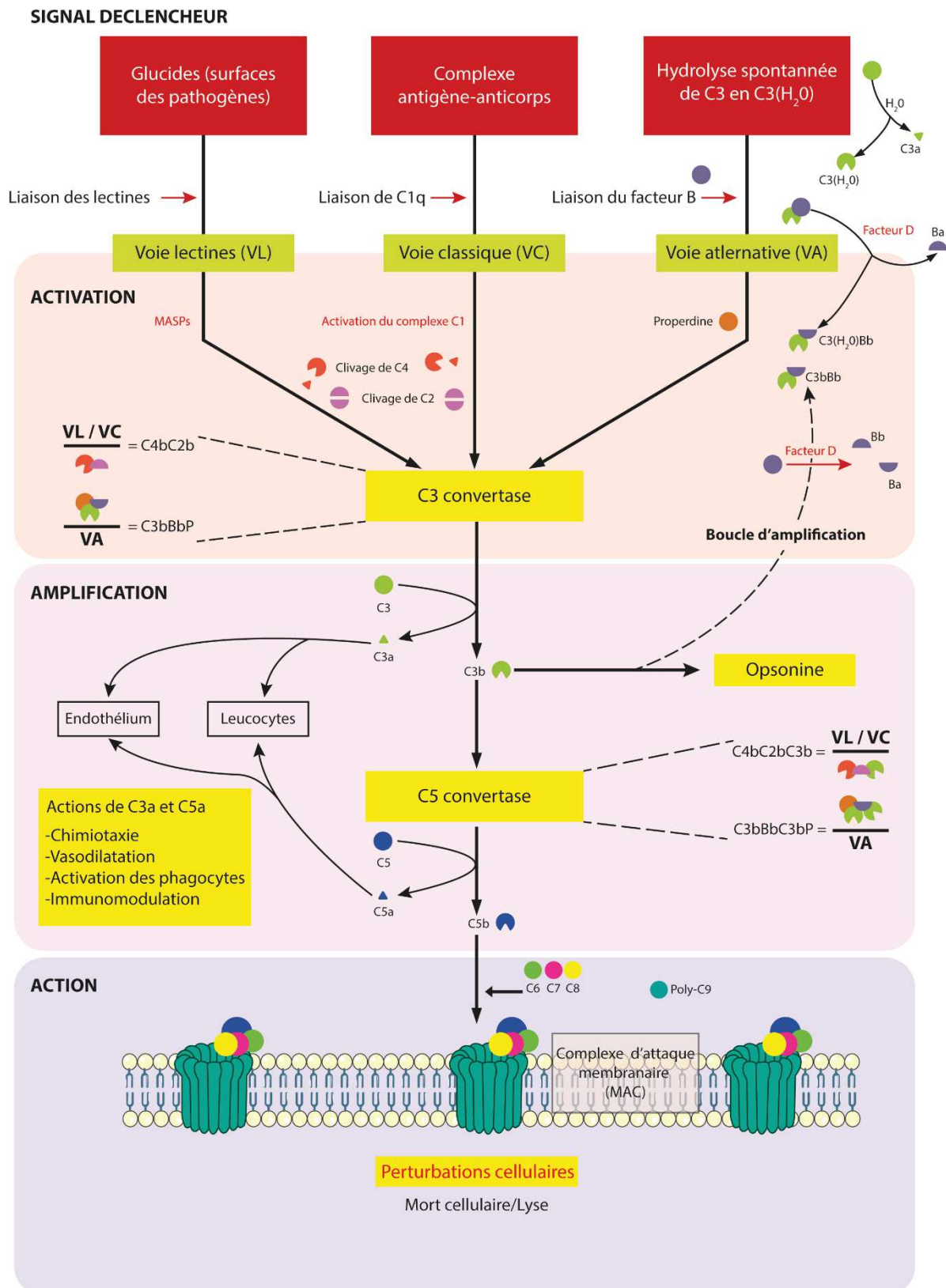


Figure 9 : Les trois voies du système du complément. Abréviations : MASPs = Sérine-protéases associées aux lectines de liaison au mannose, VL = Voie des lectines, VC = Voie classique, VA = Voie alterne. Reproduit d'après Kulkarni et al., 2018.

1.1.2. L'immunité adaptative

Comparée au système immunitaire inné, la réponse immunitaire adaptative demande plus de temps (quelques jours) pour être élaborée. Elle permet cependant une réponse antigène-spécifique plus raffinée qui sera « mise en mémoire » et réutilisable rapidement si l'antigène est réintroduit dans l'organisme. Contrairement aux récepteurs relativement génériques des cellules du système inné, les lymphocytes B et T développent respectivement des anticorps ou des récepteurs faits « sur-mesure » pour s'adapter à la diversité d'antigènes pouvant être rencontré au cours de la vie. Cette facette de l'immunité dépend également de l'intervention des CPA, cellules présentatrices d'antigène présentées plus haut, et de leur interaction avec les lymphocytes T.

Les lymphocytes sont des cellules très mobiles. Après leur différenciation, les lymphocytes T circulent dans tout l'organisme puis migrent dans les organes lymphoïdes secondaires, tels que les ganglions lymphatiques et la rate, qui sont idéalement positionnés pour une surveillance des antigènes circulants dans la circulation lymphatique et sanguine, respectivement. Après rencontre avec l'antigène, ces cellules prolifèrent et adoptent un phénotype mature de cellules effectrices.

1.1.3. L'immunité à médiation cellulaire : les lymphocytes T

La fonction principale des lymphocytes T dépend de leur capacité à produire des récepteurs antigène-spécifiques appelés récepteurs des cellules T ou TCR. La diversité des TCR repose sur l'existence d'une multitude de segments de gènes codant pour des fragments du récepteur, appelés segments de diversité (D), segment de jonction (J) et segments variables (V). Dans chaque précurseur de lymphocytes T, ces multiples segments de gènes sont l'objet de recombinaisons dites somatiques, donnant naissance à éventail de récepteurs TCR uniques et antigène-spécifique. Après élimination des lymphocytes T portant des TCR aberrants/inefficaces et maturation des lymphocytes T restants, deux populations majeures se distinguent en fonction du type de corécepteur membranaire de TCR exprimé : (1) les lymphocytes T exprimant le CD4 (CD4⁺), aussi appelés lymphocytes T auxiliaires et dont le TCR interagit avec le CMH-II (2) les lymphocytes T CD8 (CD8⁺), aussi appelés lymphocytes T cytotoxiques et dont le TCR interagit avec le CMH-I. Ces lymphocytes sont appelés « naïfs » jusqu'à ce qu'ils soient mis pour la première fois en contact avec un CMH présentant l'antigène pour lequel leur TCR a été customisé (Bonilla & Oettgen, 2010).

Les TCR fonctionnent en association avec des protéines de membranes adaptatrices, dont les protéines CD3. L'activation des lymphocytes T a lieu lorsqu'un TCR interagit avec un complexe antigène/CMH, induisant alors la formation d'un cluster protéique appelé « synapse immunologique ». Cet événement donne lieu à l'activation d'une cascade de phosphorylation, impliquant notamment les protéines membranaires CD3 et CD45 ainsi que la famille des kinases Src.

Le CMH-I est présent sur toutes les cellules nucléées de l'organisme, permettant l'interaction des CD8⁺ avec à peu près toutes les cellules de l'organisme. Les CD8⁺ sont appelés cytotoxiques car ils induisent l'apoptose de leur cellule cible par la libération de granules de perforine/granzyme B et production de FasL. Ils reconnaissent principalement les cellules infectées ou tumorales.

Au contraire, le CMH II n'est exprimé que par les cellules CPA, telles que les macrophages ou les cellules dendritiques (se référer à la section sur l'immunité innée), restreignant donc les interactions possibles des CD4⁺. Les CD4⁺ sont appelés lymphocytes auxiliaires (T_H) car ils sont capables, via la production de diverses cytokines : (1) de moduler l'activité des lymphocytes B et des T CD8⁺ (2) de recruter les granulocytes par chimiotactisme (3) de stimuler la production de lymphocytes T.

Il est important de mentionner qu'une grande diversité de sous-populations de lymphocytes T existe, notamment au sein des CD4⁺, mais également des populations plus méconnues comme les lymphocytes T de type Natural Killer, appelés lymphocytes NKT. L'une d'entre elles est la sous-population CD4⁺ appelée lymphocytes T auxiliaires folliculaires, qui joue un rôle crucial dans la formation des lymphocytes B sécréteurs d'anticorps et des lymphocytes B à mémoire.

1.1.4. L'immunité à médiation humorale : les lymphocytes B

Les lymphocytes B se distinguent des lymphocytes T car ils ne sont pas cytotoxiques, mais sont capables de se différencier en plasmocytes, spécialisés dans la sécrétion d'anticorps (aussi appelées immunoglobulines) qui pourront déclencher la réaction immunitaire une fois en interaction avec l'antigène. Les immunoglobulines (ou anticorps) sont composées de chaînes lourdes (ou H) et de chaînes légères (ou L) et interviennent dans la reconnaissance des antigènes. Ces molécules sont la spécialité des lymphocytes B, qui les expriment à leur surface ou les sécrètent dans la circulation, après différenciation en plasmocytes, afin d'agir à distance.

Les lymphocytes B expriment à leur surface le récepteur des cellules B (ou BCR), composé d'une immunoglobuline de type M (IgM) ou D (IgD) ancrées dans la face extracellulaire de la membrane plasmique, et des protéines transmembranaires associées CD79a et CD79b qui permettent la transmission du signal en intracellulaire via les kinases Src (Campbell et al., 1991). Le BCR est crucial dans le développement, l'activation et la survie des lymphocytes B (Lam et al., 1997). Tout comme le TCR, la grande diversité des IgM/IgD du BCR est issue de la recombinaison somatique de segments de gènes V, D et J dans le locus des chaînes lourdes des anticorps et des segments V et J dans le locus des chaînes légères (Brack et al., 1978). Cette découverte par Susumu Tonegawa fut récompensée par un prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1987.

Une fois armés de leur BCR, les lymphocytes B peuvent interagir directement avec un antigène au niveau du pathogène, sans avoir besoin de médiation par une cellule CPA (Il en va de même pour les anticorps sécrétés par les plasmocytes). Cette activation induit leur migration et la formation du centre germinatif (ou germinatif), structure transitoire des organes lymphoïdes secondaires composée de lymphocytes B, des lymphocytes T auxiliaire folliculaires (CD4⁺), et de cellules dendritiques. L'évènement culminant de la réaction immunitaire adaptative a lieu au sein de cette structure spécialisée, où les lymphocytes B vont se multiplier et effectuer des recombinaisons somatiques appelées hypermutations somatiques afin de produire des anticorps de plus haute affinité pour l'antigène (Stebegg et al., 2018). Les clones générés sont ensuite sélectionnés par les lymphocytes T auxiliaire folliculaires avant de se différencier : (1) en plasmocytes, sécréteurs d'anticorps (2) en lymphocytes B à mémoire, cellules stock hautement spécifiques d'un antigène et prêtes à se réactiver rapidement en cas de réintroduction du pathogène dans l'organisme.

1.2. Les modulations immunitaires dans la SLA

Dans le contexte de la SLA, l'immunité périphérique et centrale est largement remodelée. Dans les modèles *SOD1^{G93A}*, mais également *SOD1^{G37R}* et *SOD1^{G85R}*, il a été montré que la barrière hémato-encéphalique (BHE) est altérée et devient perméable à un stade présymptomatique (P60) (Zhong et al 2008 ; Garbuzova-Davis et al., 2007a ; Garbuzova-Davis et al., 2007b). Une perte de l'intégrité de cette barrière suggère que des cellules et protéines habituellement activement gardées en dehors du SNC peuvent y pénétrer au cours de la maladie. Chez les patients SLA ainsi que dans les modèles SLA mutants, nous observons une infiltration de cellules immunitaires dans le SNC (Komine et al., 2018), une activation des cellules immunitaires dans la circulation périphérique (Gustafson et al., 2017 ; Murdock et al. 2017), mais également une activation et des changements dans le profil immunitaire de certaines cellules gliales. L'étude du rôle de chacun de ces éléments dans la pathologie est cruciale pour avoir une compréhension complète des mécanismes pathogéniques ayant lieu au cours de la SLA. L'état actuel de la recherche concernant certains de ces éléments dans la maladie vous est présentée dans ce chapitre.

1.2.1. Le système du complément dans la SLA

Bien qu'il n'ait pas été démontré à ce jour que la totalité des composants de la cascade protéolytique du complément soient synthétisés dans le tissu nerveux, il est possible que celui-ci joue un rôle dans certains

contextes neuropathologiques, notamment suite à une atteinte de la BHE comme observé chez les patients SLA (Apostolski et al., 1991) et dans les modèles murins (Zhong et al. 2008 ; Garbuzova-Davis et al., 2007a ; Garbuzova-Davis et al., 2007b). Il est ainsi important d’avoir une bonne compréhension des modifications de ce système aux pouvoirs lytiques, opsonisant et de modulation de l’inflammation

Protéine/Fragment	Patients SLA	Modèles murins
Voies proximales		
C1q	Taux plus élevés: M, C, ME, sérum et CSF Conflit de données: Sérum et CSF	Taux plus élevés: M, ME
MBL	Pas d’activation apparente	Pas de données
C2 / C4 /C4d	Taux plus élevés: C, ME, sérum et CSF Conflit de données: Sérum (C4d)	Taux plus élevés: M, ME
Facteur B	Conflit de données	Taux plus élevés: M, C, ME
C3, C3a, C3b et C3aR	Taux plus élevés: M, C, ME, sérum et CSF Conflit de données: Sérum	Taux plus élevés: M, ME, NP
Voie terminale (lytique)		
C5a	Taux plus élevés: Sérum et CSF	Taux plus élevés: M, ME
C5aR1 / C5aR2	Taux plus élevés: M, C, ME (C5aR1)	Taux plus élevés: M, C, ME (C5aR1) Taux plus faibles: ME (C5aR2)
MAC (C5b – C9)	Taux plus élevés: M, C, ME + sérum et CSF (C5b)	Taux plus élevés: M
Facteurs de régulation		
Protectine (CD59)	Taux plus élevés: M	Conflit de données
DAF (CD55)	Taux plus élevés: M	Conflit de données

Tableau 3 : Récapitulatif des modulations du système du complément observées chez le patient SLA et chez les modèles de souris SLA. Abréviations : M= Muscle ; C = Cortex ; ME = Moelle épinière ; CSF = Liquide céphalo-rachidien. Les cases vertes reflètent une élévation des taux circulants (sérum, CSF) / du dépôt de protéines (Muscle/Cortex/Moelle épinière). Les cases jaunes indiquent un manque de consensus dans l’état actuel de la littérature. Inspiré de Parker et al., 2019

dans la SLA, dont un résumé vous est présenté dans le [tableau 3](#) de ce manuscrit.

Beaucoup de données sont disponibles concernant les variations du système du complément dans le contexte de la SLA. Elles suggèrent toutes qu’une activation du système a lieu au cours de la maladie au sein du SNC mais également en périphérie, dans le sang, LCR ou au niveau de la plaque motrice du muscle (Parker et al., 2019). En périphérie, le composant initiateur de la voie classique du complément, C1q, est retrouvé à des taux plus élevés chez les patients SLA que chez les individus contrôles. En effet, des taux supérieurs de cette protéine sont retrouvés dans le LCR et le sang de patients (Apostolski et al., 1991), mais également au niveau des muscles (Bahia El Idrissi et al., 2016). Des taux élevés de la protéine C1q ont également été mis en évidence en central. Au niveau cortical et spinal, la protéine colocalise essentiellement avec les cellules gliales, notamment microgliale (Sta et al., 2011). La technique d’hybridation *in situ* a permis de montrer une synthèse locale au niveau neuronal, qui coïncide dans ce cas avec un marquage de la protéine au niveau des neurones. Les données concernant les MBL, initiateurs de la voie des lectines, suggèrent que cette voie n’est pas activée dans le contexte de la SLA (Sta et al., 2011). Enfin, il a été montré qu’à un stade symptomatique, le taux d’ARNm du facteur B, impliqué dans l’initiation de la voie alterne du complément, est 6 fois plus élevé dans le modèle *SOD1^{G93A}* comparé à un contrôle sauvage (Lee et al., 2013).

Des marqueurs de formation de la C3 convertase ainsi que de l'activation de la voie terminale du complément ont également été mis en lumière chez les patients SLA. Les fragments dérivés de C3 ainsi que les fragments composants le MAC ont été visualisés dans la moelle épinière et le cortex de patients par immunomarquages (Donnenfeld et al., 1984 ; Sta et al., 2011). Dans le cas de C3, il semble colocaliser en partie avec une sous-population d'astrocytes neurotoxiques, dits astrocytes A1, surreprésentés dans la moelle épinière de patients SLA (Liddlelow et al., 2017). Les travaux de Bahia El Idrissi sur l'activation du complément au niveau des plaques motrices montrent des dépôts des composants du MAC ainsi que des protéines régulatrices du complément CD55 et CD59 (Bahia El Idrissi et al., 2016). Les composants du MAC ainsi que l'anaphylatoxine C5a sont également surexprimés dans la circulation (Mantovani et al., 2014).

Comme vous pouvez le voir dans le [tableau 3](#), les données obtenues grâce à des modèles de souris SLA sont en corrélation avec les modifications du système observées chez le patient (Lee et al., 2013, Lee et al., 2018). Au niveau du nerf périphérique, des dépôts d'immunoglobulines et de la protéine C3 sont observés dans les modèles *SOD1^{G93A}* et *SOD1^{G37R}* symptomatiques (Chiu et al., 2009). Les travaux de Lee et collaborateurs montrent une hausse du récepteur de C5a, C5aR1, au niveau des motoneurons et de la microglie au cours de la maladie chez la souris *SOD1^{G93A}*. Ils proposent ainsi C5aR1 comme acteur potentiel dans la mort des motoneurons (Lee et al., 2013). En utilisant un traitement au PMX205, antagoniste de C5aR1, les auteurs sont parvenus à modérément prolonger le maintien des fonctions motrices ainsi que la survie de souris *SOD1^{G93A}* (Woodruff et al., 2014 ; Lee et al., 2017). Ces données apportent ainsi de nouveaux éléments concernant un rôle des protéines du complément dans la pathogénèse de la SLA. Les données relatives à la significativité et au rôle de ces protéines dans la maladie, obtenues grâce aux modèles murins, manquent cependant de consensus, notamment parce que les souris SLA mutantes déplétées en C3 ou C1q ne présentent pas de différences de survie (Lobsiger et al 2013 ; Woodruff et al., 2014 ; Lobsiger & Cleveland, 2014).

1.2.2. L'infiltration immunitaire dans la SLA

De nombreuses études ont mis en évidence une infiltration immunitaire dans le SNC de patients atteints de SLA (Troost et al. 1989 ; Kawamata et al. 1992 ; Engelhardt et al. 1993) ainsi que chez les modèles murins (Alexianu et al. 2001 ; Beers et al. 2008 ; Chiu et al. 2008). Il semblerait que cette infiltration n'ait toutefois rien de hasardeux, tant concernant la chronologie de ces événements que le type de cellules qui infiltrent le tissu nerveux.

- Les lymphocytes T CD4⁺

De nombreuses études ont montré que les lymphocytes CD4⁺ circulent dans la moelle épinière et le cerveau de patients et de modèles SLA. Grâce à la création successive de différents modèles génétiques, un rôle neuroprotecteur des CD4⁺ a été mis en lumière dans la SLA : L'ablation des lymphocytes T et B dans le modèle de souris *SOD1^{G93A} ; Rag2^{-/-}* (Beers et al., 2008), ou l'inhibition fonctionnelle des lymphocytes T par ablation d'un des composants du complexe TCR chez les souris *SOD1^{G93A} ; Tcrβ^{-/-}* (Chiu et al. 2008) induit une diminution de l'espérance de vie de ces souris. La modification de l'espérance de vie de ces souris porte sur la phase de progression de la maladie, puisque l'âge de début des symptômes n'est modifié dans aucune des deux études. En d'autres termes, ces études suggèrent donc que certains lymphocytes, possiblement par leur TCR, permettent de ralentir la phase de progression de la maladie chez la souris *SOD1^{G93A}*. L'identification des CD4⁺ comme étant porteurs de cette neuroprotection vient des observations faites sur les souris *SOD1^{G93A} ; Cd4^{-/-}*, dénuées de lymphocytes CD4⁺, qui présentent une diminution de l'espérance de vie et une phase de progression similaire aux souris *SOD1^{G93A} ; Rag2^{-/-}* (Beers et al., 2008). L'analyse transcriptomique des marqueurs de l'inflammation dans la moelle épinière de ces deux modèles démontre une baisse d'expression des marqueurs CD68 et CD11b, témoignant d'une activation microgliale moins importante, ainsi qu'une baisse d'expression des cytokines anti-inflammatoires IL-4 et TGF-β et une hausse des pro-inflammatoires TNFα et IL-6. Les mêmes auteurs ont quelques années plus tard, montré un effet prédominant de la sous-population CD4⁺CD25⁺, aussi appelés lymphocytes T régulateurs (Treg), dans

la neuroprotection des CD4⁺ dans la SLA (Beers et al., 2011). Cet effet passerait essentiellement par la modulation de l'activation microgliale, comme cela avait été suggéré plus tôt par la transcriptomique. En effet, par la libération d'IL-4, les Treg sont capables *in vitro* d'abolir le phénotype neurotoxique de la microglie mutante SLA (Zhao et al., 2012). Il est cependant important de noter que dans cette étude, les seuls marqueurs de toxicité microgliale analysés portent tous la production de stress oxydant (analyse des taux de NOX2, iNOS et de NO) et qu'aucun test de toxicité directe sur les motoneurones n'a été effectué.

- Les lymphocytes T CD8⁺

En plus des lymphocytes CD4⁺, il a été montré que les lymphocytes CD8⁺ pénètrent dans la moelle épinière de patients SLA (Sta et al., 2011) et du modèle SLA *SOD1^{G93A}*. Contrairement au CD4⁺, il semblerait que l'entrée des CD8⁺ dans le parenchyme soit un événement tardif puisqu'il est observé majoritairement au stade symptomatique (150j). Il y a quelques années, notre laboratoire s'est intéressé à la fonction de ces lymphocytes dans la SLA. L'article lié à cette étude est accessible dans la partie « Publications annexes » de ce manuscrit (Coque et al., 2019). Comme présentés plus haut (se référer au chapitre sur l'immunité adaptative), la toxicité des CD8⁺ est médiée par l'interaction de leur récepteur TCR avec le complexe antigène-CMH-I exposé à la surface de cellules endogènes. Les travaux *in vitro* effectués par Coque et collaborateurs ont permis de montrer que dans un contexte de SLA, les CD8⁺ peuvent directement induire la mort des motoneurones via la voie perforine/granzyme et la voie Fas/FasL, par interaction de leur TCR avec le CMH-I motoneuronal. À l'aide de culture primaire de neurones et de lymphocytes CD8⁺, purifiés sur colonne magnétiques, l'équipe a montré que : (1) les CD8⁺ mutants SLA sont sélectivement toxiques envers les motoneurones, puisqu'ils n'induisent pas la mort d'autres neurones tels que les hippocampaux ou les striataux (2) les CD8⁺ mutants SLA induisent un taux similaire de mort des motoneurones, qu'ils soient mutants SLA ou pas (3) Les CD8⁺ non mutants SLA (sauvages) ne sont pas toxiques envers les motoneurones (4) les CD8⁺ mutants SLA acquièrent leur toxicité à partir d'un stade symptomatique, puisque aucune mort n'est observé avec des lymphocytes CD8⁺ mutants SLA issus de souris à 30j, contre ~20% et ~40% pour des CD8⁺ mutants SLA de souris à 130j et 150j, respectivement. L'utilisation de la technique de microscopie à force atomique a permis de mesurer la force du contact biophysique pouvant avoir lieu entre un CD8⁺ et un motoneurone et de confirmer l'interaction entre TCR et CMH-I dans ce contexte. Enfin, mon travail sur les échantillons de moelle épinière de souris *SOD1^{G93A} ; Cd8a^{-/-}*, génétiquement incapables de produire des CD8⁺ fonctionnels, a permis de montrer que l'ablation des lymphocytes CD8⁺ permet le maintien d'un nombre de motoneurones significativement plus élevé à un stade symptomatique (135j). Bien que ces observations permettent de confirmer le rôle cytotoxique joué *in vivo* par les lymphocytes T CD8⁺ sur les motoneurones, les études longitudinales n'ont pas permis de montrer un impact significatif de l'ablation de ces cellules sur la survie ou l'évolution des capacités motrices chez ces souris (Coque et al., 2019). Ces dernières conclusions sont en accord avec les observations faites par Komine et collaborateurs (Komine et al., 2018)

- Les lymphocytes Natural Killer

Les données concernant de rôle des lymphocytes NK dans la littérature sont discordantes, tant sur leur nombre dans la circulation (Gustafson et al., 2017), dans le SNC (Chiu et al., 2008 ; Garofalo et al., 2020 ; Komine et al., 2018) ou leur rôle dans la pathologie (Chiu et al., 2008 ; Murdock et al., 2017 ; Komine et al., 2018). L'hypothèse la plus acceptée aujourd'hui repose sur plusieurs études rapportant une infiltration importante de cellule NK dans la moelle épinière de patients SLA ainsi que du modèle *SOD1^{G93A}*. Récemment, Garofalo et collaborateurs ont montré que les NK, qui sont des cellules cytotoxiques innées, induisent directement la mort des motoneurones via leur récepteur activateur NKG2D dans un contexte SLA *in vitro* (Garofalo et al., 2020). L'utilisation dans toutes ces études de marqueurs peu spécifiques des cellules NK, tels que CD56/CD16 ou NK1.1, laisse néanmoins subsister un doute quant à l'identité des cellules observées. L'étude de ces lymphocytes dans la SLA est au cœur de mon premier projet de thèse, qui vous est présenté en détail dans le chapitre III de cette introduction.

1.2.3. L'activation périphérique dans la SLA

- Les lymphocytes B

Des autoanticorps dirigés contre des antigènes neuronaux, *i.e* anti-ganglioside GM1, anti-gangliosides AGM1 et anti-sulfatides, ont pu être identifiés dans le sang et le LCR de patients SLA (Niebroj-Dobosz et al., 1999). La présence de ces anticorps a amené les scientifiques à étudier le possible rôle des lymphocytes B dans la maladie. Contrairement aux lymphocytes CD4 et CD8, les lymphocytes B ne semblent pas infiltrer le SNC de modèle de souris SLA (Chiu et al., 2008). Les travaux de Naor et collaborateurs sur la souris *SOD1^{G93A}* ont permis de déterminer que les populations de lymphocytes B de ces souris ne se distinguent des souris sauvages ni par leur phénotype, ni par leur amplitude d'activation à des molécules immunogènes telles que le LPS (Naor et al., 2009). De plus, l'ablation chez la *SOD1^{G93A}* du gène codant pour la sous-unité μ des IgM, induisant un blocage de la différenciation des lymphocytes B au stade pro-B (Figure 7), n'a aucun impact sur l'apparition ou l'évolution de la maladie. Ces résultats sous-tendent ainsi que les lymphocytes B n'ont pas de rôle prédominant dans la SLA.

- Les macrophages

La dénervation et le démantèlement de la jonction neuromusculaire sont des événements qui commencent dès 50 jours (présymptomatique), devant donc l'apparition des premiers marqueurs centraux dans la pathologie de la SLA (Figure 3). L'observation de ces phénomènes précoces suggère l'intervention d'acteurs au niveau du système nerveux périphérique (SNP), c'est-à-dire au niveau des racines des nerfs, dans la circulation et dans les organes périphériques tels que le muscle. Plusieurs études montrent que des macrophages activés (CD68⁺) s'accumulent au niveau des racines nerveuses périphériques chez les patients SLA (Chiot et al., 2020) et dès le stade présymptomatique (60j) dans les modèles de souris SLA (Chiu et al., 2009).

L'utilisation de la technologie de microscopie à fluorescence bi-photonique (2P-LSM) a permis à Dibaj et collaborateurs (Dibaj et al., 2011) de suivre les modifications morphologiques des macrophages dans le SNP chez des souris *SOD1^{G93A}*. Ces expérimentations ont été réalisées sur des souris *SOD1^{G93A}* portant également les transgènes CX3CR1-EGFP et THY1-EYFP. Ces souris expriment donc un rapporteur GFP dans la microglie et les macrophages et un rapporteur YFP dans les projections axonales. Ces expérimentations *in vivo* montrent qu'au cours de la maladie, certains macrophages périphériques adoptent un phénotype de type spumeux et vont jusqu'à doubler de volume, phénotype suggérant la phagocytose, possiblement des débris lipidiques de myéline provenant de la dégénérescence axonale ayant lieu en parallèle (Grajchen et al., 2018). Chez ces souris, les macrophages en périphérie ne présentent pas d'activation exacerbée en réponse à une lésion laser d'axones de la racine ventrale (transection) comparée à des souris sauvages ayant subi le même traitement. Cette étude pourrait donc suggérer : (1) que dans le modèle *SOD1^{G93A}*, les macrophages périphériques n'adoptent pas de phénotype hyperexcitable, potentiellement délétère ou (2) que leur niveau d'excitation pré-lésion atteint déjà un seuil maximum qui ne peut être exacerbé. Chez ces souris, les macrophages périphériques participeraient plutôt à l'évacuation des débris de myéline, produits au cours du processus dégénératif, et empêcheraient ainsi la libération de particules pro-inflammatoires. Ce constat est en accord avec les travaux de Chiu et collaborateurs qui ont mis en évidence quelques années plus tôt un processus de phagocytose de la myéline par les macrophages en périphérie à l'aide de bleu de Toluidine (Chiu et al., 2009).

L'infiltration des macrophages au niveau du nerf périphérique semble reposer en partie sur la signalisation par le récepteur au facteur de stimulation de colonie 1 (CSF1) appelé CSFR1 (Martínez-Muriana et al., 2016), une protéine importante dans de nombreux aspects du fonctionnement des cellules monocytes/macrophages/microgliale, notamment l'hématopoïèse. L'inhibition pharmacologique de CSFR1 induit une réduction du nombre de monocytes circulants, permet de réduire le nombre de macrophages au niveau du nerf périphérique en présymptomatique et réduit la prolifération microgliale plus tard dans la maladie. Ce traitement montre des effets bénéfiques en ralentissant la perte des

fonctions motrices, en prolongeant la survie des souris de 12% et en augmentant modérément le nombre de motoneurons survivants à l'initiation des symptômes (16 semaines).

L'étude du rôle des macrophages au cours de la SLA au niveau central est rendue difficile par le manque de marqueurs spécifiques pouvant les différencier des macrophages résidents du tissu nerveux, appelés la microglie. Les microglies sont des cellules nerveuses décrites comme les macrophages du SNC, puisqu'elles partagent la même origine hématopoïétique et présente de nombreuses similitudes phénotypiques avec ceux-ci (se référer à la partie microglie du chapitre suivant). Il est donc difficile d'étudier un potentiel rôle des macrophages en central dans la SLA en s'affranchissant d'une contamination par un signal microglial. Les deux types cellulaires dérivent cependant de progéniteurs myéloïdes distincts, se sont adaptés à des environnements tissulaires très différents et présentent des spécificités qui pourraient induire des réponses différentes dans un contexte de SLA. La question d'une infiltration des monocytes/macrophages dans le SNC au cours de la maladie est donc longtemps restée sujette à controverse (Butovsky et al., 2012 ; Chiu et al., 2013 ; Komine et al., 2018), mais à laquelle il est important de répondre.

Les travaux de Chiot et collaborateurs ont permis d'apporter de nouveaux éléments de réponse quant à la dynamique et au rôle de ces cellules dans le modèle de souris *SOD1^{G93A}* (Chiot et al., 2020). Dans cette étude, les auteurs ont créé des souris *SOD1^{G93A}* ou *SOD1^{G37R}* chimériques, obtenue par myéloablation (destruction des cellules souches hématopoïétiques) puis greffe de moelle osseuse provenant de souris donneuses. La greffe de moelle osseuse provenant de souris transgéniques exprimant le rapporteur GFP de manière ubiquitaire (souris actine-GFP) permet ainsi que monitorer une infiltration potentielle de macrophages dans le SNC ou le SNP. De précédentes études procédant à la myéloablation de souris mutantes SLA par irradiation corporelle totale (ICT) ont suggéré une infiltration plus ou moins importante du SNC par les macrophages (Corti et al., 2004 ; Solomon et al., 2006 ; Lewis et al., 2009). Un effet de l'ICT en elle-même sur l'infiltration ayant été mise en lumière, les auteurs ont choisi de comparer la technique myéloablative par chimiothérapie (à l'aide de Busulfan) à la technique d'ICT. Grâce au rapporteur GFP exprimé dans les cellules dérivant des cellules souches hématopoïétiques, cette première partie de l'étude a permis de conclure que : (1) Contrairement au Busulfan, la méthode d'ICT stimule l'infiltration de cellules immunitaires dans la moelle épinière et n'est donc pas appropriée à ce paradigme expérimental (2) L'invasion de la moelle épinière par les macrophages est marginale et intervient essentiellement au stade symptomatique tardif dans le modèle *SOD1^{G93A}* (3) Cette invasion est plus importante et plus précoce (dès le stade d'apparition des signes cliniques) dans le modèle *SOD1^{G37R}*. Les auteurs montrent également que le remplacement des macrophages périphériques mutants SLA par des macrophages non SLA (actine-GFP) n'a pas d'impact sur les paramètres de la maladie suivants : l'activation des macrophages dans le SNP, l'activation microgliale, la survie des motoneurons et l'infiltration lymphocytaire. Dans un second temps, et par la même méthode (traitement au Busulfan et greffe de moelle osseuse) les auteurs ont tenté de modifier le potentiel pathogénique des macrophages périphériques dès le stade pré-symptomatique (52j). Pour cela, ils ont remplacé les macrophages périphériques mutants SLA par des macrophages neuroprotecteurs (surexprimants l'enzyme *SOD1^{WT}*, antioxydant puissant à l'état sauvage) ou des macrophages dont la neurotoxicité a été atténuée par ablation génétique de l'enzyme Nox2, productrice de radicaux libres (ROS). Dans ces deux cas, le remplacement des macrophages à la périphérie a permis de diminuer l'activation des macrophages au niveau du SNP, de réduire l'activation microgliale au niveau central, et de reculer l'âge d'apparition du stade symptomatique, sans toutefois impacter la survie. De façon très intéressante, le remplacement des macrophages plus tard dans la maladie, e.g à l'apparition des premiers symptômes cliniques (~102j), permet de reculer l'âge d'apparition du stade symptomatique et de prolonger la survie des souris.

L'ensemble de ces données permet d'identifier les macrophages comme des acteurs essentiellement périphériques dans la SLA et participant activement à différentes facettes de cette maladie. Dans le SNP, ces cellules participent à l'élimination des débris de myéline dérivant de la dégénérescence des axones moteurs (Dibaj et al., 2011 ; Chiu et al., 2009). Limiter l'infiltration de ces cellules (Martínez-Muriana

et al., 2016) ou leur activation et leur pathogénicité (Chiot et al., 2020) dans le SNC semble permettre d'atténuer l'activation microgliale dans le SNC et montre un effet bénéfique sur la survie des souris *SOD1^{G93A}*.

2. La glie réactive, acteur clef de SLA

Il a longtemps été considéré que la défense immunitaire du SNC était totalement indépendante du système immunitaire classique, pourtant universel au reste de l'organisme. Nous savons aujourd'hui des populations de macrophages et de cellules dendritiques résident dans certaines régions très spécialisées du SNC telles que les méninges, le plexus choroïde et les espaces péri-vasculaires (Nayak et al., 2012). La surveillance immunitaire centrale se distingue cependant de celle du reste de l'organisme sous plusieurs aspects : (1) Une surveillance immunitaire différente de celle de la périphérie avec un nombre réduit de lymphocytes patrouillant et l'absence d'un système de drainage lymphatique conventionnel (2) L'existence de cellules nerveuses gliales assurant des fonctions effectrices ou régulatrices clefs dans la réponse immunitaire, telles que la microglie et les astrocytes. De nombreuses études montrent aujourd'hui que la microglie et les astrocytes jouent un rôle clef dans la pathogenèse de la SLA (Lee et al., 2016).

2.1. La microglie

Les cellules microgliales sont définies de façon générique comme étant les cellules immuno-compétentes résidentes du SNC. Les avancées de la recherche dans l'étude de cette population montrent que ces cellules gliales possèdent de bien nombreuses fonctions au sein du tissu nerveux physiologique et pathologique.

2.1.1. Physiologie de la microglie

L'origine mésodermique des cellules microgliales a été la source de nombreux questionnement concernant l'identité de leur progéniteur(s) (Ginhoux et Guilliams, 2016). Jusqu'à récemment, l'hypothèse privilégiée était que la microglie dérive de monocytes circulants, eux-mêmes issus de précurseurs hématopoïétiques, et que le maintien de cette population en postnatal dépendait de colonisations régulières du SNC par des monocytes (Perry et al., 1985). Les travaux de Ginhoux et collaborateurs ont permis de montrer que la colonisation du SNC par la microglie a lieu en une seule vague, qui se situe entre E7 et E8 chez la souris (Ginhoux et al., 2010). Elle dérive de progéniteurs myéloïdes spécifiques, présents dans le sac vitellin et caractérisés par l'expression de RUNX1. En postnatal, il semblerait que la population microgliale s'auto-entretient en majorité par division cellulaire *in situ* (Ajami et al., 2007). Le maintien de la population microgliale dépend crucialement du TGF- β , comme montré par l'absence totale de ces cellules dans le SNC de souris déficientes en TGF- β 1 (Butovsky et al., 2014).

En condition physiologique, la microglie homéostatique, aussi appelée ramifiée, est répartie dans tout le parenchyme et possède de nombreux prolongements fins très dynamiques. Ces ramifications recouvrent des territoires individuels bien définis et permettent à ces cellules de continuellement analyser l'environnement ainsi que d'interagir avec les cellules voisines (Nimmerjahn et al., 2005, Fontainhas et al., 2011).

2.1.2. Les fonctions microgliales

La morphologie dynamique de la microglie lui permet par exemple de contacter les synapses neuronales. Telle une sentinelle, la microglie contacte ainsi les synapses à intervalles réguliers, à une fréquence positivement corrélée à l'activité même de la synapse (Wake et al., 2009). L'étude de la maladie de Nasu-Hakola a permis de mettre en évidence un rôle de la microglie dans la régulation de l'activité synaptique. Cette maladie est reliée à des mutations au niveau de la protéine transmembranaire TYROBP (aussi appelée KARAP ou DAP12) et engendre chez les patients un ensemble de symptômes dont une forme de DFT (Tomasello & Vivier, 2005). Dans le SNC, l'expression de TYROBP semble

être restreinte exclusivement à la microglie, où elle est notamment associée au récepteur membranaire TREM2 et permet la transduction du signal en intracellulaire (Bianchin et al., 2010). La mutation de cette protéine microgliale chez la souris engendre un ensemble de modifications au niveau synaptique, notamment des perturbations au niveau des récepteurs au glutamate (AMPA et NMDA). Les auteurs suggèrent que ce phénomène est lié à une altération de la communication entre le BDNF microglial et son récepteur neuronal TrkB, ce dernier étant largement sous-exprimé au niveau des synapses des souris mutantes pour TYROBP (Roumier et al., 2004). De même, les souris dans l'incapacité de produire du TGF- β 1 sont particulièrement sensibles à l'excitotoxicité et présentent une plasticité synaptique aberrante (Koeigsperger et al., 2013). La microglie peut ainsi directement influencer l'activité neuronale et la transmission de l'influx nerveux en régulant la densité de récepteurs au niveau de la synapse.

En coopération avec le système du complément, la microglie est également capable d'éliminer les synapses surnuméraires ou dysfonctionnelles, étape clef dans l'établissement d'un réseau neuronal fonctionnel après la naissance. Schaefer et collaborateurs ont en effet montré que le dépôt focal des protéines C1q et C3 servaient de signal déclencheur de l'élagage synaptique par la microglie, reconnaissant C3 via son récepteur au complément 3 CR3 (Schaefer et al., 2012). L'élimination de ces synapses surnuméraires est possible grâce à la haute capacité de phagocytose de ces cellules qui expriment une grande variété de récepteurs phagocytiques (Tableau 4). De par son origine développementale, la microglie partage beaucoup de similitudes avec les macrophages, dont la capacité à phagocyter divers éléments et à servir de cellule CPA. En réponse à des signaux pro-phagocytose tels que C1q, la microglie effectue une transition phénotypique de ramifiée à amœboïde et se rapproche ainsi de la morphologie du macrophage (Reichert & Rotshenker, 2019). La microglie amœboïde possède des prolongements tellement fins qu'ils n'apparaissent pas en microscopie photonique et est observée de façon prédominante au cours du développement. Cette morphologie confère à la cellule une capacité de déplacement plus grande. La microglie est également essentielle à la clairance des cellules en dégénérescence et des débris cellulaires, notamment au cours de la neurogénèse où un nombre important de cellules meurent (Napoli and Neumann, 2009). Les récepteurs Axl et Mer, tous deux impliqués dans la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages et les cellules dendritiques (Zagórska et al., 2014), sont exclusivement exprimés par la microglie dans le SNC. L'ablation des gènes codants pour les récepteurs Mer et Axl une accumulation de neurones positifs à la forme activée de la caspase-3, marqueur des cellules en cours d'apoptose, et démontre ainsi l'importance de la phagocytose microgliale dans l'élimination des neurones en dégénérescence (Fourgeaud et al., 2016). De façon intéressante, Fourgeaud et collaborateurs montrent une surexpression importante de la protéine Axl microgliale dans le modèle de souris Parkinson *Thy1-SNCA^{A53T}*.

La microglie est également une source de facteurs neurotrophiques (NTF) et cytokines nécessaires à la survie et au bon fonctionnement des neurones et d'autres populations gliales telles que les astrocytes (Walton et al., 2006 ; Nakanishi et al., 2007). Les travaux de Ueno et collaborateurs ont permis de souligner le rôle crucial joué par la microglie dans la survie neuronale. Par des techniques de co-cultures et *in vivo*, les auteurs montrent par exemple que la sécrétion d'IGF-1 (Facteur de croissance de type insuline 1, aussi appelé somatomédine C) par la microglie est vitale aux neurones corticaux (Ueno et al., 2013).

La libération de molécules chimiques telles que les cytokines est aussi un moyen pour la microglie d'orchestrer la réponse inflammatoire centrale. En condition pathologique, telles qu'une lésion du SNC ou une infection par des microorganismes, la microglie adopte en effet diverses formes d'activation. Ce processus de changement phénotypique peut également être observé chez les astrocytes ou les macrophages. L'intégration de signaux extracellulaires suggérant une agression du SNC, tels que l'ATP, peut déclencher la transition de la microglie vers un phénotype activé (Davalos et al., 2015) impliquant : la modification de son secrétome, une prolifération intense, ainsi qu'un changement vers une forme amœboïde ou une forme hypertrophique (Morrison et Filosa, 2013).

Comme chez les macrophages, deux grands types d'activation de la microglie ont été définis : (1) L'activation classique évolue vers un phénotype pro-inflammatoire, induisant la production de cytokines

telles que TNF- α , IL-1 β , IFN- γ et de dérivés toxiques comme le NO et les ROS (Hirbec et al., 2017). Elles sont apparentées au phénotype M1 du macrophage (2) L'activation alternative abouti à un phénotype immunosuppresseur et neuroprotecteur, notamment par la production d'IL-4/10/13 et de TGF- β , de facteurs neurotrophiques tels que l'IGF-1 et la clairance des débris cellulaires.

Elle est associée au phénotype M2 observé chez les macrophages (Tang & Le, 2016). Cette transition phénotypique n'est pas une réponse stéréotypée mais adaptée à chaque contexte pathologique et peut évoluer au cours d'une pathologie (Hirbec et al., 2017). Ainsi, l'activation microgliale dans les modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) diffère de celle observée en contexte neurodégénératif, et diffère également de l'activation induite dans des modèles d'infection tels que l'injection de LPS (Holtman et al., 2015 ; Mrdjen et al., 2018 ; Ajami et al., 2018).

Récepteurs de phagocytose exprimés par la microglie	Ligand	Contexte pathologique d'insertion du ligand
TLRs & co-receptors (MyD88/ TRIF / CD14)	α -Synucléine Fibrilles d'A β LPS	α -Synucléinopathies (PD) AD Infections du SNC
TREM-2	Protéine amyloïde	AD / Maladie de Nasu-Hakola / SEP / EAE
Fc γ R	α -Synucléine	PD / SEP / AD
CR3 (CD11b) & CR4 (CD11c)	Débris de myéline / A β Cellules apoptotiques	AD SEP
Récepteurs charognards (MSR-1 / CD36 / SR-C1 / CD68 / LOX-1 / SREC / RAGE)	Débris de myéline A β Thrombospondine 1	SEP / EAE AD
P2RY6	Nucléotides (ATP, UDP...)	Douleurs neuropathiques
Galectine-3 (Mac-2)	Débris de myéline	Traumas crâniens / Lésions de la moelle épinière

Tableau 4 : Principaux récepteurs de phagocytose exprimés par les cellules microgliales, leurs ligands dans le SNC et les conditions de mise en contact avec le ligand. Abréviations : PD = maladie de Parkinson, AD = maladie d'Alzheimer, SEP = sclérose en plaque, EAE = encéphalomyélite auto-immune expérimentale, A β = amyloïde β . Adapté de Fu et al., 2014

2.1.3. Activation microgliale dans la SLA

La microglie réactive est présente au niveau de toutes les régions concernées par la dégénérescence motoneuronale chez les patients SLA. Dans le modèle murin de SLA *SOD1^{G93A}*, les modifications microgliales sont observables au stade très précoce de 30 jours (Gerber et al., 2012). Étonnamment, le nombre de cellules microgliales à ce stade est moins important que chez les souris sauvages. Une prolifération intense de ces cellules a lieu lors de l'activation microgliale, observée dès le stade présymptomatique (Hall et al., 1998). Comme montré dans un contexte de lésion de la moelle épinière (Gerber et al., 2018), l'administration de GW2580, antagoniste au récepteur CSF1R, réduit significativement la prolifération microgliale chez le modèle *SOD1^{G93A}*, limite l'invasion du SNP par les macrophages et permet de ralentir la phase de progression de la maladie (Martínez-Muriana et al., 2016).

La microglie subit des changements phénotypiques au fur et à mesure de l'évolution de la maladie (Figure 3). Des études de lésion de la moelle épinière sur les souris *SOD1^{G93A}*, par transection laser d'un axone de la colonne latérale des segments L4-L5, ont permis de montrer que dès le stade présymptomatique (entre P60 et P90), la microglie est hautement réactive. En effet, dans ce contexte la microglie présente une capacité à s'activer ~180 fois plus élevée que celle d'une souris non mutante lésée du même âge (Dibaj et al., 2011). Dans la même étude, l'analyse des prolongements microgliaux et de leur motilité jusqu'à des stades tardifs de la maladie a permis de montrer que le nombre de microglie amœboïde diminue progressivement entre P60 et P120 et que la réponse microgliale à la

transection à un stade symptomatique est diminuée chez les souris *SOD1^{G93A}* en comparaison aux souris sauvages. D'autres études ont également démontré une évolution dans le statut microglial au cours de la SLA : il semblerait ainsi que la microglie activée aux premiers stades de la maladie adopte plutôt un phénotype de type M2, alors que la microglie à des stades plus avancés devient délétère et adopte un phénotype de type M1 (Liao et al., 2012 ; Chiu et al., 2013b ; Geloso et al., 2017) (Figure 10).

Dans la SLA, la toxicité microgliale repose essentiellement sur la production de facteurs délétères, dont des cytokines inflammatoires (e.g TNF- α , IL-1 β) et la production de ROS par les enzymes NADPH oxydases (NOX). Ces enzymes sont présentes au niveau des membranes plasmiques et transforment l'oxygène en ROS (i.e en ions superoxydes O₂⁻ et en peroxydes d'hydrogène H₂O₂) (Figure 10). Dans la cellule, les ROS peuvent endommager l'ADN, les membranes lipidiques mais aussi la conformation des protéines, induisant possiblement la formation d'agrégats et l'altération d'activités enzymatiques importantes (Barber et al., 2006 ; Boillée & Cleveland, 2008). Une surexpression de la sous-unité NOX2 de la NADPH oxydase a été rapportée dans le modèle SLA *SOD1^{G93A}* ainsi que chez les patients SLA sporadiques (Wu et al., 2006 ; Marden et al., 2007). L'impact du stress oxydant dans la maladie n'est en effet pas négligeable : Wu et collaborateurs montrent que les ROS inhibent la voie de survie motoneuronale IGF-1/Akt en altérant le récepteur à l'IGF-1 IGF-1R (Wu et al., 2006) (Figure 10). De plus, l'ablation de Nox2 chez la souris modèle SLA induit un décalage de l'apparition des symptômes. Le traitement chronique à l'apocynine, inhibiteur des Nox, a permis dans une étude de rallonger drastiquement la survie des souris *SOD1^{G93A}* de 4 mois (Harrasz et al., 2008), mais ces résultats n'ont pas pu être reproduit par la suite (Trumbull et al., 2012).

Un rôle déterminant de la microglie dans la SLA fait aujourd'hui consensus. La surexpression de la protéine SOD1 porteuse d'une mutation SLA dans la microglie induit une accélération de la phase de progression de la maladie (Beers et al., 2006 ; Xiao et al., 2007). À l'inverse, l'abolition sélective de l'expression de la SOD1 humaine mutante dans la microglie des modèles de SLA murins *SOD1^{G37R}* et *SOD1^{G85R}* permet d'allonger leur espérance de vie (Boillée et al., 2006). La protéine mSOD1 semble d'ailleurs directement impliquée dans l'induction d'une toxicité microgliale envers les motoneurons dans la SLA (Harrasz et al., 2008 ; Zhao et al., 2010 ; Roberts et al., 2013). La protéine mSOD1 est capable de stimuler l'enzyme NOX microgliale, responsable de la production de ROS toxiques pour le motoneurone. Grâce à un système de co-culture primaire de microglie et de motoneurons sauvages, Zhao et collaborateurs sont parvenus à démontrer que la SOD1 extracellulaire n'est pas directement toxique envers les motoneurons, mais via l'activation des cellules microgliales. En effet, le traitement avant co-culture de la microglie avec les protéines recombinantes *SOD1^{G93A}* ou *SOD1^{G85R}* induit leur transition vers un phénotype neurotoxique de type M1 qui s'effectue via les récepteurs de surface TLR2/4 et leur co-récepteur CD14 (Zhao et al., 2010) (Figure 10). Cela se traduit par une augmentation drastique de la production de TNF- α (39 fois plus élevé) et plus modérée d'IL-1 β , une augmentation de l'expression de NOX2 accompagnée d'une augmentation de la production de ROS, une augmentation drastique de l'expression de l'enzyme iNOS (140 fois plus élevée), une réduction de la production d'IGF-1, ainsi que par une mort motoneuronale de 60% après 7 jours de co-culture (Figure 10). De façon intéressante, la forme agrégée de mSOD1 semble potentialiser une réponse microgliale neurotoxique plus forte que la forme soluble (Roberts et al., 2013). Il a été montré que dans le cas de la SLA, la mSOD1 interagit physiquement avec NOX2 et amplifie son activation.

Les chercheurs ont récemment identifié, dans les modèles murins SLA et Alzheimer ainsi que chez les patients Alzheimer, un type de microglie activée appelée « microglie associée à la maladie » ou DAM (pour « disease associated microglia ») (Keren-Shaul et al., 2017). Les avancées dans les analyses transcriptomiques à l'échelle de la cellule unique ont permis de conclure que ces cellules possèdent une signature d'expression génique bien distincte de celle des phénotypes M1 ou M2. Cette population est retrouvée dans certaines conditions pathologiques spécifiques, notamment neurodégénératives : ce phénotype est ainsi retrouvé de façon conservée dans les différents modèles de la maladie d'Alzheimer, le modèle de SLA *SOD1^{G93A}* (Keren-Shaul et al., 2017), mais aussi des modèles de vieillissement (Holtman et al., 2015) ou de démyélinisation induite à la cuprizone (Poliani et al., 2015).

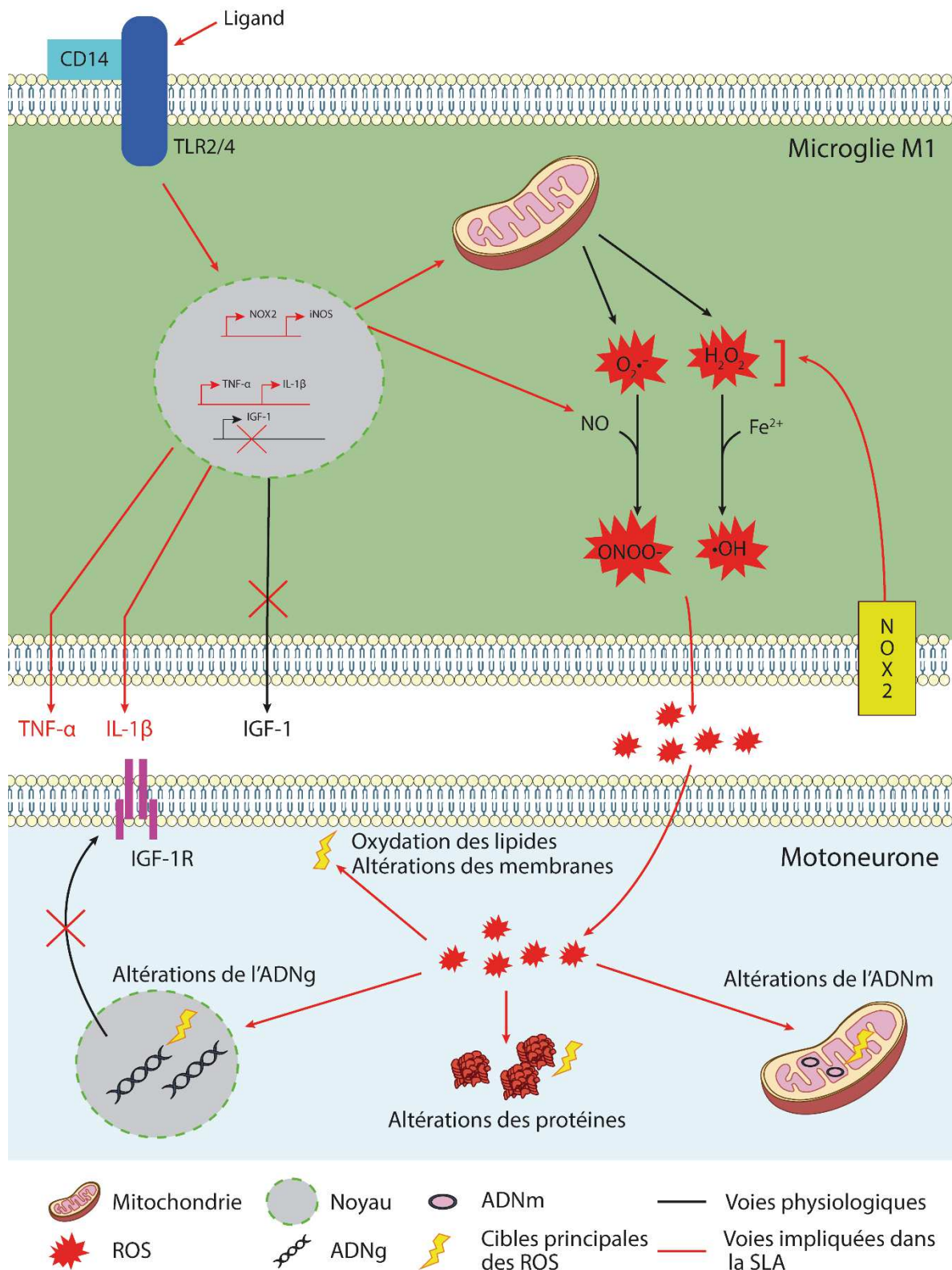


Figure 10 : La toxicité microgliale M1 envers le motoneurone dans la SLA. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires type TNF- α et IL-1 β ainsi que la libération de radicaux libres (ROS) contribuent à l'atteinte de toute la machinerie du motoneurone. La sous-expression d'IGF-1 par la microglie M1 combinée à l'altération d'expression du récepteur induite par les ROS entrave la voie de survie IGF-1/Akt nécessaire à la survie du motoneurone. Abréviations : TLR = Récepteur de type toll ; iNOS = NO synthase inductible ; NOX2 = Sous-unité 2 de la NADPH ; ADNm = ADN mitochondrial ; ADNg = ADN génomique ; H₂O₂ = Peroxyde d'hydrogène ; O₂^{•-} = ions superoxydes ; NO = monoxyde d'azote ; ONOO[•] = Peroxynitrite.

En étudiant le lien entre ces pathologies, il a été suggéré que les DAM soient induites dans les pathologies nécessitant la phagocytose de beaucoup de matériel endogène, *i.e* des cellules apoptotiques, des débris lipidiques issus de la dégénérescence (myéline) ou encore des agrégats protéiques (Figure 11). D'un point de vue transcriptomique, cette population de cellule gliale relativement homogène sous-exprime un ensemble gènes définissant la microglie homéostatique (*e.g* *P2ry12* et *Cx3cr1*), expriment certains gènes également exprimés par les types microgliaux activés M1 et M2 et surexpriment un ensemble de gènes à présent utilisés pour caractériser les DAM (*e.g* *Tyrobp*, *Cst7* et *Lpl*). Parmi eux se trouvent des gènes impliqués dans la réponse aux interférons, dans la réponse au stress, dans la fonction lysosomale et dans le métabolisme lipidique, ainsi que des gènes déjà abordés plus haut tels que *Axl* et *Trem2* (Song & Colonna, 2018). À l'aide d'un modèle Alzheimer de souris également déficientes en *Trem2*, Keren-Shaul et collaborateurs ont mis en évidence une induction des DAM à deux étapes : (1) une phase *Trem2*-indépendante, comprenant la baisse d'expression de gènes homéostatiques et l'augmentation de gènes spécifiques tels que *Tyrobp* et *Trem2* (2) une phase finale d'activation *Trem2*-dépendante. Les DAM sont des cellules hautement phagocytiques et retrouvée majoritairement au niveau des sites de lésions. Grâce à l'un des marqueurs spécifiques de ces cellules, *Lpl*, il a pu être déterminé que la quasi-totalité de la microglie associée aux plaques amyloïde β sont des DAM. Dans le modèle *SOD1^{G93A}*, les DAM représentent 6% des cellules hématopoïétiques $CD45^+$ au stade présymptomatique (80j) et 30% au stade symptomatique (135j).

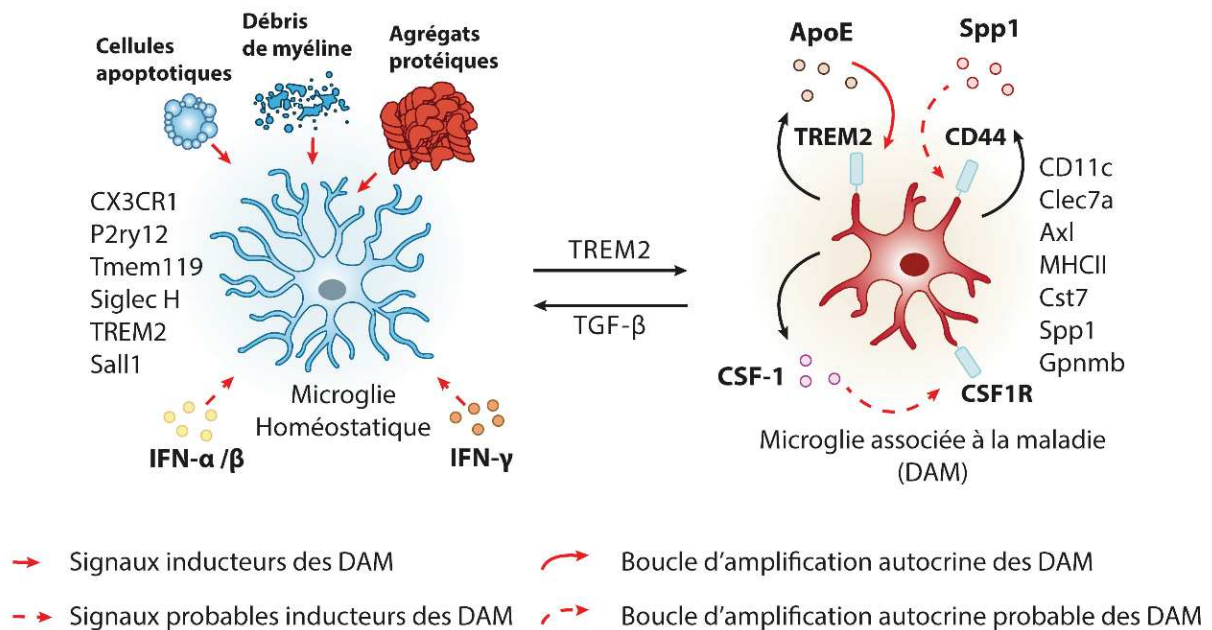


Figure 11 : Facteurs déterminants dans l'induction de la microglie associée à la maladie (DAM).

La stimulation de la microglie homéostatique, caractérisée par des marqueurs tels que *Tmem119* ou *CX3CR1*, par des signaux de phagocytose de matériel endogène (*i.e* cellules apoptotiques, débris myéliniques, agrégats protéiques) initie sa transition vers un phénotype DAM. Les DAM sous-expriment un ensemble de gènes homéostatiques et surexpriment des gènes spécifiques tels que *Spp1* ou *CD11c*. La signalisation via *TREM2* est nécessaire pour finaliser la transition en DAM, qui est ensuite maintenue par des boucles d'amplifications autocrines : Par exemple, il a été montré dans la maladie d'Alzheimer que les DAM produisent l'ApoE, qui en retour stimule *TREM2*. D'après Song & Colonna, 2018

2.2.L'astrocyte

Les astrocytes représentent une partie très importante du nombre de cellule dans le SNC, où ils occupent tous les territoires. Pendant très longtemps, la perception des fonctions astrocytaires est restée restreinte à un rôle de support neuronal. Les avancées de la recherche dans l'étude de ce type de cellule gliale dévoilent peu à peu les multiples fonctions et phénotypes qu'ils peuvent arborer. Il ne fait plus doute aujourd'hui que l'astrocyte est une cellule au rôle crucial dans le contexte physiologique ainsi que le contexte pathologique (Sofroniew & Vinters, 2010).

2.2.1. Physiologie de l'astrocyte

L'un des marqueurs immuno-histochimique le plus utilisé pour visualiser les astrocytes est la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), un filament intermédiaire du cytosquelette exprimé par les astrocytes et d'autres sous-types de cellules gliales tels que les cellules de Schwann. Morphologiquement, les astrocytes se composent d'un corps cellulaire entouré de multiples prolongements, structure particulièrement complexe chez l'homme en comparaison des astrocytes murins (Oberheim et al., 2009). Certains de ces prolongements forment des zones de contact appelées pieds astrocytaires au niveau des vaisseaux sanguins ou des synapses neuronales. Deux grandes classes d'astrocytes physiologiques ont été différenciées par les travaux de Ramon et Cajal et sont encore d'usage de nos jours : (1) les astrocytes fibreux possèdent de longs prolongements et sont situés entre les axones myélinisés de la substance blanche, où ils contactent les nœuds de Ranvier (2) les astrocytes protoplasmiques sont composés de prolongements plus courts mais très ramifiés et sont localisés dans la substance grise. Dans la substance grise, les astrocytes sont répartis de manière uniforme, en territoires individuels qui ne se superposent pas (Halassa et al., 2007). Ils forment un réseau communicant en se connectant chimiquement avec les astrocytes voisins par des structures spécialisées appelées jonction gap. Au-delà de ces deux grandes classes d'astrocytes, il existe une variété de sous-type d'astrocytes spécialisés dans certaines zones du SNC, tels que les cellules de Müller (rétine) et de Bergmann (cervelet), les pituicytes (neurohypophyse) ou encore les astrocytes positifs à Gömöri (faisceau arqué) (Khakh & Deneen, 2019).

2.2.2. Fonctions astrocytaires

Les astrocytes sont associés à des fonctions physiologiques très variées, comprenant : (1) La régulation métabolique des neurones via le stockage et la sécrétion de nutriments, (2) Le maintien de l'homéostasie, (3) La formation et la régulation de la BHE et (4) La régulation de l'activité neuronale et de la transmission synaptique.

Au cours du développement, les sécrétions astrocytaires jouent un rôle primordial dans la mise en place et la maturation du réseau neuronal. Par exemple, les astrocytes chapotent le guidage axonal en contrôlant la composition de la matrice extracellulaire, notamment par la production de protéoglycanes à chondroïtine sulfate (Powell & Geller, 1999). En plus de pouvoir directement stimuler la synaptogénèse, par exemple par la sécrétion de thrombospondines 1 et 2 et de TGF- β (Christopherson et al., 2005 ; Bialas & Stevens, 2013), les astrocytes participent à l'élagage des synapses surnuméraires, en stimulant la production focale de C1q par les neurones au niveau synaptique (Stevens et al., 2007). Comme expliqué plus haut dans la partie sur le système du complément, C1q est en amont de la cascade d'activation classique du complément. Son accumulation à la synapse permet ainsi de signaler les éléments à éliminer à la microglie.

Les astrocytes sont intimement localisés autour de la synapse et englobent les éléments pré- et post-synaptique pour former, et réguler, la synapse tripartite (Araque et al., 1999 ; Halassa et al., 2007). Les astrocytes sont des cellules excitables, qui expriment des canaux ioniques, peuvent générer des courants calciques à réception de certains neurotransmetteurs (Cornell-Bell et al., 1990) et eux-mêmes sécréter certains neurotransmetteurs tels que le glutamate, parfois appelés gliotransmetteurs (Bezzi et al., 1998). Ils jouent un rôle primordial dans la recapture de molécules libérées dans la synapse : l'expression de transporteurs spécifiques au glutamate (Mennerick & Zorumski, 1994), à la glycine, au GABA et aux ions tels que le potassium à leur membrane évite la stimulation excessive des neurones et permet le

recyclage de ces molécules solubles. Pour empêcher une accumulation excessive de glutamate au niveau de la fente synaptique, potentiellement excitotoxique, les astrocytes sont munis des transporteurs à l'acide aminé excitateur 1 (EAAT1 ou GLAST) et 2 (EAAT2 ou GLT-1).

Les jonctions gap permettent le couplage d'un grand nombre d'astrocytes et notamment des échanges ioniques. Ces structures membranaires se composent majoritairement de monomères de connexines 43 et 30 (Cx43 et Cx30 respectivement) assemblés en pores, les connexons. L'alignement des connexons de deux astrocytes forme la jonction gap. La formation de connexons a également lieu entre astrocytes et oligodendrocytes, la glie myélinisante du SNC, grâce à l'expression de connexine Cx29, Cx32 et Cx47 par ces derniers. Ce couplage astrocytes-oligodendrocytes semble nécessaire au maintien de la gaine de myéline entourant les axones.

Les astrocytes représentent un soutien métabolique fondamental pour les neurones, dont le fonctionnement dépend strictement du glucose et de ses dérivés. Les pieds astrocytaires permettent aux astrocytes d'absorber le glucose de la circulation sanguine afin de le stocker sous forme de glycogène ou de le transmettre aux neurones selon un principe appelé le shuttle du lactate d'astrocyte à neurone (Pellerin & Magistretti, 1994). L'entrée du glucose du capillaire à l'astrocyte s'effectue grâce au transporteur du glucose 1 (GLUT1). Une fois dans le cytoplasme, le glucose est transformé en lactate qui peut alors sortir de l'astrocyte et entrer dans le neurone via les transporteurs de monocarboxylate. Dans le neurone, le lactate sert de fuel métabolique pour la production d'ATP en étant transformé en pyruvate. De façon très intéressante, les astrocytes adaptent l'apport de nutriment à la demande neuronale par un processus appelé couplage neurovasculaire. En effet, les astrocytes sont capables de percevoir des hausses d'activités neuronale dans une région du SNC, en percevant la libération de glutamate dans le milieu extracellulaire par exemple, et d'augmenter le flux sanguin cérébral afin d'intensifier l'apport en glucose (Iadecola & Nedergaard, 2007). Il a été montré que les astrocytes contrôlent le débit sanguin via la sécrétion un ensemble de molécules vasodilatatrices (e.g la prostaglandine E2, l'acide epoxyeicosatriénoïque et le NO) et vasoconstrictrices (e.g l'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque).

Les astrocytes sont également des gardiens de l'homéostasie du SNC. Leur forte production de l'enzyme anhydrase carbonique leur permet par exemple de convertir le CO₂ en bicarbonate, permettant ainsi de tamponner un pH extracellulaire qui deviendrait trop acide. À l'instar du shuttle du lactate, des chercheurs ont montré récemment qu'il existe une production astrocytaire de bicarbonate dépendante de l'activité neuronale, productrice d'ions proton (Theparambil et al., 2020). Ce « shuttle du bicarbonate » est rendu possible par la présence de récepteurs purinergiques au niveau de la membrane plasmique des astrocytes, qui leur permet ainsi de produire du bicarbonate en fonction de l'ATP sécrété par les neurones en activités.

Comme la microglie, les astrocytes peuvent évoluer vers des phénotypes réactifs en contexte pathologiques. Cette transition phénotypique implique un changement morphologique mais également le gain et la perte de fonctions.

2.2.3. Activation astrocytaire dans la SLA

Une forte réactivité astrogliale est observée chez les patients SLA ainsi que dans les modèles murins de la maladie et contribue activement aux différentes phases de la maladie (Nagy et al., 1994). Les astrocytes réactifs sont encore peu nombreux à un stade pré-symptomatique mais augmentent drastiquement en nombre lors de la phase de progression (Dibaj et al., 2011b ; Boillée et al., 2006). Grâce aux modèles *in vitro* sur cellules murines ou humaines, plusieurs équipes ont montré que les astrocytes mutants SLA induisent la mort des motoneurones via la sécrétion de facteurs toxiques solubles (Nagai et al., 2007 ; Di Giorgio et al., 2007 ; Marchetto et al., 2008 ; Haidet-Pillips et al., 2011). Marchetto et collaborateurs ont étudié l'impact direct des astrocytes mutants sur la survie des motoneurones grâce à l'utilisation de co-culture d'astrocytes primaires humains exprimant la protéine *SOD1*^{G37R} ou *SOD1*^{WT} et de motoneurones dérivés de cellules souches embryonnaires humaines. En comparaison avec la condition motoneurone-astrocytes non mutants, les motoneurones cultivés avec des

astrocytes mutants SLA ont une diminution de survie de 49% après 4 semaines. Les astrocytes mutants SLA n'impactent pas la survie de neurones GABAergiques et l'expression de *SOD1^{WT}* dans les astrocytes n'a pas d'effet sur la survie motoneuronale. Dans ces expériences, les cultures d'astrocytes mutants SLA comptent deux fois plus de cellules productrices de ROS que les cultures d'astrocytes exprimant la *SOD1^{WT}*. En accord avec ces premières observations, les auteurs montrent également que les astrocytes mutants *SOD1^{G37R}* sur-expriment NOX2, iNOS et sécrètent significativement plus de NO dans le milieu que les contrôles. Intéressamment, le traitement des astrocytes mutants à l'Apocyanine, inhibiteur de NOX2, abroge totalement la mort motoneuronale induite par les astrocytes. Comme la précédente étude de Nagai et collaborateurs, ces résultats soulignent bien de la toxicité astrogliale, qui provoque spécifiquement la mort des motoneurons mettant en jeu le stress oxydatif et la voie apoptotique Bax et caspase-3 dépendante (Nagai et al., 2007). D'autres études montrent que l'ablation partielle de l'expression de mSOD1 dans des cultures d'astrocytes dérivés de patients SLA familiaux et sporadiques permet de sauver efficacement les motoneurons de la mort en condition de co-culture (Haidet-Pillips et al., 2011).

L'ablation spécifique de mSOD1 dans les astrocytes a un effet bénéfique *in vivo* qui varie légèrement en fonction du modèle utilisé. Ainsi, Yamanaka et collaborateurs montrent que la délétion de la mSOD1 astrocytaire rallonge la survie des souris *SOD1^{G37R}*, modèle de progression lente de la maladie, de 48 jours en impactant majoritairement la phase de progression tardive (Yamanaka et al., 2008). Chez ces souris, un décalage de l'activation microgliale est également observé, sans toutefois retarder l'âge d'apparition des symptômes. En revanche, l'ablation de mSOD1 dans les astrocytes du modèle de progression rapide *SOD1^{G85R}* permet le recul de l'apparition des symptômes ainsi qu'un ralentissement de la phase précoce de progression de la maladie, rallongeant la survie des souris de 37 jours (Wang et al., 2011). Il n'est pas surprenant d'observer un effet légèrement différent de la délétion de mSOD1 dans ces deux modèles de SLA, qui en plus de se différencier sur la durée de la maladie, ils se différencient également sur le comportement de la mSOD1, qui est non-fonctionnelle chez la *SOD1^{G85R}* et complètement fonctionnelle dans le modèle *SOD1^{G37R}*. Dans ce dernier, mSOD1 s'agrège tôt et essentiellement dans les astrocytes où elle induit une baisse précoce du transporteur au glutamate EAAT2, caractéristiques également compensées par l'ablation de la protéine (Bruijn et al., 1997 ; Wang et al., 2011).

Dans le contexte de la SLA, une baisse de plus de 50% de l'expression du transporteur au glutamate EAAT2 a été rapportée chez les patients et dans les modèles murins (Rothstein et al. 1995 ; Bruijn et al., 1997 ; Bendotti et al. 2001). Un excès de glutamate ou une action post-synaptique prolongée de celui-ci peut avoir lieu lorsque son recyclage par l'astrocyte est défectueux et avoir un effet excitotoxique sur le neurone. L'excitotoxicité est l'un des mécanismes mis en avant dans la dégénérescence des motoneurons. Au-delà d'un certain seuil, le motoneurone n'est plus capable de tamponner l'entrée excessive de calcium qui a lieu par ses récepteurs au glutamate (GluR) NMDA, AMPA et kaïnate. Une surcharge calcique peut alors actionner différentes voies causant des dommages au niveau mitochondrial (Kushnareva et al., 2005), un stress oxydatif et l'activation de facteurs pro-apoptotiques (D'Orsi et al., 2012 ; Armada-Moreira et al., 2020) contribuant tous à la mort du motoneurone. Les expériences *in vivo* visant à sur-exprimer EAAT2 dans les modèles SLA de souris n'ont pas d'effet sur la survie, mais l'une des études montre que cela permet de retarder la mort des motoneurons (Li et al., 2015 ; Battaglia et al., 2015). L'expression de EAAT2 peut être réprimée par de nombreuses molécules, notamment à l'état d'ARNm par des facteurs impliqués dans la SLA tels que TDP-43 et FUS (Rosenblum & Trotti, 2017). Les travaux de Jiang et collaborateurs ont permis de déterminer que l'expression de ce transporteur est positivement régulée par la protéine du réticulum endoplasmique membranaire, également sous-exprimée chez les patients et dans les modèles SLA (Jiang et al., 2019) (Figure 12). La surexpression de cette protéine dans les astrocytes *SOD1^{G93A}* permet de partiellement sauver les motoneurons de la mort *in vitro* et de rallonger, modérément mais significativement (*i.e* de 13 jours), la survie des souris *in vivo*.

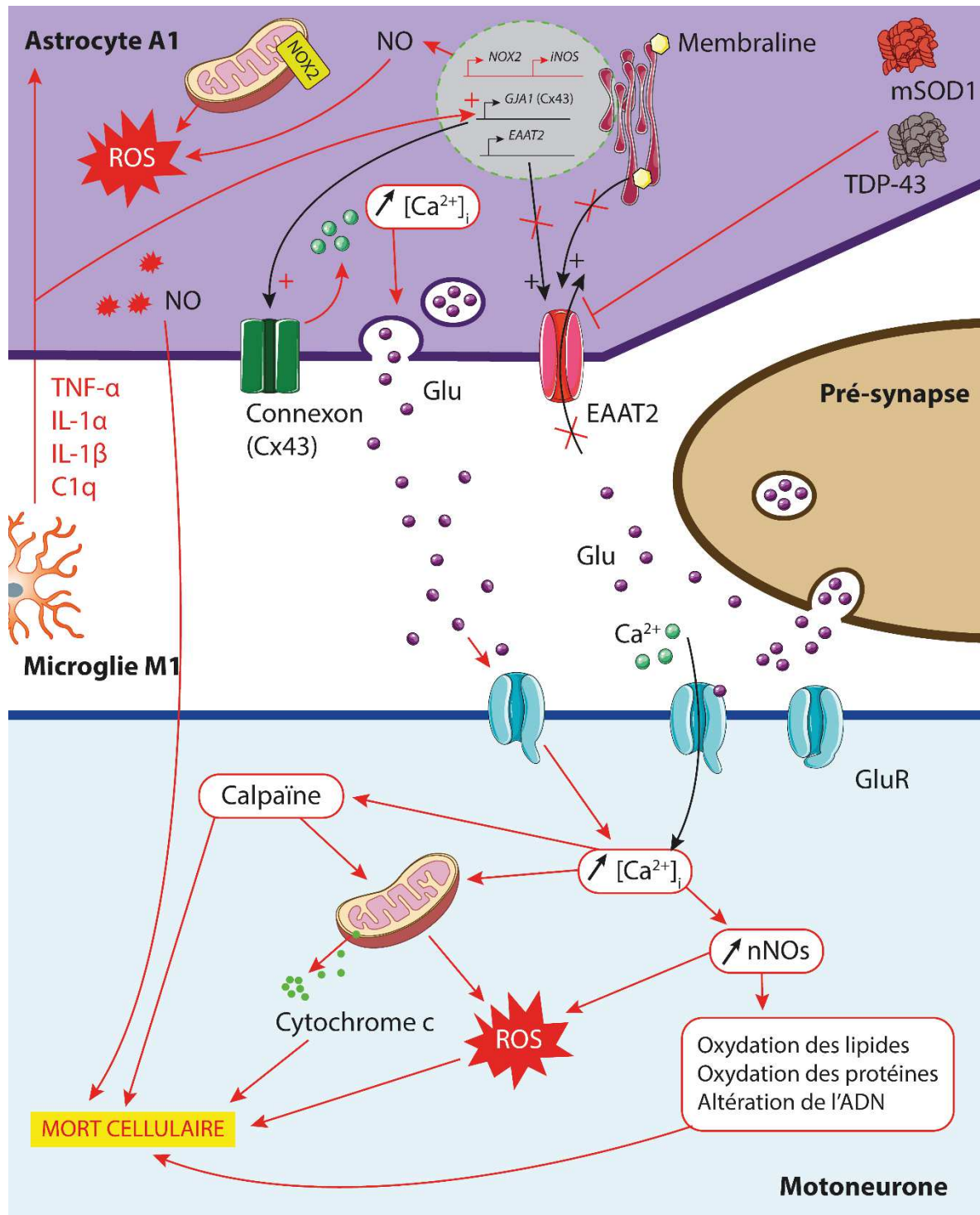
Une dérégulation des jonctions gap, et tout particulièrement une surexpression de la Cx43, a été rapportée dans le modèle SLA *SOD1^{G93A}* ainsi que chez les patients SLA sporadiques (Almad et al., 2016). Cette surexpression est également observée dans les cultures primaires d'astrocytes *SOD1^{G93A}*, où elle engrange une augmentation des connexons, des jonctions gap et une vague calcique exacerbée en réponse à différents stimuli. Le traitement des astrocytes mutants avec des antagonistes de la Cx43 permet de bloquer leur toxicité envers les motoneurons en condition de co-culture. Une précédente étude réalisée au niveau de l'hippocampe a montré que la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β par la microglie en condition inflammatoire génère une hausse d'expression de Cx43 au niveau des astrocytes. Cette augmentation se traduit chez l'astrocyte par la libération de glutamate en réponse à une hausse du calcium intracellulaire (Abudara et al., 2015). L'augmentation d'expression de Cx43 dans le contexte de la SLA pourrait donc être une réponse à la libération de TNF- α et d'IL-1 β par la microglie, ce qui participerait potentiellement au phénomène d'excitotoxicité et à la mort des motoneurons (Figure 12).

- Les astrocytes réactifs A1 et leur interaction avec la microglie dans la SLA

Dans des contextes de pathologies neurodégénératives, l'activation astrogliale peut aboutir à des phénotypes au rôle neuroprotecteur ou pro-inflammatoire à l'instar de la microglie et des macrophages. Les avancées sur ces sous-populations d'astrocytes activés sont récentes, mais apportent un nouveau regard sur les rôles que peuvent tenir ces cellules face à la maladie et nous aident à mieux comprendre les mécanismes intégrés mis en jeu lors des interactions entre les différents acteurs de la SLA. En accord avec la terminologie déjà en place, les astrocytes réactifs neurotoxiques, induits par exemple par le LPS, sont appelés A1 et les astrocytes réactifs neuroprotecteurs, observés par exemple après une ischémie, sont appelés A2 (Zamanian et al., 2012 ; Liddelow et al., 2017).

Les astrocytes A1 sont observés chez les patients SLA mais ne sont pas spécifiques de la maladie. Ils pourraient être induits dans des pathologies chroniques du SNC telles que la maladie d'Alzheimer, d'Huntington ou dans la sclérose en plaques. Ce phénotype est induit par la microglie réactive via la production de 3 facteurs solubles majeurs : TNF- α , IL-1 α et C1q. Une étude récente sur l'induction de ce phénotype astroglial suggère qu'elle pourrait en partie passer par la sécrétion par la microglie de mitochondries fragmentées qui seraient ensuite internalisées dans l'astrocyte. Une fois dans l'astrocyte, ces mitochondries fragmentées pourraient induire la fragmentation de plus de mitochondries astrogliales et induire une pathologie mitochondriale qui déclencherait la transition vers un phénotype A1 (Joshi et al., 2019). La délétion de la protéine TDP-43 dans les astrocytes leur confère un phénotype proche du phénotype A1. L'agrégation de la protéine TDP-43 dans le noyau et le cytoplasme des cellules du SNC est l'une des caractéristiques histologiques les plus répandues chez les patients atteints de SLA. En plus d'induire un phénotype de type A1 dans les astrocytes, l'ablation sélective de TDP-43 dans les astrocytes induit une surexpression de C1q au niveau microglial, une inhibition de la maturation des oligodendrocytes et des déficits moteurs, sans pour autant induire de mort motoneuronale ou de démantèlement des JNM (Peng et al., 2020).

En plus d'une perte des fonctions de base, telles que la synaptogénèse, les astrocytes A1 sont hautement toxiques envers les neurones, dont les motoneurons (à l'exception des motoneurons γ), et impactent négativement la différenciation et la maturation des oligodendrocytes (Liddelow et al., 2017). Les expériences *in vitro* utilisant leur milieu conditionné montrent que cette toxicité est médiée par la sécrétion de facteurs solubles et induit l'activation des voies apoptotiques dépendantes des caspases-2 et -3. Dans le modèle SLA *SOD1^{G93A}*, l'ablation génétique simultanée des gènes codants pour les protéines TNF- α , IL-1 α et C1q empêche presque totalement l'apparition du phénotype A1 et prolonge la survie des souris de plus de 50%, soit 70 jours (Guttenplan et al., 2020). Cet effet drastique sur la survie est accompagné d'un ralentissement important de la perte de poids, des fonctions motrices, de la dégénérescence des motoneurons et du démantèlement des JNM. Ces résultats sont particulièrement intéressants puisque l'ablation génétique de ces facteurs individuellement dans des études précédentes n'a pas montré d'effets bénéfiques sur la maladie (Gowing et al., 2006 ; Lobsiger et al., 2013).



Noyau
 Mitochondrie
 Reticulum endoplasmique
 ROS

Figure 12 : La toxicité astrocytaire dans la SLA et l'influence de la microglie M1 sur ce phénotype délétère. La suractivation des récepteurs glutamatergiques (GluR) au niveau du motoneurone induit une hausse de la concentration en calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) et active différentes voies participant à la mort du motoneurone : la voie mitochondriale, le stress oxydatif et la voie des calpaïnes. Cette excitotoxicité est en partie promue par les astrocytes mutants SLA qui, une fois activés, sous-expriment le transporteur au glutamate (Glu) EAAT2 et sécrètent du glutamate. Par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires spécifiques, la microglie réactive induit la transition phénotypique des astrocytes en astrocytes A1 et participent à l'excitotoxicité en favorisant la surexpression de la connexine 43 (Cx43).

- La population astrocytaire Aba (AbGC) dans la SLA

Les cellules aberrantes positives à la GFAP ont été mises en évidence depuis peu et semblent particulièrement, si ce n'est exclusivement, retrouvées dans le contexte pathologique de la SLA. Elles forment une population de cellules de phénotype astrocytaire réactif encore peu connue et qui a été l'objet d'une des parties de la revue de littérature « How Degeneration of Cells Surrounding Motoneurons Contributes to Amyotrophic Lateral Sclerosis » (Crabé et al., 2020) effectuée au cours de ma thèse. Cette revue est disponible dans la partie Résultats de ce manuscrit pages 125 à 142.

III. Projets de thèse

1. L'étude des cellules NK et du récepteur de cytotoxicité naturelle Ncr1 dans la SLA

1.1. Les cellules Natural Killer

Les cellules Natural Killer sont des lymphocytes cytotoxiques dépourvus de complexe récepteur TCR/CD3 ou d'Ig membranaires. Ces lymphocytes possèdent donc un système alternatif d'activation reposant sur l'intégration de signaux provenant d'un ensemble de récepteurs membranaires et peuvent ainsi exercer leur fonction de façon indépendante.

1.1.1. Origine embryonnaire, différenciation et maturation

A l'instar des lymphocytes T et B, les NK dérivent de la différenciation du progéniteur CLP à partir de cellules souches hématopoïétiques (Figure 7). Elles font partie d'un ensemble de cellules innées classifiées récemment sous le terme de cellules lymphoïdes innées ou ILC. Les ILC sont subdivisées en trois types en fonction de l'éventail de cytokines qu'elles produisent. Les cellules NK appartiennent aux ILC de type 1, caractérisées en partie par leur capacité à sécréter l'IFN- γ (Spits et al., 2013). Leur engagement dans la voie de différenciation NK est majoritairement dépendant de la signalisation du facteur de transcription Id2 (inhibiteur de liaison à l'ADN 2), T-bet et Eomes (Gordon et al., 2012). De nombreuses étapes de différenciation, identifiables par l'exposition d'une combinaison précise de marqueurs de surfaces, séparent le stade précurseur pré-NKP (pré-précurseur NK) du stade de maturation terminal F (Figure 13).

1.1.2. Marqueurs des NK et sous-population

Les cellules NK dites conventionnelles sont des lymphocytes circulants dans le sang et résidents dans la rate. Des sous-types de NK existent, comme les NK résidentes du foie (Aw Yeang et al., 2017), les NK utérines (uNK) présentes durant la grossesse (Moffett & Colucci, 2014), et les cellules Natural Killer T (ou NKT) qui se trouvent à l'interface entre les cellules NK et les lymphocytes T puisqu'elles sont dotées d'un TCR mais expriment des marqueurs NK (Vankaer, 2007). Nous nous focaliserons dans ce projet sur les cellules NK conventionnelles.

De nombreux marqueurs existent pour étudier les cellules NK conventionnelles, mais aucun n'est véritablement spécifique. Pour les études de cytométrie de flux, les marqueurs de surface les plus utilisés pour l'étude de la souris sont CD49b, NK1.1 (également appelé KLRB1c ou NKRP1c), NKp46 (aussi appelé NCR1 ou CD335), CD11b et KLRG1 (Figure 13).

1.1.3. Fonctions des cellules NK

Les cellules NK circulant dans le sang interviennent principalement dans la défense de l'organisme contre le cancer et les infections via leur action cytotoxique. Elles peuvent également infiltrer des tissus sous l'influence de différentes cytokines telles que l'IL-2 et sont elles-mêmes impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire par la production de cytokines et chimiokines. Chez l'homme, environ 90% des NK circulantes sont CD3⁻; CD56^{faible}; CD16⁺ et sont cytotoxiques. Les 10% restantes sont CD3⁻; CD56^{fort}; CD16⁻ et plutôt focalisées sur l'immunorégulation (Jacobs et al., 2001). Les cellules NK résidentes des organes lymphoïdes secondaires sont principalement des acteurs de l'immunorégulation également.

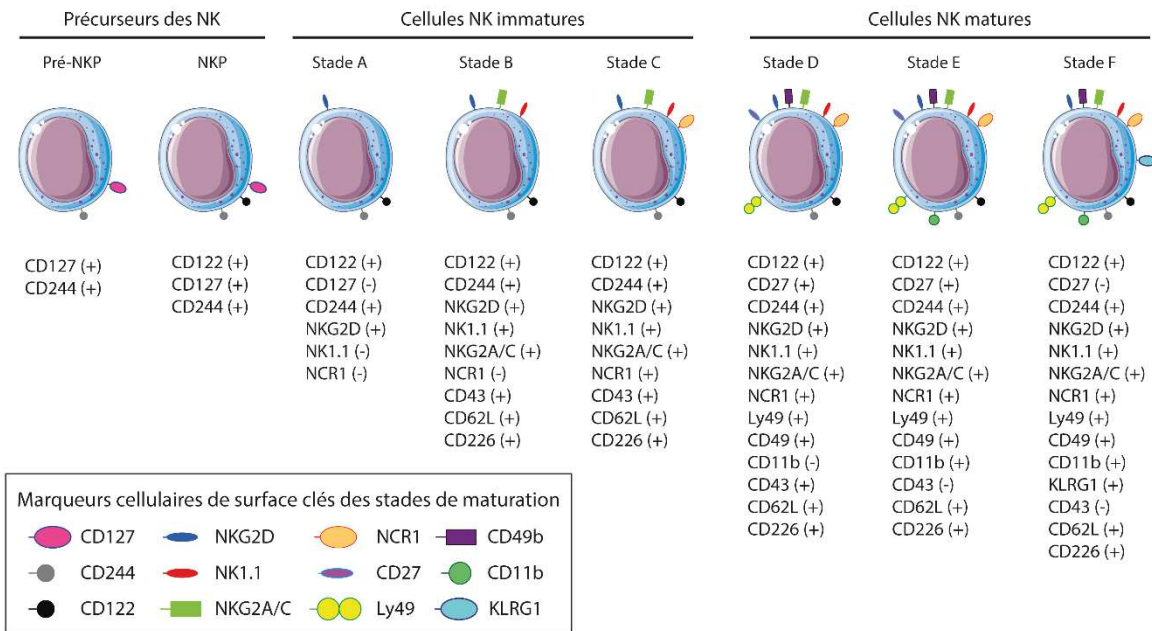


Figure 13 : Les étapes de maturation des cellules NK chez la souris et les marqueurs de surfaces associés, du stade de précurseur pré-NKP au stade complètement mature F. Chaque étape de maturation des cellules NK se caractérise par une combinaison spécifique de marqueurs de surface. D'après Abel et al., 2018

- Cytotoxicité : la balance entre signaux inhibiteurs et activateurs

Les cellules NK ne sont pas activées par la présentation d'un antigène par une cellule CPA. Leur activation est provoquée : (1) par une forte stimulation de leurs récepteurs activateurs, tels que les récepteurs à lectine de type C (NKG2D, NKG2C) ou les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR1, NCR2, NCR3, aussi appelés NKp30, NKp44, NKp46) (2) par une stimulation faible ou nulle de ses récepteurs inhibiteurs, tels que les récepteurs inhibiteurs des leucocytes (LIR1, LAIR-1) ou les récepteurs inhibiteurs des killers (KIR) tels que Ly49 ou NKG2A (Masilamani et al., 2006 ; Kirwan & Burshtyn, 2007). La reconnaissance du CMH-I à la surface des cellules du soi est un inhibiteur puissant de l'activation des NK, ce qui les empêche de tuer les cellules endogènes. Les cellules NK expriment des combinaisons différentes de récepteurs inhibiteurs et activateurs parmi l'éventail de récepteurs présentés dans la figure 14, ce qui leur confère une hétérogénéité avantageuse pour la reconnaissance de différents pathogènes (Malnati et al., 1993). Les récepteurs NKp46 et NKG2D sont par contre exprimés par toutes les cellules NK.

Une fois activée, la cellule NK peut induire l'apoptose de cellules cibles par la voie perforine / granzyme ou par l'activation des récepteurs de mort. Il a été montré que l'activation de ces cellules est hautement dépendante de l'augmentation de leur métabolisme glycolytique, qui représente donc une étape clef de l'engagement dans les voies effectrices (Donnelly et al., 2014 ; Poznanski & Ashkar, 2019) (Figure 14). Dans le premier cas, la cellule NK réorganise son cytosquelette d'actine afin d'orienter ses granules, appelés lysosomes sécrétoires, vers la synapse immunitaire formée avec la cellule cible. Lors du processus de dégranulation, les lysosomes sécrétoires fusionnent avec la membrane de la cellule cible et y déversent leur contenu, composé notamment de la perforine et de granzyme (Pardo et al., 2002). L'activation des cellules NK est généralement mesurée en mesurant l'expression du marqueur de surface CD69 ou de CD107a pour témoigner de leur dégranulation (Clausen et al., 2003 ; Alter et al., 2004).

Pour activer les récepteurs de mort de la cellule cible, les cellules NK expriment FasL, TNF- α et le ligand inducteur d'apoptose relié au TNF (TRAIL) (Hashimoto et al., 1999 ; Screpanti et al., 2001 ; Takeda et al., 2002) (Figure 14). Ces deux voies sont régulées de façon indépendante. Par exemple, lorsque les cellules NK éliminent des cibles « en série », il semblerait qu'elles aient d'abord recours à la dégranulation puis à la production de ligand des récepteurs de mort dans un deuxième temps (Prager et al., 2019).

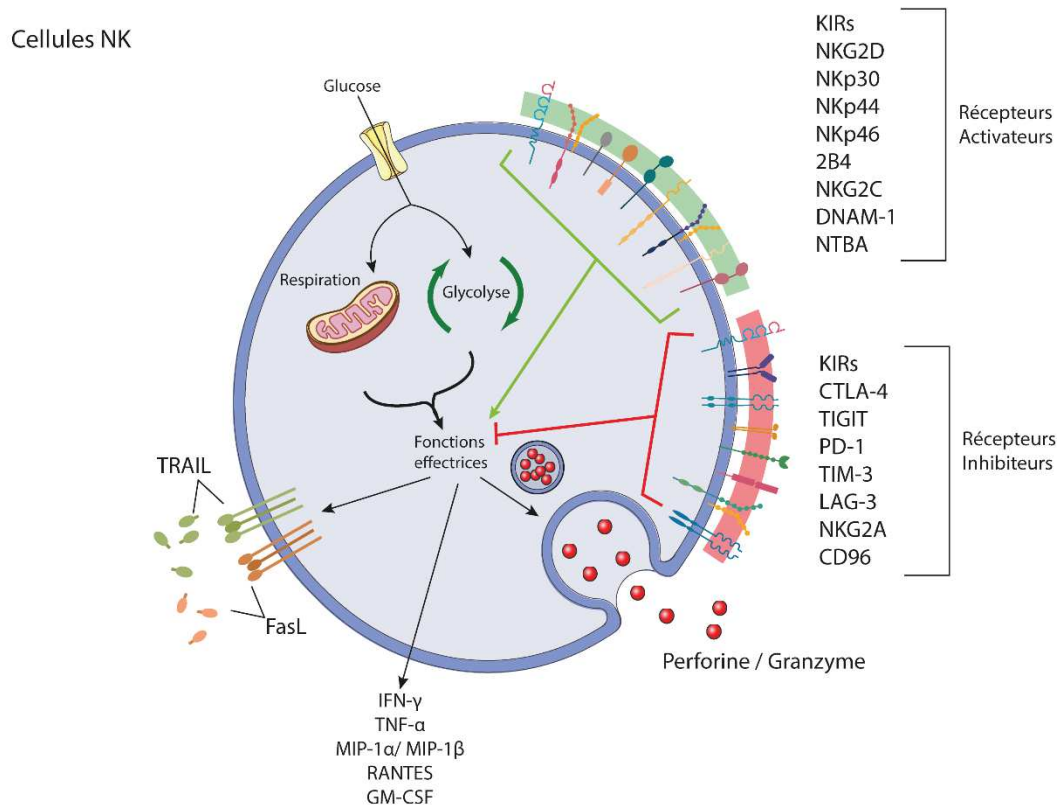


Figure 14 : La balance inhibitrice/activatrice des fonctions effectrices de la cellule NK. Les cellules NK peuvent exprimer une grande diversité de récepteurs activateurs et inhibiteurs des fonctions effectrices. L'engagement dans les voies effectrices est intimement lié à l'augmentation du métabolisme du glucose dans les NK. L'induction de l'apoptose de la cellule cible peut engager la voie de sécrétion lysosomale, impliquant la libération des perforines et granzymes, ou la voie d'activation des récepteurs de mort, par la production de ligand tels que TRAIL ou FasL. L'activation des NK peut également aboutir à la sécrétion de nombreux immunomodulateurs : des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ / TNF- α) et des chimiokines telles que les MIP-1, RANTES et le GM-CSF. D'après Piñeiro Fernández et al., 2019

- Régulation de la réaction immunitaire

En fonction de l'identité de la cellule cible, les cellules NK développent différents degrés d'activation (de 1 à 4) et sécrètent en fonction différentes molécules immunorégulatrices (Fauriat et al., 2010). Les cellules NK sont en effet capables de produire des cytokines pro-inflammatoires (*i.e* TNF- α et IFN- γ) ainsi que des chimiokines afin d'amplifier la réponse immunitaire en recrutant et stimulant d'autres leucocytes (Une partie de ces molécules sont listées dans la figure 14). Les protéines inflammatoires des macrophages (MIP-1 α et MIP-1 β) semblent toujours sécrétées en cas d'activation alors que le TNF- α semble nécessiter une activation de degré 2 pour être libéré par la cellule NK. L'IFN- γ , l'un des médiateurs les plus puissants de l'inflammation, est lui libéré lors d'activation forte de la cellule, aux

degrés 3 et 4. La sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK est par exemple un acteur fondamental dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes T auxiliaires T_H 1, eux-mêmes producteurs d'IFN- γ après différenciation (Morandi et al., 2006).

La recherche découvre peu à peu le rôle de régulation des NK dans l'immunité du SNC et la neuroinflammation. Dans les maladies auto-immunes démyélinisantes du tissu nerveux, telles que la SEP ou l'EAE, les NK infiltrent le SNC et ont un rôle d'inhibition des CD4⁺ activés de façon aberrantes envers des molécules endogènes (Zhang et al., 1997 ; Hertwig 2016 ; Segal, 2007).

1.2. Le récepteur de cytotoxicité naturelle NCR1

NCR1 (NKp46, Ly94 ou CD335) est un récepteur membranaire au rôle majeur dans l'activation des fonctions effectrices des cellules NK (Figures 14 & 15). C'est l'unique récepteur de cytotoxicité naturelle (NCR) conservé chez la souris, qui correspond chez l'homme au récepteur NKp46 (Sivori et al., 1997 ; Pessino et al., 1998 ; Sivori et al., 1999). Il constitue l'un des marqueurs les plus spécifiques des cellules NK circulantes conservé chez le mammifère (Walzer et al., 2007 ; Lai & Mager, 2012). NCR1 est exprimé par toutes les cellules NK, par certaines ILC et par de petites sous-populations d'origine lymphoïde telles que les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Barrow et al., 2019 ; Stewart et al., 2007). Plusieurs ligands pathogènes sont reconnus par NCR1 tels que l'hémagglutinine du virus de la grippe, la vimentine exprimée par les monocytes infectés par *Mycobacterium tuberculosis* et de nombreux ligands à la surface des cellules tumorales (Mandelboim et al., 2001 ; Garg et al., 2006 ; Glasner et al., 2012). En plus de son rôle dans l'activation des cellules NK face à de nombreux pathogènes, NCR1 reconnaît des ligands encore non-identifiés au niveau des cellules β du Pancréas, impliquant les cellules NK dans le développement du diabète de type I (Gur et al., 2010). Dans les cellules NK, il a également été montré que NCR1 est nécessaire à l'expression du ligand pro-apoptotique TRAIL, qui est l'une des voies utilisées par les NK pour lyser leur cible (Sheppard et al., 2018). Plus récemment, le premier ligand endogène de NCR1 a été identifié comme étant la protéine du complément properdine, mais aucune fonction relative à cette interaction n'a été identifiée à ce jour (Narni-Mancinelli et al., 2017).

1.2.1. Protéine NCR1

Le récepteur NCR1 appartient à la superfamille des glycoprotéines transmembranaires de type Ig. Cette protéine se compose en effet de deux domaines de type Ig en extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine intracellulaire. La partie intracellulaire de NCR1 ne semble pas impliquée dans la transmission du signal en intracellulaire. Le domaine transmembranaire est quant à lui composé d'acides aminés arginine (R) chargés positivement qui permettent son association avec des corécepteurs, capables de transmettre le signal d'activation à la cellule par autophosphorylation de leurs tyrosines (Pessino et al., 1998). Les deux corécepteurs, CD3 ζ et Fc ϵ RI γ , interagissent avec NCR1 grâce à la charge négative conférée par les aspartates (D) de leurs domaines membranaires sont porteur de domaines ITAM (pour « motif d'activation à base de tyrosine d'immunorécepteur ») qui sont phosphorylés par la kinase Src après liaison du ligand. La voie de signalisation intracellulaire qui découle de l'interaction de NCR1 et de ses ligands transmet un signal activateur aux cellules NK par l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire (Sivori et al., 1997) ainsi que la réorganisation du cytosquelette (détaillé dans la Figure 15).

1.2.2. Génétique

Le gène humain *NCR1* est localisé au niveau du locus du complexe de récepteurs des leucocytes (LRC) sur le bras court du chromosome 19 (Pessino et al., 1998). Le gène murin *Ncr1* est localisé dans la région synténique du chromosome 19 humain, au niveau du chromosome 7. La transcription du gène est régulée positivement par la liaison du facteur de transcription RUNX3 dans la région régulatrice en amont du gène (Lai & Mager, 2012).

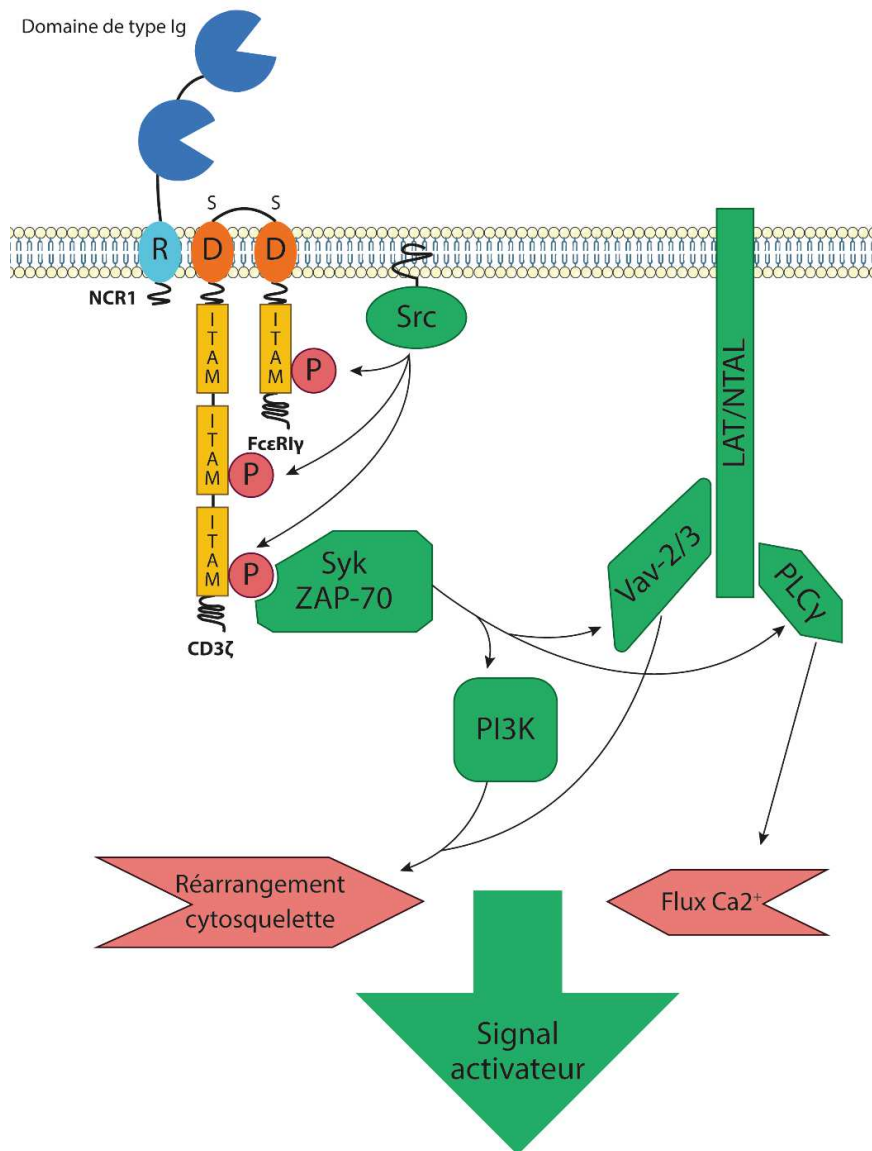


Figure 15 : Voie de signalisation canonique du récepteur NCR1 (NKp46) impliquée dans l'activation de la cellule NK. NCR1 est composé de deux domaines extracellulaires de type Ig, d'un domaine transmembranaire et d'un court segment intracellulaire. La transmission du signal s'effectue via l'association non-covalente des acides aminés chargés positivement de son domaine transmembranaire, avec les acides aminés chargés négativement des domaines transmembranaires de ses corécepteurs, CD3ζ et FcεRIγ. Les corécepteurs sont munis de motif ITAM, qui subissent la phosphorylation de leurs tyrosines par la kinase Src après liaison du ligand en extracellulaire. La cascade de signalisation en aval implique le recrutement des kinases Syk/ZAP-70 qui induisent : (1) la phosphorylation des protéines adaptatrices transmembranaires LAT et NTAL (2) l'activation de la PI3 kinase (PI3K) et de la phospholipase C γ (PLCγ) (3) l'activation des facteurs d'échanges de la guanine (GEF) régulateurs de l'actine Vav-2 et Vav-3. Le flux calcique et le réarrangement du cytosquelette qui découlent de ces voies permettent ensuite de promouvoir l'activation de la cellule NK. Abréviations : Ig = immunoglobuline ; CD3ζ = chaîne ζ du récepteur CD3 ; FcεRIγ = chaîne γ du récepteur à la partie Fc des immunoglobulines de type E ; ITAM = motif d'activation à base de tyrosine d'immunorécepteur ; LAT = lien pour l'activation des cellules T ; NTAL = lien pour l'activation des cellules non-T ; R = Arginine ; D = Aspartate. Inspiré de Koch et al., 2013

1.3. Les cellules NK dans la SLA

Comme nous l'avons vu plus haut, les cellules NK sont capables d'infiltrer le CNS dans certains contextes pathologiques tels que l'EAE, et peuvent participer à la résolution de l'inflammation dans le SNC, notamment par la modulation des lymphocytes T CD4⁺. Les lymphocytes NK s'affranchissent également de signal antigénique précis pour effectuer leur fonction cytotoxique, et peuvent parfois s'attaquer à des cellules du soi en cas de dysfonctionnement, comme dans le cas du diabète du type 1. Il est donc important d'étudier ces cellules aux multiples rôles dans le contexte de la SLA. Les cellules NK sont cependant difficiles à étudier en raison du manque de spécificité des marqueurs utilisés, et les résultats disponibles à ce jour concernant leur implication dans la SLA manquent de consensus.

En périphérie, le nombre de cellules NK circulantes, basé sur le phénotype CD56⁺ ; CD3⁻, semble être plus élevé chez les patients SLA que chez les individus contrôles (Murdock et al., 2017 ; Jin et al., 2020). Il ne semble pas y avoir de corrélation entre le nombre de cellules NK et le score ALSFRS-R. Ce phénomène n'est cependant pas observé systématiquement, bien que les marqueurs utilisés soient les mêmes que dans les articles précédents (Garofalo et al., 2020). L'étude de Garofalo et collaborateurs observe en effet une baisse du nombre de cellules NK CD56⁺ ; CD3⁻ circulantes. Ajouté à l'observation par immunomarquages de cellules NCR1⁺ (NKp46⁺) dans le cortex et la moelle épinière de patients, ce résultat est alors interprété par les auteurs comme la conséquence d'une infiltration des cellules NK dans le SNC.

Au niveau central, la majorité des études rapportent une infiltration des NK dans le SNC des modèles de souris SLA. Les quantifications de ces infiltrats sont cependant peu homogènes et varient de 3 à 30% du total des cellules CD45⁺ dans la moelle épinière entre les différentes études (Chiu et al., 2008 : 19% de NK1.1⁺ parmi les CD45⁺ ; Komine et al., 2018 ~30% de NK1.1⁺ dans les CD45⁺ ; Garofallo et al., 2020 : ~3% de NK1.1⁺/CD3⁻ dans les CD45⁺). Concernant le potentiel rôle de ces cellules dans la pathogénèse de la SLA, les données divergent également. L'augmentation artificielle de l'infiltration des cellules NK dans le SNC via l'injection intrapéritonéale d'IL-2, une cytokine capable d'induire la prolifération et l'activation des cellules NK et des lymphocytes T, n'a pas montré d'impact sur la survie des souris *SOD1^{G93A}* (Effectué à 100j dans Komine et al., 2018). Dans la même étude, l'ablation des cellules NK grâce à l'utilisation d'anticorps anti-NK1.1 n'a pas montré d'effet sur la survie des souris modèles SLA (Komine et al., 2018). De façon étonnante, les travaux de Garofalo et collaborateurs utilisant le même paradigme expérimental dans les modèles SLA *SOD1^{G93A}* et *TDP43^{A315T}* apportent des résultats drastiquement différents. Dans ces deux modèles, l'administration répétée d'anti-NK1.1 de la 8^e à la 11^e semaine permet d'allonger la survie (~8 jours et ~15 jours respectivement) et de décaler l'âge d'apparition de la paralysie (~1 semaine pour *SOD1^{G93A}*) (Garofallo et al., 2020). Dans cette même étude, les auteurs montrent que les NK entrent dans le SNC en partie sous l'influence de CCL2 (pour chimiokine ligand 2, aussi appelée MCP-1 pour protéine chimi-attractante des monocytes 1) et exercent une activité cytotoxique envers les motoneurons mutants SLA via le récepteur activateur NKG2D. En plus de l'attaque des motoneurons, l'IFN- γ sécrété par les NK activées induirait alors la transition de la microglie vers un phénotype pro-inflammatoire et empêcherait le recrutement des lymphocytes CD4⁺ dans le SNC. Cette étude récente propose ainsi un rôle central des cellules NK dans la SLA, qui orchestreraient à la fois la neuro-inflammation et la mort des motoneurons par cytotoxicité directe.

1.4. Objectif du projet de thèse

L'ensemble des études portant sur le rôle des cellules NK dans la SLA ne permettent pas de conclusion définitive sur leur dynamique et leur rôle en central et en périphérique. L'objectif de ce premier projet est de d'identifier le rôle joué par les cellules NK dans le modèle de SLA *SOD1^{G93A}* à travers le traçage *in vivo* de ces cellules grâce à un marqueur GFP endogène sous le contrôle du marqueur spécifique NCR1. L'étude du rôle de ce récepteur majeur de l'activation des cellules NK est également étudiée par ablation génétique de son expression dans le modèle *SOD1^{G93A}*. Les données obtenues au cours de ce projet ainsi que la discussion des résultats sont disponibles dans l'article « Deletion of the Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 1 Does Not Influence Motoneuron degeneration and Life Expectancy of ALS Mice » (Crabé et al., en attente de soumission), dont le manuscrit est joint à la partie résultat de cette thèse pages 81 à 110.

2. L'étude du rôle du facteur P du complément properdine dans la SLA

Le facteur P du complément, également appelé la properdine, est une glycoprotéine circulante découverte en 1954 par Louis Pillemer. Elle est décrite à l'époque comme une nouvelle protéine du sérum qui « participe à des activités diverses comme la destruction de bactéries, la neutralisation de virus, et la lyse de certaines hématies » (Pillemer et al., 1954). Son rôle dans l'amplification de la voie alterne du complément est de plus en plus élucidé, mais des fonctions secondaires de cette protéine, dans la reconnaissance de motifs DAMPs par exemple, commencent également à émerger dans la littérature. La properdine est au cœur de ce deuxième projet de thèse, qui consiste à caractériser le rôle de cette protéine, notamment de ses fonctions secondaires, dans le SNC de souris mutante SLA.

2.1. Protéine

2.1.1. Origine cellulaire et sécrétion

Contrairement aux autres protéines du complément, properdine n'est pas synthétisée par les hépatocytes mais essentiellement par les leucocytes. De nombreux types cellulaires sont responsables du maintien d'un niveau de properdine circulante stable, à des concentrations moyennes de 4 à 25 µg/ml de sérum (Pangburn et al., 1989 ; Cortes et al., 2013 ; Xu et al., 2008). La liste des types cellulaires impliqués dans la synthèse de properdine ainsi que les stimuli nécessaires à sa sécrétion sont listés page suivante (Tableau 5). La concentration de properdine peut être augmentée localement et ponctuellement en étant relarguée par certains types cellulaires après activation. Wirthmuller et associés ont ainsi été les premiers à montrer que des quantités importantes de properdine sont stockées dans les granules secondaires des neutrophiles. Ces stocks peuvent être rapidement libérés suite à leur dégranulation après leur activation par différents chémoattractants. Les auteurs montrent ainsi que les molécules qui déclenchent la libération la plus rapide de properdine sont des agonistes de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) telles que fMLP, C5a et l'IL-8 (Wirthmueller et al., 1997).

2.1.1. Domaines peptidiques et interactions

Un monomère de properdine mature se compose de 442 acides aminés et possède une masse moléculaire d'environ 53kDa. Les analyses de microscopie électronique récentes ont permis de montrer qu'un monomère se présente sous la forme d'un « bretzel », plutôt qu'un bâtonnet comme postulé originellement (Pedersen et al., 2021 ; Smith et al., 1984).

La properdine est composée de 6 domaines de répétition thrombospondine de type I (TSR), nommés TSR1 à TSR6 de l'extrémité N-terminale (N-ter) à l'extrémité C-terminale (C-ter). Ils se caractérisent par la conservation de 6 résidus cystéines (Sun et al., 2004 ; Pedersen et al., 2019) et adoptent chacun une conformation en « vortex », avec une partie centrale composée de 3 feuillets β anti-parallèles stabilisés par 3 ponts disulfures (Pedersen et al., 2019).

Type cellulaire	Forme mise en évidence	Type de sécrétion/Stimulus	Référence bibliographique
Monocytes	Protéine	Constitutive	Whaley et al., 1980
Cellules dendritiques	Protéine, ARNm	Constitutive	Reis et al., 2006 Li et al., 2011
Lymphocytes T	ARNm	Constitutive	Schwaeble et al., 1993
Granulocytes mastocytes	Protéine	Constitutive	Stover et al., 2008
Neutrophiles	Protéine, ARNm	Stimulus: TNF-a, TNF/fMLP, PMA Stimulus: TNF-a, C5a, IL-8, fMLP	Wirthmuller et al., 1997 Camous et al., 2011
Cellules endothéliales	Protéine, ARNm	Stimulus: Contraintes de cisaillement	Bongrazio et al., 2003
Adipocytes	Protéine, ARNm	Constitutive	Peake et al., 1997 Patrick et al., 2009

Tableau 5 : Liste des sources connues de properdine. D'après Cortes et al., 2013

Les TSR1 à 5 sont identiques et se composent d'environ 60 acides aminés (Nolan et al., 1992). Le TSR6 se différencie des autres par l'insertion de 31 résidus d'acides aminés supplémentaires. En extrémité N-terminale du peptide se trouve un peptide signal de 27 acides aminés permettant l'adressage de la protéine dans les voies de sécrétion (Nolan et al., 1992). La properdine se compose aussi d'un domaine TSR0, situé après le peptide signal et qui a longtemps été décrit comme une version tronquée d'un domaine TSR. Les méthodes d'analyses récentes de cristallographie ont permis de démontrer que cette partie de la protéine adopte une forme globulaire à deux feuillets β et une hélice α , lui conférant la conformation d'un domaine de liaison au TGF β (domaine TB) et non pas d'un domaine TSR (Pedersen et al., 2019 ; Van den bos et al., 2019). Les TSR sont des domaines impliqués dans les interactions cellule/cellule et cellule/matrice. Higgins et collaborateurs ont invalidé sélectivement chaque TSR de la properdine pour en déterminer la fonction (Higgins et al., 1995). Grâce à ces travaux et aux études qui ont suivi, nous savons par exemple que le TSR 5 n'est pas impliqué dans l'oligomérisation de la protéine mais participe à la liaison de C3b et à l'interaction de properdine avec les sulfatides (Holt et al., 1990). Les fonctions connues à ce jour de chaque TSR ou motif peptidique de properdine sont résumées dans le [tableau 6](#).

2.1.1. Modifications post-traductionnelles

Les domaines TSR de properdine possèdent tous des motifs aminés WXXWXXW, les tryptophanes (W) représentant autant de sites potentiels de C-Mannosylation (Hartmann & Hofsteenge, 2000). A la sortie du réticulum endoplasmique, un monomère de properdine peut ainsi comporter jusqu'à 17 C-mannosylation, 1 N-glycosylation et 4 O-fucosylation, ce qui en fait une protéine hautement glycosylée (Gonzalez de Peredo et al., 2002 ; Yang et al., 2016). Ces modifications confèrent à la properdine une forte charge positive, avec un point isoélectrique $pI > 9,5$ (Fearon & Austen, 1975). La charge de properdine joue un rôle clef dans ses interactions biochimiques. La properdine possède également de nombreux ponts disulfures, dont 3 au niveau du TSR0 qui lui permettent d'adopter une conformation de domaine TB (Pedersen et al., 2019).

Domaines / motifs	Fonction / interactions moléculaires	Références bibliographiques
Domaine TSR0 / TB	Liaison putative au TGFβ Rôle dans l'oligomérisation par interaction avec un TSR4	Pedersen et al., 2019; Van den Bos et al., 2019
Domaine TSR1	Rôle dans l'oligomérisation par interaction avec le TSR6 d'un autre monomère	Pedersen et al., 2019; Van den Bos et al., 2019
Domaine TSR2		
Domaine TSR3		
Domaine TSR4	Stabilisation de la C3 convertase Liaison au Facteur B Rôle dans la maturation (formation de trimères et tétramères) par interaction avec un domaine TB Liaison aux nanotubes de carbones fonctionnalisés	Higgins et al., 1995 Pedersen et al., 2019; Van den Bos et al., 2019 Kouser et al., 2018
Domaine TSR5	Liaison à C3b et au sulfatide Liaison aux nanotubes de carbones fonctionnalisés	Higgins et al., 1995 ; Holt et al., 1990; Pedersen et al., 2019 Kouser et al., 2018
Domaine TSR6	Indispensable à l'oligomérisation par interaction avec TSR1 d'un autre monomère Liaison à FB ou Bb pour stabiliser la C3 convertase	Higgins et al., 1995 Pedersen et al., 2019; Van den Bos et al., 2019
Motif CSVTCG	Interaction avec CD36 Interaction avec les sulfatides	Sun et al., 2004 Holt et al., 1990

Tableau 6 : Fonctions et interactions moléculaires attribuées aux domaines protéiques et motifs d'acides aminés présents dans un monomère de properdine.

2.1.2. Oligomérisation

La forme monomérique de properdine n'est pas présente dans le sérum. L'oligomérisation des monomères de properdine a lieu avant leur sécrétion de la cellule et permet la formation de structures stables en conditions non-dénaturantes. Ils s'organisent en structures cycliques par association en tête à queue, comme le révèlent plusieurs études de microscopie électronique et de cristallographie (Smith et al., 1984 ; Pedersen et al., 2019). Deux points de contacts possibles entre deux monomères de properdine ont été mis en évidence : l'interaction du TSR0 d'un monomère avec le TSR4 d'un deuxième ; l'interaction du TSR1 d'un monomère avec les TSR6 d'un deuxième. En condition physiologique, la properdine peut être retrouvée dans le sérum sous forme de dimères (P₂) ; trimères (P₃) ; tétramères (P₄) à des ratios respectifs d'environ 26% ; 54% ; 20%. (Pangburn et al., 1989). Le degré d'oligomérisation de properdine a directement été relié à sa fonction dans la voie alterne du complément, les formes de plus haut poids moléculaire étant les plus efficaces (Pangburn et al., 1989 ; Pedersen et al., 2017). Des formes de très haut poids moléculaire de la properdine, alors nommée properdine « activée » ou P_n, ont également été mis en évidence (Pillemer et al., 1954). L'absence de ces formes de properdine du sérum humain (Pangburn et al., 1989) a rapidement permis d'émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'artéfacts issus d'une agrégation non-physiologique de la protéine lorsqu'elle est soumise à des cycles de congélation/décongélation trop importants ou à une conservation trop prolongée à 4°C (Farries et al., 1987 ; Pangburn et al., 1989).

2.2. Génétique

2.2.1. Gène humain

La séquence génomique codant pour la protéine properdine humaine se situe au niveau du gène *CFP*, localisé entre les positions Xp11.3-p21.1 du bras court du chromosome X (Ash et al., 1994, Goundis et al., 1989). Le gène *CFP* comporte 10 exons et mesure environ 6kb (Nolan et al., 1992). Les exons 1 et 2 ainsi que le début de l'exon 3 codent pour la région promotrice, le 5'UTR ainsi que le peptide signal. Le reste de l'exon 3 comporte la séquence codant pour le domaine TSR0 et les exons 4 à 8 codent chacun pour un TSR distinct, les TSR1 à 5. La séquence du TSR6, plus longue, est quant à elle à cheval sur les exons 9 à 10 et est suivie d'un codon d'arrêt de la traduction en TAA. En plus du codon stop, l'exon 10 comporte une courte région 3' UTR ainsi qu'une séquence classique de polyadénylation AATAAA (Nolan et al., 1992). L'épissage alternatif du gène *CFP* peut donner lieu à 8 variants d'ARNm.

Dans l'environnement direct du gène *CFP* se trouvent les gènes : *ARAF1*, codant pour la protéine proto-oncogène A-raf-1 ; *SYN1*, qui code pour la protéine neuronale synapsine 1 ; et *TIMP*, gène codant pour la protéine du même nom Timp. Le gène *CFP* est particulièrement proche du gène *SYN1* puisqu'il est localisé à moins de 5kb de son extrémité 5'.

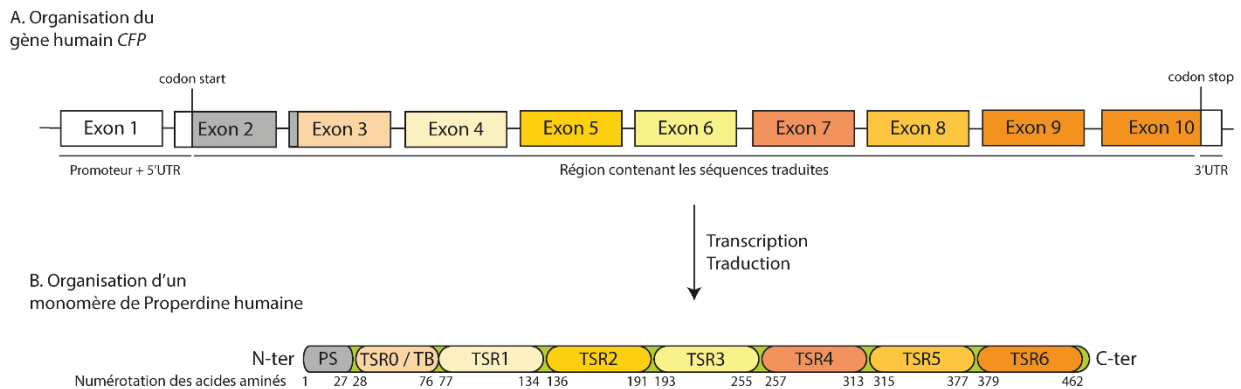


Figure 16 : Schématisation de l'organisation du gène *CFP* et du monomère de properdine qui en découle. (A) Représentation des séquences exoniques du gène *CFP* (rectangles). Les parties d'exons colorées sont directement impliquées dans le codage des acides aminés de la protéine properdine. **(B)** Représentation d'un monomère de properdine ainsi que de ses domaines fonctionnels connus (ovale). Un domaine protéique donné et la portion de gène codant pour ce domaine sont de couleur équivalente. Ainsi, le peptide signal (PS) en gris est codé par les exons grisés, soit la partie 3' de l'exon 2 et la partie 5' de l'exon 3. TSR = répétition thrombospondine de type I, 5' UTR = région 5' non-traduite, 3'UTR= région 3' non-traduite. D'après Chen et al., 2016

2.2.2. Maladies génétiques liées à *CFP*

Il a été fait état à ce jour d'une vingtaine de mutations du gène *CFP* sur un total d'une trentaine de familles dans le monde (Chen et al., 2018). Les mutations de ce gène mènent à des déficiences en properdine plus ou moins sévères classées en déficiences de types I à III (Sjöholm et al., 1982 ; Fijen et al., 1999) et à des pathologies très souvent liées au rôle de properdine dans le système immunitaire inné. Les patients déficients en properdine sont particulièrement sensibles aux infections par la bactérie *Neisseria meningitidis*, avec un risque accru de développer des pathologies sévères telles que la méningite ou la septicémie. Ces pathologies sont listées extensivement dans la revue de Chen et collaborateurs parue en 2018 (Tableau 2 de Chen et al., 2018). Une déficience en properdine de type I concerne les individus dont le sérum est complètement dépourvu de la protéine, du fait de la production

d'une forme tronquée (Helminen et al., 2012 ; Westberg et al., 1995) ou d'un repliement anormal de la protéine qui empêche sa sécrétion (Van den Bogaard et al., 2000). Une déficience de type II concerne les personnes avec des taux de la properdine circulante très faibles (<10% de la concentration moyenne). Une prédominance de la forme P₂ de la protéine a été mise en évidence chez ces patients, suggérant un problème dans le mécanisme d'oligomérisation de la protéine (Fredrikson et al., 1998 ; Pedersen et al., 2017). Les patient atteints de déficience de type III possèdent des taux normaux de properdine dans le sérum mais la protéine est peu ou non-fonctionnelle (Fredrikson et al., 1996).

Des données récentes suggèrent également que certains variants génétiques du gène *CFP* sont corrélés à taux anormalement élevés de properdine, ce qui représenterait un facteur de risque dans le rejet humoral d'allogreffe cardiaque (Marrón-Liñares et al., 2018).

2.2.3. Gène et protéine chez *Mus musculus*

Le gène de la properdine est hautement conservé chez les mammifères. Le séquençage de l'ADNc de la properdine murine a été effectué en 1988 à partir d'une banque d'ADNc de macrophage murins, montrant une homologie de 79% avec l'ADNc humain (Goundis & Reid, 1988 ; Nolan et al., 1992). L'orthologue de *CFP* chez la souris, appelé alors *Cfp*, se compose de 9 exons et est localisé au niveau de la fin du centromère du chromosome X (locus A1-A5). Le gène *Cfp* semble appartenir au même groupe synténique que son orthologue humain et son locus colocalise donc avec ceux des gènes *Timp*, *Araf1* et *Syn1* (Derry & Barnard, 1992).

La properdine murine possède une séquence peptide signal de 19 acides aminés et se compose de 6 domaine TSR. Le peptide signal est en grande partie codé par l'exon 1 du gène *Cfp*, et les deux derniers acides aminés de la séquence sont codés par l'exon 2 (Dupont, 2000) (Figure 17).

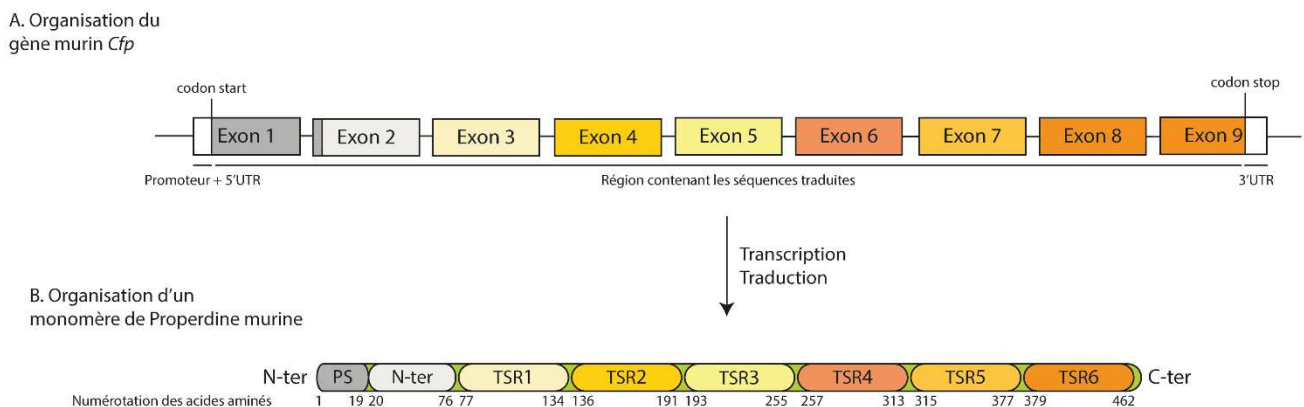


Figure 17 : Schématisation de l'organisation du gène *Cfp* et du monomère de properdine qui en découle. (A) Représentation des séquences exoniques du gène *Cfp* (rectangles). Les parties d'exons colorées sont directement impliquées dans le codage des acides aminés de la protéine properdine. **(B)** représentation d'un monomère de properdine ainsi que de ses domaines fonctionnels connus (ovale). Un domaine protéique donné et la portion de gène codant pour ce domaine sont de couleur équivalente. Ainsi, le peptide signal (PS) en gris est codé par les exons grisés, soit la partie 3' de l'exon 1 et la partie 5' de l'exon 2. TSR = répétition thrombospondine de type I, 5' UTR = région 5' non-traduite, 3'UTR= région 3' non-traduite.

2.3.Fonction dans la voie alterne du système du complément

La vaste majorité des études concernant properdine sont focalisées sur son rôle d'unique agoniste connu du système du complément. Les recherches récentes dévoilent peu à peu les multiples facettes du rôle de cette protéine dans l'organisme, qui occupe une place bien plus active dans le système du complément qu'originellement décrite. Elle assure des fonctions variées telles que la régulation du métabolisme énergétique des lipides (Gauvreau et al., 2012), l'opsonisation de cellules en dégénérescence (Kemper et al., 2008), ou encore l'orientation de la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire M1 (Al-Rayahi et al., 2017, Al-Mozaini et al., 2018). La properdine a également été identifiée comme étant l'un des ligands du récepteur NCR1, mais l'effet de leur interaction sur les cellules NK n'est pas encore élucidé (Narni-Mancinelli et al., 2017).

2.3.1. La stabilisation des C3 et C5 convertases de la voie alterne du complément

La liaison de properdine à la C3 convertase alternative C3bBb, pour former le complexe fonctionnel C3bBbP, permet d'allonger la demi-vie de cette enzyme de 5 à 10 fois en retardant l'inactivation spontanée de Bb et en empêchant l'action des facteurs inhibiteurs FI et FH (Fearon & Austen, 1975 ; Schreiber et al., 1975). Les travaux de Pedersen et collaborateurs ont permis de déterminer que cette interaction a lieu entre la partie C-ter de C3 et le TSR 5 et entre FB (ou Bb) et le TSR 6 (Pedersen et al., 2019). La stabilisation de la C3 convertase par properdine permet de générer plus de C3b à la surface, indispensable à la formation de la C5 convertase des 3 voies du complément (Figure 9), et amplifie donc la réponse du complément. L'action de stabilisation de la properdine s'étend également à la C5 convertase (Medicus et al., 1976). Son rôle dans la stabilisation et la formation des protéases clefs du système du complément font de properdine un agoniste essentiel de ce système.

L'affinité de la properdine pour la C3 convertase C3bBb varie en fonction de son degré d'oligomérisation, les formes trimériques et tétramériques ayant la plus haute affinité (Pedersen et al., 2019b). La properdine est aussi capable de se lier à C3bB et, avec une affinité moindre, à C3b. L'interaction de properdine à ces 3 molécules a lieu essentiellement lorsque celles-ci sont attachées à la membrane de la cellule cible et très peu en phase fluide (Farries et al., 1988).

Enfin, la capacité de properdine à stabiliser les C3 et C5 convertases participe également à l'amplification autocrine de l'activation des neutrophiles (Figure 18). Camous et collaborateurs ont ainsi démontré que la libération de properdine par les neutrophiles activés permet de stabiliser les C3 et C5 convertases au niveau de la membrane plasmique des neutrophiles (Camous et al., 2011). La formation à la membrane plasmique de dérivés directs de l'activité de ces enzymes, le fragment C5a et le MAC à des doses non-lytiques, sont des activateurs connus des neutrophiles (Morgan, 1989).

2.3.2. La reconnaissance de motifs moléculaires

De par sa charge positive et ses nombreux domaines protéiques, la properdine est par définition une protéine armée pour participer à différentes interactions moléculaires. Les études récentes sur la properdine montrent par exemple qu'elle est capable d'opsoniser des nanoparticules *in vitro* (Kouser et al., 2018).

- L'initiation du complément à la surface des pathogènes exogènes

La vaste majorité des recherches publiées concernant la properdine sont focalisées sur son rôle dans la stabilisation de C3 convertase alternative préformée et des complexes qui lui sont associés. Grâce à la technique de résonance plasmonique de surface, Hourcade a pu démontrer que la properdine peut également être initiatrice de l'activation du complément. Lorsque la properdine se lie à des motifs moléculaires spécifiques, elle peut servir d'ancrage à C3b et FB et promouvoir leur association pour

former la C3 convertase (Hourcade et al., 2006) (Figure 18). Depuis, il a été démontré que la properdine peut reconnaître spécifiquement des molécules PAMPs présentes à la surface des levures (zymosan), de *Neisseria gonorrhoeae* ou encore d'*Escherichia coli DH5α* (Spitzer et al., 2007 ; Stover et al., 2008). Ces découvertes font écho aux hypothèses concernant la fonction de properdine dans le complément proposées par Pillemer 50 ans auparavant, puis abandonnées au profit de sa fonction d'agoniste des convertases (Pillemer et al., 1954).

- L'initiation du complément et l'opsonisation de cellules en dégénérescence

Les expérimentations *in vitro* sans sérum ainsi que l'utilisation de cultures primaires dérivées de modèles de souris dépourvues de C3 (C3 KO) ont permis de déterminer que la properdine est également capable d'opsoniser des cellules en dégénérescence indépendamment de C3b. Son action d'opsonine se porte essentiellement sur les cellules apoptotiques tardives et les cellules nécrotiques, caractérisée par une réactivité positive à l'annexine V et au iodure de propidium, et ne semble pas concerner les cellules apoptotiques précoces, positives à l'annexine V mais négatives au iodure de propidium (Xu et al., 2008 ; Kemper et al., 2008). Le recrutement de properdine à la surface de ces cellules est nécessaire au dépôt de C3b qui par la suite recrute des macrophages ou des cellules dendritiques pour médier la phagocytose et active également la voie alterne du complément et le dépôt du MAC (Xu et al., 2008). Ces études montrent qu'en l'absence de properdine, C3 et C3b ne sont pas capables d'opsoniser les cellules endogènes en dégénérescence. La reconnaissance des cellules nécrotiques par la properdine semble être un phénomène commun à tous les types cellulaires et a été mise en évidence sur des cellules nécrotiques de type Jurkat, HUVEC, U937, HK-2 et EBV-LCL.

Les protéines des voies classiques et lectines du complément, C1q et MBL, sont également capables de se lier à la surface de cellules apoptotiques de façon compétitives en se liant à des ligands communs à la surface de ces cellules, ce qui ne semble pas être le cas de la properdine (Nauta et al., 2003). La properdine semble capable de se lier aux glycosaminoglycanes (GAG) tels que l'héparine (Yu et al., 2005). Les expérimentations *in vitro* effectuées par Kemper et collaborateurs ont permis d'identifier les GAG héparane sulfate et chondroïtine sulfate comme des ligands de properdine à la surface des cellules apoptotiques. L'inhibition de la liaison de properdine aux cellules prétraitées au sodium chlorate souligne l'importance de la sulfation des GAG de surfaces dans cette interaction (Kemper et al., 2008). Cette protéine présente également une forte affinité pour l'ADN fragmenté, qui est exposé à la surface des cellules lors de leur entrée dans des processus de mort avancés (Xu et al., 2008 ; Radic et al., 2004). Il a été proposé que les charges négatives présentes sur l'ADN interagissent avec les nombreuses charges positives portées par la properdine.

- Le rôle de properdine dans la régulation de l'inflammation

A travers son action de stabilisateur des convertases ainsi que de point focal pour la formation *de novo* de C3 convertase, properdine favorise ainsi l'activation du complément et donc la formation des anaphylatoxines C3a et C5a. En plus de ce rôle dans le complément properdine, est impliquée dans la signalisation par opsonisation des entités à phagocyter. Au-delà de l'élimination de la cible, plusieurs études montrent que l'action de properdine dans ce processus semble moduler l'activation des cellules dendritiques et stimuler une réponse pro-inflammatoire chez les monocytes, en favorisant leur transition vers un phénotype M1 (Dupont et al., 2014 ; Kouser et al., 2018). Les monocytes qui internalisent des nanotubes de carbone fonctionnalisés, *i.e* chimiquement modifiés en surface, préalablement opsonisés par la properdine présentent une augmentation drastique des ARNm codant pour le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 ainsi que le GM-CSF, molécules impliquées dans la réponse inflammatoire et la prolifération myéloïde.

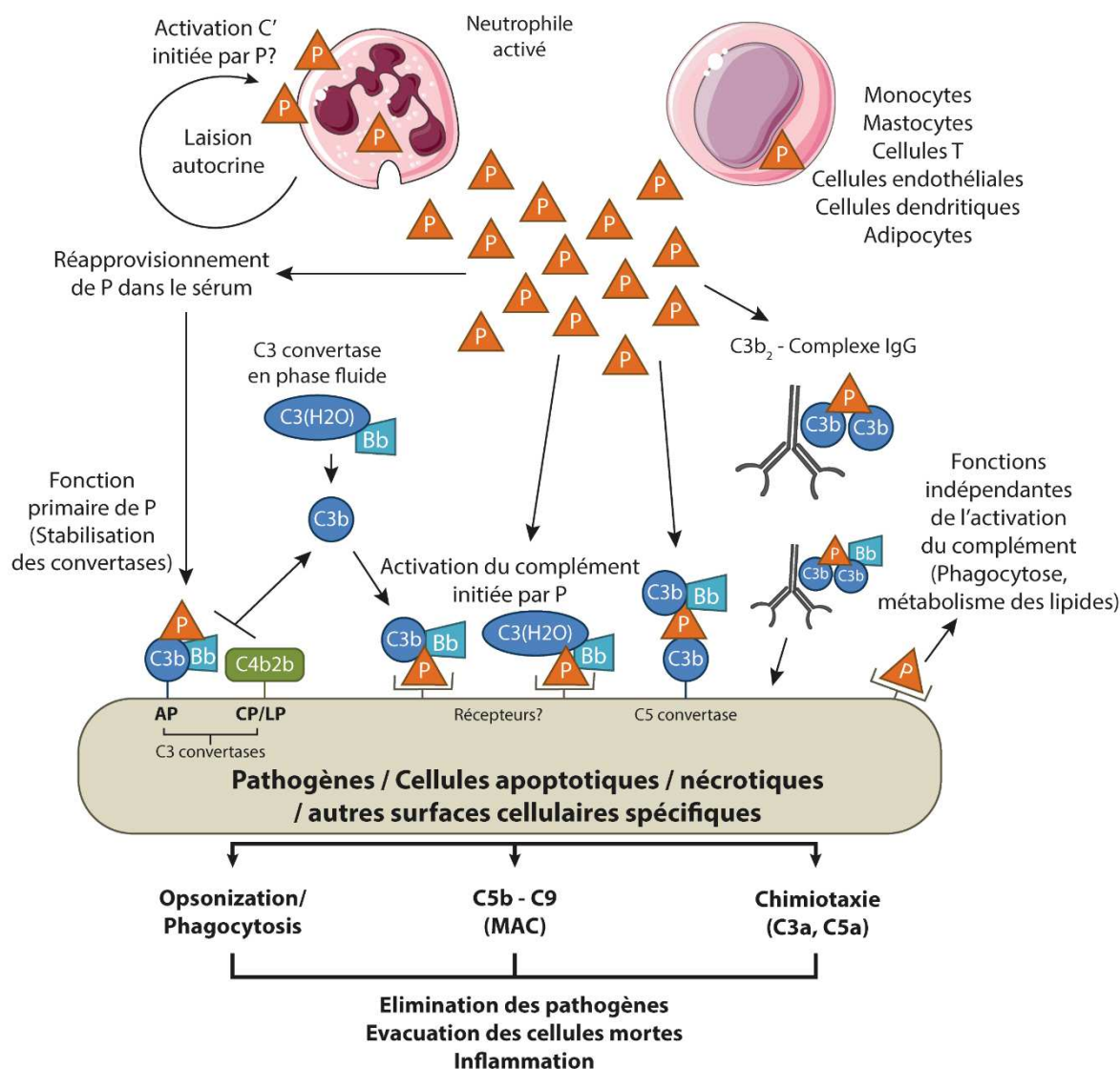


Figure 18 : Les différentes voies d'action de la properdine. La properdine est sécrétée par des types cellulaires variés tels que les monocytes et les cellules dendritiques, mais aussi localement par dégranulation des neutrophiles. Dans le microenvironnement, sa fonction primaire est de stabiliser des C3 et C5 convertases. Properdine est également capable de se lier indépendamment de C3 à certains PAMPs et DAMPs et servir de point focal de dépôt des protéines du complément (activation initiée par properdine), à des fins de lyse ou d'opsonisation. Liée aux cellules en dégénérescence, elle peut en effet initier le dépôt de C3b afin de signaler la cible aux phagocytes. La properdine peut également se lier aux neutrophiles et former une boucle d'amplification de leur activation de manière autocrine, en activant le complément à leur surface. Enfin, la liaison de properdine à deux molécules de C3 permet la stabilisation de leur liaison au complexe IgG. D'après Cortes et al., 2013

2.4. Objectifs du projet de thèse

L'action de la properdine ayant majoritairement lieu dans la circulation sanguine, peu de données sont disponibles sur un possible rôle de cette protéine dans le SNC. Une augmentation de la properdine et de plusieurs autres protéines du complément a été récemment rapportée dans le LCR de patients atteints d'angéite primaire du système nerveux central (PACNS), une maladie inflammatoire des vaisseaux sanguins du SNC (Mandel-Brehm et al., 2019). La properdine a également été étudiée en condition d'encéphalopathie hypoxique-ischémique (EHI) néonatale, évènement induisant une mort cellulaire due à l'inflammation et au stress oxydatif qui lui sont associés. L'inactivation du gène *Cfp* dans les modèles EHI a un effet neuroprotecteur chez ces souris, qui présentent une réduction de la mort cellulaire et de l'activation microgliale (Sisa et al., 2019). Aucune donnée sur l'action de la properdine et son interaction potentielle avec les cellules nerveuses n'est cependant disponible à ce jour. Ce projet a démarré lorsque nous avons fait le constat que la moelle de souris *SOD1^{G93A}* symptomatique est fortement immunoréactive pour la properdine, contrairement à un contrôle sauvage de même âge (Figure 19). Ceci est, à notre connaissance, la première fois que cette protéine est observée dans la moelle épinière. La présence sélective de la properdine dans le modèle *SOD1^{G93A}*, accumulée en particulier au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière où se situent les motoneurones, ainsi que les multiples facettes de cette protéine, nous ont poussés à explorer son rôle potentiel dans la pathogénèse de la SLA. Les résultats obtenus jusqu'ici sur ce projet sont présentés dans la partie II. du chapitre matériels, méthodes & résultats de ce manuscrit.

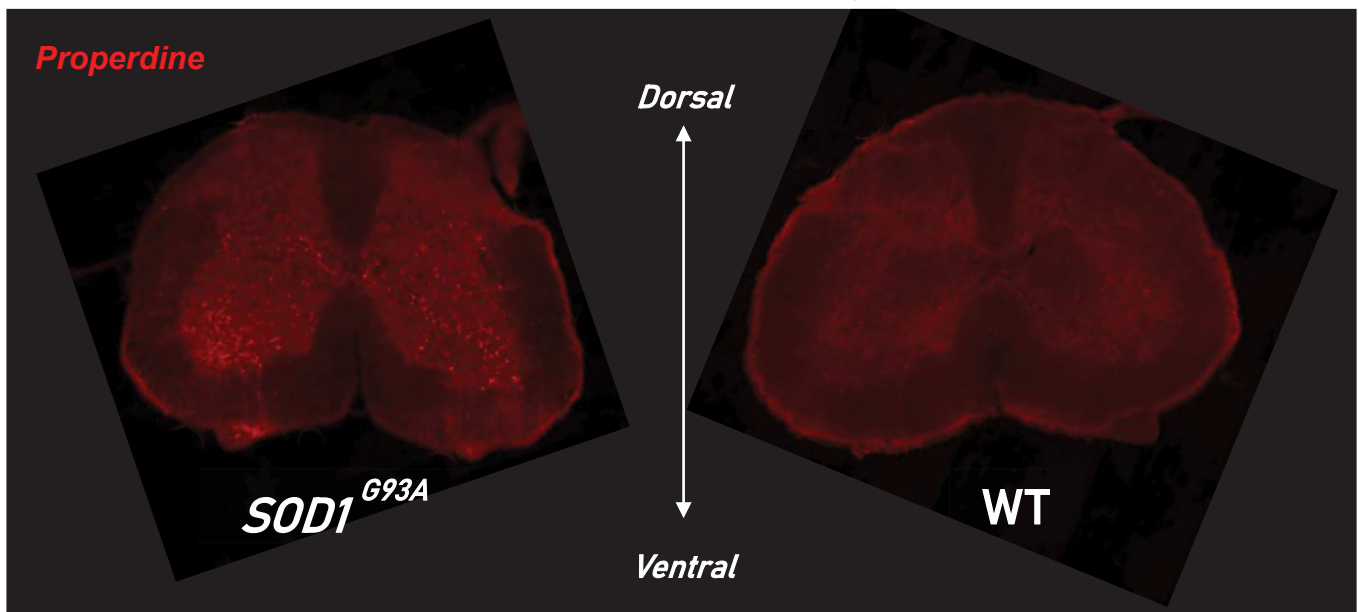


Figure 19 : Immunohistofluorescence montrant la localisation différentielle de la properdine (marquage rouge) dans la moelle épinière de souris *SOD1^{G93A}* symptomatique (140j), comparée au contrôle sauvage (WT) de même âge. Une section de moelle épinière entière est représentée pour chaque génotype. Un marquage intense est observé dans le tissu nerveux de la souris mutante SLA, accumulé dans la partie ventrale de la moelle épinière, alors qu'aucun marquage n'est observé en condition WT.

MATERIELS, METHODES & RESULTATS

I. Le rôle des cellules Natural killer et du récepteur Ncr1 dans la SLA

Publication jointe pages 81 à 110 « Natural killer cells are not significantly recruited to the central nervous system of ALS mice and deletion of Ncr1 does not influence their motor decline » - *Crabé et al., en attente de soumission*

Ce projet vise à apporter des réponses quant au rôle et à la dynamique migratoire/d'activation des cellules NK dans un contexte de SLA. Ncr1 est l'un des marqueurs les plus spécifiques des cellules NK (il est cependant exprimé par certaines sous-populations immunitaires spécialisées) et un récepteur activateur majeur de leur cytotoxicité. J'ai donc généré la souris *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* afin de tracer ces cellules grâce à un rapporteur fluorescent GFP et d'étudier un potentiel rôle de ce récepteur dans la pathogénèse de la SLA.

A l'aide de cet outil génétique et d'une analyse cytométrique des multiples étapes de maturation et d'activation des cellules NK, nous avons essayé de comprendre si ces lymphocytes subissaient des modifications au cours de la maladie dans différents compartiments clefs : la moelle épinière, les méninges et la circulation sanguine. Ces données ont été obtenues grâce à notre collaboration avec Alexandre Brodovitch, José Boucraut, Rejane Rua, Gabriel Espinosa-Carrasco et Javier Hernandez. Nos données ne montrent aucune différence dans le nombre de cellules NK circulantes entre les souris mutantes SLA ou sauvages au stade symptomatique (*Crabé et al., en attente de soumission* Figure 1G). Aucune différence n'a également été observé entre la condition sauvage et pathologique concernant des paramètres d'analyse plus fins des cellules NK tels que les différents status de maturité ou d'activation (*Crabé et al., en attente de soumission* Figure 2).

De précédents papiers basés sur l'étude cytométrique du marqueur NK1.1 ou sur des immunomarquages du récepteur Ncr1 ont suggéré une infiltration plus ou moins importante de cellules NK dans la moelle épinière (Komine et al., 2018 ; Garofalo et al., 2020 ; Chiu et al., 2008). Nos quantifications préliminaires de la moelle épinière entière en cytométrie, basée sur l'expression en surface de CD49b, marqueur des NK matures excluant les ILC1 (Figure 13), ne montrent pas de différence significative entre les tissus sauvages (wildtype) et mutants SLA. En effet, la proportion de cellules CD3⁺CD49b⁺ parmi les cellules d'origine hématopoïétiques hors lymphocytes T et B (CD45⁺CD90.2⁻) est d'environ 10% dans ces deux génotypes (*Crabé et al., en attente de soumission* Figure supplémentaire 1). Afin de nous affranchir de possibles problèmes de spécificité de marqueurs ou même des anticorps, nous avons développé un modèle de souris mutantes SLA *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* exprimant de façon endogène le rapporteur GFP dans les cellules NK, sous contrôle du promoteur du gène *Ncr1*. Les données cytométriques obtenues à partir de tissu de moelle épinière de souris à 140j sont en cours d'analyse par nos collaborateurs. J'ai cependant effectué des coupes histologiques de rate et de moelle épinière afin de visualiser les cellules NK par microscopie optique grâce au traceur GFP (*Crabé et al., en attente de soumission* Figure 4). Bien que les cellules NK soient nettement visibles dans les tissus contrôles (e.g la rate *Ncr1^{gfp/gfp}*), ce n'est pas le cas dans la moelle épinière des souris *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* ou *Ncr1^{gfp/gfp}*.

Nous avons également voulu étudier l'impact de l'ablation du récepteur Ncr1 sur les paramètres généraux d'évaluation de la maladie dans une étude longitudinale. Le but de cette expérimentation était de déceler un possible rôle des cellules NK dans les processus de dégénérescence observé dans la SLA, comme cela a été proposé récemment par Garofalo et collaborateurs (Garofalo et al., 2020). Nous nous sommes d'abord assuré que l'ablation de Ncr1 ne perturbait pas les autres composants du système immunitaire tels que les lymphocytes B ou les T CD4⁺ et CD8⁺, dont le rôle dans la SLA est aujourd'hui établi. Les résultats de cette étude montrent clairement que l'abolition de la toxicité des cellules NK via le récepteur Ncr1 : (1) n'a pas d'effet sur la survie des motoneurones au stade symptomatique (2) n'a pas d'effet sur la perte de poids ou des fonctions motrices (3) n'a pas d'effet sur l'âge d'apparition des symptômes ou sur la survie des souris (*Crabé et al., en attente de soumission* Figure 5).

Natural Killer cells Are Not Significantly Recruited to the Central Nervous System of ALS mice and Deletion of *Ncr1* Does Not Influence their Motor Decline

Roxane Crabé ¹, Alexandre Brodovitch ^{2,3}, Antoine Picot ¹, Thibaut Gaubiac ⁴, Gabriel Espinosa-Carrasco ⁵, Javier Hernandez ⁵, Rejane Rua ⁴, Thierry Vincent ^{1,6}, José Boucraut ³ and Cédric Raoul ^{1,*}.

¹ INM, Univ Montpellier, INSERM, Montpellier, France

² Reference Centre for ALS and Neuromuscular diseases, La Timone University Hospital, Aix-Marseille University, Marseille, France.

³ Immunology Laboratory, AP-HM, Conception Hospital, Marseille, France.

⁴ Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille University, INSERM, CNRS, Marseille, France.

⁵ Institute for regenerative medicine and biotherapy, Univ Montpellier, Montpellier, France

⁶ Department of Immunology, Univ Montpellier, CHU Montpellier, Montpellier, France

* Author to whom correspondence should be addressed: cedric.raoul@inserm.fr

Abstract (200 words)

Amyotrophic Lateral Sclerosis is a fatal neurodegenerative disease characterized by progressive motoneuronal death, neuroinflammation and immune reactivity. Research shows that different components of the immune system hold different roles in the disease. The role of NK cells in ALS remains however unclear and previous studies show opposite results. Our work aimed at understanding the role of NK cells in the *SOD1*^{G93A} mouse model using robust tools, more suited to study these lymphocytes and offers methodological advice for the future studies on NK cells, especially in the context of chronic inflammation.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis, Neuroimmunity, Natural Killer, Lymphocytes, Innate lymphoid cell, Natural cytotoxicity triggering receptor 1, NKp46, Motoneurons.

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressively paralyzing neurodegenerative disorder usually fatal within 3 years of diagnosis (Masrori & Damme, 2020). ALS affects both upper and lower motoneurons located in the motor cortex, brainstem and spinal cord. The incidence of ALS ranges between 2 to 3 per 100 000 person-years, with a median age comprised between 50 and 70 years (Longinetti & Fang, 2019). The majority of cases being diagnosed are considered sporadic, while approximately 10% of patients have a familial history of the disease (Mathis et al., 2019). ALS causing mutations in *Cu-Zn superoxide dismutase (SOD1)* were the first to be identified and are among the most frequently found in familial cases. Transgenic mice that express ALS-causing mutations in SOD1 recapitulate the main traits of the human disease and represent a reliable and informative model to comprehend pathogenic mechanisms. Besides motoneuron dysfunction and degeneration, ALS is typified by an overt glial response encompassing mainly reactive astrocytes and activated microglial cells that as the disease progress gain detrimental functions (Yamanaka & Komine, 2018; Haukedal & Freude, 2019). In the recent years, an immune response has also been implicated as an important component contributing in the natural history of the disease (Chiot et al., 2019; Bowerman et al., 2012). An adaptive immunity takes place during the neurodegenerative process in ALS patients and mouse models of the disease. Regulatory T cells (Treg) CD4⁺ T cells, which play a pivotal role in suppressing innate and adaptive immune responses, increase at early stage of the disease and then rapidly decrease at progression phase, as their suppressive capacity become reduced (Beers et al., 2017). The adoptive transfer of Treg were shown to prolong the lifespan of ALS mice (Beers et al., 2011).

We and other have shown that CD8⁺ T lymphocytes infiltrate the central nervous system (CNS) of ALS patients and mice (Chiu et al., 2008; Coque et al., 2019; Engelhardt et al., 1993). CD8⁺ T cells expressing SOD1 mutant can selectively kill motoneurons that are presumably

electrically silent. The ablation of CD8⁺ T cells results in the reduction of motoneuron loss in ALS mice (Coque et al., 2019).

The contribution of Natural Killer (NK) lymphocytes in ALS pathogenesis remains more puzzling. At the difference of cytotoxic CD8⁺ T cells, NK cells have a lytic activity regardless of non-self peptide presentation by major histocompatibility complex (MHC). The cytotoxic functions of NK depend on a balance between inhibitory signals provided by any cell expressing self-MHC class I (MHC-I) and stimulatory signals when transformed cells lose expression of MHC-I or express other stimulatory molecules (Vivier et al., 2011). The number of NK cells, based on CD3, CD16 and CD56 expression, was reported to increase in the peripheral blood of patients with ALS, compared to healthy individuals (Rentzos et al., 2012; Murdock et al., 2017; Jin et al., 2020; Gustafson et al., 2017). A reduction of CD3⁻CD56⁺ cells has however been reported in the peripheral blood of sporadic ALS patients compared to control (Garofalo et al., 2020). NK cell changes were not systematically directly correlated with changes in ALS functional rating scale (ALSFRS-R) scores (Murdock et al., 2017; Murdock et al., 2021). Although NK cell number has been reported to be inversely correlated with ALSFRS-R score (Gustafson et al., 2017). Another study documented a significantly higher amount of CD56^{bright}CD16^{dim} NK cells in slowly progressing ALS patients compared to fast ALS (Jin et al., 2020).

A significant increase of NK1.1⁺ cells was described in the spinal cord of *SOD1^{G93A}* mice (Komine et al., 2018; Garofalo et al., 2020; Chiu et al., 2008). The NK1.1⁺ can, depending on the study, represent 18.8% of CD45⁺ cells (Chiu et al., 2008), or about 4% of CD3⁻ CD45^{high} cells (Garofalo et al., 2020) and in total cell number represent as many as CD8⁺ T cells (Komine et al., 2018). With regard to the function of NK cells in ALS pathogenesis, injection of NK depleting anti-NK1.1 antibody has no effect on the survival. Complementarily, increasing the number of infiltrating NK-T and NK cells in the spinal cord of *SOD1^{G93A}* mice by injection of IL-2 complex has no effect on the lifespan of ALS mice (Komine et al., 2018). Another study

showed however that injection of depleting anti-NK1.1 in *SOD1^{G93A}* and *TDP-43^{A315T}* mice delayed disease onset and extended lifespan of mice (Garofalo et al., 2020). The latter study proposed that NK cells exert a cytotoxic activity against motoneurons in the neurodegenerative context.

Here, we aimed to trace NK cells and investigate their cytotoxic role in ALS pathogenesis using genetic tool targeting the natural cytotoxicity triggering receptor (*Ncr1*) (Gazit et al., 2006). We did not observe any increase or decrease number of NK cells in the blood of *SOD1* mutant compared to wildtype mice. The detailed analysis of maturation and activation status of NK cells confirmed the absence of difference between ALS and control mice. At the contrary to other studies that used fluorescence-activated cell sorting analysis with NK1.1 marker or immunohistochemistry with NKp46 (*Ncr1* in mouse) in human (Komine et al., 2018; Garofalo et al., 2020; Chiu et al., 2008), we did not observe any significant infiltration of NK cells in the spinal cord of *SOD1^{G93A}* mice. The genetic ablation of *Ncr1* in *SOD1^{G93A}* mice did not influence disease onset, decline of motor function, motoneuron survival and life span. Our work does support a substantial contribution of NK cells in ALS pathogenesis.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

All animal experiments were approved by the national ethics committee on animal experimentation, and were done in compliance with the European community and national directives for the care and use of laboratory animals. B6.Cg-Tg(*SOD1*G93A*)1Gur/J (*SOD1^{G93A}*) and B6;129-*Ncr1^{tm1Oman}*/J (*Ncr1^{gfp}*) were purchased from the Jackson Laboratory. Mice were maintained on a C57BL/6J background under specific-pathogen-free conditions. Mixed-sex cohorts of mice were used in all experimental groups.

2.2. Fluorescence-activated cell sorting analysis

For the meta-analysis of CD3⁻CD49b⁺ cells among CD45⁺CD90.2⁻ cells, the single cell suspension from the blood, spinal cord and brain of wildtype and *SOD1*^{G93A} mice was initially stained with anti-CD3-BV785 (BioLegend); anti-CD4, anti-CD45-BV650, anti-CD90.2 (Thy1.2)-V500, anti-CD8a-APC, anti-CD49b-PE-CF594, anti-CD62L-PerCP-Cy5.5, anti-CD44-FITC, anti-CD25-BV421 (BD Biosciences); and anti-KLRG1-PE-Cy7 (eBioscience) antibodies (Coque et al., 2019). The flow cytometry data were obtained with FACSCanto II or an LSR Fortessa apparatus. The meta-analysis of cytometry datasets was done using FACSDiva software (BD Biosciences).

2.3. Functional assays

For muscle atrophy-induced weight loss, mice were weighed once a week starting at 28 days of age and thrice a week from 56 days until end stage. For grid test analysis, mice were tested once a week starting at 56 days of age. Starting with a 40 g metal grid, followed by 30, 20 and 10 g grids, the time the mouse held on the grid before dropping was measured, with a plateau of 30 s. The experiment was repeated three times with each grid. Muscle strength (arbitrary units) was quantified with the following formula: (40 g x best time) + (30 g x best time) + (20 g x best time) + (10 g x best time) (Saxena et al., 2009; Soulard et al., 2020). The mortality was defined as the point in time when the mice are unable to right themselves within 15 sec after being placed upon their back. All these studies were done in a blinded manner.

2.4. Immunohistochemistry

Mice were anesthetized and transcardially perfused with PBS and then with 4% paraformaldehyde (PFA). The spinal cord and spleen were harvested and post-fixed in 4% PFA by immersion at +4°C for 45 min. Tissues were incubated 72 h in 30% sucrose solution and imbedded in O.C.T. compound (Sakura Finetek). Cryosections of the spinal cord or spleen (16 μ m) were collected onto Superfrost Plus slides and rinsed with PBS before being incubated for 1 h at RT in blocking solution (20% Donkey Serum, 0.3% Triton X-100). Sections were incubated with goat anti-ChAT (AB144P, Merck) or anti-GFP (PABG1, ChromoTek) diluted in blocking solution for 48 h at +4°C. After washing in PBS, sections were incubated with AlexaFluor 594 or AlexaFluor 488-conjugated donkey anti-goat, anti-rabbit or secondary antibody (ThermoFisher Scientific) diluted in blocking solution for 1 h at RT. Slides were mounted in NeoBio mount fluo mounting solution (NeoBiotech). Images were acquired using a Zeiss LSM700 laser scanning confocal microscope.

2.5. Statistical Analysis

Statistical significance was determined when appropriate by unpaired two-tailed *t* test, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey-Kramer's *post hoc* tests or two-way repeated-measure ANOVA followed by a Newman-Keuls's *post hoc* test. For the Kaplan-Meier survival analysis, the Log-rank Mantel-Cox test was used. Statistical analyses were done with Prism software version 8 (GraphPad Software). Significance was accepted at the level of $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Circulating NK cells does not show signs of abnormal frequency, maturation or activation in ALS mice

An internal ribosome entry site followed by the green fluorescent protein (GFP) coding sequence was incorporated in the *natural cytotoxicity triggering receptor 1 (Ncr1)* gene deleting exons 5 to 7. *Ncr1^{gfp/gfp}* mice, that faithfully trace NK cells, exhibit an abolished killing activity of NK cells towards target cells missing MHC-I, without affecting development of NK population and their migration properties (Gazit et al., 2006). We investigated the representation, maturation and activation status of NK cells in the circulating blood of ALS mice harboring or not *Ncr1^{gfp/gfp}* locus. To quantify the frequency of circulating lymphocytes, flow cytometry analysis with CD45, CD3, CD8, CD19, CD49b, Ncr1 and GFP was performed at symptomatic stage (150 d) and age-matched control mice. As we previously described, the percentage of CD8⁺ T cells in the peripheral blood did not differ between wildtype and *SOD1^{G93A}* mice (Coque et al., 2019), as the percentage of CD3⁺ T cells and CD19⁺ B lymphocytes (Fig. 1A-E). This is consistent with what has already been observed between ALS patients and healthy subjects (Zhang et al., 2005; Beers et al., 2011; Jin et al., 2020). The frequency of these lymphocyte populations was not influenced by the loss of Ncr1 function (Fig. 1A-E).

To determine whether the percentage of circulating NK cells might vary between *SOD1^{G93A}* and wildtype mice, we combined immunolabeling of CD45, CD3, CD49b and Ncr1 with native GFP whose expression is under the control of *Ncr1* endogenous promoter. Single event cells were first defined with forward scatter and side scatter parameters and the percentage of Ncr1⁺CD49b⁺ as well as Ncr1⁺GFP⁺ determined among the CD45⁺CD3⁻ cells. As expected, we observed a complementary expression pattern between Ncr1 and GFP when mice harbor (or not) the *Ncr1^{gfp/gfp}* locus (Fig. 1F). We did not observe however any difference in the percentage of Ncr1⁺CD49b⁺ cells between wildtype and *SOD1^{G93A}*, and in the percentage of GFP⁺CD49b⁺ cells between *Ncr1^{gfp/gfp}* and *SOD1^{G93A}*; *Ncr1^{gfp/gfp}* mice (Fig. 1G,H).

We next performed a meta-analysis of cytometry data obtained during our previous immunophenotyping of circulating lymphocytes in symptomatic 150-day-old *SOD1^{G93A}* mice

(Coque et al., 2019). At this stage, CD8⁺ T lymphocytes significantly increase in the CNS, but not in the blood, of ALS mice (this *SOD1*^{G93A} mouse strain, in our housing condition, has an average age of onset around 110 days, with a mean survival of approximately 170 days) (Coque et al., 2019). We then determined the frequency of CD3⁻CD49b⁺ within CD45⁺CD90.2⁻ cells (our previous study only included CD49b as a maker of NK cells) in peripheral blood. Coherently, we did not find any significant difference in this combination of markers between wildtype and *SOD1*^{G93A} mice (Supplementary Figure 1).

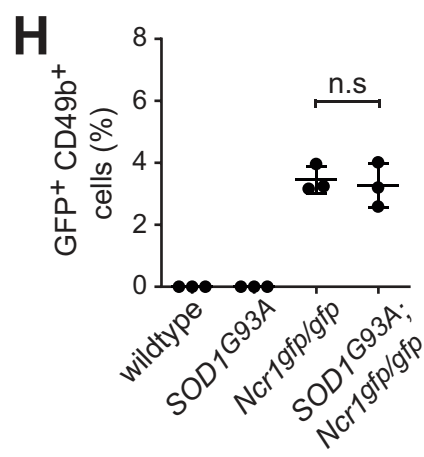
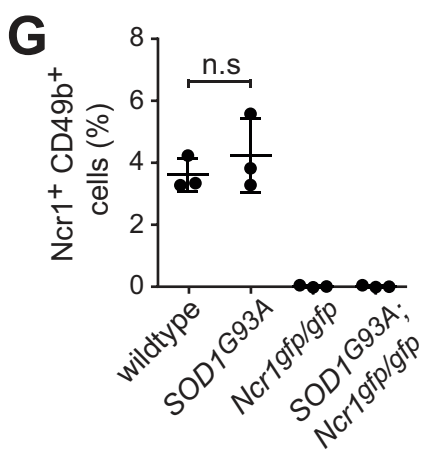
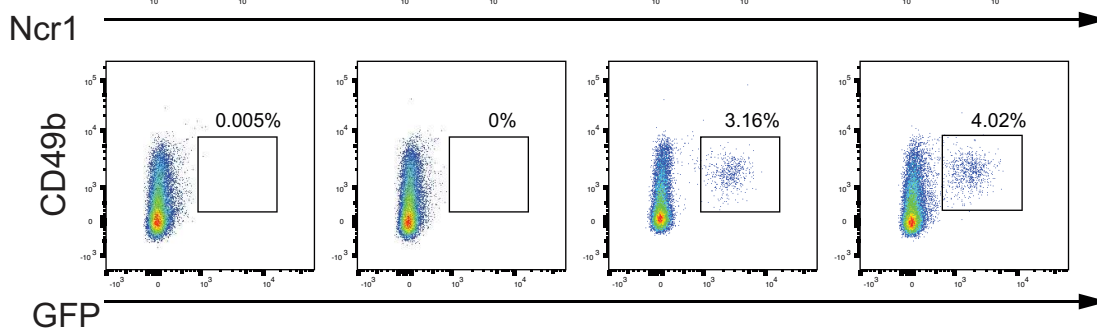
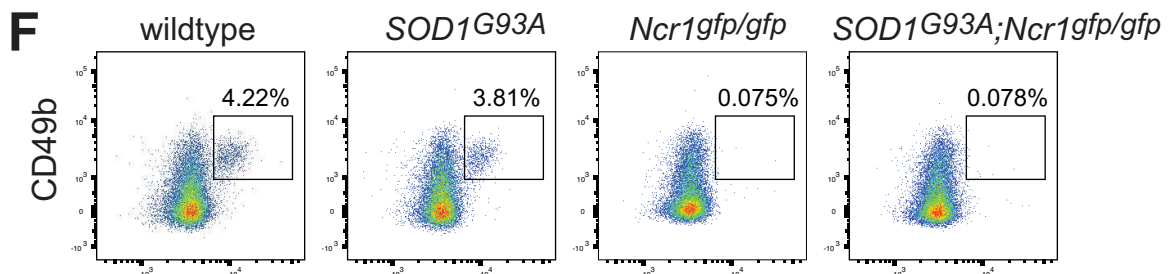
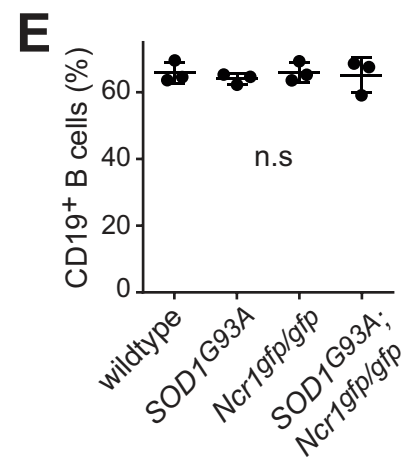
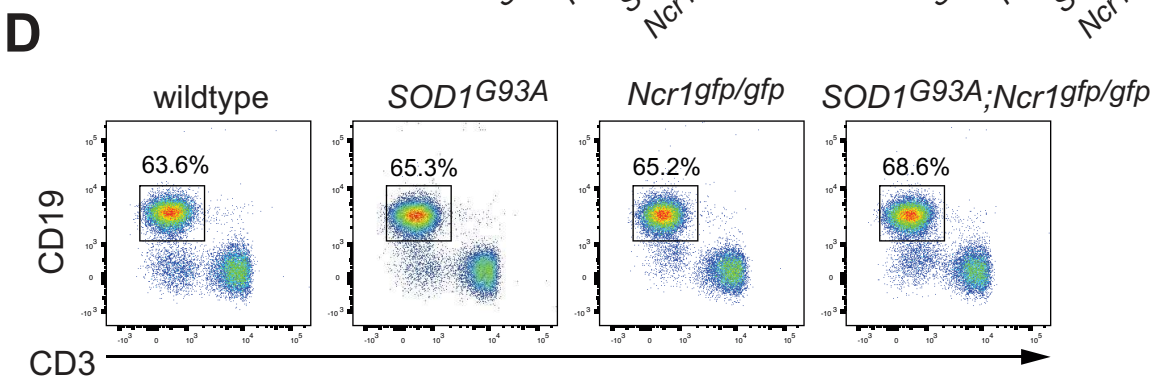
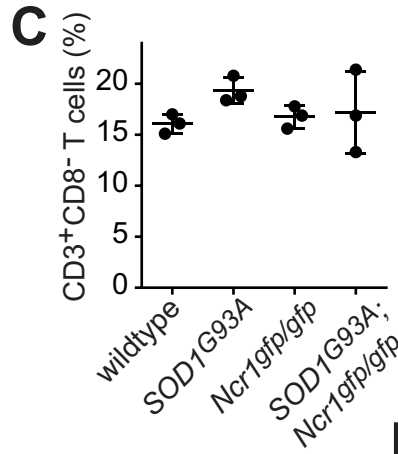
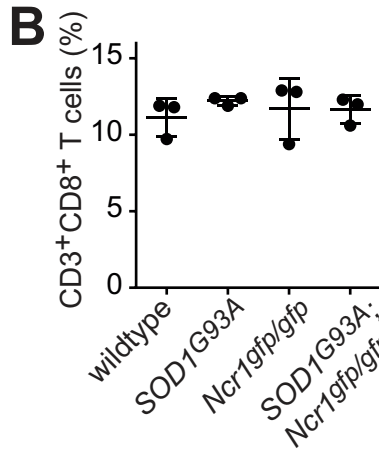
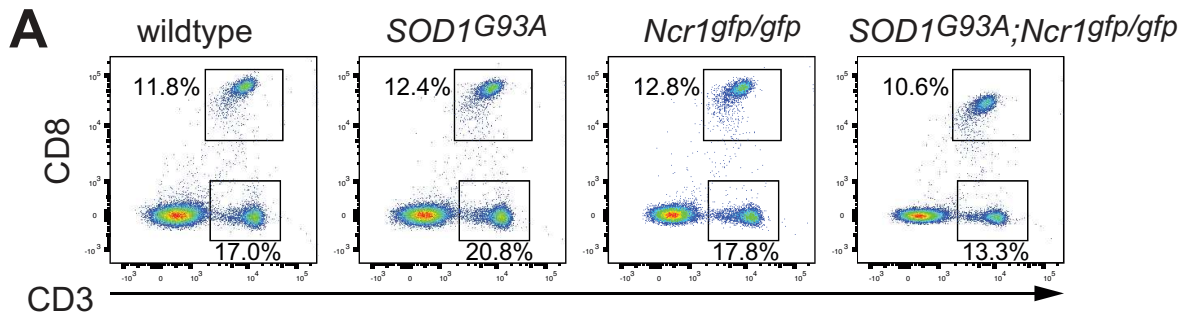


Figure 1. (A) Flow cytometry plots showing CD3⁺ and CD8⁺ T cells in the peripheral blood of 150-day-old wildtype, *SOD1^{G93A}*, *Ncr1^{gfp/gfp}* and *SOD1^{G93A};Ncr1^{gfp/gfp}* mice. (B) and (C) scatter plots depict the proportion of CD3⁺ and CD8⁺ T cells respectively, in mice of the indicated genotype. (D) Flow cytometry analysis of CD19 and CD3 in CD45-gated cells in the blood of wildtype, *SOD1^{G93A}*, *Ncr1^{gfp/gfp}* and *SOD1^{G93A};Ncr1^{gfp/gfp}* mice at 150 days of age. (E) shows the percentage of circulating CD19⁺ (CD3⁻) B cells in mice of the indicated genotype. (F) CD49b⁺, Ncr1⁺ and GFP⁺ cells in the blood of wildtype, *SOD1^{G93A}*, *Ncr1^{gfp/gfp}* and *SOD1^{G93A};Ncr1^{gfp/gfp}* mice were identified by flow cytometry. (G,H) Mean frequency of circulating Ncr1⁺CD49b⁺ (G) and GFP⁺CD49⁺ NK cells in mice with indicated genotype. Representative flow cytometry dot plots are shown, *n* = 3 per group. Numbers in the quadrants indicate the percentage of gated cells, horizontal bars show mean values ± SEM, n.s, non-significant, one-way ANOVA with Tukey-Kramer's *post hoc* test.

Nevertheless, we explored whether more discrete yet functional changes in NK subsets could exist between ALS and control mice. NK precursors cells undergo a series of maturation stages that can be identified by a differential expression of surface markers (Abel et al., 2018). CD49b is expressed by mature stage 4 to 6 NK cells. CD11b is expressed by stage 5 and 6 mature NK cells. KLRG1 being expressed by fully mature stage 6 NK cells. By combining CD49, CD11b and KLRG1, we can therefore trace stage 4 (CD49b⁺CD11b⁻KLRG1⁻), stage 5 (CD49b⁺CD11b⁺KLRG1⁻) and terminal stage 6 (CD49b⁺CD11b⁺KLRG1⁺) (Fig. 2A). However, we did not observe any significant difference in the maturation stages of NK cells between wildtype and *SOD1^{G93A}* mice using NCR1 marker or *Ncr1^{gfp/gfp}* and *SOD1^{G93A}*, *Ncr1^{gfp/gfp}* mice using GFP reporter (Fig. 2B-D). This analysis was further completed by combining NCR1, expressed from stage 3 (immature) NK cells and all mature stages, NK1.1 expressed from stage 2 (immature) NK cells and all mature stages with CD27 that is expressed by immature and mature NK cells but whose expression is lost in mature stage 6 NK cells. The expression of SOD1 in mice with or without targeted deletion of *Ncr1* does not alter the terminal maturation of NK cells (Fig. 2E, F). We then investigated the activation status of circulating

NK cells in the different genotypes of mice. The C-type lectin receptor CD69 is a suitable marker to identify NK cells with cytotoxic properties (Clausen, 2003; Abel et al., 2018). We therefore compared the percentage of NCR1⁺NK1.1⁺CD69⁺ and GFP⁺NK1.1⁺CD69⁺ NK cells between wildtype, *SOD1^{G93A}*, *Ncr1^{gfp/gfp}*, *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}*, and we did not find any significant difference between different groups (Fig. 2G,H).

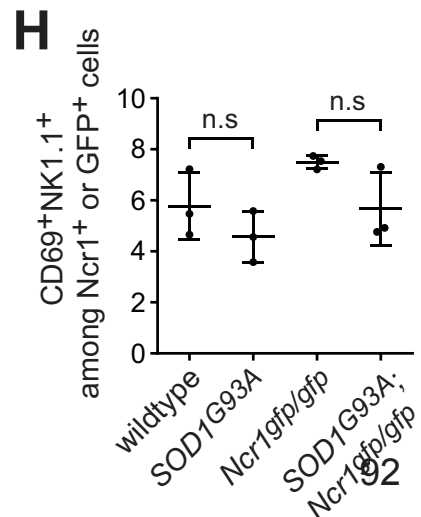
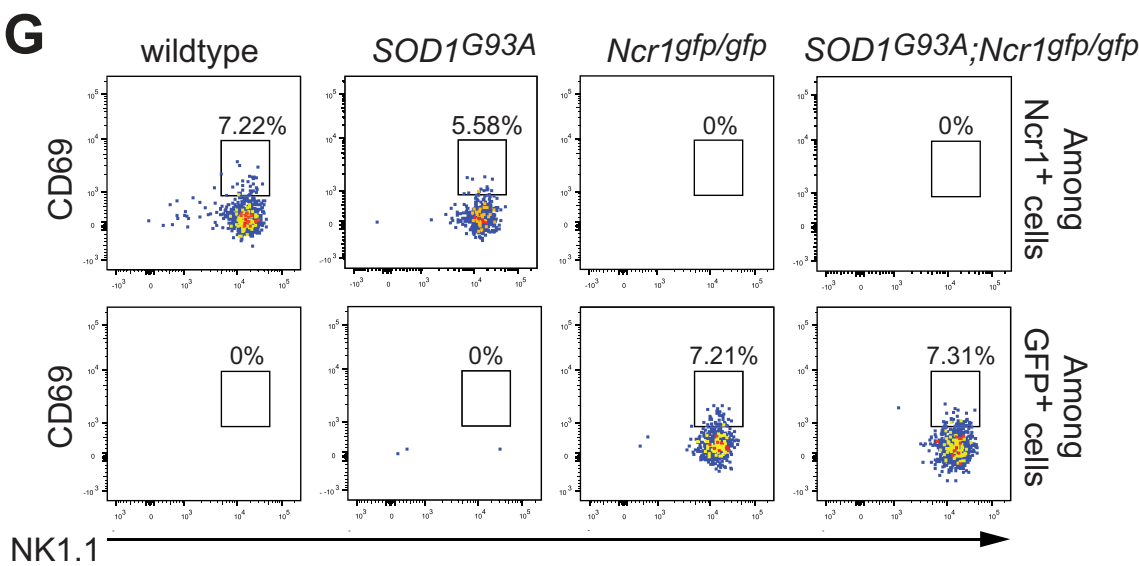
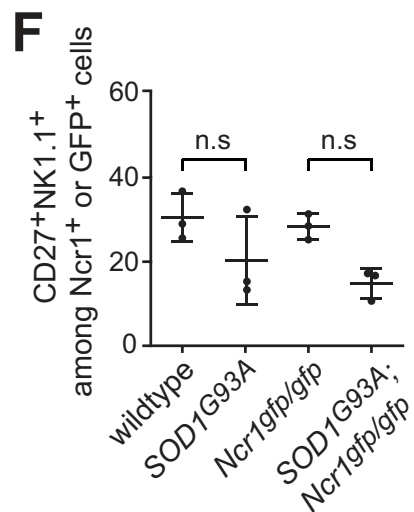
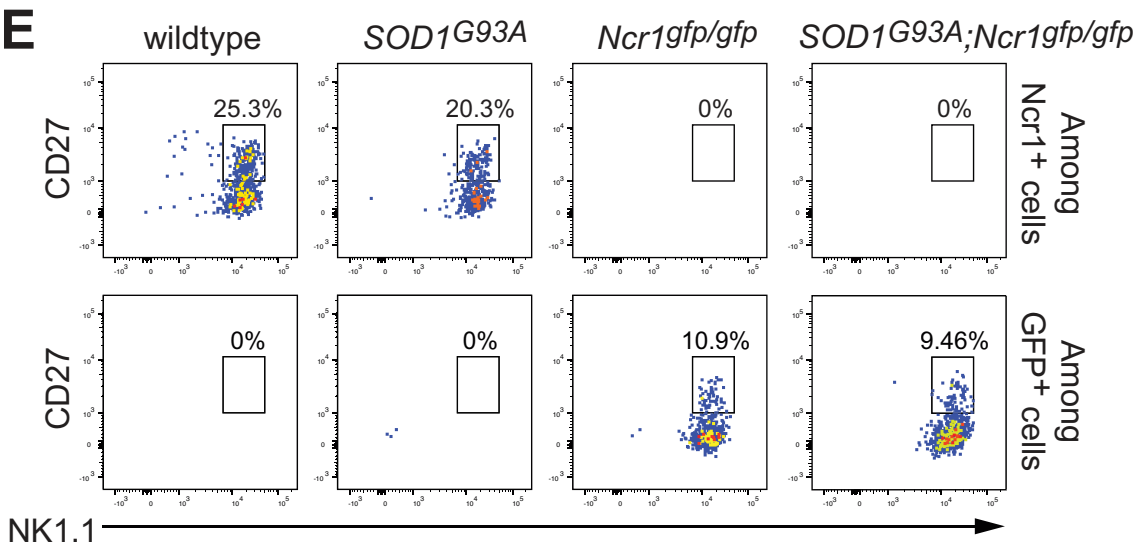
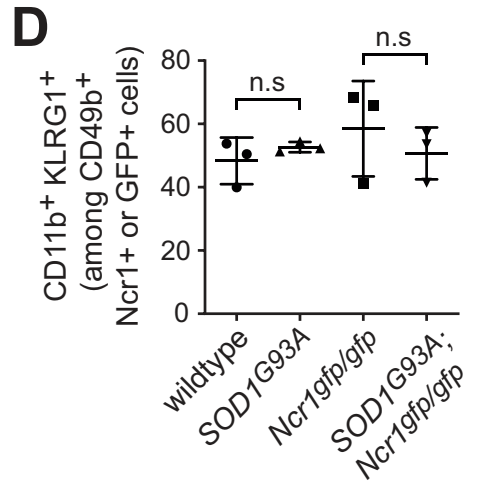
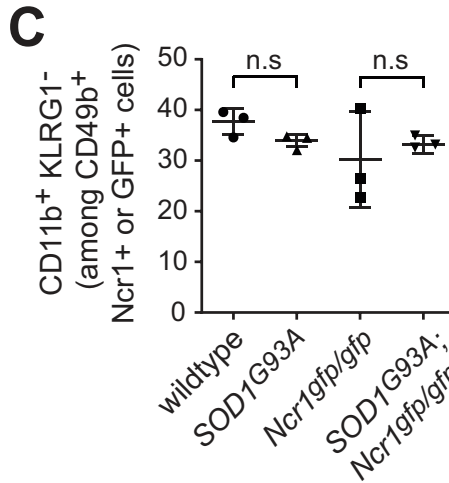
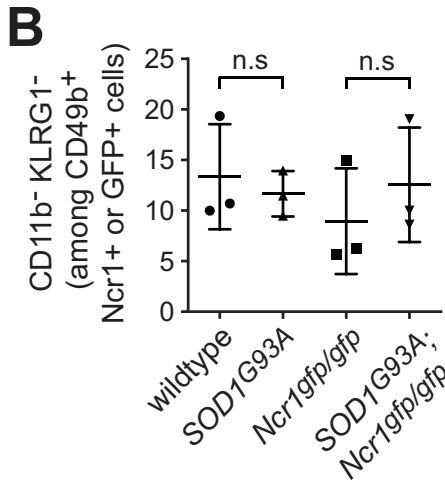
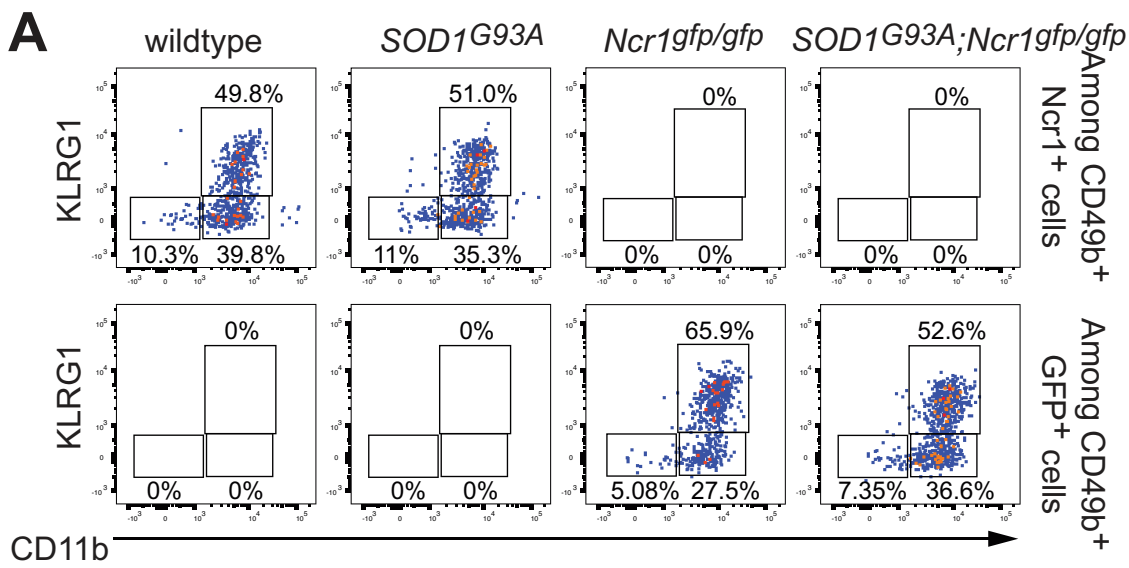


Figure 2. (A) Cells were recovered from the peripheral blood of 150-day-old wildtype, *SOD1^{G93A}*, *Ncr1^{gfp/gfp}* and *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* mice and labeled with CD45, CD3, CD49b, Ncr1, CD11b and KLRG1. CD11b⁺ and KLRG1⁺ cells were sorted among the CD45⁺CD3⁻CD49b⁺Ncr1⁺ or CD45⁺CD3⁻CD49b⁺GFP⁺ NK cells. (B-D) Comparison of CD11b⁻KLRG1⁻ (B), CD11b⁺KLRG1⁻ (C) and CD11b⁺KLRG1⁺ (D) NK cells (CD49b⁺Ncr1⁺ or CD49b⁺GFP⁺) frequencies in the peripheral blood of wildtype, *SOD1^{G93A}*, *Ncr1^{gfp/gfp}* and *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}*. (E) Cytometry plots of CD27⁺NK1.1⁺ cells within the Ncr1⁺ or GFP⁺ NK cells of mice with indicated genotype. (F) Percentages of CD27⁺NK1.1⁺ cells among circulating Ncr1⁺ or GFP⁺ NK cells from mice of indicated genotype. (G) Dot plots of CD69⁺NK1.1⁺ cells among the population Ncr1⁺ or GFP⁺ NK cells of wildtype, *SOD1^{G93A}*, *Ncr1^{gfp/gfp}* and *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* mice at 150 days of age. (H) Scatter plot show the percentage of CD69⁺NK1.1⁺ cells among the Ncr1⁺ or GFP⁺ NK cells in the peripheral blood of mice with indicated genotype. Representative flow cytometry plots are shown, *n* = 3. Numbers in the quadrants indicate the percentage of gated cells, Bars superimposed to the scatter plots show the mean ± SEM, n.s, non-significant, one-way ANOVA with Tukey-Kramer's *post hoc* test.

3.2. NK lymphocytes are not found the spinal cord of *SOD1^{G93A}* mice (to be completed)

We first tested whether NK cells could be detected in the CNS of *SOD1^{G93A}* mice.

Waiting for latest results

Figure 3.

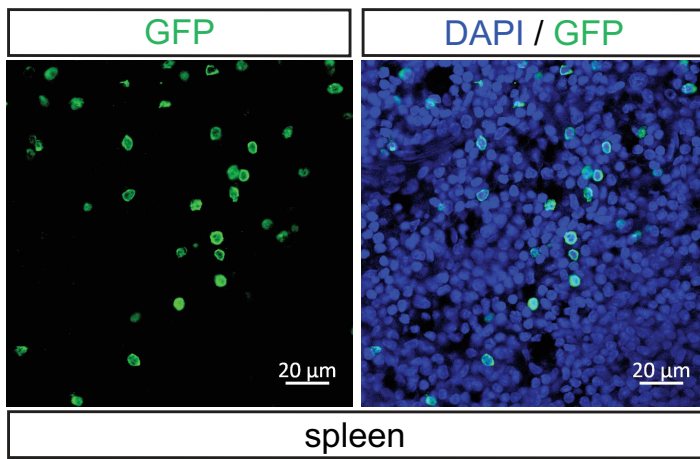
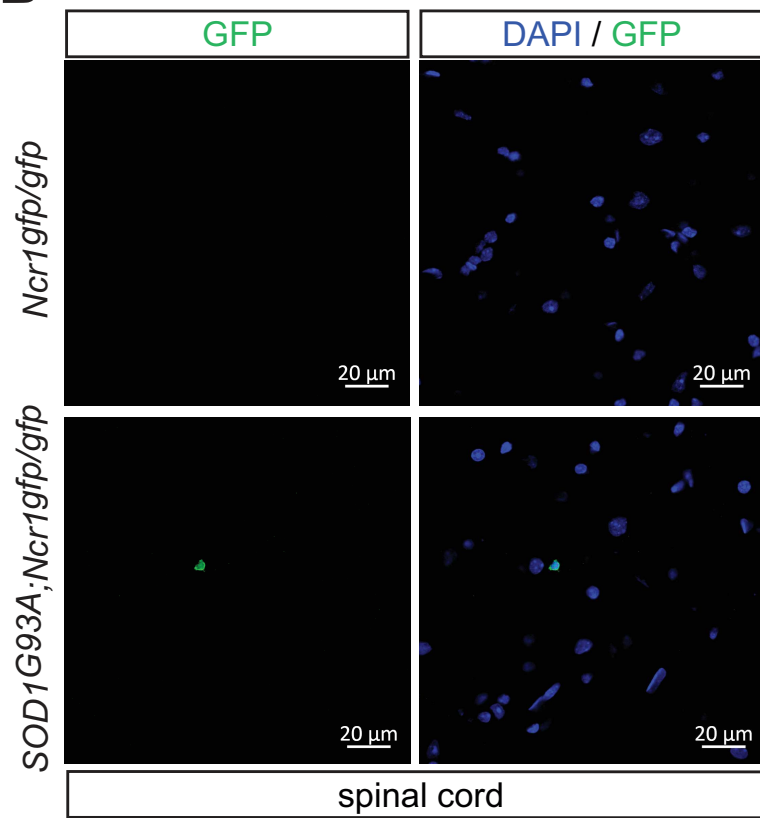
A**B**

Figure 4. Immunohistofluorescence against GFP of (A) spleen and (B) spinal cord sections showing GFP⁺ cells in adult *Ncr1^{gfp/gfp}* and symptomatic *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* mice (140 days of age). GFP expressing cells are found in number in second lymphoid organs which are known to host NK cells. Very rare GFP expressing cells are present in the spinal cord of symptomatic *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* mice. We did not witness any GFP⁺ cells in the *Ncr1^{gfp/gfp}* spinal cord.

3.3. Loss of the NK cell-activating receptor Ncr1 in SOD1 mutant mice does not have any influence on motor decline and life span.

We sought to determine whether the stimulatory receptor Ncr1 could have a function in the pathogenic events leading to motor deterioration. To address this point, we bred *Ncr1^{gfp/gfp}* with *SOD1^{G93A}* mice. *Ncr1^{gfp/gfp}* are viable and fertile (Gazit et al., 2006), and were maintained in specific-pathogen free environment. We explored the impact of the loss of NCR1 function in SOD1 mutant mice on disease onset, defined as the timepoint when mice reach peak body weight; motor performance, determined by grid test and life expectancy (Coque et al., 2019). When we analyzed the time of onset, we did not observe any significant difference between *SOD1^{G93A}* and *SOD1^{G93A}* with a genetic deletion of *Ncr1* (*SOD1^{G93A}*, 113.7 ± 2.9 d and *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* 121.8 ± 4.1 d, means \pm SEM, $P = 0.118$, t test) (Fig 5A & B). We then investigated the impact of *Ncr1* deletion on motor decline of SOD1 mutant mice. There is no statistical significant effect when comparing mice expressing *SOD1^{G93A}* with mice expressing *SOD1^{G93A}* with NCR1 ablation (Figure 5C). We next determined the lifespan of *SOD1^{G93A}* and *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* mice (Figure 5D). We found that the deletion of *Ncr1* neither reduced nor increased the median lifespan of SOD1 mutant mice (*SOD1^{G93A}*, 165 d and *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}*, 165 d, mean \pm SEM, $P = 0.566$, Log-rank Mantel-Cox test). Motoneuron survival was then assessed by determining the number of choline acetyltransferase (ChAT)-positive motoneurons in the spinal cord of 135-day-old symptomatic *SOD1^{G93A}* and *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* mice and age-matched wildtype and *Ncr1^{gfp/gfp}* control mice (Figure S2).

Consistently, we did not observe a significant difference in the number of spinal motoneurons between *SOD1^{G93A}* and *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* mice, while as expected, expression of SOD1 mutant alone leads to a marked loss of motoneurons compared to wildtype and *Ncr1^{gfp/gfp}*. These results show that loss of the cytotoxicity-activating receptor Ncr1 function does not have functional consequence on the ALS-related deterioration of the motor system.

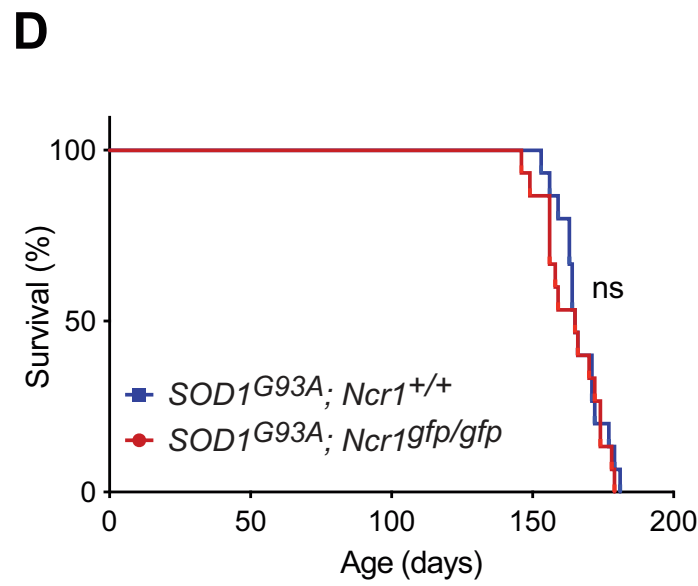
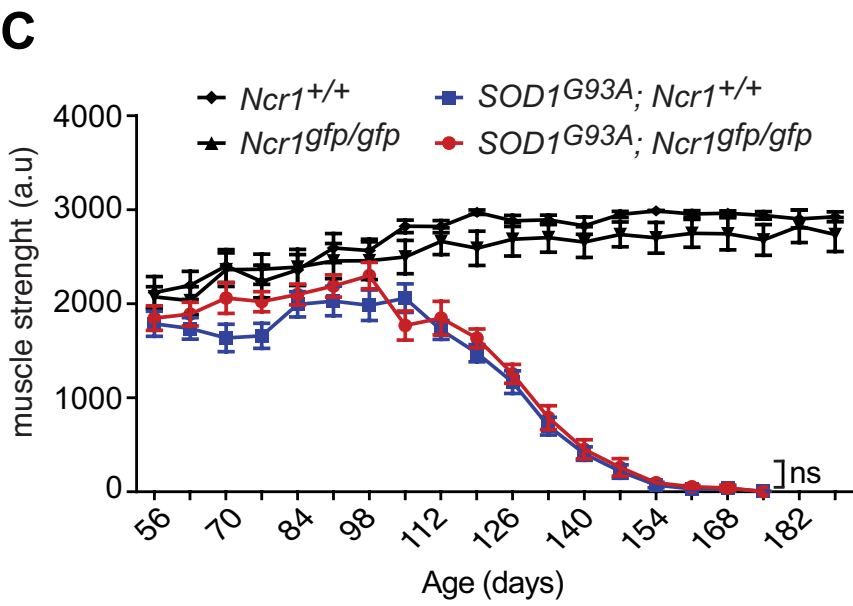
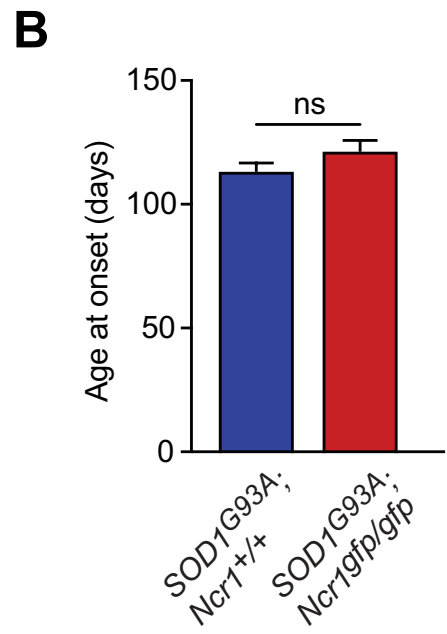
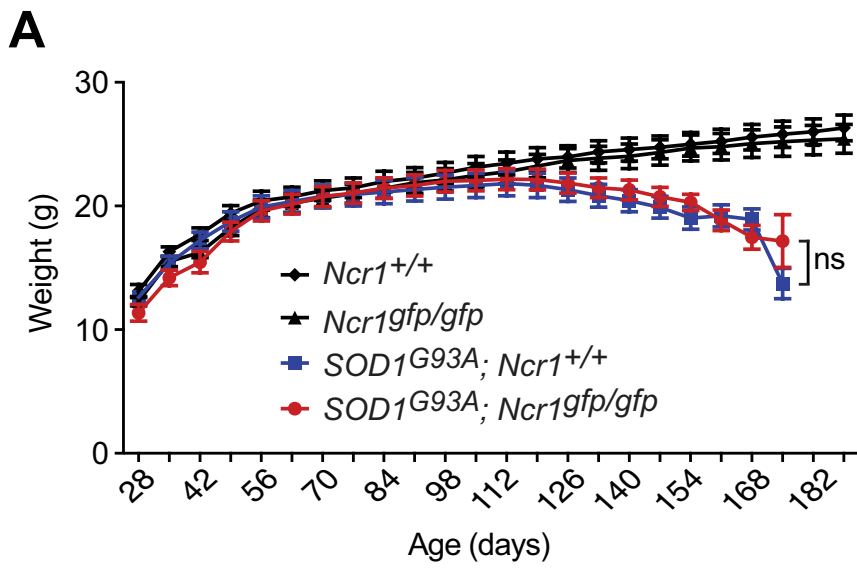


Figure x
Crabé R et al.

Figure 5. (A) Body weight curves of wildtype ($Ncr1^{+/+}$), $Ncr1^{gfp/gfp}$, $SOD1^{G93A}$ and $SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}$ mice (n = 15) (B) Mean age of disease onset of $SOD1^{G93A}$ and $SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}$ mice. The age of onset of was determined at the time mice reach the maximum of the weight curve (n= 15 in each mixed-sex group) (C) Muscle strength (arbitrary unit [a.u]) evolution of wildtype ($Ncr1^{+/+}$), $Ncr1^{gfp/gfp}$, $SOD1^{G93A}$ and $SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}$ mice, monitored with the grid test from pre-symptomatic (56 days of age) until death (n= 15 in each mixed-sex group). Values are expressed as mean \pm SEM, n.s = non-significant. Two-way repeated-measure ANOVA followed by a Newman-Keuls's *post hoc* test (D) Kaplan-Meier survival curve of $SOD1^{G93A}$ and $SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}$ mice (n = 15 in each mixed-sex group). Log-rank Mantel-Cox test.

4. Discussion

Following facial nerve axotomy, NK cells infiltrate the CNS coincidentally with CD4⁺ T cells (Raivich et al., 1998; Byram et al., 2003). However, using cell reconstitution of NK-deficient mouse models, it was demonstrated that NK cells do not promote motoneuron survival. The neuroprotective effect being likely related to CD4⁺ T cells (Byram et al., 2003). In the context of ALS, infiltration of NKp46⁺ and NK1.1⁺ cells have been reported in ALS patients and mice respectively, though the administration of depleting NK1.1 antibody in SOD1 mutant mice led to contrary results on the functional outcome of NK cells (Garofalo et al., 2020; Komine et al., 2018). Here, we did not observe that the expression of the ALS-linked SOD1 mutant influence either the percentage, the profile of maturation and activation of circulation NK cells or promote a significant increase of NK cells in the CNS of mice. The loss of NCR1 function in $SOD1^{G93A}$ mice did not modify the course of the disease or influence motoneuron survival.

In human, NKp46 was initially described as a NK-specific receptor involved in NK activation triggering non MHC-restricted cytotoxicity (Pessino et al., 1998). Since then, NKp46/NCR1 have been found expressed by innate lymphoid cells (ILC); by V δ 1⁺ T cells, a discrete subset of T lymphocytes with cytolytic properties against some hematologic tumor cells (Correia et al., 2011), as well as by a subset of gut intraepithelial lymphocytes (Ettersperger et al., 2016). Our study suggests that NCR1-dependent functions of NK cells as well as of these immune cell

population do not play a major role in ALS, though other functions of immune cell populations that share common surface marker with NK cells should be investigated in the disease context.

4.1. Ncr1 (NKp46)-expressing innate lymphoid cells

ILCs represent a heterogeneous group of immune cells that encompass NK cells, group 1 (ILC1), group 2, (ILC2), and group 3 (ILC3). ILC3s are subdivided into lymphoid tissue-inducer-like ILC3 and Ncr1⁺ ILC3 (Van de Pavert & Vivier, 2016). Despite the expression of the NK cytotoxic receptor, Ncr1⁺ ILC3 are more described for their ability to promote inflammation than for their lytic functions. ILC3s are commonly retrieved in mucosal surfaces, where they play an important role in the maintenance of mucosal tissue homeostasis, as well as in secondary lymphoid organs, meninges and CNS (Brown et al., 2018). Ncr1⁺ ILC3 reside in the meninges of mice under physiological condition, in and experimental autoimmune encephalomyelitis, a murine model of multiple sclerosis, ILC3s accumulate in the meninges and the brain and spinal cord (Hatfield & Brown, 2015). Ncr1⁺ ILCs has been shown to control the onset of neuroinflammation by controlling the infiltration and stability of CD4⁺ Th17 cells (Kwong et al., 2017). NKp46⁺ immunolabeled cells has been observed in the CNS of ALS patient and *SOD1^{G93A}* mice by immunohistochemistry (Garofalo et al., 2020). In the present study, we failed to observe any GFP⁺ (from *NCR1^{gfp/gfp}* locus) cells in spinal of *SOD1^{G93A}* mice cells. We cannot exclude that levels of GFP expression under the control of endogenous Ncr1 promoter were not sufficient high to enable GFP detection by immunohistochemistry or that mouse NK cells lose the expression of Ncr1 while in the CNS. In addition, detailed studies of spinal cord meningeal compartment require non-conventional extrusion of the tissue, longitudinal section or whole mount preparation (Kwong et al., 2017; Rua et al., 2019; DiSano et al., 2020). A methodological approach that we did not take in the present study. Future analysis will further our understanding whether and how ILC3 contribute to the immune response in ALS. Among Ncr1⁺ immune cells that do not belong to T cell lineage, another

specific subset of ILC are intraepithelial lamina propria ILC1 that express Ncr1 and are involved in inflammatory bowel disease (Fuchs et al., 2013). Although the role of this specific subset is not currently known in the context of neurological diseases, ILC1, as discussed below, might represent interesting candidate.

4.2. NK1.1 in spinal microglia, activated macrophages and innate lymphoid cells

NK1.1 cell surface expression in CD45⁺CD3⁻ cells has been used to quantify the infiltration of NK cells in the CNS of ALS mice. Interestingly, analysis of the spinal microglial transcriptome of *SOD1*^{G93A} mice identified *Killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1c* as the most upregulated gene between onset/early symptomatic and presymptomatic stage of the disease (Chiot et al., 2020). *Klrb1b* was also found upregulated in CD11b-sorted microglia the spinal cord of early symptomatic *SOD1*^{G93A} mice compared to wildtype mice (Noristani et al., 2015). Similarly, *Klrb1d*, an allele of *Klrb1b* (Kirkham & Carlyle, 2014), was found upregulated in purified *SOD1*^{G93A}-expressing microglial cells mainly at early symptomatic stage of the disease compared to control mice (Chiu et al., 2013). The product of *Klrb1c* and *Klrb1b* genes is the NK1.1 antigen that is recognized by the commonly used PK136 monoclonal antibody.

NK1.1 can also be found expressed at the surface of other CD45⁺ hematopoietic cells negative for CD3, the prototypic marker of T lymphocytes. Indeed, in response to some specific inflammatory signals, macrophages exhibit surface expression of NK1.1 and exert a Perforin-dependent cytotoxic activity toward target cells. The commonly used anti-NK1.1 (clone PK136) blocking/depleting antibody significantly decrease the killing activity of NK1.1⁺ macrophages (Steiger et al., 2015). It has also been demonstrated that lipopolysaccharide-activated macrophage can also express NKG2D. NKG2D activation by H-60 or Rae1 β NKG2D ligands promote macrophage effector as typified by the production nitric oxide and tumor necrosis factor alpha (TNF α) (Diefenbach et al., 2000). Macrophages from naked mole-rats were also characterized by the expression of CD11b and NK1.1. Activation of NK1.1 in these

macrophages leads to morphological changes as well as their proliferation (Wada et al., 2019). It is noteworthy that a population of macrophages can acquire effector features and can directly kill target cells through the NKG2D and Perforin/Granzyme B pathway (Chu et al., 2020; Baba et al., 2008).

In the liver at physiological condition, of the CD45⁺CD3⁻NK1.1⁺ cells about 60% are classic CD49b⁺ NK cells and 40% are resident ILC1 (Chen et al., 2017). Importantly, ILC1 can also be observed in the CNS (Romero-Suárez et al., 2019). In the CNS, ILC1 can be distinguished by NK by the expression of CD49a and CD49b, as well as other markers despite less stringent (CD200R, CXCR6, TRAIL and DNAM-1). The phenotypic profile of ILC1 in the CNS being CD45^{high}CD3⁻NK1.1⁺CD49a⁺CD49b⁻. ILC1 of the CNS express Perforin and Granzyme B and upon stimulation produce TNF α and interferon gamma (IFN γ). During CNS inflammation, the number of ILC1 (as well as intermediate ILC1) increase in the parenchyma of the brain, and might derive from infiltration from other meningeal compartment (Romero-Suárez et al., 2019). In the present study, we carefully combined NCR1, CD49b, GFP from *Ncr1* locus and NK1.1 expression to narrow any overlap with cell types other than NK, however, we were unable to demonstrate neither significant NK infiltration into the CNS nor variation in the number of NK cells in the circulating blood of ALS mice. It remains of interest to explore the relative contribution of NK1.1⁺ macrophages and ILC1 populations in the pathogenesis of the disease.

4.3. Peripheral disturbance of NK cells in ALS

Our immunophenotyping of circulating NK cells showed that neither their representation, maturation nor activation status differ between ALS and control mice harboring or not a targeted deletion of the *Ncr1* locus. In agreement, a previous report showed that the percentage of NK cells in the spleen and liver do not differ between wildtype and *SOD1^{G93A}* mice (Finkelstein et al., 2011). The studies that combined the surface expression of phenotypic markers CD3, CD16 and CD56 observed a significant increase of NK cells in the circulating

blood of patients with ALS compared to healthy subjects (Rentzos et al., 2012; Murdock et al., 2017; Gustafson et al., 2017; Jin et al., 2020). This increase is in conjunction with a peripheral inflammatory response as defined by the pro-inflammatory feature of innate and adaptive immune cells and the impressive panel of cytokines which are found elevated in the blood and cerebrospinal fluid of ALS patients (McCombe et al., 2020; Moreno-Martinez et al., 2019). However, data reported so far include healthy controls but not include patients with chronic inflammatory disease or other neurological disorders with or not peripheral inflammatory components. Additional studies including comprehensive cohorts could identify ALS-specific immune signature in cell subpopulation and cytokine profiles. This can be of a particular importance knowing the more global function of NK cells in immune surveillance or disease controlling as illustrated in the resolution of acute allergic airway inflammation or the diminution of local inflammatory response in the CNS (Haworth et al., 2011; Hao et al., 2010). Levels of Interleukin (IL)-12, IL-18 and IL-15, which stimulate NK proliferation and activation, are found elevated in blood of ALS patients (Moreno-Martinez, 2019). This is of a particular interest knowing that these cytokines can, independently of target cells, restimulate a particular population of memory-like NK cells, which have been previously activated by tumor cells or following virus infection, to produce IFN γ with an inherited capacity to proliferate (Romee et al., 2012; Pahl et al., 2018).

Another study using CD3 and CD56 as discriminating determinants observed however a reduced frequency of NK cells (Garofalo et al., 2020). Difference between clinical characteristics, cohort size, methodological factors might indeed be considered to explain variability among studies. Although, the standardization of immunophenotypic analysis would also be cardinal, since for instance some population of activated plasmacytoid, IL-15-induced myeloid dendritic cells, ILC-1-like cells and NKT cells express CD56 (Tel et al., 2012; Anguille et al., 2012; Salome et al., 2019). Of note, the increased levels of NK cells in the peripheral blood of ALS patients compared to healthy subjects was not however correlated with the

amount of NK cells retrieved in the cerebro-spinal fluid (CSF) (Jin et al., 2020), while the CSF can be regarded as a trafficking compartment between blood and the CNS.

Author Contributions

Study concept and design: J.B., T.V. and C.R.

Acquisition of data: R.C., A.B., A.P., T.G., G.E.A, R.R., J.B.

Analysis and interpretation of data: R.C., A.B., G.E.A., J.H., R.R., T.V., J.B. and C.R.

Drafting the manuscript: C.R.

Project Administration, C.R.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We are grateful to all members of the team, Dr. Xavier Ayrygnac, Dr. Sophie Ugolini and Pr. Florence Perrin for their helpful discussion throughout this work. We thank Céline Salsac, Désiré Challuau, Sébastien Milesi, Maria Mantero, Pierre Portales and Marie Guirguis for their technical advices or help. We are grateful to Anne-Laure Bonnefont and the personnel of the INM animal core facility, the Réseau des animaleries de Montpellier (RAM), the Réseau d'histologie expérimentale de Montpellier (RHEM) and the MRI imaging facility.

Funding

This work was supported by grants from the national institute for health and medical research (Inserm) and the association française pour la recherche sur la SLA (ARSLA). R.C. is a recipient of a Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (MESRI) and ARSLA Ph.D fellowship.

Abbreviations

ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
ALSFRS-R	ALS functional rating scale
CNS	Central Nervous system
GFP	Green fluorescent protein
ILC	Innate lymphoid cells
IFN γ	Interferon gamma
Klrb1	Killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1
MHC	Major histocompatibility complex
NK	Natural killer
SOD1	Superoxide dismutase-1
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
Treg	Regulatory T cell

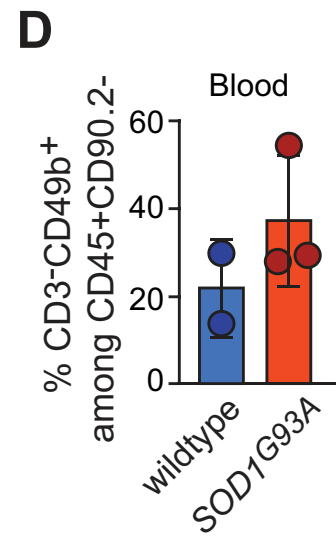
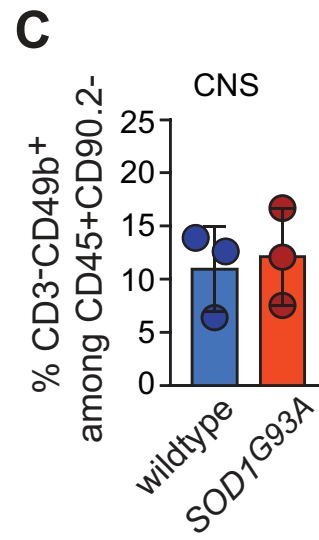
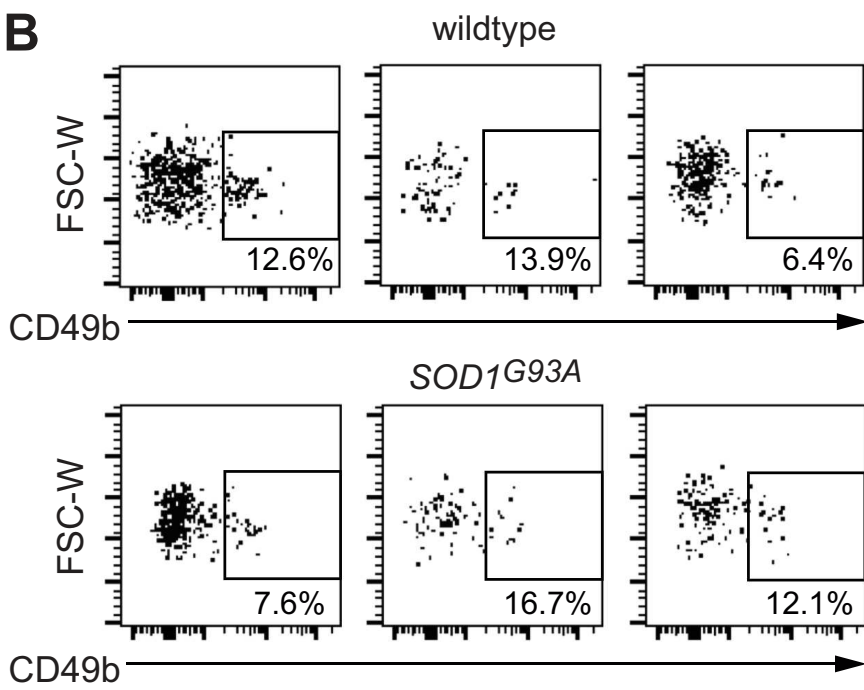
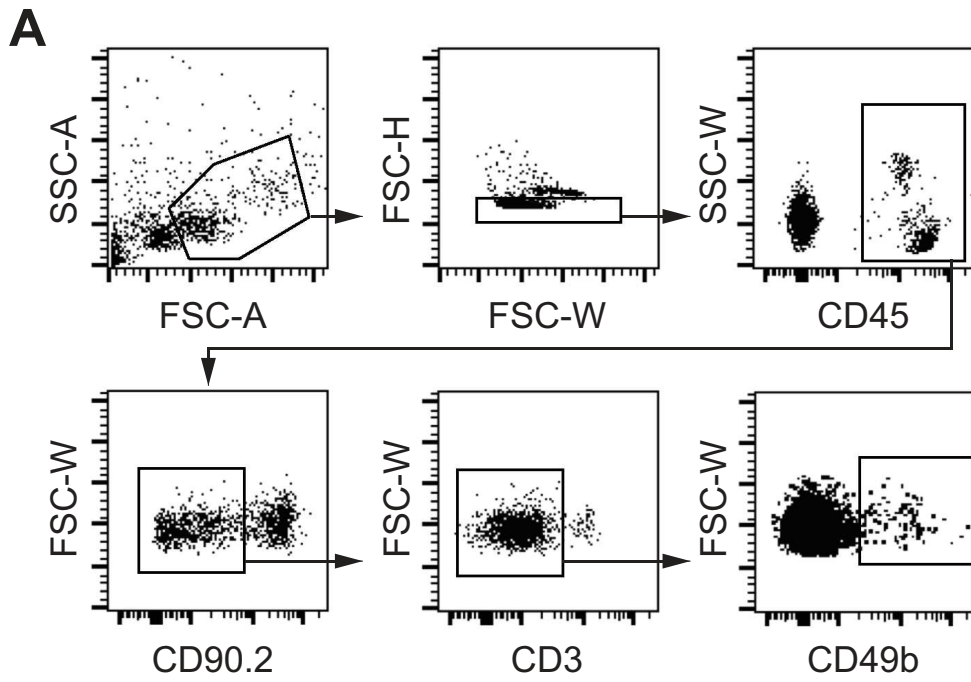
References

1. Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S. & Malarkannan, S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* 9, (2018).
2. Anguille, S. et al. Interleukin-15-Induced CD56⁺ Myeloid Dendritic Cells Combine Potent Tumor Antigen Presentation with Direct Tumoricidal Potential. *PLOS ONE* 7, e51851 (2012).
3. Baba, T. et al. Rat CD4⁺ CD8⁺ Macrophages Kill Tumor Cells through an NKG2D- and Granzyme/Perforin-Dependent Mechanism. *J Immunol* 180, 2999–3006 (2008).
4. Beers, D. R. et al. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134, 1293–1314 (2011).
5. Beers, D. R. et al. ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI Insight* 2, (2017).
6. Bowerman, M. et al. Neuroimmunity dynamics and the development of therapeutic strategies for amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 7, (2013).
7. Brown, G., Ceredig, R. & Tsapogas, P. The Making of Hematopoiesis: Developmental Ancestry and Environmental Nurture. *IJMS* 19, 2122 (2018).
8. Byram, S. C., Serpe, C. J., Pruett, S. B., Sanders, V. M. & Jones, K. J. Natural killer cells do not mediate facial motoneuron survival after facial nerve transection. *Brain, Behavior, and Immunity* 17, 417–425 (2003).
9. Chen, S. et al. NK1.1⁺ cells promote sustained tissue injury and inflammation after trauma with hemorrhagic shock. *Journal of Leukocyte Biology* 102, 127–134 (2017).
10. Chiot, A., Lobsiger, C. S. & Boillée, S. New insights on the disease contribution of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Current Opinion in Neurology* 32, 764–770 (2019).
11. Chiot, A. et al. Modifying macrophages at the periphery has the capacity to change microglial reactivity and to extend ALS survival. *Nat Neurosci* 23, 1339–1351 (2020).
12. Chiu, I. M. et al. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *PNAS* 105, 17913–17918 (2008).
13. Chiu, I. M. et al. A Neurodegeneration-Specific Gene-Expression Signature of Acutely Isolated Microglia from an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *Cell Reports* 4, 385–401 (2013).
14. Chu, Z. et al. Primed macrophages directly and specifically reject allografts. *Cell Mol Immunol* 17, 237–246 (2020).

15. Clausen, J. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology* 207, 85–93 (2003).
16. Coque, E. et al. Cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes expressing ALS-causing SOD1 mutant selectively trigger death of spinal motoneurons. 6.
17. Correia, D. V. et al. Differentiation of human peripheral blood V δ 1⁺ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. *Blood* 118, 992–1001 (2011).
18. Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N. & Raulet, D. H. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 1, 119–126 (2000).
19. DiSano, K. D. et al. Isolating Central Nervous System Tissues and Associated Meninges for the Downstream Analysis of Immune cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e61166 (2020) doi:10.3791/61166.
20. Engelhardt, J. I., Tajti, J. & Appel, S. H. Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 50, 30–36 (1993).
21. Eittersperger, J. et al. Interleukin-15-Dependent T-Cell-like Innate Intraepithelial Lymphocytes Develop in the Intestine and Transform into Lymphomas in Celiac Disease. *Immunity* 45, 610–625 (2016).
22. Finkelstein, A. et al. Abnormal Changes in NKT Cells, the IGF-1 Axis, and Liver Pathology in an Animal Model of ALS. *PLoS ONE* 6, e22374 (2011).
23. Fuchs, A. et al. Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- γ -Producing Cells. *Immunity* 38, 769–781 (2013).
24. Garofalo, S. et al. Natural killer cells modulate motor neuron-immune cell cross talk in models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nat Commun* 11, 1773 (2020).
25. Gazit, R. et al. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*. *Nat Immunol* 7, 517–523 (2006).
26. Gustafson, M. P. et al. Comprehensive immune profiling reveals substantial immune system alterations in a subset of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 12, e0182002 (2017).
27. Hao, J. et al. Central nervous system (CNS)–resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *Journal of Experimental Medicine* 207, 1907–1921 (2010).
28. Hatfield, J. K. & Brown, M. A. Group 3 innate lymphoid cells accumulate and exhibit disease-induced activation in the meninges in EAE. *Cellular Immunology* 297, 69–79 (2015).
29. Haukedal, H. & Freude, K. Implications of Microglia in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Journal of Molecular Biology* 431, 1818–1829 (2019).

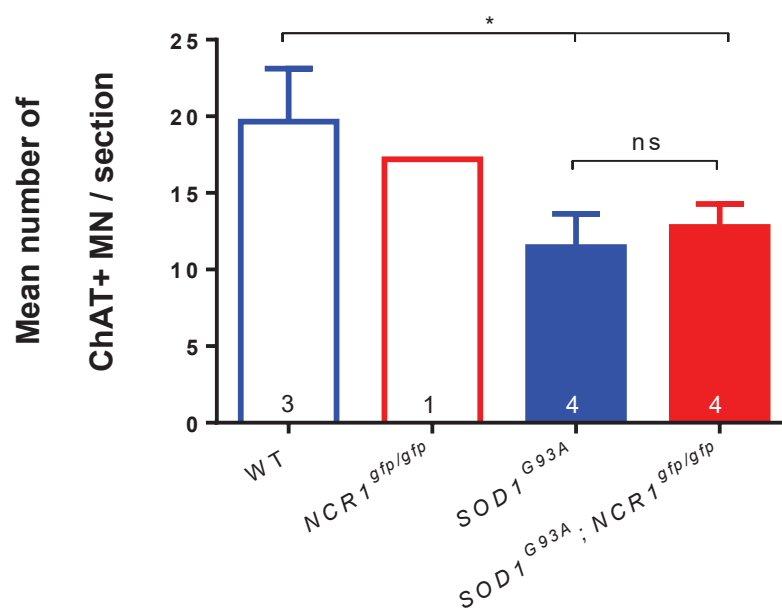
30. Haworth, O., Cernadas, M. & Levy, B. D. NK Cells Are Effectors for Resolvin E1 in the Timely Resolution of Allergic Airway Inflammation. *J.I.* 186, 6129–6135 (2011).
31. Jin, M., Günther, R., Akgün, K., Hermann, A. & Ziemssen, T. Peripheral proinflammatory Th1/Th17 immune cell shift is linked to disease severity in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* 10, 5941 (2020).
32. Kirkham, C. L. & Carlyle, J. R. Complexity and Diversity of the NKR-P1:Clr (Klrb1:Clec2) Recognition Systems. *Front. Immunol.* 5, (2014).
33. Komine, O. et al. Innate immune adaptor TRIF deficiency accelerates disease progression of ALS mice with accumulation of aberrantly activated astrocytes. *Cell Death Differ* 25, 2130–2146 (2018).
34. Kwong, B. et al. T-bet-dependent NKp46⁺ innate lymphoid cells regulate the onset of TH17-induced neuroinflammation. *Nat Immunol* 18, 1117–1127 (2017).
35. Longinetti, E. & Fang, F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Current Opinion in Neurology* 32, 771–776 (2019).
36. Masrori, P. & Damme, P. V. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *European Journal of Neurology* 27, 1918–1929 (2020).
37. Mathis, S., Goizet, C., Soulages, A., Vallat, J.-M. & Masson, G. L. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: A review. *Journal of the Neurological Sciences* 399, 217–226 (2019).
38. McCombe, P. A., Lee, J. D., Woodruff, T. M. & Henderson, R. D. The Peripheral Immune System and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurol* 11, 279 (2020).
39. Moreno-Martinez, L., Calvo, A. C., Muñoz, M. J. & Osta, R. Are Circulating Cytokines Reliable Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis? *IJMS* 20, 2759 (2019).
40. Murdock, B. J. et al. Natural killer cells associate with amyotrophic lateral sclerosis in a sex- and age-dependent manner. *JCI Insight* (2021) doi:10.1172/jci.insight.147129.
41. Murdock, B. J. et al. Correlation of Peripheral Immunity With Rapid Amyotrophic Lateral Sclerosis Progression. *JAMA Neurol* 74, 1446–1454 (2017).
42. Noristani, H. N. et al. Brcal is expressed in human microglia and is dysregulated in human and animal model of ALS. *Mol Neurodegeneration* 10, 34 (2015).
43. Pahl, J. H. W., Cerwenka, A. & Ni, J. Memory-Like NK Cells: Remembering a Previous Activation by Cytokines and NK Cell Receptors. *Front. Immunol.* 9, (2018).
44. Pessino, A. et al. Molecular Cloning of NKp46: A Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily Involved in Triggering of Natural Cytotoxicity. *Journal of Experimental Medicine* 188, 953–960 (1998).
45. Raivich, G. et al. Immune Surveillance in the Injured Nervous System: T-Lymphocytes Invade the Axotomized Mouse Facial Motor Nucleus and Aggregate around Sites of Neuronal Degeneration. *J. Neurosci.* 18, 5804–5816 (1998).

46. Rentzos, M. et al. Alterations of T cell subsets in ALS: a systemic immune activation? *Acta Neurologica Scandinavica* 125, 260–264 (2012).
47. Romee, R. et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* 120, 4751–4760 (2012).
48. Romero-Suárez, S. et al. The Central Nervous System Contains ILC1s That Differ From NK Cells in the Response to Inflammation. *Front. Immunol.* 10, (2019).
49. Rua, R. et al. Infection drives meningeal engraftment by inflammatory monocytes that impairs CNS immunity. *Nat Immunol* 20, 407–419 (2019).
50. Salomé, B. et al. CD56 as a marker of an ILC1-like population with NK cell properties that is functionally impaired in AML. *Blood Advances* 3, 3674–3687 (2019).
51. Saxena, S., Cabuy, E. & Caroni, P. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 12, 627–636 (2009).
52. Soulard, C. et al. Spinal Motoneuron TMEM16F Acts at C-boutons to Modulate Motor Resistance and Contributes to ALS Pathogenesis. *Cell Rep* 30, 2581-2593.e7 (2020).
53. Steiger, S., Kuhn, S., Ronchese, F. & Harper, J. L. Monosodium Urate Crystals Induce Upregulation of NK1.1-Dependent Killing by Macrophages and Support Tumor-Resident NK1.1+ Monocyte/Macrophage Populations in Antitumor Therapy. *The Journal of Immunology* 195, 5495–5502 (2015).
54. Tel, J. et al. Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood* 120, 3936–3944 (2012).
55. van de Pavert, S. A. & Vivier, E. Differentiation and function of group 3 innate lymphoid cells, from embryo to adult. *INTIMM dxv052* (2015) doi:10.1093/intimm/dxv052.
56. Vivier, E. et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* 331, 44–49 (2011).
57. Wada, H. et al. Flow cytometric identification and cell-line establishment of macrophages in naked mole-rats. *Sci Rep* 9, 17981 (2019).
58. Yamanaka, K. & Komine, O. The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neuroscience Research* 126, 31–38 (2018).
59. Zhang, R. et al. Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *Journal of Neuroimmunology* 159, 215–224 (2005).



Supplementary figure S1. (A) Gating strategy (B) Flow cytometry plots showing CD49b⁺ (CD45⁺CD90.2⁻CD3⁻) cells in the CNS (spinal cord) of 150-day-old wildtype and *SOD1^{G93A}* mice. FSC-W = Forward light scatter width. (C) and (D) show the percentage of circulating CD3⁻CD49b⁺ NK cells in the spinal cord and blood, respectively, from mice of the indicated genotype. Representative flow cytometry dot plots are shown, *n* = 3 per group. Numbers in the quadrants indicate the percentage of gated cells, horizontal bars show mean values ± SEM.

Motoneuron survival at symptomatic stage (140 days)



Supplementary figure S2. Quantification of the number of ChAT⁺ motoneurons in 10 sections of the lumbar spinal cord of 140 days-old wild-type (n=3), *Ncr1^{gfp/gfp}* (n=1), *SOD1^{G93A}* (n=4) and *SOD1^{G93A}; Ncr1^{gfp/gfp}* (n=4) mice. Values are means ± SEM. n.s = non-significant. ANOVA with Turkey-Kramer's post hoc test.

II. Le rôle de properdine dans la SLA

1. Matériels et méthodes

1.1. Création du double mutant souris *SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}*

Le modèle de souris déficiente en properdine (*Cfp^{-/-}*) est un généreux don de la professeure Cordula Stover du laboratoire d'immunologie de l'université de Leicester (Royaume-Uni). Les souris *Cfp^{-/-}* ont été obtenues par recombinaison homologue avec un vecteur aboutissant au remplacement d'une région de 1.6 kb comportant les exons 3 à 7 par le gène de sélection positive *neo^r*, codant pour la néomycine (Stover et al., 2008). Cette mutation correspond à une recombinaison des régions codantes pour les TSR 1 à 5, avec la troncation des exons 3 et 7 (TSR 1 et 5) et le remplacement total des exons 4 à 6 (codants pour les TSR 2 à 4) par la cassette *neo^r*, comme illustré sur la **figure 20**.

La souris modèle SLA déplétée en properdine, appelée *SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}*, a été générée par accouplement de mâles *SOD1^{G93A}* avec des femelles *Cfp^{-/-}* (properdine KO). La position du gène sur le chromosome X a permis l'obtention de mâles *SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}* (properdine KO) dès la première génération. Quatre cohortes ont été comparées en fonction de leur génotype : Le groupe test *SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}* et les groupes contrôles *SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}* et sauvage (WT).

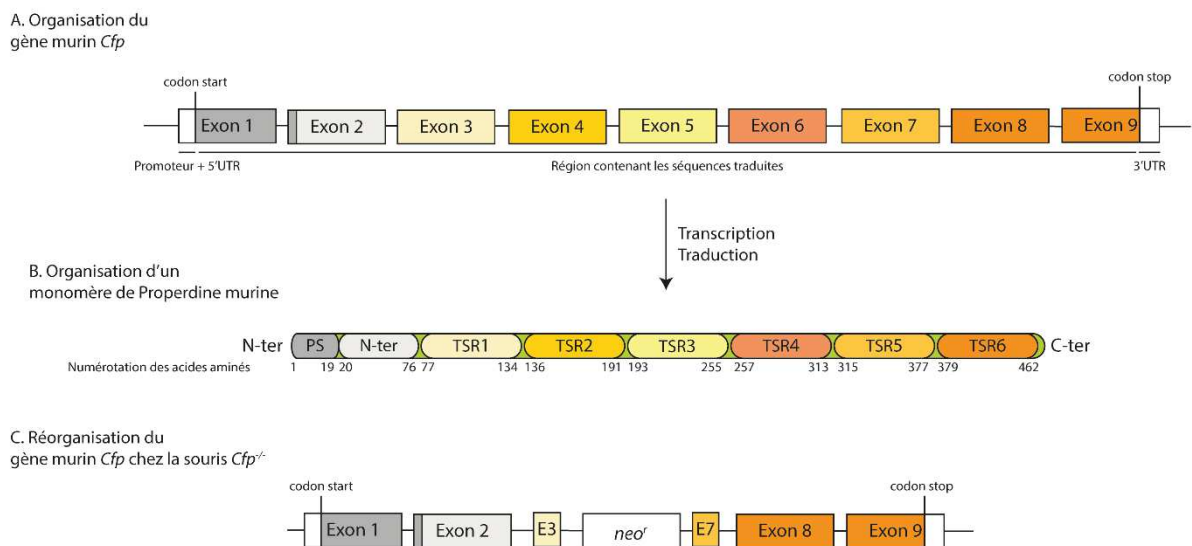


Figure 20 : Schématisation de l'organisation du gène *Cfp* chez la souris *Cfp^{-/-}*. (A) Représentation des séquences exoniques du gène *Cfp* (Rectangles). Les parties d'exons colorées sont directement impliquées dans le codage des acides aminés de la protéine Properdine. (B) Représentation d'un monomère de Properdine ainsi que de ses domaines fonctionnels connus (ovale). Un domaine protéique donné et la portion de gène codant pour ce domaine sont de couleur équivalente. Ainsi, le peptide signal (PS) en gris est codé par les exons grisés, soit la partie 3' de l'exon 1 et la partie 5' de l'exon 2. (C) Représentation des séquences exoniques théoriques restantes après recombinaison homologue du gène. TSR = Répétition thrombospondine de type I, 5' UTR = Région 5' non-traduite, 3'UTR= Région 3' non-traduite, E3 = Exon 3, E7 = Exon 7, *neo^r* = cassette néomycine.

1.2. Analyses histologiques

Les expérimentations d'immunohistofluorescence, les prélèvements de tissus et les analyses statistiques ont été réalisés suivant le même protocole qu'utilisé précédemment dans l'article « Natural killer cells are not significantly recruited to the central nervous system of ALS mice and deletion of Ncr1 does not influence their motor decline » pages 83 à 84 de ce manuscrit.

Les illustrations et quantifications ont été réalisées sur des cryosections de moelle épinière lombaire. Un marqueur de noyaux Dapi a été utilisé sur certains échantillons à la fin du processus d'immunomarquage (dilution au 1/1000 dans du PBS, incubation de 5 min). Pour les marquages, les anticorps suivant ont été utilisés :

1.2.1. Anticorps primaires

Epitope	Référence ou nom du clone	Fournisseur	Espèce	Dilution
Properdine	186834	Abcam	Lapin	1/200
Properdine humaine	LS-B13878	LS Biosciences	Lapin	1/200
ChAT	AB144P	Merck Millipore	Chèvre	1/400
GFAP	GA6	Merck Millipore	Souris	1/300
CD45	IBL-5/25	Merck Millipore	Rat	1/500
CD68	FA-11	Bio-Rad	Souris	1/200
Caspase-3 (clivée)	9661	Cell signaling Tech	Lapin	1/100
SOD1 mal conformée	B8H10	Medimabs	Souris	1/50

1.2.2. Anticorps secondaires

Epitope	Nom	Fournisseur	Espèce	Dilution
Ig de lapin	Alexa Fluor 594	ThermoFisher Scientific	Ane	1/1000
Ig de lapin	Alexa Fluor 488	ThermoFisher Scientific	Ane	1/1000
Ig de chèvre	Alexa Fluor 594	ThermoFisher Scientific	Ane	1/1000
Ig de rat	Alexa Fluor 488	ThermoFisher Scientific	Ane	1/1000
Ig de souris	Alexa Fluor 647	ThermoFisher Scientific	Ane	1/1000
Ig de souris	Alexa Fluor 488	ThermoFisher Scientific	Ane	1/1000

1.2.3. Quantifications

Les motoneurones survivants ont été comptés manuellement sur le logiciels Zen. Tous les motoneurones positifs pour ChAT d'une section ont été pris en compte.

La microglie, les astrocytes et les astrocytes Aβ ont été quantifiés manuellement par Julie Bourret, étudiante en Master 2. Toutes les cellules positives pour CD45 (microglie) ou Gfap (astrocytes et Aβ) dans une région d'intérêt (ROI) de la corne ventrale de la moelle épinière ont été prises en compte. La ROI a été standardisée à un disque des dimensions suivantes : $xy = 4823,6 \text{ mm}^2$ sur une profondeur $z = 7 \text{ }\mu\text{m}$.

2. Résultats

2.1. La properdine s'accumule progressivement dans la moelle épinière de souris SLA et colocalise avec des déterminants pathologiques spécifiques

Nos premières observations de la properdine dans la moelle épinière de souris symptomatique SLA ont montré que la protéine est présente sous la forme de gros agrégats. Ces agrégats sont restreints à la substance grise de la moelle épinière et concentrés majoritairement au niveau de la corne ventrale, lieu de la dégénérescence des motoneurones dans la pathologie. La protéine est quasiment absente de la corne dorsale de la moelle épinière, comme illustré dans la **figure 21**. Les immunomarquages de la protéine à des stades plus précoces de la pathologie montrent que la properdine n'est pas présente à 75 jours (pré-symptomatique) et commence à s'accumuler aux alentours de 110 jours (début des symptômes cliniques). Une quantification préliminaire dans la corne ventrale de la moelle épinière de souris *SOD1^{G93A}* de 110 jours et 150 jours indique une hausse de la surface occupée par les agrégats d'un facteur ~10 (**Figure 23**).

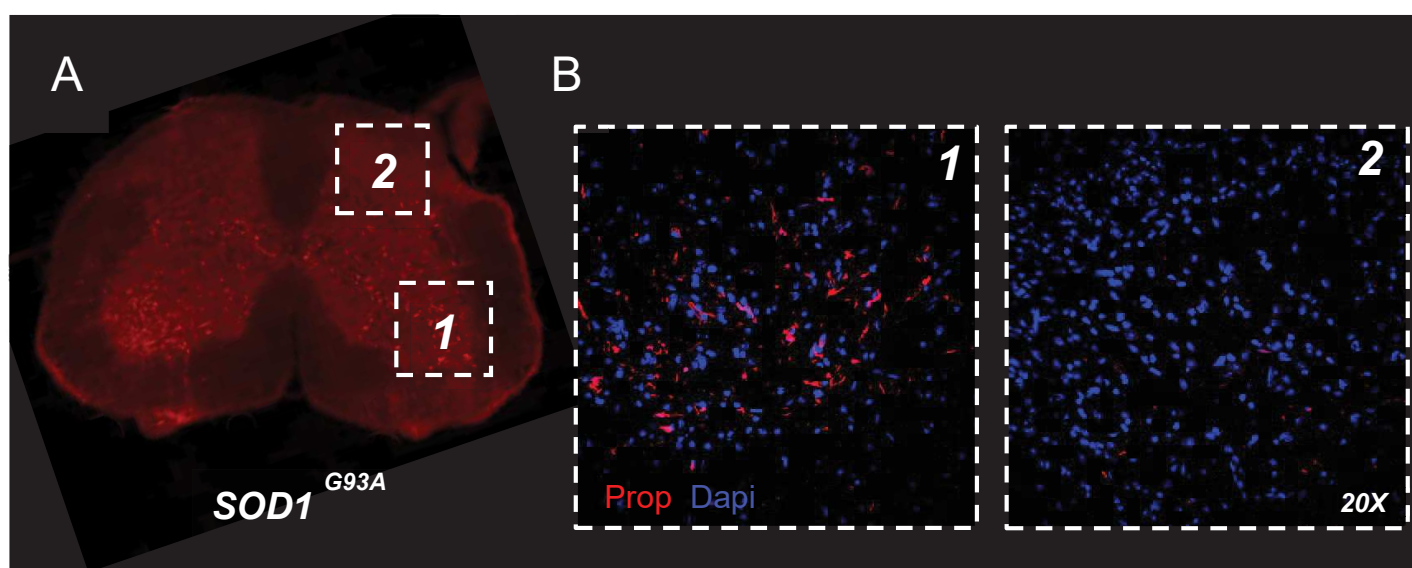


Figure 21 : La properdine s'accumule principalement dans la corne ventrale de la moelle épinière de souris modèle SLA *SOD1^{G93A}*. (A) Section de moelle épinière entière immunomarkuée avec un anticorps anti-properdine (Prop, rouge). Les encarts 1 et 2 correspondent en (B) aux agrandissements de la corne ventrale (1) et dorsale (2) de la moelle épinière, marquées également au dapi pour visualiser les noyaux (bleu). Image de section entière obtenue via l'AxioScan (Zeiss). Image d'agrandissement obtenues par microscopie à confocal LMS700 (Zeiss).

2.2. La properdine colocalise avec des déterminants pathologiques et pourrait participer à leur élimination par la microglie

Nous savons que la SLA est une protéinopathie, les patients SLA sporadiques et familiaux présentant le plus souvent des agrégats de TDP-43 et dans un pourcentage plus faible des agrégats de SOD1 (Tan et al., 2007 ; Pokrishevsky et al., 2012). Le modèle de souris *SOD1^{G93A}* est parfaitement adapté à l'étude de SOD1 puisqu'il accumule de nombreux agrégats de la protéine mal conformée au cours de la maladie,

visualisable grâce à l'utilisation d'anticorps conformationnels spécifiques (Parone et al., 2013). J'ai voulu comparer le motif d'agrégation de la properdine à celui, connu, de la SOD1 humaine mal conformée (hSOD1 mis). Étonnamment, nos résultats montrent une colocalisation fréquente des deux protéines aux sein de même agrégats dans le tissu symptomatique, notamment autour du motoneurone (Figure 22.A). Bien que les agrégats observés semblent extracellulaires, j'ai effectué des marquages des différents types de cellules présentes dans l'environnement du motoneurone afin de vérifier une possible localisation intracellulaire spécifique ou ubiquitaire. Ces analyses n'ont pas montré de lien évident avec les motoneurons ChAT⁺ (Figure 23. A). De façon surprenante, j'ai visualisé un nombre non-négligeable de cellules microgliales / de macrophages CD45⁺ physiquement proches, voire intriqués, avec des agrégats réactifs à la properdine ou doublement réactifs à la properdine/hSOD1 mis (Figure 22.B et 23.B).

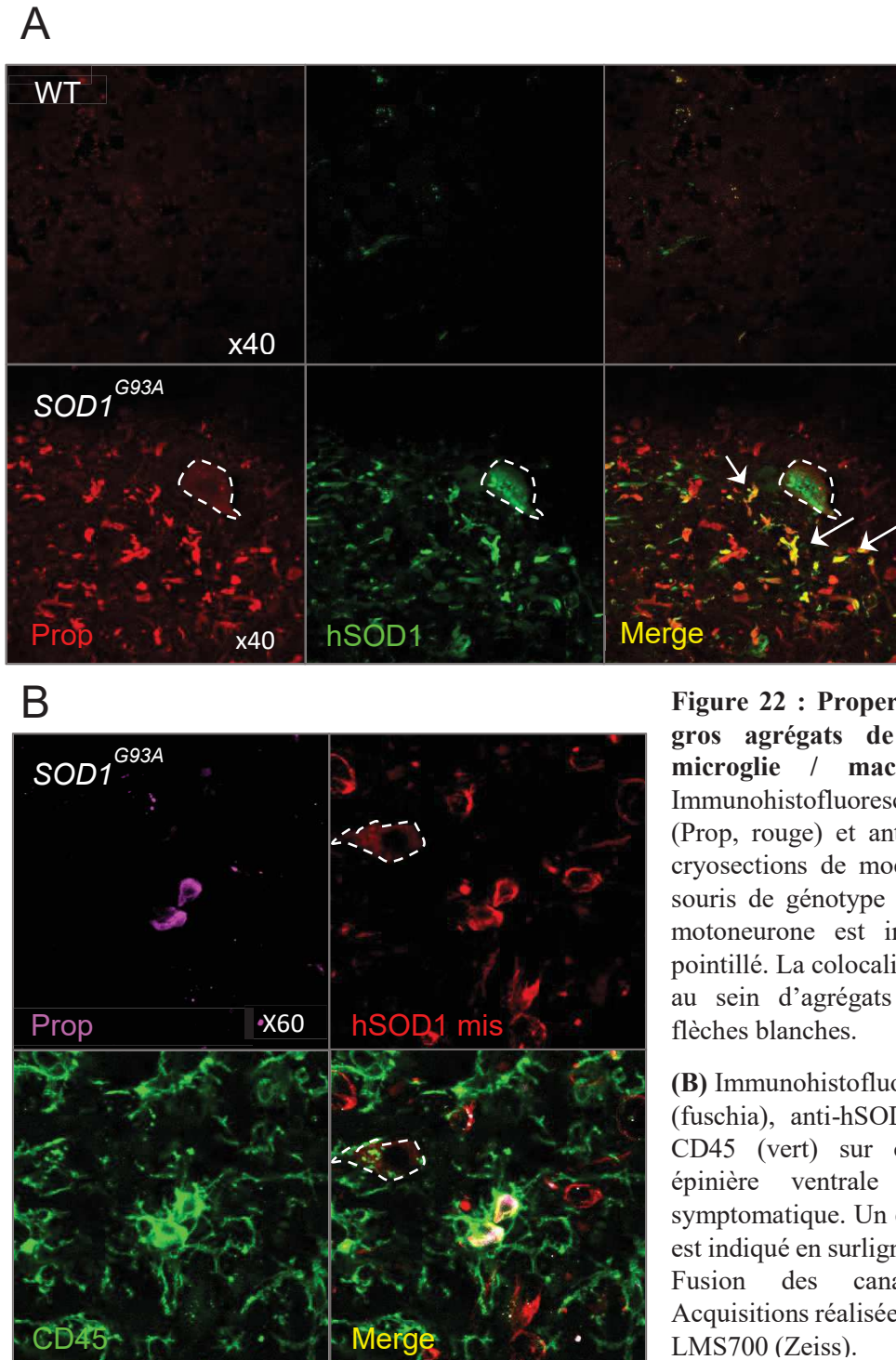


Figure 22 : Properdine colocalise avec les gros agrégats de mSOD1 et avec la microglie / macrophage CD45⁺. (A) Immunohistofluorescence anti-properdine (Prop, rouge) et anti-hSOD1 mis (vert) sur cryosections de moelle épinière ventrale de souris de génotype indiqué. Un exemple de motoneurone est indiqué en surlignement pointillé. La colocalisation des deux protéines au sein d'agrégats est soulignée par des flèches blanches.

(B) Immunohistofluorescence anti-properdine (fuschia), anti-hSOD1 mis (rouge) et anti-CD45 (vert) sur cryosections de moelle épinière ventrale de souris *SOD1^{G93A}* symptomatique. Un exemple de motoneurone est indiqué en surlignement pointillé. Merge = Fusion des canaux de fluorescence. Acquisitions réalisées au microscope confocal LMS700 (Zeiss).

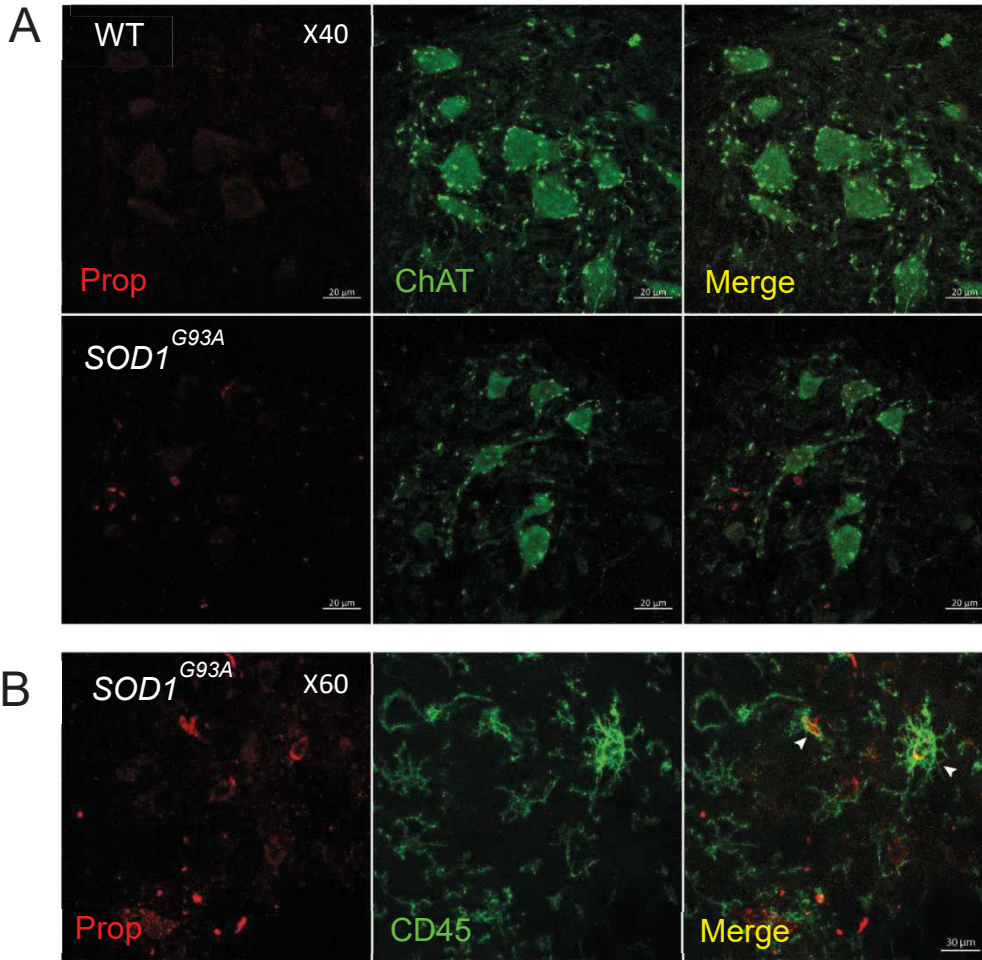
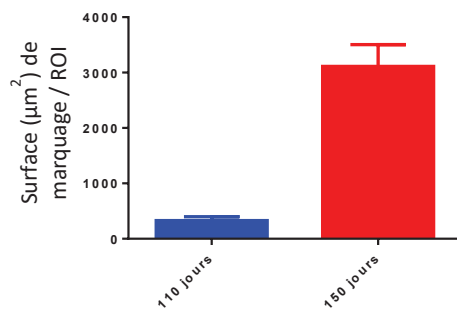


Figure 23 : Properdine s'accumule progressivement dans la corne ventrale de la moelle épinière (ME) à partir du début des symptômes cliniques.

(A) Immunohistofluorescence de properdine (Prop, rouge) et de ChAT (vert) à 110 jours. Properdine agrégée ne semble pas colocaliser avec les motoneurones ChAT⁺ (B) Immunohistofluorescence de properdine (rouge) et de CD45 (vert) à 110 jours. Dès ce stade, la properdine agrégée paraît internalisée par la microglie CD45⁺ (têtes de flèche blanches) (C) La quantification de la surface totale du marquage properdine dans la corne ventrale de la moelle épinière à 110j et 150 j révèle une accumulation d'un facteur 10 entre durant la phase de progression de la maladie (n = 1). Merge = Fusion des canaux de fluorescence. Acquisitions réalisées au microscope confocal LMS700 (Zeiss). Analyse réalisées via le logiciel Imaris.

C Accumulation de properdine dans la corne ventrale de la ME au cours du temps



Pour plus de simplicités, et considérant que la population microgiale est la population CD45⁺ majoritaire dans la moelle épinière de souris SLA avec peu d'infiltration macrophagique au cours de la maladie (se référer à la partie d'introduction sur les macrophages et sur la microglie), j'utiliserais sans distinction le terme de microglie pour faire référence aux cellules CD45⁺ observées dans la moelle de souris *SOD1^{G93A}* dans la suite de ce manuscrit. Les immunomarquages obtenus montrent clairement des cellules microgliales émettant des prolongements en direction d'agrégats positifs pour properdine, évoquant donc un possible phénomène de phagocytose. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai utilisé le logiciel Imaris afin de transparer le marquage microglial et de mieux visualiser l'interface microglie/properdine agrégée. Cette première analyse, illustrée par la **figure 24 (A)** et la **figure 25 (C)**, suggère bien une internalisation de la properdine par la cellule microgiale. Dans cette même démarche, j'ai ensuite utilisé le marqueur de membrane lysosomale CD68 (aussi appelé macrosialine chez la souris), pour visualiser les cellules ayant une activité phagocytaire.

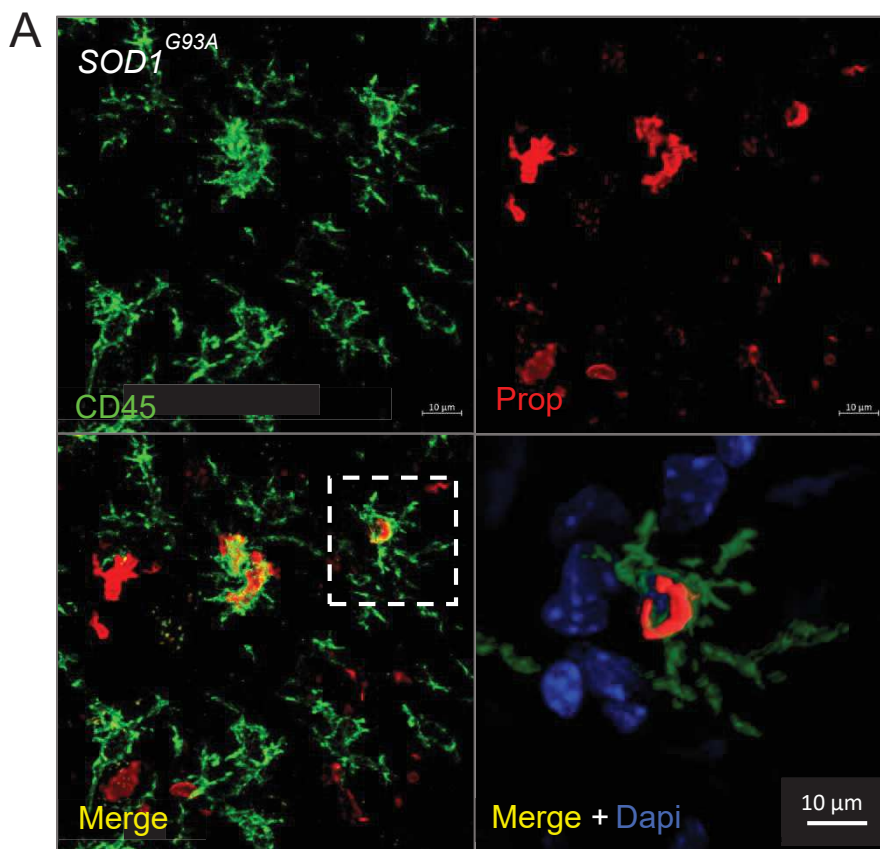
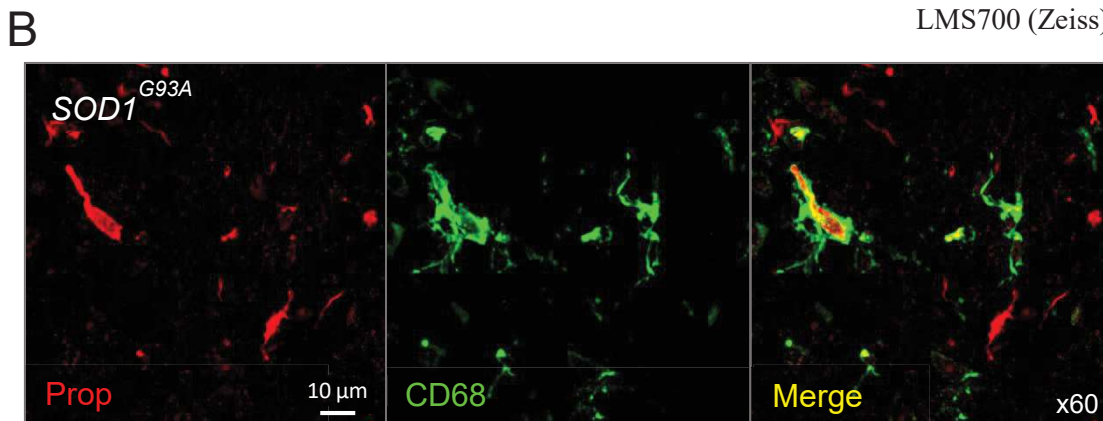


Figure 24 : Les amas de properdine sont internalisés par des macrophages / microglies phagocytaires CD45⁺ et CD68⁺. (A) Immunohistofluorescence anti-properdine (Prop, rouge) et anti-CD45 (vert) sur cryosections de moelle épinière ventrale de souris *SOD1^{G93A}* symptomatiques. La cellule marquée par l'encart en pointillés est agrandie sur l'illustration de droite, qui est une reconstruction de la cellule obtenue grâce au logiciel IMARIS. Le marquage CD45 y a été transposé pour une meilleure visualisation du processus d'internalisation de la properdine (B) Immunohistofluorescence anti-properdine (rouge) et anti-CD68 (vert) à partir des mêmes échantillons. Merge = Fusion des canaux de fluorescence. Acquisitions réalisées au microscope confocal LMS700 (Zeiss).



Le marqueur CD68 est en effet surexprimé dans les cellules myéloïdes en contexte inflammatoire et peut également être transloqué à la membrane plasmique dans certaines conditions, pour possiblement servir de récepteurs charognard (scavenger). Plusieurs ligands de CD68, exogènes et endogènes, ont en effet déjà été identifiés (Tableau 2). Le double immunomarquage de properdine et de CD68, montrant une superposition des deux marqueurs sur les pourtours des agrégats, nous a permis de confirmer le lien entre la properdine agrégée et les phagocytes, que nous identifions comme de la microglie (Figure 24.B).

Nos investigations sur la localisation de la properdine dans la moelle épinière de souris mutante SLA, et tout particulièrement sur ses interactions avec les autres composants du tissu nerveux, nous ont amené à l'intrigante découverte d'une colocalisation de cette protéine avec des marquages nucléaires diffus, révélés par l'intercalant de l'ADN Dapi (Figure 25). A travers différents immunomarquages, nous sommes parvenus à la conclusion que les cellules en dégénérescence concernées par ce signal properdine sont systématiquement Gfap⁺ (Figures 25. A et 26. A). J'ai confirmé l'état dégénératif des astrocytes concernés par ce marquage nucléaire diffus et positifs à la properdine par leur immunoréactivité à la forme active de la caspase-3 (Cl casp-3) (Figure 25). La dégénérescence astrocytaire dans la SLA n'est pas un domaine de recherche majoritaire, bien que quelques études aient déjà fait été d'une mort astrocytaire dans le SNC de patients et de modèle de souris SLA (Pasinelli et al., 2000 ; Rossi et al., 2008). Une population d'astrocytes spécifiques dérivant de la microglie et présentant une toxicité particulièrement délétère pour les motoneurons SLA a été identifiées récemment par le groupe de Luis Barbeito (Diaz-Amarilla et al., 2011 ; Trias et al., 2013). Ces cellules, appelées astrocytes aberrant ou Aba, présentent des altérations morphologiques et fonctionnelles, apparaissent avant la dégénérescence motoneuronale et finissent par entrer en apoptose. Elles sont présentées en détails dans la revue de littérature jointe à ce manuscrit « How Degeneration of Cells Surrounding Motoneurons Contributes to Amyotrophic Lateral Sclerosis » (Crabé et al., 2020) pages 125 à 142. Enfin, des immunomarquages de la microglie dans le SNC de souris *SOD1^{G93A}* nous ont permis d'observer, comme pour les agrégats de SOD1 mal conformée, une proximité particulière de ces cellules en dégénérescence properdine⁺ avec les cellules microgliales (Figure 26. B). Grâce aux outils de reconstructions d'image en tri-dimension, j'ai constaté que la properdine fait l'interface entre l'ADN et les cellules microgliales CD45⁺ (Figure 26. C). A partir de ces premières données, nous suggérons que la properdine se lie spécifiquement au astrocytes Aba en dégénérescence afin de faciliter leur élimination par la microglie, comme cela est observé entre les lymphocytes T apoptotiques et nécrotiques et les macrophages/cellules dendritiques en périphérie (Kemper et al., 2008 ; Xu et al., 2008).

Le constat préliminaire que la properdine : (1) s'accumule progressivement dans la moelle épinière de souris *SOD1^{G93A}* (2) colocalise avec des déterminants pathogènes spécifiques de la maladie (*i.e* la SOD1 agrégée et les astrocytes aberrants Aba) (3) est vraisemblablement phagocytée par la microglie, nous a poussé à explorer plus avant le rôle que pourrait avoir la protéine dans la maladie. Dans ce but, j'ai développé le modèle de souris SLA déficiente en properdine *SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}*, afin d'examiner indirectement le rôle potentiel de cette protéine dans la SLA *in vivo*.

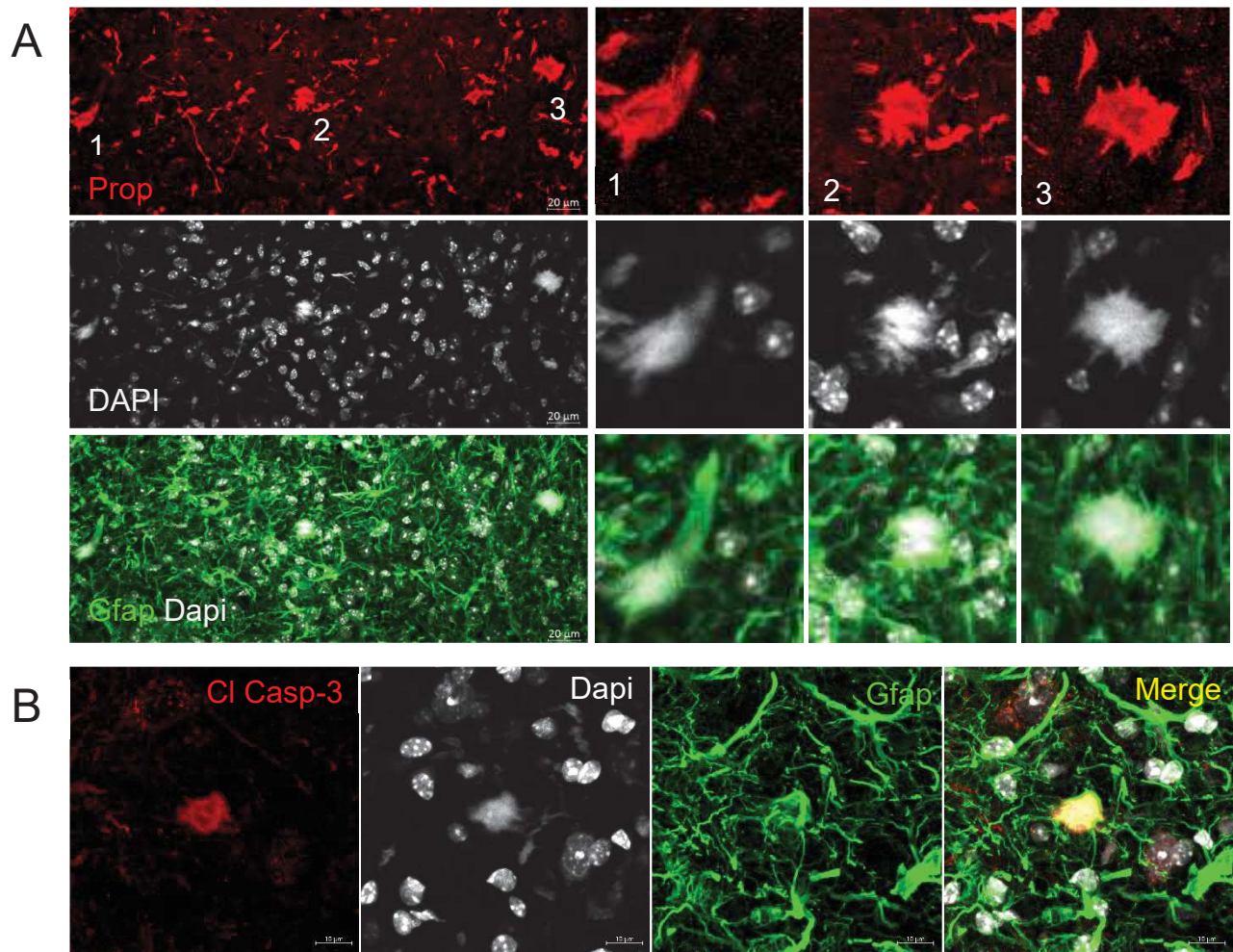


Figure 25. Properdine colocalise avec des cellules apoptotiques Gfap⁺ dans la moelle épinière de souris *SOD1*^{G93A}. (A) Properdin (Prop, rouge) colocalise avec de la chromatine décondensée Gfap⁺ (blanc et vert, respectivement). La colonne de gauche correspond à l'image d'origine acquise en x20. Les trois colonnes de droite correspondent aux agrandissements des cellules en dégénérescence doublement positives à la properdine et à Gfap numérotées de 1 à 3. (B) Exemple d'astrocyte en dégénérescence Gfap⁺ (vert), présentant un noyau diffus (blanc) ainsi qu'une activation de l'enzyme apoptotique caspase-3 (Cleaved caspase-3, ou Cl Casp-3, rouge). Merge = Fusion des canaux de fluorescence. Acquisitions réalisées au microscope confocal LMS700 (Zeiss).

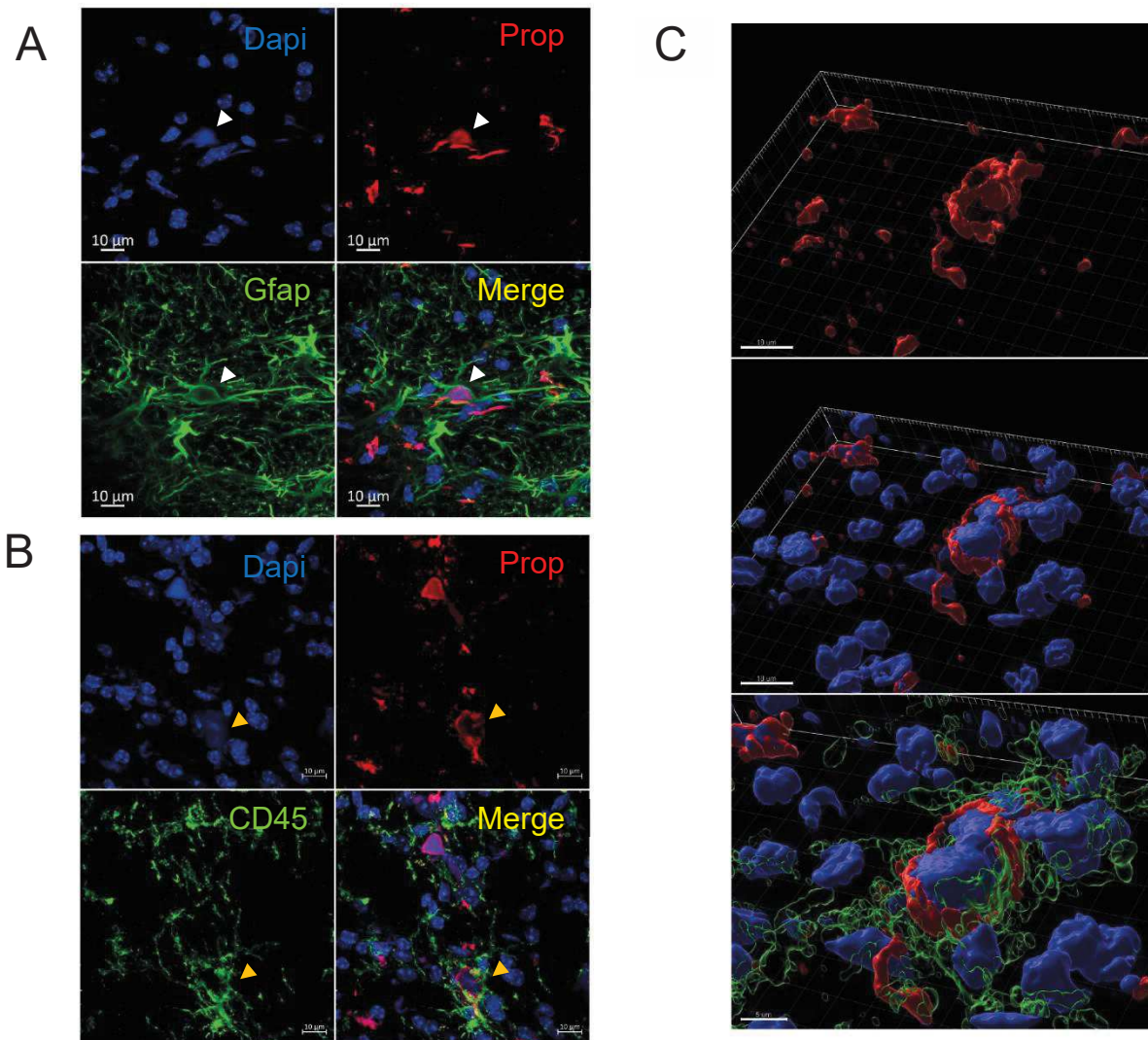


Figure 26 : Properdine colocalise avec des astrocytes en dégénérescence, également internalisés par la microglie / macrophage CD45⁺ dans la moelle épinière de souris *SOD1^{G93A}*. (A) Immunohistofluorescence anti-properdine (Prop, rouge) et anti-Gfap (vert) à 140 jours. Properdine colocalise avec des marquages nucléaires diffus (Dapi, bleu) et Gfap⁺, signes d'astrocytes en cours de dégénérescence (têtes de flèche blanches). (B) Immunohistofluorescence anti-properdine (Prop, rouge) et anti-CD45 (vert) à 140 jours. Les noyaux diffus positif à la properdine semblent également phagocytés par la microglie CD45⁺ (têtes de flèche oranges). (C) Reconstruction 3D de l'évènement fléché en B, montrant la position intermédiaire de la properdine entre le marquage nucléaire et microgliale. Les cellules microgliales (vert) ont été partiellement transparentisées. Merge = Fusion des canaux de fluorescence. Acquisitions réalisées au microscope confocal LMS700 (Zeiss). Analyses en 3D réalisées via le logiciel Imaris.

2.3. La properdine ne semble pas jouer un rôle déterminant sur les caractéristiques tardives de la SLA

Quatre cohortes ont été soumises à une étude histologique afin d'étudier un possible effet de l'absence de la protéine sur des marqueurs tissulaires classiquement utilisés pour mesurer la sévérité de la pathologie : les souris test $SOD1^{G93A}; Cfp^{-/-}$ et les groupes contrôle $SOD1^{G93A}, Cfp^{-/-}$ et sauvage (WT). Les résultats concernant la survie des motoneurones et l'activation gliale au stade symptomatique (140 jours) vous sont présentés ci-dessous. Le nombre de motoneurones survivants au stade avancé de 140 jours ne diffère pas entre les souris $SOD1^{G93A}$ et les souris $SOD1^{G93A}; Cfp^{-/-}$ (Figure 27). Comparé aux groupes contrôles WT et $Cfp^{-/-}$, les groupes mutants SLA présentent la même perte standard d'environ 50% du contingent de motoneurones. L'absence de properdine ne semble donc pas avoir d'effet sur la survie motoneuronale au stade tardif de 140 jours.

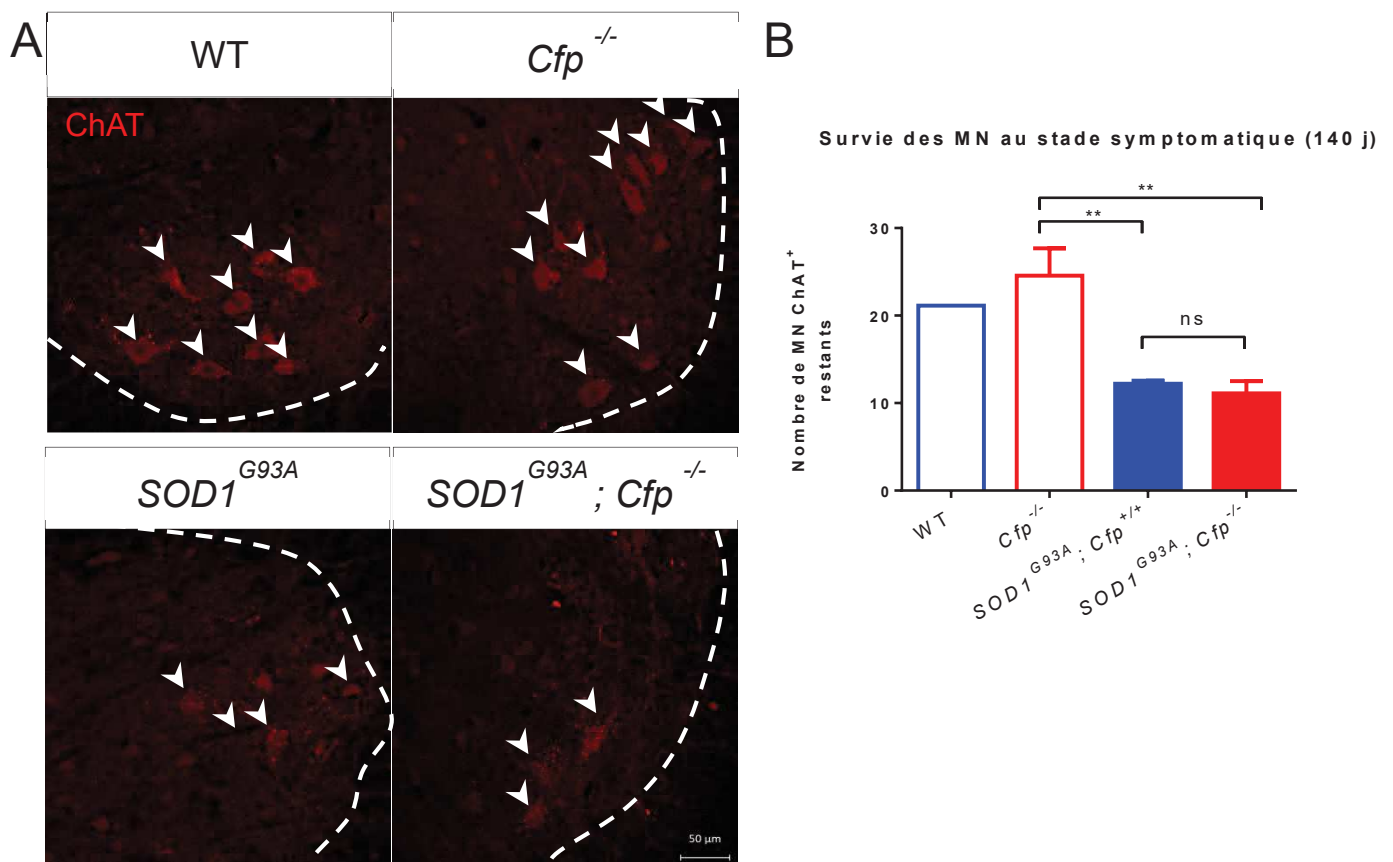


Figure 27 : L'absence de properdine n'a pas d'impact sur la survie des motoneurones chez les souris $SOD1^{G93A}$ à un stade symptomatique. (A) Exemple d'expériences d'immunohistofluorescence anti-ChAT (rouge) au niveau de la corne ventrale de moelle épinière de souris de génotypes indiqués. Les motoneurones sont indiqués par des tête de flèches blanches (B) Résultats de quantification des motoneurones survivants au stade symptomatique (140 jours) par section de moelle épinière de souris de génotypes indiqués (n = 3, sauf pour WT où n = 1). Two-way ANOVA avec test *post hoc* de Tukey, n.s = non significatif. ** = $P \leq 0.01$

Afin d'étudier le rôle de properdine sur la neuroinflammation, nous avons décidé de quantifier la densité de cellules gliales activées dans la corne ventrale de la moelle épinière des souris $SOD1^{G93A}$, $Cfp^{-/-}$. De même, les analyses de la densité de microglie activée $CD45^+$ et d'astrocytes réactifs $Gfap^+$ n'a pas permis de mettre en évidence une différence dans l'intensité de la réaction inflammatoire entre les souris $SOD1^{G93A}$ et $SOD1^{G93A}$, $Cfp^{-/-}$ à 140 jours (Figure 28.A.B). Ces deux génotypes présentent, en comparaison aux contrôles non-mutants SLA, une augmentation équivalente du nombre de cellules gliales dans la corne ventrale de la moelle épinière.

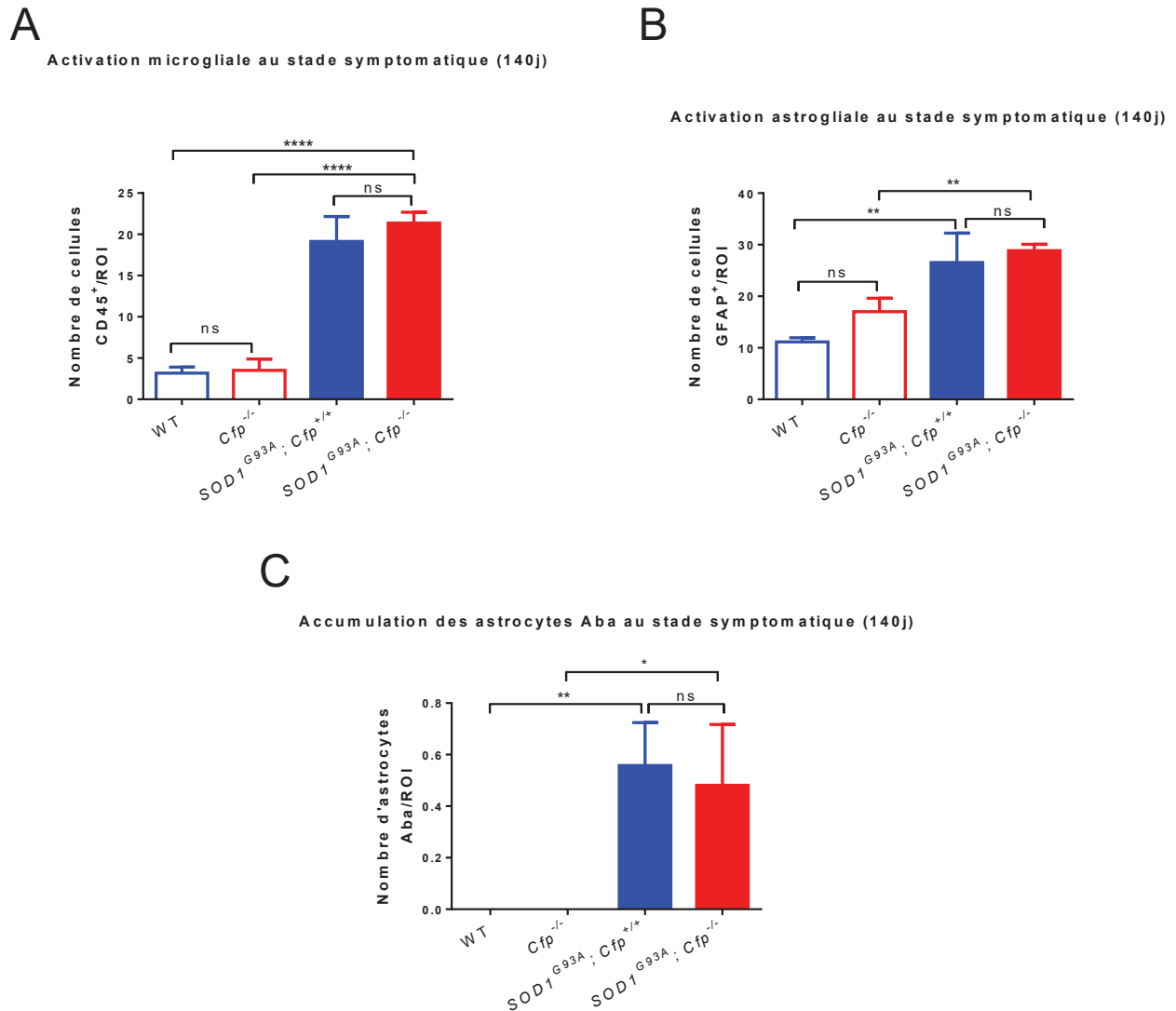


Figure 28 : L'absence de properdine n'a pas d'effet sur le nombre de cellules gliales présentes dans la corne ventrale des souris $SOD1^{G93A}$ symptomatiques. (A) Analyse de l'activation microgliale par quantification du nombre de cellules $CD45^+$ dans une ROI de la corne ventrale de la moelle épinière. **(B)** Analyse de l'activation astrogliale par quantification du nombre de cellules $Gfap^+$ dans une ROI de la corne ventrale de la moelle épinière. **(C)** Quantification du nombre d'astrocytes aberrants Aba présents dans une ROI de la corne ventrale de la moelle épinière. Les différents génotypes étudiés sont renseignés sur le graphique. Two-way ANOVA avec test *post hoc* de Tukey, ns= non-significatif ; * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; **** = $P \leq 0.0001$.

La plus curieuse constatation que nous ayons faite concernant la localisation de properdine dans la moelle épinière SLA réside dans la colocalisation de cette protéine avec des entités pathogènes spécifiques : les agrégats de SOD1 et les astrocytes aberrants en dégénérescence Aba. Dans la continuité d'une de nos hypothèses de départ, un rôle de la properdine dans l'opsonisation et l'élimination de ces deux entités par la microglie, nous avons comparé le nombre d'astrocytes Aba présents dans la corne ventrale de la moelle épinière des souris *SOD1^{G93A}* déficientes ou non en properdine. Au stade symptomatique, nous n'observons encore une fois aucune différence du nombre d'Aba entre ces deux génotypes (Figure 28.C).

Dû à la crise sanitaire mondiale et sans précédent de la COVID-19, les expérimentations qui vous ont été présentées ci-dessus restent à ce jour incomplètes et ne permettent pas d'avoir une vision complète du rôle de la properdine dans la SLA. La planification de ce projet prévoyait en effet une étude de l'impact de la délétion de properdine sur un paramètre essentiel dans ce projet qui est l'accumulation de la protéine SOD1 dans le tissu. Ces résultats devaient également être complété d'une étude histologique à des stades plus précoces (*i.e* 110 jours et 75 jours), ainsi qu'une étude longitudinale des paramètres de poids, force motrice et de la survie identiques à ce qui a été effectué pour le premier projet présenté dans ce manuscrit. Il est donc difficile d'émettre un avis définitif quant au rôle de la properdine dans la SLA à partir de données aussi préliminaires. Il est planifié que les expériences citées plus haut soient réalisées le plus vite possible, ce qui apportera, je l'espère, des réponses intéressantes aux nombreuses interrogations soulevées par les premières observations qui vous ont été présentées.

DISCUSSION

I. Le rôle des cellules Natural killer et du récepteur NCR1 dans la SLA

Les études réalisées sur les cellules NK dans la SLA ne permettent pas de conclure sur un potentiel rôle de ces cellules dans la maladie, qu'il s'agisse de leur état d'activation en périphérie, leur présence dans le SNC ou encore leur fonction. L'ablation de ces cellules via l'administration d'anticorps anti-NK1.1 dans les modèles de souris SLA a par exemple des effets opposés sur la maladie en fonction des études (Komine et al., 2018 ; Garofalo et al., 2020). Le fort potentiel cytotoxique de ces lymphocytes, leur rôle de modulateurs de l'immunité, notamment vis-à-vis de la polarisation des T CD4⁺ (Morandi et al., 2006), ainsi que leur mode d'activation indépendant, sont autant de caractéristiques qui présentent néanmoins un intérêt tout particulier dans l'étude de la SLA.

Afin d'élucider une possible activation des cellules NK en périphérie, nous avons également effectué une analyse phénotypique approfondie de cette population dans la circulation sanguine. Nos expérimentations de cytométrie ne montrent aucune différence entre le compartiment NK des souris mutantes et non-mutantes SLA au stade symptomatique. Cette observation va à l'encontre de ce qui a été observé jusqu'ici dans la SLA, la plupart des études montrant une hausse du nombre de cellules NK dans le sang de patients et de souris modèles SLA (Murdock et al., 2017 ; Komine et al., 2018). Des données contraires ont également été obtenues chez la souris dans une étude (Garofalo et al., 2020). Bien que nos expériences soient situées dans la même fenêtre de temps que les autres études, nous n'excluons pas la possibilité que l'infiltrat de NK soit un phénomène particulièrement transient qui ne soit plus visible au stade étudié. Dans le sang, les NK ont une demie-vie moyenne de 7 à 15 jours chez l'homme et 7 à 10 jours chez la souris (Zhang et al., 2007). Les mêmes expérimentations ont donc été réalisées sur des souris à 110 jours dans le but de déceler un potentiel infiltrat plus précoce dans notre modèle. Les données sont actuellement analysées par nos collaborateurs. Un premier élément de réponse est néanmoins apporté par notre analyse cytométrique indépendante de NK1.1 et utilisant le marqueur de cellules NK matures CD49b : aucune différence n'est observée dans le nombre de cellules NK circulantes CD3⁻CD49b⁺CD45⁺CD90.2⁻ entre les souris sauvages et *SOD1*^{G93A}.

Dans cette même expérience préliminaire, nous avons également montré qu'il n'y avait pas de différence dans le nombre de cellules CD49b⁺ entre les moelles épinières sauvages et *SOD1*^{G93A} au stade symptomatique. La littérature disponible actuellement concernant les cellules NK dans la SLA suggère que ces lymphocytes représentent une partie non-négligeable de l'infiltrat immunitaire observé dans la maladie (Chiu et al., 2008 ; Komine et al., 2018 ; Garofalo et al., 2020). Ces résultats ont tous été obtenus via l'utilisation d'immunomarquages de CD56 (chez l'homme) et NK1.1 en cytométrie et *Ncr1* (NKp46) en histologie. Nos expérimentations utilisant l'expression endogène du rapporteur GFP sous contrôle du marqueur *Ncr1* ne montrent jusqu'ici aucune infiltration notable de cellules NK dans la moelle épinière des souris mutantes SLA. Ces résultats se limitent pour le moment à une analyse histologique du signal GFP dans la moelle épinière et la rate de souris *Ncr1*^{gfp/gfp} et/ou *SOD1*^{G93A} au stade symptomatique. Les analyses cytométriques des quatre différentes cohortes de souris étudiées dans ce projet ont été réalisées au stade de début des symptômes (110 jours) et symptomatique (140 jours) et sont en cours d'analyse.

Il ne fait pas de doute que les cellules NK représentent une population difficile à étudier puisqu'aucun réel marqueur spécifique n'existe chez l'homme ou la souris. Le marqueur le plus utilisé chez la souris est l'antigène NK1.1, qui est le produit de l'expression des gènes *Klrb1c* et *Klrb1b* (ou *Klrb1d* dans une autre version allélique) (Kirkham & Carlyle, 2014). Cette molécule semble pourtant loin d'être un marqueur fiable des cellules NK puisqu'elle peut par exemple être exprimé par les macrophages dans

certaines conditions inflammatoires (Steiger et al., 2015). Ce problème de spécificité est également relevant dans un contexte de SLA. En effet, les données de la littérature montrent que : (1) *Klrb1c* est le gène le plus surexprimé par la microglie spinale chez la *SOD1^{G93A}* entre le stade pré-symptomatique et symptomatique précoce (Chiot et al., 2020) (2) *Klrb1b* est l'un des gènes les plus surexprimés par la microglie CD11b⁺ issues de moelle épinière de souris *SOD1^{G93A}* symptomatique précoce (Noristani et al., 2015) (3) *Klrb1d* est surexprimé par la microglie purifiée dérivée de la moelle épinière de souris *SOD1^{G93A}* symptomatique précoce (Chiu et al., 2013). Les marqueurs Ncr1 et CD49b font parti des plus adaptés à ce type d'étude lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec un marqueur permettant d'exclure les cellules T tels que CD3 ou CD90.2 (aussi appelé Thy1.2). Ces deux marqueurs sont effet exprimés par certaines sous populations de lymphocytes T (Richter et al., 2007).

Enfin, nous avons montré que l'ablation du récepteur de cytotoxicité naturelle 1 (Ncr1) n'avait pas d'impact sur l'apparition et la progression des caractéristiques principale de la SLA dans le modèle *SOD1^{G93A}*. Très récemment, une étude de Garofalo et collaborateurs a suggéré que les cellules NK infiltrent la moelle épinière au cours de la SLA et exercent une activité cytotoxiques directe envers les motoneurons via leur récepteur activateur NKG2D. Bien que nous ne visualisons pas d'infiltration de cellules NK dans le SNC au stade symptomatique, ce résultat reste néanmoins intrigant et mérite d'être étudié plus avant. Une des explications possibles réside dans le fait que comme NK1.1, NKG2D peut être surexprimé par les macrophages dans certaines conditions et activer leur fonction effectrices (Diefenbach et al., 2000).

Mise bout à bout, les données collectées à ce jour dans notre étude ne permettent pas de confirmer les observations faites par des études antérieures concernant un rôle des cellules NK dans la SLA.

II. Le rôle de properdine dans la SLA

1. La properdine s'accumule dans la corne ventrale des souris *SOD1^{G93A}* au cours de la pathologie

Nos résultats font état, pour la première fois, d'une accumulation de la properdine dans le SNC. Cette observation est faite uniquement dans le modèle de souris SLA *SOD1^{G93A}*, où la protéine s'accumule progressivement entre les stades de début des symptômes et le stade symptomatique avancé. Nous constatons que cette protéine est présente sous la forme de gros agrégats, concentrés dans la corne ventrale de la moelle épinière. La protéine semble être absente du SNC des souris contrôles de même âge. La properdine est normalement présente dans le sang sous la forme d'oligomères de P₂ à P₄, en quantité relativement faible en comparaison à d'autres protéines du complément telles que C3 (Pangburn et al., 1989). Ces formes quaternaires de la protéine sont médiées par l'interaction des domaines TB (TSR0) et TSR6 d'un monomère avec les TSR4 et TSR1, respectivement, d'un autre monomère de properdine (Pedersen et al., 2019). Des degrés plus hauts d'oligomérisation, possédant toujours certaines fonctions, ont été rapporté dans la littérature. Ces formes de properdine « activée » ou « P_n » ne sont cependant pas retrouvées physiologiquement dans le sang et sont considérés comme des artéfacts dûs aux conditions de stockage et de décongélation de la protéine (Farries et al., 1987). Nous ne savons cependant pas quelle dynamique peut être adoptée par la protéine si elle est présente de façon concentrée dans un tissu, ou quelles sont les modifications auxquelles elle pourrait être soumise, de modifications post-traductionnelles et de conformation, dans des conditions d'inflammation chronique telles que ce qui a lieu dans la moelle épinière SLA. La protéine montre des capacités à former des structures de hauts poids moléculaire à partir de solution purifiée dans certaines conditions dénaturantes. Nous ne pouvons de ce fait exclure que la properdine forme des agrégats dans le tissu nerveux *SOD1^{G93A}*.

L'une des questions à laquelle nous devons répondre dans le futur concerne l'origine de la properdine, qui est fortement représentée dans la moelle épinière à 140j. Nous savons que la properdine peut être synthétisée par divers types cellulaires, d'origine essentiellement immunitaire (Cortes et al., 2013) (Tableau 5). Dans le SNC, certaines protéines du complément sont produites directement par les cellules nerveuses, neuronales et gliales. Dans la SLA, on observe d'ailleurs une tendance globale à la surexpression de nombreuses protéines des trois voies du complément, chez les patients ainsi que dans les modèles de souris SLA (Parker et al., 2019) (Tableau 3). A notre connaissance, seule une étude suggère une synthèse de la properdine par des cellules du système nerveux, basée sur une analyse transcriptomique dans des cultures primaires d'astrocytes humains (Avery et al., 1993). Une autre étude rapporte l'association de properdine avec les plaques séniles et de rares astrocytes dans le cortex de souris transgéniques APP, modèles de la maladie d'Alzheimer (Fonseca et al. 2011). Plusieurs hypothèses sont possibles afin d'expliquer la présence de la protéine dans la moelle épinière *SOD1^{G93A}* : (1) La properdine est d'origine périphérique et s'accumule progressivement dans la moelle épinière en passant la BHE, dont l'intégrité est atteinte en condition de SLA (Zhong et al 2008 ; Garbuzova-Davis et al., 2007a ; Garbuzova-Davis et al., 2007b) (2) La properdine est synthétisée dans la moelle épinière, par des cellules sécrétrices classiques telles que les lymphocytes T, présents sous la forme d'infiltrat au cours de la maladie (Beers et al. 2008) (3) Comme d'autres protéines du complément, la properdine est synthétisée dans la moelle épinière par des cellules du SNC, dans un contexte de SLA (Schafer et al., 2012 ; Parker et al., 2019). Je n'ai à ce jour pas eu l'opportunité de réaliser d'expérimentations permettant de déterminer si la protéine est synthétisée localement. Des expériences de qPCR de moelle entière, suivies d'hybridations *in situ* devraient nous apporter des éléments de réponse.

2. La properdine colocalise avec des pathogènes spécifiques dans la moelle épinière de souris modèle SLA

2.1. La properdine et les agrégats de mSOD1

La properdine est une protéine hautement glycosylée et composée de 7 domaines pouvant potentiellement médier des interactions moléculaires diverses. Les immunomarquages de la properdine et de la forme mal conformée de la SOD1 humaine montrent une colocalisation des deux protéines au sein de mêmes agrégats à proximité des motoneurones. L'observation d'une colocalisation entre la properdine et mSOD1 soulève de nombreuses questions quant au rôle de cette protéine vis-à-vis de l'agrégation de mSOD1. Plusieurs études montrent que l'agrégation de SOD1, sauvage et mutante, peut être déclenchée ou accélérée par son interaction électrostatique avec des polyanions tels que l'ADN et l'héparine (Zhao et al., 2014 ; Jiang et al., 2007 ; Yin et al., 2010). L'affinité de ces polyanions semble être commune à plusieurs protéines ayant une propension forte à s'agréger telles que l'A β , l' α -synucléine ou encore la protéine prion Prp. Cette interaction entre la SOD1 et des polyanions tels que l'ADN, disponible dans l'environnement extracellulaire à l'issue de la dégénérescence cellulaire ayant lieu dans la SLA, pourrait favoriser la formation de gros agrégats amorphes (en opposition aux agrégats organisés dits fibrillaires). Il a été suggéré que ce phénomène de co-agrégation pourrait en fait être un mécanisme protecteur pour « piéger » les protéines de SOD1 mutantes afin de limiter leur action toxique. En effet, des études comparant la toxicité de la SOD1 à différents degrés d'agrégation ont montré que la forme trimérique de la SOD1 paraît la plus toxique envers les motoneurones, alors que les agrégats de haut poids moléculaire amorphes ne présentent pas de toxicité notable (Zhu et al., 2018 ; Shvil et al., 2018). De façon intéressante, il a été montré que la properdine a une haute affinité pour l'ADN sous toutes ses formes (Xu et al., 2008). De ce fait, il est tout à fait possible que la colocalisation que nous observons entre la properdine et la mSOD1 soit le produit d'une agrégation de la properdine et de la mSOD1 avec l'ADN libéré lors de la dégénérescence des cellules au cours de la SLA.

Afin de vérifier une possible colocalisation de la properdine avec de la SOD1 coagrégée avec de l'héparine, nous avons tenté d'injecter par voie intrathécale de l'héparine fusionnée à fluorescéine (FITC, H7482 de chez ThermoFisher) au niveau lombaire chez des souris *SOD1^{G93A}*. L'héparine ayant une demie-vie très courte, nous avons effectué une administration journalière sur 7 jours chez des souris de 110 jours, à l'issue desquels les souris ont été sacrifiées afin de collecter la moelle épinière pour des immunomarquages. Nous n'avons malheureusement eu l'opportunité d'effectuer cette expérience une seule fois avant la crise de la COVID-19, et nous ne sommes pas parvenus à observer de signal de l'héparine-FITC dans la moelle épinière. Cette hypothèse mérite néanmoins des investigations plus poussées.

La localisation de properdine au sein des mêmes agrégats que mSOD1, que celle-ci soit due à une interaction avec de l'ADN ou directement avec mSOD1, pourrait signifier que la properdine sert à l'élimination des gros agrégats protéiques par les phagocytes. De façon très intéressante, nous avons observé à de nombreuses reprises que les agrégats properdine⁺ sont internalisés par des cellules microgliales. Il a été montré par le passé que la properdine peut favoriser l'opsonisation et la phagocytose de nanoparticules par les macrophages *in vitro* (Kouser et al., 2018). Nous aimerions donc effectuer prochainement une quantification de l'accumulation des agrégats de mSOD1 dans la moelle épinière des souris *SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}* (déficiences en properdine). Bien que les immunomarquages de C3 n'aient pas jusqu'ici montré de colocalisation avec les agrégats de mSOD1 dans le SNC des patients SLA ou des souris modèles SLA, il semble important de vérifier si les agrégats sont opsonisés par d'autres protéines du complément. Il est cependant important de noter que les expériences de Kouser et collaborateurs montrent que la properdine peut servir d'opsonine sans contribution d'autres protéines du système du complément. Les mêmes auteurs montrent également que l'internalisation par les macrophages de nanoparticules opsonisées par la properdine induisent leur polarisation vers un phénotype pro-inflammatoire, marqué par la surexpression de cytokines telles que TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-12. Nos quantifications du nombre de cellules microgliales chez les souris symptomatiques *SOD1^{G93A}* ne montrent pas de différence en présence ou absence de properdine. Il serait très intéressant de comparer le profil transcriptomique de cultures primaires de microglie dérivées de souris *SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}* et *SOD1^{G93A}* en contact avec de la properdine recombinante afin de déterminer si la protéine a un effet sur la polarisation de ces cellules.

2.2. La properdine et les astrocytes en dégénérescence

En plus d'une colocalisation avec les agrégats de mSOD1, nous observons un marquage de properdine au niveau de cellules en dégénérescence dans la moelle épinière de souris *SOD1^{G93A}*. Les immunomarquages réalisés afin de caractériser le type cellulaire avec lequel la properdine semble interagir nous ont permis de déterminer qu'il s'agit d'astrocytes en cours d'apoptose (Gfap⁺C1 casp-3⁺). La dégénérescence astrocytaire dans la SLA n'est pas un domaine de recherche majoritaire, bien que quelques études aient déjà fait état d'une mort astrocytaire dans le SNC de patients et de modèle de souris SLA (Pasinelli et al., 2000 ; Rossi et al., 2008). Récemment, une sous-population bien spécifique d'astrocytes dérivant la transdifférenciation de cellules microgliales activées a été décrite, appelée Aba ou AbGC (Diaz-Amarilla et al., 2011 ; Crabé et al., 2020). Nos observations montrent des similitudes entre la population d'astrocytes Aba précédemment décrite et les astrocytes immunoréactifs à la properdine. Plusieurs groupes ont démontré que la properdine joue un rôle dans l'opsonisation de cellules au stade d'apoptose tardive / de nécrose en potentialisant le dépôt de protéine C3b à la surface de ces cellules (Kemper et al., 2008 ; Xu et al., 2008). Dans ce contexte, la properdine favorise ainsi la reconnaissance par des phagocytes tels que les macrophages et les cellules dendritiques de cellules à éliminer. Les cellules mourrantes exposent de l'ADN à leur surface. Comme expliqué précédemment, la properdine présente une forte affinité pour l'ADN, qui serait ainsi l'une molécule permettant à la properdine de se lier à la surface des cellules en dégénérescence (Xu et al., 2008). Grâce à des reconstructions en 3D d'astrocytes, que nous assimilons à la population Aba, nous montrons que la

properdine se trouve à l'interface entre la chromatine décondensée et les prolongements de cellules microgliales émis en direction de la cellule en dégénérescence. Nous suggérons ainsi que la properdine L'étude de Komine et collaborateurs sur les souris *SOD1^{G93A} ; Trif^{-/-}* démontre qu'en l'absence de TRIF, molécule adaptatrice des récepteurs TLR3 et TLR4, les cellules Aba s'accumulent dans la moelle épinière de souris SLA. Il a également été montré que les souris *SOD1^{G93A} ; Trif^{-/-}* ont une espérance de vie plus courte et présente une accélération de la phase de progression de la maladie. Les astrocytes Aba sont les cellules les plus toxiques envers les motoneurons jamais testées *in vitro* dans la recherche sur la SLA. Nous ne savons pas si leur entrée dans la voie de mort programmée est induite par une signalisation extracellulaire ou bien si elle est déclenchée par les nombreux dysfonctionnements intracellulaires observés dans ces cellules. Il semblerait cependant que l'accumulation de ces cellules très toxiques dans la moelle épinière de souris SLA coïncide avec une survie plus courte, possiblement la conséquence d'une action plus forte ou prolongée des mécanismes toxiques exercés par les Aba. Partant de l'hypothèse que la properdine sert de tremplin pour l'élimination des Aba par la microglie, nous avons quantifié l'accumulation de ces cellules dans la moelle épinière de souris *SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}* et *SOD1^{G93A}* au stade symptomatique. Nos résultats à ce stade ne montrent pas de différence significative entre ces deux génotypes, suggérant qu'il n'y a pas d'effet de l'ablation génétique de properdine sur l'élimination de ces cellules. De même, le nombre de motoneurons survivants est équivalent entre les souris *SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}* et *SOD1^{G93A}* à 140 jours.

Il est difficile de conclure sur le rôle de la properdine dans l'élimination de déterminants pathologiques tels que mSOD1 et les astrocytes Aba à partir de l'étude d'un seul stade de la maladie. Nous espérons en apprendre plus sur le rôle de cette protéine dans la SLA à travers les explorations histologiques de stades plus précoces ainsi que l'exploration fonctionnelle des souris *SOD1^{G93A} ; Cfp^{-/-}* dans l'étude longitudinale qui aura lieu prochainement. Il semble important de compléter dans le futur des études *in vivo* par des paradigmes *in vitro* plus simplifiés. J'ai commencé à mettre au point des expérimentations de phagocytose sur culture primaire dans le but de quantifier l'impact de l'opsonisation par la properdine de billes fluorescentes sur leur élimination par la microglie. La même chose pourrait également être transposée aux Aba afin d'étudier les mécanismes d'élimination de ces cellules en culture.

La capacité de la properdine à opsoniser des nanoparticules indépendamment du complément suggère qu'elle peut être directement reconnue par des récepteurs de phagocytose exprimés à la surface des macrophages tels que les récepteurs à opsonines. De part leur proximité phénotypique, la microglie et les macrophages partagent un large éventail de récepteurs de phagocytose. Les expérimentations de Komine et collaborateurs suggèrent que l'élimination des astrocytes Aba est dépendante de la signalisation par les TLR3, intégré à la surface des endosomes, et TLR4 qui lui est présent à la membrane plasmique et pourrait potentiellement interagir avec la properdine (Komine et al., 2018). Les domaines TSR composant une grande partie de la properdine sont porteurs du motif aminé conservé CSVTCG (Asch et al., 1992). Il a été montré que le récepteur charognard CD36, exprimé par la microglie et les macrophages, est capable de reconnaître cette série d'acides aminés et de médier la phagocytose de pathogènes tels que l'A β (Coraci et al., 2002). Le récepteur CD36 représente donc un autre candidat possible médiant l'internalisation de la properdine par la microglie.

PUBLICATIONS ANNEXES

- I. Revue de la littérature : « How Degeneration of Cells Surrounding Motoneurons Contributes to Amyotrophic Lateral Sclerosis » - Crabé et al., 2020

Review

How Degeneration of Cells Surrounding Motoneurons Contributes to Amyotrophic Lateral Sclerosis

Roxane Crabé ¹, Franck Aimond ¹, Philippe Gosset ¹ , Frédérique Scamps ¹ and Cédric Raoul ^{1,2,*} 

¹ The Neuroscience Institute of Montpellier, INSERM, UMR1051, University of Montpellier, 34091 Montpellier, France; roxane.crabe@inserm.fr (R.C.); franck.aimond@inserm.fr (F.A.); philippej.gosset@inserm.fr (P.G.); frederique.scamps@inserm.fr (F.S.)

² Laboratory of Neurobiology, Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russia

* Correspondence: cedric.raoul@inserm.fr

Received: 2 October 2020; Accepted: 24 November 2020; Published: 27 November 2020



Abstract: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurological disorder characterized by the progressive degeneration of upper and lower motoneurons. Despite motoneuron death being recognized as the cardinal event of the disease, the loss of glial cells and interneurons in the brain and spinal cord accompanies and even precedes motoneuron elimination. In this review, we provide striking evidence that the degeneration of astrocytes and oligodendrocytes, in addition to inhibitory and modulatory interneurons, disrupt the functionally coherent environment of motoneurons. We discuss the extent to which the degeneration of glial cells and interneurons also contributes to the decline of the motor system. This pathogenic cellular network therefore represents a novel strategic field of therapeutic investigation.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis; spinal cord; cortex; motoneuron; astrocytes; interneuron; oligodendrocytes; degeneration

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset neurodegenerative disease characterized by the selective and progressive loss of upper and lower motoneurons. ALS begins with focal muscle weakness and wasting that relentlessly spreads to other body parts, leading to death mostly from respiratory failure within three years of onset. ALS is predominantly a sporadic disease, although at least 10% of cases are due to inherited mutations. Among the 50 genes that have been linked to ALS, pathogenic mutations in *chromosome 9 open reading frame 72*, *superoxide dismutase-1 (SOD1)*, *fused in sarcoma (FUS)*, and *TAR DNA binding protein* (encoding TDP-43) genes are most frequently found [1]. Numerous studies using a wide spectrum of genetic ALS models have shed light on potential intrinsic and extrinsic factors responsible for the susceptibility of motoneurons to the disease. The cell-autonomous mechanisms that ground motoneuron vulnerability are associated with calcium (Ca²⁺) mishandling, susceptibility to endoplasmic reticulum (ER) stress and death receptor signaling, modified electrophysiological properties, and/or altered RNA homeostasis [2–5]. Non-neuronal cells, including astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells, and blood-derived immune cells, can contribute to the selective degeneration of motoneurons through the release of inflammatory mediators and cytokines, production of reactive oxygen species, loss of homeostatic functions associated with metabolic supply, anti-inflammatory factors, glutamate clearance and neurotrophic support, in addition to direct killing [6–9]. The status and inflammatory response of cells constituting the local environment of motoneurons have received the most attention. However, the degeneration of astrocytes,

oligodendrocytes, and neurons with local (and long-range) connectivity has been documented as events that precede or are concomitant with motoneuron death. Loss of motoneuron neighboring cells might therefore be regarded not only as a consecutive dismantling of cells partaking in the network ensuring motoneuron function but also as an active component of ALS pathogenesis. Our goal is to review the current understanding of neurodegenerative processes that occur in the vicinity of motoneurons and take part in the deterioration of motor functions. We suggest not characterizing ALS as an exclusively motoneuron disorder, and consider these grey areas of degenerative events to stimulate further investigation and develop new efficient approaches to treat the disease.

2. The Degenerative Astrocytes

2.1. Characterisation of AbGC in ALS Pathogenesis

Astrocytes represent one of the most abundant cell types in the central nervous system (CNS) and support numerous physiological functions that include trophic and metabolic support of neurons, regulation of synapse formation and activity, ion homeostasis, and induction and maintenance of the blood–brain barrier. A key event in the physiopathology of neurological disorders is the neuroinflammatory response mediated by astrocytes, whose functions can drastically change. Reactive astrogliosis is a salient feature that was initially documented in histopathological examinations of the spinal cord and motor cortex of patients with ALS [10,11]. Subsequently, a compelling body of evidence has been established that suggests astrocytes contribute through different mechanisms to the non-cell-autonomous degeneration of motoneurons [7,12]. The toxicity of ALS astrocytes towards motoneurons was shown to be mediated by soluble factors that include extracellular vesicles, tumor necrosis factor alpha, interferon gamma (IFN γ), nerve growth factor, and reactive oxygen/nitrogen species [13–18]. Degeneration of astrocytes, which is another manifestation of astrocytic pathology, was first evidenced in the spinal cord of mutant SOD1 mouse as ubiquitin-, activated caspase-3-, and SOD1-positive round inclusions delineated by glial fibrillary acidic protein (GFAP) [19]. This population of degenerating astrocytes was also referred to as spheroid GFAP-positive cells (SGPCs) due to the unusual morphology of the cells, which are composed of a round hypertrophic cell body and thick short processes [20]. A few years later, Luis Barbeito and colleagues shared their observations on phenotypically aberrant astrocytes, referred to as aberrant astrocytes (Aba), which, once isolated from the spinal cord of ALS symptomatic rats, were able to proliferate abundantly in culture [21]. Aba were also demonstrated in the tissue where they take the form of hypertrophic reactive astrocytes. Although the parallel between both groups' studies has never been clearly established, the description of these specific astrocyte populations shows great similarity in localization, distinctive histological features, fate, and function. In accordance with the latest findings and terminology [22], we decided to use the term aberrant glial cells (AbGC) when referring to the generic concept of aberrant degenerating astrocytes in ALS. AbGC are found in the close vicinity of motoneurons; 93% of are located less than 130 μm from a motoneuron. When considering molecular markers, Aba cells strongly express the astrocytic proteins S100 β and connexin-43 [21], and harbor, like SGPCs, an unusual blurred and annular-shaped GFAP staining, restricted to the cell body periphery and proximal processes. Consistent with their active proliferation and degenerating state, AbGC are Ki67 $^{+}$ and cleaved-caspase-3 $^{+}$. In addition, the cells present inclusions of human SOD1, p62, and ubiquitin [19,23], again demonstrating their abnormal state in vivo. Unexpectedly, AbGC also express several markers of the macrophage/microglial lineage. We can, however, note a difference in the microglial markers expressed by AbGC in the symptomatic SOD1 G93A rats compared to their mouse equivalent. Whereas rat AbGC express Iba1, CD163, Cd11b, and CD68 [24], mouse AbGC are CD68 and Iba1 negative but express Mac-2, a marker of phagocytic microglia [23,25,26] (Figure 1). Even if surprising, the chimeric phenotype of AbGC is not the first case of cells sharing microglial and astrocytic markers, as seen in patients with glioblastoma multiforme and cerebral ischemia models [25,27,28]. In vitro studies have shown that AbGC actually originate from activated microglial cells [21,24]. Although anecdotal in vivo

at the asymptomatic stage, this astrocyte/microglial phenotype is predominant in the motoneuron microenvironment at the symptomatic stage, with Iba1-expressing cells representing up to 70% of AbGC in ALS rats [21,24]. In mice, the surge of these AbGC was evaluated to be 21-fold at onset and 57-fold at end stage [20]. Given the great similarities between the above-mentioned research, it is likely that the observations of both teams come from the study of the same subpopulation of astrocytic cell, possibly originating from aberrant microglia in the ALS rat and mouse.

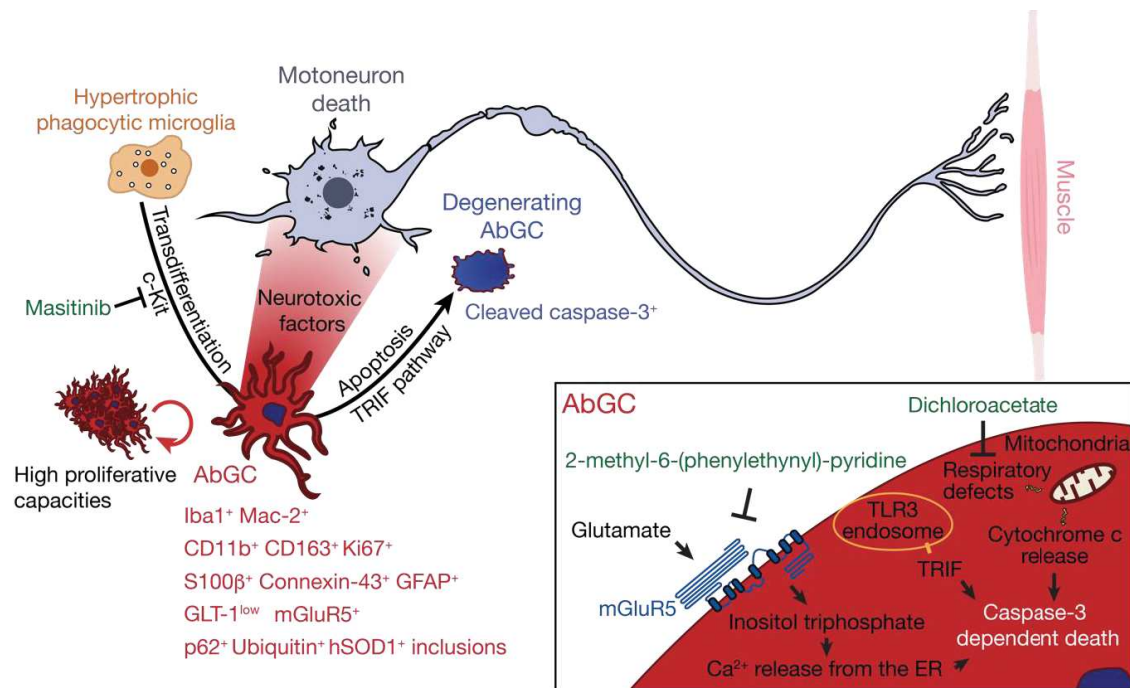


Figure 1. AbGC are highly toxic toward motoneurons, and present cellular dysfunctions ultimately leading to their degeneration. Hypertrophic phagocytic microglia in the motoneuron microenvironment can transdifferentiate, possibly in a c-kit-dependent manner, towards an aberrant astroglial phenotype (in red) that can be identified by a combination of markers in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). AbGC show defects in mitochondrial functions, glutamate handling, and high proliferative capacities and produce soluble factors that are particularly toxic for motoneurons. Several intracellular events lead to AbGC death, including activation of the TLR3-TRIF pathway, inositol triphosphate formation and Ca^{2+} release from internal store, cytochrome c release from mitochondria, and caspase-3 activation. In green are indicated small molecules that, by targeting AbGC-associated pathogenic mechanisms, confer therapeutic benefits in ALS mice.

2.2. AbGC are Dysfunctional Degenerating Cells

Extensive proliferation is one of the key characteristics of AbGC. In addition, cultured AbGC are not subjected to replicative senescence, because they survived to a year of successive passage, nor to contact inhibition [21,29]. Interesting results were obtained with masitinib, an inhibitor of c-Kit, and a member of the type III receptor tyrosine kinase family located upstream of pathways controlling proliferation, differentiation, and migration of hematopoietic cells [30]. Chronic masitinib administration more than halved the number of hypertrophic phagocytic microglia transdifferentiating into AbGC, in addition to their pro-inflammatory profile and their ability to migrate [31]. Remarkably, the treatment reduced motoneuron loss and extended life expectancy of ALS mice.

Mitochondrial damage is one of the many subcellular dysfunctions affecting AbGC. Mitochondria of AbGC display reduced length, altered morphology, and major impairments of the respiratory functions compared to wildtype and *SOD1^{G93A}* astrocytes [22,29]. Dichloroacetate (DCA) is an inhibitor of the pyruvate dehydrogenase kinase that reorients pyruvate consumption towards mitochondrial

oxidative phosphorylation. Treatment with DCA is able to restore mitochondrial functions in AbGC cultures, in addition to slowing their proliferation and reducing their neurotoxicity towards motoneurons [22]. This drug, which has been on the market for more than 40 years, can cross the blood–brain barrier and its chronic administration has been shown to be effective on the disease course, to increase motoneuron survival, and reduce glial reactivity and the number of AbGC in the ventral horn of the spinal cord [22,32].

Glutamate induced-excitotoxicity is one of the putative causes of motoneuron loss in ALS. This is mainly supported by the observation of a loss of the major glutamate transporter GLT-1 expression by astrocytes, making them unable to properly buffer the glutamate surplus from motoneuron excitatory inputs. Early studies in the asymptomatic *SOD1^{G93A}* mouse revealed that AbGC express low levels of GLT-1 [20,21,33]. Two studies also suggested that glutamate is closely linked to the degenerative state of AbGC, which express the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) as shown in the spinal cord of sporadic ALS patients and *SOD1^{G93A}* mice [20,33]. In the spinal cord of *SOD1^{G93A}* mice, levels of mGluR5 increase before disease onset and then decrease to reach levels comparable to control mice [33]. The exposure of *SOD1* mutant astrocytes to glutamate selectively triggers their death through mGluR5 signaling, which implicates the production of inositol trisphosphate and release of Ca^{2+} from the ER store [20,33]. Administration of 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine, a selective mGluR5 antagonist, in *SOD1^{G93A}* mice significantly reduced the number of cleaved-caspase-3⁺ astrocytes, although there was no difference in the total number of AbGC, delayed onset, and prolonged survival [20] (Figure 1).

One consensus concerning AbGC, evidently linked to the many deficiencies above-mentioned, is their degenerative state and consequent death through apoptosis [19,20,23]. The study in mice revealed that the first signs of astrocyte degeneration occurred around disease onset with 18% of cleaved-caspase-3⁺ AbGC and reached 33% by end stage [20]. Activated caspase-3 is able to digest the GFAP cytoskeleton into a 20 kDa fragment found in the homogenate of spinal cord from ALS mice [20], which could explain the characteristic blurred GFAP immunoreactivity of AbGC in vivo and their peculiar spheroid morphology. Absence of intermediate filament structures in AbGC in vitro could suggest a near total digestion of GFAP following caspase activation [29]. Interestingly, the apoptosis rate of AbGC can be reduced by the genetic ablation of the TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β (TRIF) [23]. TRIF is an adaptor molecule in the Toll-like receptors (TLR) 3 and 4 signaling cascades. *SOD1^{G93A}* mice with a targeted deletion of the *Trif* gene present an increased number of Mac-2⁺ GFAP⁺ AbGC in the ventral horn of the spinal cord with a reduced proportion of cleaved-caspase-3⁺ AbGC compared to *SOD1^{G93A}* controls. Apoptosis induced in a TRIF-dependent pathway was therefore proposed as a means to reduce deleterious effects of AbGC on motoneurons [23].

2.3. AbGC are Highly Toxic Towards Motoneurons and Aggravate Disease Progression in ALS Rodent Models

A wealth of studies have demonstrated that ALS mutant astrocytes are selectively toxic to motoneurons through the production of soluble factors [7]. In the first study on AbGC, co-culture experiments demonstrated that these cells are far more toxic towards motoneurons than *SOD1^{G93A}* neonate-derived astrocytes, allowing less than 10% survival (compared to 60% with regular mutant astrocytes). This toxicity implicates the secretion of toxic factors, as evidenced by the use of condition media of AbGC that display a motoneuron-selective toxicity [21]. To further explore the extent of the pathogenic potential of AbGC, transplantation experiments have also been performed in the lumbar spinal cord of wildtype rats [34]. Transplanted AbGC are able to proliferate and potently provoke bilateral microglial and astroglial activation compared to rats injected with vehicle or *SOD1^{G93A}* neonatal microglia. Transplanted AbGC did not migrate along the rostrocaudal axis but elicited a strong gliosis up to the cervical segments of the spinal cord. Such a phenotype is coherent with the release of toxic/pro-inflammatory soluble factors by AbGC. Notably, the authors indicate that even though motoneuron survival is comparable to controls seven days after transplant, the presence of cytoplasmic ubiquitin aggregates could be an early sign of motoneuron degeneration. The experiments

never exceeded seven days, which could have been insufficient to elicit noticeable motoneuron death. Overall, data collected from experimental models during the past two decades strongly suggest that AbGC play an important role in non-cell-autonomous mechanisms leading to motoneuron degeneration in ALS.

Additional evidence of astrocyte death is provided by the study of human astrocytes derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) that were established from an ALS patient harboring a mutation in TDP-43 [35]. A cell-autonomous mechanism of astrocyte degeneration associated with TDP-43 mislocalization was here described as likely occurring in a caspase-independent manner. A similar cell-autonomous mechanism affecting astrocyte survival was observed in iPSC-derived valosin-containing protein-mutant astrocytes [36]. Very recently, it was shown that the release of fragmented mitochondria from SOD1^{G93A}-expressing microglial cells induces the inflammatory A1 type of astrocyte [37]. A1 is a particularly neurotoxic population of reactive astrocytes [38], as are AbGC. The activated microglia lead to mitochondria dysfunction and fragmentation, reactive oxygen species and proinflammatory cytokine production, and death of naive primary astrocytes [37]. Beyond demonstrating that astrocyte degeneration is not a consequence of an idiosyncratic effect of SOD1, it also raises additional questions about the link between A1 type and AbGC, in addition to cell- and non-cell autonomous mechanisms that result in this astrocytic pathology.

3. Oligodendrocyte Degeneration

Oligodendrocytes are found throughout the entire CNS where their most known role is the myelination of axons. Oligodendrocytes produce the myelin sheath that acts as an electrical insulator to facilitate conduction in axons. Oligodendrocytes also ensure basic functions in providing trophic and metabolic support to neurons [39]. Thus, oligodendrocytes are able to transform glucose into lactate or pyruvate and supply these products to neurons via monocarboxylic acid transporters (MCT) [40] (Figure 2). Increasing evidence shows that oligodendrocytes contribute to many neurodegenerative diseases through mechanisms related to demyelination or the metabolic support provided to neurons [41]. Loss of myelin is observed in the gray matter of the cortex and the ventral part of the spinal cord of patients with ALS [42]. Mature oligodendrocytes that are found in the gray matter of the spinal cord of SOD1^{G93A}-expressing mice degenerate before the loss of motoneurons and the first symptoms of the disease [8,42]. This degeneration is followed by the proliferation of NG2⁺ progenitor cells of oligodendrocytes in the spinal cord. However, these NG2⁺ cells do not mature and are therefore unable to replace the pool of already degenerated oligodendrocytes, thus leaving axons of motoneurons demyelinated. In mice, the genetic deletion of mutated SOD1 in oligodendrocyte precursors markedly delayed disease onset and prolonged the survival of the mice [42]. More recently, a study performed on zebrafish, in which only mature oligodendrocytes expressed an ALS-linked mutated SOD1, showed an increased proliferation of oligodendrocyte precursors and an increased degeneration of mature oligodendrocytes. These events were followed by neuromuscular junction defects and the degeneration of motoneurons [43], and were accompanied by behavioral abnormalities, including anxiety-like behavior, learning impairment, and motor defects. The expression of SOD1^{G93A} or TDP-43^{Q331K} in mature oligodendrocytes leads to disturbances in myelin organization that might affect axonal conductance [43]. Another noxious effect of oligodendrocyte pathology on motoneuron function is linked to the delivery of lactate, the major energy source, through MCT-1. Indeed, an important reduction in MCT-1 levels can be observed in sporadic ALS patients and SOD1^{G93A} mice [44]. The susceptibility of motoneurons to human oligodendrocytes differentiated from iPSCs of ALS patients was associated with reduced levels of MCT-1 and lower secretion of lactate [45] (Figure 2).

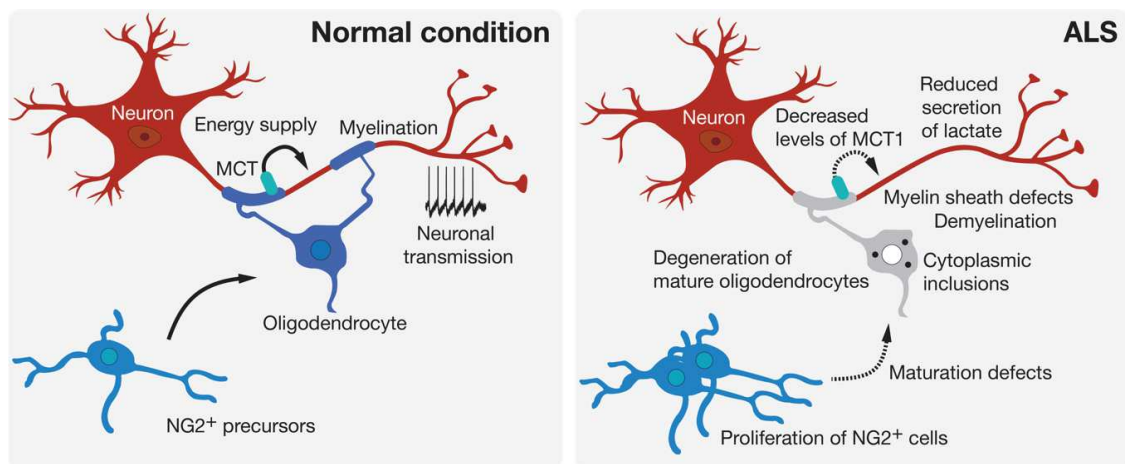


Figure 2. Oligodendroglial pathology in ALS. Oligodendrocytes can contribute to neuronal function by providing metabolic support and potentiating signal conduction by myelination of the axon. Many signs of oligodendrocyte dysfunction and loss can be observed prior to motoneuron degeneration in experimental models and in patients with ALS.

Post mortem tissue analyses of ALS patients have shown that TDP-43 and FUS form cytoplasmic inclusions in oligodendrocytes [46–48]. The phosphorylated form of TDP-43, which is prone to form ubiquitin-positive inclusions [49], is present in the primary cortex and spinal cord of ALS patients [47,48]. The cytoplasmic accumulation of TDP-43 aggregates can result in a loss-of-function via the progressive depletion of TDP-43 from the nucleus [50]. With regards to this mechanism, the conditional deletion of TDP-43 transgene in myelinating oligodendrocytes leads to the deterioration of motor scores and reduced lifespan [51]. The depletion of TDP-43 in mature oligodendrocytes is accompanied by a reduction in myelin, myelin sheath defects, and myelination capacities in the CNS. TDP-43 depletion causes a marked gray matter oligodendrocyte death by necroptosis, which can be compensated by an enhanced proliferation of NG2⁺ oligodendrocyte precursor cells. However, there appears to be no effect on the number and size of motoneurons [51]. The pathogenic mislocalization of FUS in the cytoplasm leads to an increased number of white matter oligodendrocytes in the spinal cord, which occurs independently of motoneuron alteration. These oligodendroglial defects in the spinal cord are corroborated by the downregulation of genes implicated in myelination [52]. Oligodendrocytes therefore represent a predominant site of cytoplasmic inclusions, as also evidenced in the CNS of ALS patients by the accumulation of p62, a cargo receptor for ubiquitinated proteins [53], or the Von Hippel Lindau protein, involved in the degradation of fragmented TDP-43 [54].

The dysfunction and degeneration of oligodendrocytes is, in conclusion, an important factor damaging the functional unity of the motor system in the disease (Figure 2). However, mechanisms underlying their degeneration remain elusive, but could involve the excitotoxicity mechanism induced by α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/kainate glutamate receptors [55], the pro-inflammatory cytokine IFN γ [56], which was previously described as an astrocyte-derived motoneuron toxic factor and whose levels are increased in the spinal cord of ALS patients and mice [15,57], or the disruption of protein homeostasis in respect of cytoplasmic inclusions observed in the disease, because impairment of the unfolded protein response can lead to death of mature oligodendrocytes in mice [58].

4. Interneuronopathy in ALS

4.1. Inhibitory Interneuron Degeneration

Central pattern generators (CPGs) are the basic neuronal circuits responsible for the fine control of skilled movements and the general coordination of locomotion. Interneurons are one of the

main regulators of neuronal signaling and play an important function in the spinal CPG network. The coordinated activity of several interneuron types, such as inhibitory neurons, plays a crucial role in the modulation of motoneurons output to the appropriate muscles. At least 11 neuronal types of interneurons have been identified and inhibitory interneurons mainly use γ -aminobutyric acid (GABA) or glycine as neurotransmitters. These neurotransmitters are released from V1, V0_D, and V2b interneurons, classified according to their respective combinatorial transcription factor code. The V1 class includes Ia inhibitory interneurons and Renshaw cells, V0_D are commissural interneurons, and V2b are primarily ipsilateral with a subset with commissural projections [59–61]. The circuitry complexity of the pyramidal upper motoneurons that is located in layer 5 of the motor cortex is illustrated by the diversity of projection targets; long-distance apical dendrites; the diversity of inputs including those coming from local circuitry, cortical layer 2/3, thalamocortical neurons, or callosal projection neurons; and the large heterogeneity of GABAergic inhibitory neurons classified in 3 major groups according to expression of parvalbumin, somatostatin, and serotonin receptor 5HT3aR [62–65].

Transcranial magnetic stimulation in ALS patients showed a reduced intracortical inhibition that suggests an impairment or loss of inhibitory interneurons [66–70]. A decreased density of neurites positive for neuropeptide Y (NPY), a neurochemical marker of inhibitory interneurons, was found in the motor cortex of ALS patients. Although the total number of NPY⁺ interneurons was not affected, they were found to be atrophic with signs of dendritic pruning [71]. Post mortem analysis of ALS patient spinal cord indicated a loss of dorsomedial interneurons [72], and a loss of calbindin⁺ interneurons and their processes in the ventral horn [73]. In more specific terms of the interneuronal identity, the density of GABAergic interneurons was found to be reduced in the cortical layer 5 of the primary motor cortex of ALS patients [74]. Another study showed a decrease in parvalbumin⁺ GABAergic interneurons in the motor cortex of ALS patients [75]. These results can be correlated with the decreased levels of GABA that were observed in the motor cortex of ALS patients using proton magnetic resonance spectroscopy [76]. Correspondingly, reduced volumes of distribution of [¹¹C] flumazenil, a specific type of A GABA (GABA_A) benzodiazepine receptor antagonist, were observed in the motor and premotor cortex (and in extramotor areas) of ALS patients by positron emission tomography [77] (Figure 3).

Similar results were obtained in mouse models of ALS. A decrease in calretinin⁺ interneurons was observed in the cerebral cortex and hippocampus of *SOD1*^{G93A} mice [78,79]. In the spinal cord of G86R mutant *SOD1* mice, a 40% loss of calretinin interneurons was observed at the symptomatic stage [80]. High-resolution magnetic resonance spectroscopy also showed a steady decrease in GABA in the spinal cord of *SOD1*^{G93A} mice from pre-symptomatic to late disease stage [81]. In mice expressing TDP-43^{A315T}, an ubiquitin accumulation has been observed in spinal interneurons [82], and impairments in GABAergic transmission, implicating somatostatin and parvalbumin interneurons, have been demonstrated to contribute to cortical hyperexcitability, excitotoxicity, and in fine degeneration of pyramidal neurons [83]. A study of a mutant *SOD1* zebrafish model revealed that the earliest affected neurons were inhibitory interneurons, leading to a reduction in glycinergic inputs and then defects in motoneurons [84]. Electrophysiological recordings performed in spinal cord organotypic cultures, and cortical and brainstem slices of pre-symptomatic ALS mice, demonstrated an hyperexcitability, possibly due to a decrease in inhibitory neurotransmission, that could in fine lead to degeneration [85,86]. Similarly, GABA-induced release of glutamate from gliosomes isolated from the spinal cord of *SOD1*^{G93A} mice was found to be enhanced [87]. In cultured motoneuron from ALS mice, a specific desensitization of GABA_AR with α 1 subunit was described [88]. In addition, a decrease in tonic GABAergic inhibition, related to a reduction in the vesicular GABA transporter [89], and a 72% reduction in GABA receptor-mediated inhibitory currents, were also described in motor cortex slices of the wobbler mouse model [90].

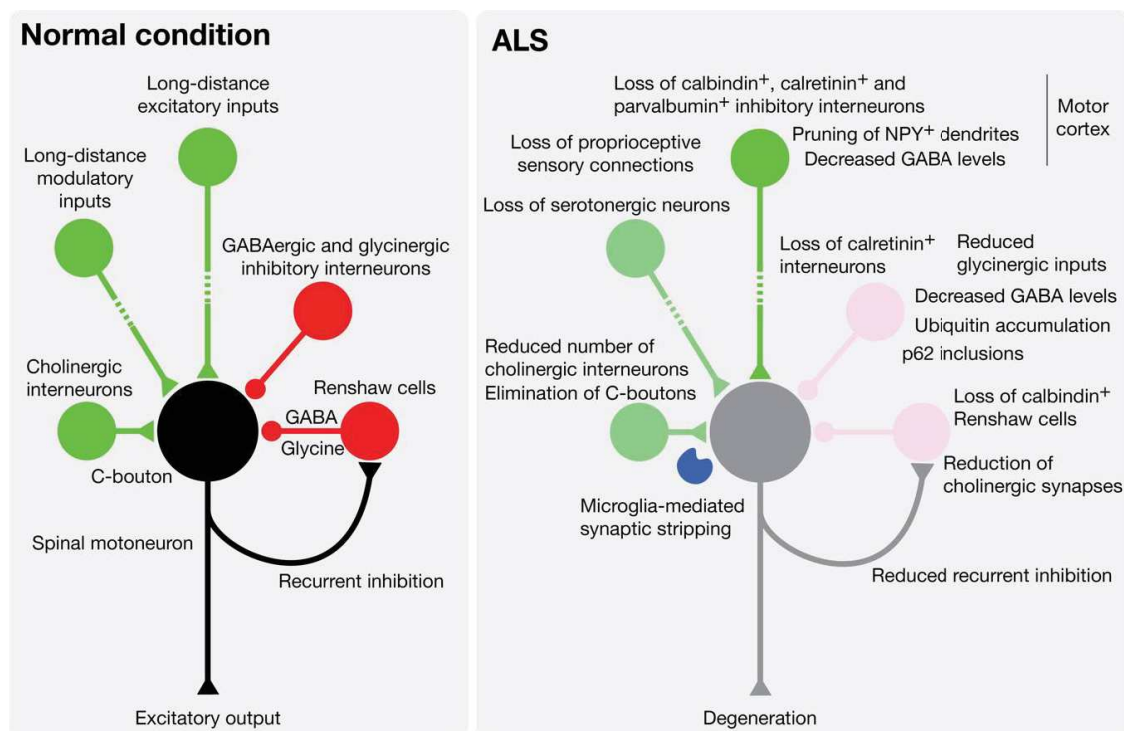


Figure 3. Interneuron pathology leads to an impaired excitation/inhibition balance in ALS. Lower motoneurons execute voluntary movements by integrating central descending and peripheral commands, and local inhibitory (GABAergic or glycinergic interneurons and Renshaw cells) and modulatory (cholinergic and serotonergic neurons) inputs. During the natural course of the disease, including prior to the first signs of clinical symptoms, dysfunctions and loss of the different classes of interneurons have been documented in the motor cortex and spinal cord of ALS patients and mouse models of the disease.

Renshaw cells, which are GABAergic and glycinergic inhibitory cells, receive input from motor axon collaterals and synapses, in turn, on the soma of motoneurons for negative-feedback. A loss of calbindin⁺ Renshaw cells and glycinergic synapses on motoneurons has been observed since pre-symptomatic age, prior to motoneuron loss, in spinal cord of SOD1 mutant mice [91]. Most recent evidence also favors an early disconnection of Renshaw cell feed-forward inputs from motoneurons [92]. The early loss of glycinergic interneurons or the Renshaw cell-mediated recurrent inhibitory pathway can lead to motoneuron hyperexcitability. Interestingly, another study that also reported a reduced number of Renshaw cells in *SOD1*^{G93A} spinal cord showed a marked reduction in cholinergic synapses on Renshaw cells, suggesting a decrease in recurrent inhibition [92,93]. This reduced recurrent inhibition was also observed in patients with ALS [94]. These results may explain how Renshaw cell alterations contribute to impairment of the excitatory/inhibitory balance and motor system coherence.

The molecular mechanisms leading to the dysfunction of interneuron inhibition and the death of interneurons remain enigmatic. It is noteworthy that transplantation of spinal progenitors, derived from iPSCs obtained from sporadic ALS patients, into the spinal cord of immunodeficient mice, leads to the predominant production of astrocytes with reactive properties and death of neurons before motoneuron degeneration. This was accompanied by a significant loss of GABAergic and glycinergic inhibitory inputs on motoneuron soma [95]. The interneuron pathology, revealed by the formation of p62⁺ skein-like inclusions in parvalbumin⁺ neurons in late stages of the disease, and which is delayed by the selective inhibition of autophagy in motoneurons, opens new fields of investigation [96].

4.2. Cholinergic Synapse Defects

The spinal cholinergic synapse, also called C-bouton, originates from V0c neurons, a small population of Pitx2⁺ interneurons, which is located in the lamina X that surrounds the central canal [97,98]. C-boutons form large clusters at the soma and proximal dendrites of alpha-motoneurons in the spinal cord [99]. It is now well established that C-boutons increase the firing rate of motoneurons and are involved in high task demands that recruit fast-fatigable and fatigue-resistant motor units [98–100]. V0c interneurons receive synaptic inputs from descending serotonergic pathways, local or long-distance vesicular glutamate transporter 2 projections, V2b inhibitory interneurons, interneurons of the dorsal horn involved in nociception, and direct input from parvalbumin⁺ non-proprioceptive sensory neurons [98,101,102]. Of note, motoneurons that innervate fast-twitch muscles and that are the most vulnerable to ALS have a greater number of C-boutons than those innervating slow-twitch motoneurons and that are largely resistant to neurodegeneration [103]. In addition, the muscarinic stimulation is motoneuron-type dependent with a higher efficacy in motoneurons vulnerable to the disease, further supporting some specific role of tasks related to C-boutons in ALS [104].

A pioneer study documented a severe loss of cholinergic synapses on motoneurons of sporadic ALS patients [105]. In two different SOD1 mutant mice, it was shown that although the number of C-boutons does not change until the symptomatic stage, thereafter a significant decrease in C-boutons per motoneuron can be observed [106]. However, a marked decrease in cholinergic synapse was observed in asymptomatic SOD1 mutant mice [93]. A detailed longitudinal analysis in SOD1^{G93A} mice described several changes in the morphology, number of C-boutons, or M2 muscarinic receptor levels that start at pre-symptomatic stages [107]. Importantly, a loss of Lamina X cholinergic interneurons has been observed in the symptomatic ALS mouse [107], while a decrease in their choline acetyl transferase (ChAT) content was noticeable at the asymptomatic stage [93]. Additional studies show an enlargement of C-boutons in ALS mice [108,109], although the increase in the size, but not the number, was observed only in males in another report [110]. Two other studies reported a reduction in C-bouton number and density only at the end-stage of the disease [111,112] (Figure 3).

The contribution of dysfunction and loss of interneuronal cholinergic transmission in ALS remains still largely unknown. The silencing of C-boutons in SOD1^{G93A} mice with the conditional deletion of *Chat* in Dbx1⁺ V0 interneurons accelerates the locomotor defects [113]. Moreover, decreasing the excitability of fast-twitch motoneurons through the Ca²⁺-activated chloride channel TMEM16F at C-boutons reduced stress of motoneuron and denervation at the neuromuscular junction, and maintained muscle strength [104]. To date, it remains to be demonstrated whether the loss of C-boutons is a compensatory or an aggravating mechanism of ALS, and whether the circuitry controlling V0c interneurons activity is affected in ALS. An appealing pathogenic mechanism is related to the potential role of the neuroinflammatory response that accompanies motoneuron degeneration, where the stripping of cholinergic synapses in the spinal cord was proposed to be mediated by microglial cells [93,112,114]. Indeed, expression of neuregulin-1 at the post-synaptic site of C-bouton might promote the recruitment and activation of microglia [114].

5. Conclusions

As shown in this review, prior to or concomitant with motoneuron degeneration, deficits in glial and neuronal functions take part in the pathogenic process leading to ALS. Here, we focused on the populations of cells that participate in the local network of motoneurons and whose impairment and loss will lead to the demise of the motor system. However, a significant number of studies report that other peripheral and central neuronal types are also affected in ALS. The degeneration of serotonergic neurons in the brainstem has been described in ALS patients [115]. In SOD1 mutant mice, the loss of serotonergic neurons was evidenced at disease onset, and was associated with reduced serotonergic innervation on spinal motoneurons and the development of spasticity [116]. Additionally, in the neuromodulatory system, the loss of tyrosine hydroxylase dopaminergic neurons was reported in the substantia nigra of ALS patients [117], and was corroborated by nigrostriatal dopamine deficits [118,119].

Reduced levels of dopamine in the midbrain were also reported in *SOD1^{G93A}* mice at disease end-stage, and were associated with a reduced number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area [120]. Peripheral sensory abnormalities, such as axonal swelling and loss, impaired sensory evoked potential, and spinal integration, have been reported both in ALS patients and mice (for review [121,122]). Interestingly, defects in proprioceptive neuron excitability can be observed in brainstem preparation from *SOD1* mutant mice at 2 weeks of age [123]. Recent evidence from two different animal models has also shown that the peripheral innervation of spindles by group Ia and II fibers is diminished in the pre-symptomatic stages of disease, although the sensory neuron somata are unaffected at this stage [124,125], and that central synapses are affected only late in the disease process [125]. More in-depth studies exploring spatiotemporal degeneration of long-range neuronal networks will be critical to bridge the communication gap with local networks and therefore provide an integrated view of ALS pathogenesis. Another area for future investigation will be to investigate the functional consequence of the potential loss of other types of glial cells, including ependymal cells, radial glia, satellite cells, and tanycytes.

It may seem surprising that this review does not cover microglia cells, when these cells play an undeniable role in the pathology [126]. To our knowledge, only one study has reported a process of microglial degeneration, known as cytorrhesis [127]. Cytorrhesis, which is characterized by cytoplasmic disintegration, can be observed at the end stage of the disease in the spinal cord of *SOD1^{G93A}* rats, although, in the brain stem, nuclear shrinkage can also be observed in shrunken microglial cells. Of note, microglia activation or abnormalities were not observed in the cortex of *SOD1^{G93A}* rats. Although cytorrhesis is considered a form of accidental death [128], in contrast to apoptosis, more attention should be drawn to these early results.

In conclusion, the challenge is not only to comprehend the intrinsic elements that make motoneurons selectively vulnerable to the disease, but also to understand: (1) how ALS causative agents specifically affect other neuronal and non-neuronal populations; (2) what is the ordered sequence of cellular events, and their interrelation, that leads to deleterious changes for motoneurons; (3) whether and how the map of brain and spinal connectivity underlies a compensatory homeostatic response; (4) whether the complexity of these non-motoneuronal mechanisms participates in the clinical heterogeneity of the pathology; and (5) how this knowledge can be pertinently anticipated to design new efficient therapies.

Author Contributions: Conceptualization, R.C. and C.R.; writing—original draft preparation, R.C., F.A., P.G., F.S. and C.R.; writing—review and editing, R.C., F.A., P.G., F.S. and C.R.; visualization, R.C., P.G. and C.R.; supervision, C.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the national institute for health and medical research (Inserm) and Marie Skłodowska Curie Individual fellowship “ADELE” (C.R.). R.C. is a recipient of a Ministère de l’enseignement supérieur, de la recherche et de l’innovation (MESRI) and ARSLA Ph.D fellowship. P.G. is a recipient of a Ph.D fellowship from the agence nationale de la recherche, ANR, “SPREADALS”.

Acknowledgments: We are grateful to all members of the team and Patrick Carroll for their helpful discussion. We apologize to authors whose work could not have been cited due to space limitations.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

Aba	Aberrant astrocyte
AbGC	Aberrant glial cell
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
ChAT	Choline acetyl transferase
CPG	Central pattern generator
CNS	Central nervous system

DCA	Dichloroacetate
ER	Endoplasmic reticulum
FUS	Fused in sarcoma
GABA	γ -aminobutyric acid
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLT-1	Glutamate transporter 1
IFN γ	Interferon gamma
iPSC	Induced pluripotent stem cell
MCT	Monocarboxylic acid transporter
mGluR5	Metabotropic Glutamate receptor 5
NPY	Neuropeptide Y
SOD1	Superoxide dismutase-1
SGPC	Spheroid GFAP-positive cell
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β
TLR	Toll-like receptor

References

- Mejzini, R.; Flynn, L.L.; Pitout, I.L.; Fletcher, S.; Wilton, S.D.; Akkari, P.A. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 1310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nijssen, J.; Comley, L.H.; Hedlund, E. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **2017**, *133*, 863–885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aebischer, J.; Bernard-Marissal, N.; Pettmann, B.; Raoul, C. Death Receptors in the Selective Degeneration of Motoneurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurodegener. Dis.* **2013**, *2013*, 746845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ruegsegger, C.; Saxena, S. Proteostasis impairment in ALS. *Brain Res.* **2016**, *1648*, 571–579. [[CrossRef](#)]
- Gunes, Z.I.; Kan, V.W.Y.; Ye, X.; Liebscher, S. Exciting Complexity: The Role of Motor Circuit Elements in ALS Pathophysiology. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 573. [[CrossRef](#)]
- Bowerman, M.; Vincent, T.; Scamps, F.; Perrin, F.E.; Camu, W.; Raoul, C. Neuroimmunity dynamics and the development of therapeutic strategies for amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell Neurosci.* **2013**, *7*, 214. [[CrossRef](#)]
- Yamanaka, K.; Komine, O. The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neurosci. Res.* **2018**, *126*, 31–38. [[CrossRef](#)]
- Philips, T.; Bento-Abreu, A.; Nonneman, A.; Haeck, W.; Staats, K.; Geelen, V.; Hersmus, N.; Kusters, B.; Van Den Bosch, L.; Van Damme, P.; et al. Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **2013**, *136*, 471–482. [[CrossRef](#)]
- Chiot, A.; Lobsiger, C.S.; Boillee, S. New insights on the disease contribution of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* **2019**, *32*, 764–770. [[CrossRef](#)]
- Schiffer, D.; Cordera, S.; Cavalla, P.; Migheli, A. Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **1996**, *139*, 27–33. [[CrossRef](#)]
- Murayama, S.; Inoue, K.; Kawakami, H.; Bouldin, T.W.; Suzuki, K. A unique pattern of astrocytosis in the primary motor area in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **1991**, *82*, 456–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yamanaka, K.; Chun, S.J.; Boillee, S.; Fujimori-Tonou, N.; Yamashita, H.; Gutmann, D.H.; Takahashi, R.; Misawa, H.; Cleveland, D.W. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 251–253. [[CrossRef](#)]
- Varcianna, A.; Myszczyńska, M.A.; Castelli, L.M.; O'Neill, B.; Kim, Y.; Talbot, J.; Nyberg, S.; Nyamali, I.; Heath, P.R.; Stopford, M.J.; et al. Micro-RNAs secreted through astrocyte-derived extracellular vesicles cause neuronal network degeneration in C9orf72 ALS. *EBioMedicine* **2019**, *40*, 626–635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kia, A.; McAvoy, K.; Krishnamurthy, K.; Trotti, D.; Pasinelli, P. Astrocytes expressing ALS-linked mutant FUS induce motor neuron death through release of tumor necrosis factor-alpha. *Glia* **2018**, *66*, 1016–1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Aebischer, J.; Cassina, P.; Otsmane, B.; Moumen, A.; Seilhean, D.; Meininger, V.; Barbeito, L.; Pettmann, B.; Raoul, C. IFN γ triggers a LIGHT-dependent selective death of motoneurons contributing to the non-cell-autonomous effects of mutant SOD1. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 754–768. [[CrossRef](#)]
16. Pehar, M.; Cassina, P.; Vargas, M.R.; Castellanos, R.; Viera, L.; Beckman, J.S.; Estevez, A.G.; Barbeito, L. Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **2004**, *89*, 464–473. [[CrossRef](#)]
17. Marchetto, M.C.; Muotri, A.R.; Mu, Y.; Smith, A.M.; Cezar, G.G.; Gage, F.H. Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **2008**, *3*, 649–657. [[CrossRef](#)]
18. Birger, A.; Ben-Dor, I.; Ottolenghi, M.; Turetsky, T.; Gil, Y.; Sweetat, S.; Perez, L.; Belzer, V.; Casden, N.; Steiner, D.; et al. Human iPSC-derived astrocytes from ALS patients with mutated C9ORF72 show increased oxidative stress and neurotoxicity. *EBioMedicine* **2019**, *50*, 274–289. [[CrossRef](#)]
19. Pasinelli, P.; Houseweart, M.K.; Brown, R.H., Jr.; Cleveland, D.W. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13901–13906. [[CrossRef](#)]
20. Rossi, D.; Brambilla, L.; Valori, C.F.; Roncoroni, C.; Crugnola, A.; Yokota, T.; Bredesen, D.E.; Volterra, A. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 1691–1700. [[CrossRef](#)]
21. Diaz-Amarilla, P.; Olivera-Bravo, S.; Trias, E.; Cragolini, A.; Martinez-Palma, L.; Cassina, P.; Beckman, J.; Barbeito, L. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 18126–18131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Martinez-Palma, L.; Miquel, E.; Lagos-Rodriguez, V.; Barbeito, L.; Cassina, A.; Cassina, P. Mitochondrial Modulation by Dichloroacetate Reduces Toxicity of Aberrant Glial Cells and Gliosis in the SOD1G93A Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* **2019**, *16*, 203–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Komine, O.; Yamashita, H.; Fujimori-Tonou, N.; Koike, M.; Jin, S.; Moriwaki, Y.; Endo, F.; Watanabe, S.; Uematsu, S.; Akira, S.; et al. Innate immune adaptor TRIF deficiency accelerates disease progression of ALS mice with accumulation of aberrantly activated astrocytes. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 2130–2146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Trias, E.; Diaz-Amarilla, P.; Olivera-Bravo, S.; Isasi, E.; Drechsel, D.A.; Lopez, N.; Bradford, C.S.; Ireton, K.E.; Beckman, J.S.; Barbeito, L. Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. *Front. Cell Neurosci.* **2013**, *7*, 274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Trias, E.; Barbeito, L.; Yamanaka, K. Phenotypic heterogeneity of astrocytes in motor neuron disease. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* **2018**, *9*, 225–234. [[CrossRef](#)]
26. Rotshenker, S. The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease. *J. Mol. Neurosci.* **2009**, *39*, 99–103. [[CrossRef](#)]
27. Huysentruyt, L.C.; Akgoc, Z.; Seyfried, T.N. Hypothesis: Are neoplastic macrophages/microglia present in glioblastoma multiforme? *ASN Neuro* **2011**, *3*. [[CrossRef](#)]
28. Morizawa, Y.M.; Hirayama, Y.; Ohno, N.; Shibata, S.; Shigetomi, E.; Sui, Y.; Nabekura, J.; Sato, K.; Okajima, F.; Takebayashi, H.; et al. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 28. [[CrossRef](#)]
29. Jimenez-Riani, M.; Diaz-Amarilla, P.; Isasi, E.; Casanova, G.; Barbeito, L.; Olivera-Bravo, S. Ultrastructural features of aberrant glial cells isolated from the spinal cord of paralytic rats expressing the amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1G93A mutation. *Cell Tissue Res.* **2017**, *370*, 391–401. [[CrossRef](#)]
30. Liang, J.; Wu, Y.L.; Chen, B.J.; Zhang, W.; Tanaka, Y.; Sugiyama, H. The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int. J. Biol. Sci.* **2013**, *9*, 435–443. [[CrossRef](#)]
31. Trias, E.; Ibarburu, S.; Barreto-Nunez, R.; Babdor, J.; Maciel, T.T.; Guillo, M.; Gros, L.; Dubreuil, P.; Diaz-Amarilla, P.; Cassina, P.; et al. Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflammation* **2016**, *13*, 177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Miquel, E.; Cassina, A.; Martinez-Palma, L.; Bolatto, C.; Trias, E.; Gandelman, M.; Radi, R.; Barbeito, L.; Cassina, P. Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Martorana, F.; Brambilla, L.; Valori, C.F.; Bergamaschi, C.; Roncoroni, C.; Aronica, E.; Volterra, A.; Bezzi, P.; Rossi, D. The BH4 domain of Bcl-X(L) rescues astrocyte degeneration in amyotrophic lateral sclerosis by modulating intracellular calcium signals. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 826–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ibarburu, S.; Trias, E.; Lago, N.; Peluffo, H.; Barreto-Nunez, R.; Varela, V.; Beckman, J.S.; Barbeito, L. Focal Transplantation of Aberrant Glial Cells Carrying the SOD1G93A Mutation into Rat Spinal Cord Induces Extensive Gliosis. *Neuroimmunomodulation* **2017**, *24*, 143–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Serio, A.; Bilican, B.; Barmada, S.J.; Ando, D.M.; Zhao, C.; Siller, R.; Burr, K.; Haghi, G.; Story, D.; Nishimura, A.L.; et al. Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 4697–4702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hall, C.E.; Yao, Z.; Choi, M.; Tyzack, G.E.; Serio, A.; Luisier, R.; Harley, J.; Preza, E.; Arber, C.; Crisp, S.J.; et al. Progressive Motor Neuron Pathology and the Role of Astrocytes in a Human Stem Cell Model of VCP-Related ALS. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 1739–1749. [[CrossRef](#)]
37. Joshi, A.U.; Minhas, P.S.; Liddelow, S.A.; Haileselassie, B.; Andreasson, K.I.; Dorn, G.W., 2nd; Mochly-Rosen, D. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* **2019**, *22*, 1635–1648. [[CrossRef](#)]
38. Liddelow, S.A.; Guttenplan, K.A.; Clarke, L.E.; Bennett, F.C.; Bohlen, C.J.; Schirmer, L.; Bennett, M.L.; Munch, A.E.; Chung, W.S.; Peterson, T.C.; et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **2017**, *541*, 481–487. [[CrossRef](#)]
39. Hartline, D.K.; Colman, D.R. Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, R29–R35. [[CrossRef](#)]
40. Funfschilling, U.; Supplie, L.M.; Mahad, D.; Boretius, S.; Saab, A.S.; Edgar, J.; Brinkmann, B.G.; Kassmann, C.M.; Tzvetanova, I.D.; Mobius, W.; et al. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* **2012**, *485*, 517–521. [[CrossRef](#)]
41. Philips, T.; Rothstein, J.D. Oligodendroglia: Metabolic supporters of neurons. *J. Clin. Investig.* **2017**, *127*, 3271–3280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kang, S.H.; Li, Y.; Fukaya, M.; Lorenzini, I.; Cleveland, D.W.; Ostrow, L.W.; Rothstein, J.D.; Bergles, D.E. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* **2013**, *16*, 571–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kim, S.; Chung, A.Y.; Na, J.E.; Lee, S.J.; Jeong, S.H.; Kim, E.; Sun, W.; Rhyu, I.J.; Park, H.C. Myelin degeneration induced by mutant superoxide dismutase 1 accumulation promotes amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* **2019**, *67*, 1910–1921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lee, Y.; Morrison, B.M.; Li, Y.; Lengacher, S.; Farah, M.H.; Hoffman, P.N.; Liu, Y.; Tsingalia, A.; Jin, L.; Zhang, P.W.; et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* **2012**, *487*, 443–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ferraiuolo, L.; Meyer, K.; Sherwood, T.W.; Vick, J.; Likhite, S.; Frakes, A.; Miranda, C.J.; Braun, L.; Heath, P.R.; Pineda, R.; et al. Oligodendrocytes contribute to motor neuron death in ALS via SOD1-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E6496–E6505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Mackenzie, I.R.; Ansorge, O.; Strong, M.; Bilbao, J.; Zinman, L.; Ang, L.C.; Baker, M.; Stewart, H.; Eisen, A.; Rademakers, R.; et al. Pathological heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations: Two distinct patterns correlating with disease severity and mutation. *Acta Neuropathol.* **2011**, *122*, 87–98. [[CrossRef](#)]
47. Nolan, M.; Scott, C.; Gamarallage, M.P.; Lunn, D.; Carpenter, K.; McDonough, E.; Meyer, D.; Kaanumalle, S.; Santamaria-Pang, A.; Turner, M.R.; et al. Quantitative patterns of motor cortex proteinopathy across ALS genotypes. *Acta Neuropathol. Commun.* **2020**, *8*, 98. [[CrossRef](#)]
48. Rohan, Z.; Matej, R.; Rusina, R.; Kovacs, G.G. Oligodendroglial response in the spinal cord in TDP-43 proteinopathy with motor neuron involvement. *Neurodegener. Dis.* **2014**, *14*, 117–124. [[CrossRef](#)]
49. Hasegawa, M.; Arai, T.; Nonaka, T.; Kametani, F.; Yoshida, M.; Hashizume, Y.; Beach, T.G.; Buratti, E.; Baralle, F.; Morita, M.; et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **2008**, *64*, 60–70. [[CrossRef](#)]
50. Vanden Broeck, L.; Callaerts, P.; Dermaut, B. TDP-43-mediated neurodegeneration: Towards a loss-of-function hypothesis? *Trends Mol. Med.* **2014**, *20*, 66–71. [[CrossRef](#)]

51. Wang, J.; Ho, W.Y.; Lim, K.; Feng, J.; Tucker-Kellogg, G.; Nave, K.A.; Ling, S.C. Cell-autonomous requirement of TDP-43, an ALS/FTD signature protein, for oligodendrocyte survival and myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E10941–E10950. [[CrossRef](#)]
52. Scekic-Zahirovic, J.; Oussini, H.E.; Mersmann, S.; Drenner, K.; Wagner, M.; Sun, Y.; Allmeroth, K.; Dieterle, S.; Sinniger, J.; Dirrig-Grosch, S.; et al. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **2017**, *133*, 887–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Lorente Pons, A.; Higginbottom, A.; Cooper-Knock, J.; Alrafiah, A.; Alofi, E.; Kirby, J.; Shaw, P.J.; Wood, J.D.; Highley, J.R. Oligodendrocyte pathology exceeds axonal pathology in white matter in human amyotrophic lateral sclerosis. *J. Pathol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
54. Uchida, T.; Tamaki, Y.; Ayaki, T.; Shodai, A.; Kaji, S.; Morimura, T.; Banno, Y.; Nishitsuji, K.; Sakashita, N.; Maki, T.; et al. CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Rosin, C.; Bates, T.E.; Skaper, S.D. Excitatory amino acid induced oligodendrocyte cell death in vitro: Receptor-dependent and -independent mechanisms. *J. Neurochem.* **2004**, *90*, 1173–1185. [[CrossRef](#)]
56. Vartanian, T.; Li, Y.; Zhao, M.; Stefansson, K. Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: Implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol. Med.* **1995**, *1*, 732–743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Aebischer, J.; Moumen, A.; Sazdovitch, V.; Seilhean, D.; Meininger, V.; Raoul, C. Elevated levels of IFN γ and LIGHT in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **2012**, *19*, e745–e756. [[CrossRef](#)]
58. Stone, S.; Wu, S.; Nave, K.A.; Lin, W. The UPR preserves mature oligodendrocyte viability and function in adults by regulating autophagy of PLP. *JCI Insight* **2020**, *5*. [[CrossRef](#)]
59. Osseward, P.J., 2nd; Pfaff, S.L. Cell type and circuit modules in the spinal cord. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2019**, *56*, 175–184. [[CrossRef](#)]
60. Ramirez-Jarquín, U.N.; Tapia, R. Excitatory and Inhibitory Neuronal Circuits in the Spinal Cord and Their Role in the Control of Motor Neuron Function and Degeneration. *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, *9*, 211–216. [[CrossRef](#)]
61. Gosgnach, S. The role of genetically-defined interneurons in generating the mammalian locomotor rhythm. *Integr. Comp. Biol.* **2011**, *51*, 903–912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Jara, J.H.; Genc, B.; Klessner, J.L.; Ozdinler, P.H. Retrograde labeling, transduction, and genetic targeting allow cellular analysis of corticospinal motor neurons: Implications in health and disease. *Front. Neuroanat.* **2014**, *8*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Oswald, M.J.; Tantirigama, M.L.; Sonntag, I.; Hughes, S.M.; Empson, R.M. Diversity of layer 5 projection neurons in the mouse motor cortex. *Front. Cell Neurosci.* **2013**, *7*, 174. [[CrossRef](#)]
64. Kawaguchi, Y. Pyramidal Cell Subtypes and Their Synaptic Connections in Layer 5 of Rat Frontal Cortex. *Cereb Cortex* **2017**, *27*, 5755–5771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Naka, A.; Adesnik, H. Inhibitory Circuits in Cortical Layer 5. *Front. Neural. Circuits* **2016**, *10*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Vucic, S.; Cheah, B.C.; Yiannikas, C.; Kiernan, M.C. Cortical excitability distinguishes ALS from mimic disorders. *Clin. Neurophysiol.* **2011**, *122*, 1860–1866. [[CrossRef](#)]
67. Vucic, S.; Nicholson, G.A.; Kiernan, M.C. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **2008**, *131*, 1540–1550. [[CrossRef](#)]
68. Zanette, G.; Tamburin, S.; Manganotti, P.; Refatti, N.; Forgiione, A.; Rizzuto, N. Different mechanisms contribute to motor cortex hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* **2002**, *113*, 1688–1697. [[CrossRef](#)]
69. Zanette, G.; Tamburin, S.; Manganotti, P.; Refatti, N.; Forgiione, A.; Rizzuto, N. Changes in motor cortex inhibition over time in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* **2002**, *249*, 1723–1728. [[CrossRef](#)]
70. Ziemann, U.; Winter, M.; Reimers, C.D.; Reimers, K.; Tergau, F.; Paulus, W. Impaired motor cortex inhibition in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Evidence from paired transcranial magnetic stimulation. *Neurology* **1997**, *49*, 1292–1298. [[CrossRef](#)]
71. Nihei, K.; Kowall, N.W. Involvement of NPY-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurosci. Lett.* **1993**, *159*, 67–70. [[CrossRef](#)]

72. Stephens, B.; Guiloff, R.J.; Navarrete, R.; Newman, P.; Nikhar, N.; Lewis, P. Widespread loss of neuronal populations in the spinal ventral horn in sporadic motor neuron disease. A morphometric study. *J. Neurol. Sci.* **2006**, *244*, 41–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Ince, P.; Stout, N.; Shaw, P.; Slade, J.; Hunziker, W.; Heizmann, C.W.; Baimbridge, K.G. Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1993**, *19*, 291–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Maekawa, S.; Al-Sarraj, S.; Kibble, M.; Landau, S.; Parnavelas, J.; Cotter, D.; Everall, I.; Leigh, P.N. Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: A morphometric study. *Brain* **2004**, *127*, 1237–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Nihei, K.; McKee, A.C.; Kowall, N.W. Patterns of neuronal degeneration in the motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol.* **1993**, *86*, 55–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Foerster, B.R.; Callaghan, B.C.; Petrou, M.; Edden, R.A.; Chenevert, T.L.; Feldman, E.L. Decreased motor cortex gamma-aminobutyric acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **2012**, *78*, 1596–1600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Lloyd, C.M.; Richardson, M.P.; Brooks, D.J.; Al-Chalabi, A.; Leigh, P.N. Extramotor involvement in ALS: PET studies with the GABA(A) ligand [(11)C]flumazenil. *Brain* **2000**, *123*, 2289–2296. [[CrossRef](#)]
78. Chung, Y.H.; Joo, K.M.; Nam, R.H.; Cho, M.H.; Kim, D.J.; Lee, W.B.; Cha, C.I. Decreased expression of calretinin in the cerebral cortex and hippocampus of SOD1G93A transgenic mice. *Brain Res.* **2005**, *1035*, 105–109. [[CrossRef](#)]
79. Clark, R.M.; Blizzard, C.A.; Young, K.M.; King, A.E.; Dickson, T.C. Calretinin and Neuropeptide Y interneurons are differentially altered in the motor cortex of the SOD1(G93A) mouse model of ALS. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44461. [[CrossRef](#)]
80. Morrison, B.M.; Janssen, W.G.; Gordon, J.W.; Morrison, J.H. Time course of neuropathology in the spinal cord of G86R superoxide dismutase transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* **1998**, *391*, 64–77. [[CrossRef](#)]
81. Niessen, H.G.; Debska-Vielhaber, G.; Sander, K.; Angenstein, F.; Ludolph, A.C.; Hilfert, L.; Willker, W.; Leibfritz, D.; Heinze, H.J.; Kunz, W.S.; et al. Metabolic progression markers of neurodegeneration in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *25*, 1669–1677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Wegorzewska, I.; Bell, S.; Cairns, N.J.; Miller, T.M.; Baloh, R.H. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18809–18814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Zhang, W.; Zhang, L.; Liang, B.; Schroeder, D.; Zhang, Z.W.; Cox, G.A.; Li, Y.; Lin, D.T. Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nat. Neurosci.* **2016**, *19*, 557–559. [[CrossRef](#)]
84. McGown, A.; McDearmid, J.R.; Panagiotaki, N.; Tong, H.; Al Mashhadi, S.; Redhead, N.; Lyon, A.N.; Beattie, C.E.; Shaw, P.J.; Ramesh, T.M. Early interneuron dysfunction in ALS: Insights from a mutant sod1 zebrafish model. *Ann. Neurol.* **2013**, *73*, 246–258. [[CrossRef](#)]
85. Kuo, J.J.; Schonewille, M.; Siddique, T.; Schults, A.N.; Fu, R.; Bar, P.R.; Anelli, R.; Heckman, C.J.; Kroese, A.B. Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J. Neurophysiol.* **2004**, *91*, 571–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. van Zundert, B.; Peuscher, M.H.; Hynynen, M.; Chen, A.; Neve, R.L.; Brown, R.H., Jr.; Constantine-Paton, M.; Bellingham, M.C. Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 10864–10874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Milanese, M.; Zappettini, S.; Jacchetti, E.; Bonifacino, T.; Cervetto, C.; Usai, C.; Bonanno, G. In vitro activation of GAT1 transporters expressed in spinal cord gliosomes stimulates glutamate release that is abnormally elevated in the SOD1/G93A(+) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **2010**, *113*, 489–501. [[CrossRef](#)]
88. Carunchio, I.; Mollinari, C.; Pieri, M.; Merlo, D.; Zona, C. GAB(A) receptors present higher affinity and modified subunit composition in spinal motor neurons from a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* **2008**, *28*, 1275–1285. [[CrossRef](#)]

89. Nieto-Gonzalez, J.L.; Moser, J.; Lauritzen, M.; Schmitt-John, T.; Jensen, K. Reduced GABAergic inhibition explains cortical hyperexcitability in the wobbler mouse model of ALS. *Cereb Cortex* **2011**, *21*, 625–635. [[CrossRef](#)]
90. Moser, J.M.; Bigini, P.; Schmitt-John, T. The wobbler mouse, an ALS animal model. *Mol. Genet. Genom.* **2013**, *288*, 207–229. [[CrossRef](#)]
91. Chang, Q.; Martin, L.J. Glycinergic innervation of motoneurons is deficient in amyotrophic lateral sclerosis mice: A quantitative confocal analysis. *Am. J. Pathol.* **2009**, *174*, 574–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Wootz, H.; Fitzsimons-Kantamneni, E.; Larhammar, M.; Rotterman, T.M.; Enjin, A.; Patra, K.; Andre, E.; Van Zundert, B.; Kullander, K.; Alvarez, F.J. Alterations in the motor neuron-renshaw cell circuit in the Sod1(G93A) mouse model. *J. Comp. Neurol.* **2013**, *521*, 1449–1469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Casas, C.; Herrando-Grabulosa, M.; Manzano, R.; Mancuso, R.; Osta, R.; Navarro, X. Early presymptomatic cholinergic dysfunction in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav.* **2013**, *3*, 145–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Raynor, E.M.; Shefner, J.M. Recurrent inhibition is decreased in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **1994**, *44*, 2148–2153. [[CrossRef](#)]
95. Qian, K.; Huang, H.; Peterson, A.; Hu, B.; Maragakis, N.J.; Ming, G.L.; Chen, H.; Zhang, S.C. Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem. Cell Rep.* **2017**, *8*, 843–855. [[CrossRef](#)]
96. Rudnick, N.D.; Griffey, C.J.; Guarnieri, P.; Gerbino, V.; Wang, X.; Piersaint, J.A.; Tapia, J.C.; Rich, M.M.; Maniatis, T. Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1(G93A) mouse model of ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E8294–E8303. [[CrossRef](#)]
97. Enjin, A.; Rabe, N.; Nakanishi, S.T.; Vallstedt, A.; Gezelius, H.; Memic, F.; Lind, M.; Hjalt, T.; Tourtellotte, W.G.; Bruder, C.; et al. Identification of novel spinal cholinergic genetic subtypes disclose Chodl and Pitx2 as markers for fast motor neurons and partition cells. *J. Comp. Neurol.* **2010**, *518*, 2284–2304. [[CrossRef](#)]
98. Zagoraiou, L.; Akay, T.; Martin, J.F.; Brownstone, R.M.; Jessell, T.M.; Miles, G.B. A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron* **2009**, *64*, 645–662. [[CrossRef](#)]
99. Witts, E.C.; Zagoraiou, L.; Miles, G.B. Anatomy and function of cholinergic C bouton inputs to motor neurons. *J. Anat* **2014**, *224*, 52–60. [[CrossRef](#)]
100. Deardorff, A.S.; Romer, S.H.; Sonner, P.M.; Fyffe, R.E. Swimming against the tide: Investigations of the C-bouton synapse. *Front. Neural. Circuits* **2014**, *8*, 106. [[CrossRef](#)]
101. Zampieri, N.; Jessell, T.M.; Murray, A.J. Mapping sensory circuits by anterograde transsynaptic transfer of recombinant rabies virus. *Neuron* **2014**, *81*, 766–778. [[CrossRef](#)]
102. Zhang, J.; Lanuza, G.M.; Britz, O.; Wang, Z.; Siembab, V.C.; Zhang, Y.; Velasquez, T.; Alvarez, F.J.; Frank, E.; Goulding, M. V1 and v2b interneurons secure the alternating flexor-extensor motor activity mice require for limbed locomotion. *Neuron* **2014**, *82*, 138–150. [[CrossRef](#)]
103. Hellstrom, J.; Oliveira, A.L.; Meister, B.; Cullheim, S. Large cholinergic nerve terminals on subsets of motoneurons and their relation to muscarinic receptor type 2. *J. Comp. Neurol.* **2003**, *460*, 476–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Soulard, C.; Salsac, C.; Mouzat, K.; Hilaire, C.; Roussel, J.; Mezghrani, A.; Lumbroso, S.; Raoul, C.; Scamps, F. Spinal Motoneuron TMEM16F Acts at C-boutons to Modulate Motor Resistance and Contributes to ALS Pathogenesis. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 2581–2593 e2587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Nagao, M.; Misawa, H.; Kato, S.; Hirai, S. Loss of cholinergic synapses on the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1998**, *57*, 329–333. [[CrossRef](#)]
106. Lasiene, J.; Komine, O.; Fujimori-Tonou, N.; Powers, B.; Endo, F.; Watanabe, S.; Shijie, J.; Ravits, J.; Horner, P.; Misawa, H.; et al. Neuregulin 1 confers neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons. *Acta Neuropathol. Commun.* **2016**, *4*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Milan, L.; Courtand, G.; Cardoit, L.; Masméjean, F.; Barriere, G.; Cazalets, J.R.; Garret, M.; Bertrand, S.S. Age-Related Changes in Pre- and Postsynaptic Partners of the Cholinergic C-Boutons in Wild-Type and SOD1G93A Lumbar Motoneurons. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Pullen, A.H.; Athanasiou, D. Increase in presynaptic territory of C-terminals on lumbar motoneurons of G93A SOD1 mice during disease progression. *Eur. J. Neurosci.* **2009**, *29*, 551–561. [[CrossRef](#)]

109. Saxena, S.; Roselli, F.; Singh, K.; Leptien, K.; Julien, J.P.; Gros-Louis, F.; Caroni, P. Neuroprotection through Excitability and mTOR Required in ALS Motoneurons to Delay Disease and Extend Survival. *Neuron* **2013**, *80*, 80–96. [[CrossRef](#)]
110. Herron, L.R.; Miles, G.B. Gender-specific perturbations in modulatory inputs to motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* **2012**, *226*, 313–323. [[CrossRef](#)]
111. Dukkupati, S.S.; Chihi, A.; Wang, Y.; Elbasiouny, S.M. Experimental Design and Data Analysis Issues Contribute to Inconsistent Results of C-Bouton Changes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *eNeuro* **2017**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Gallart-Palau, X.; Tarabal, O.; Casanovas, A.; Sabado, J.; Correa, F.J.; Hereu, M.; Piedrafita, L.; Caldero, J.; Esquerda, J.E. Neuregulin-1 is concentrated in the postsynaptic subsurface cistern of C-bouton inputs to alpha-motoneurons and altered during motoneuron diseases. *FASEB J.* **2014**, *28*, 3618–3632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Landoni, L.M.; Myles, J.R.; Wells, T.L.; Mayer, W.P.; Akay, T. Cholinergic modulation of motor neurons through the C-boutons are necessary for the locomotor compensation for severe motor neuron loss during amyotrophic lateral sclerosis disease progression. *Behav. Brain Res.* **2019**, *369*, 111914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Salvany, S.; Casanovas, A.; Tarabal, O.; Piedrafita, L.; Hernandez, S.; Santafe, M.; Soto-Bernardini, M.C.; Caldero, J.; Schwab, M.H.; Esquerda, J.E. Localization and dynamic changes of neuregulin-1 at C-type synaptic boutons in association with motor neuron injury and repair. *FASEB J.* **2019**, *33*, 7833–7851. [[CrossRef](#)]
115. Dentel, C.; Palamiuc, L.; Henriques, A.; Lannes, B.; Spreux-Varoquaux, O.; Gutknecht, L.; Rene, F.; Echaniz-Laguna, A.; Gonzalez de Aguilar, J.L.; Lesch, K.P.; et al. Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: A link to spasticity. *Brain* **2013**, *136*, 483–493. [[CrossRef](#)]
116. El Oussini, H.; Scekcic-Zahirovic, J.; Vercruyse, P.; Marques, C.; Dirrig-Grosch, S.; Dieterle, S.; Picchiarelli, G.; Sinniger, J.; Rouaux, C.; Dupuis, L. Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **2017**, *82*, 444–456. [[CrossRef](#)]
117. Kato, S.; Oda, M.; Tanabe, H. Diminution of dopaminergic neurons in the substantia nigra of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1993**, *19*, 300–304. [[CrossRef](#)]
118. Borasio, G.D.; Linke, R.; Schwarz, J.; Schlamp, V.; Abel, A.; Mozley, P.D.; Tatsch, K. Dopaminergic deficit in amyotrophic lateral sclerosis assessed with [I-123] IPT single photon emission computed tomography. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1998**, *65*, 263–265. [[CrossRef](#)]
119. Takahashi, H.; Snow, B.J.; Bhatt, M.H.; Peppard, R.; Eisen, A.; Calne, D.B. Evidence for a dopaminergic deficit in sporadic amyotrophic lateral sclerosis on positron emission scanning. *Lancet* **1993**, *342*, 1016–1018. [[CrossRef](#)]
120. Kostic, V.; Gurney, M.E.; Deng, H.X.; Siddique, T.; Epstein, C.J.; Przedborski, S. Midbrain dopaminergic neuronal degeneration in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **1997**, *41*, 497–504. [[CrossRef](#)]
121. Riancho, J.; Paz-Fajardo, L.; Lopez de Munain, A. Clinical and preclinical evidence of somatosensory involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Br. J. Pharm.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Tao, Q.Q.; Wei, Q.; Wu, Z.Y. Sensory nerve disturbance in amyotrophic lateral sclerosis. *Life Sci.* **2018**, *203*, 242–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Seki, S.; Yamamoto, T.; Quinn, K.; Spigelman, I.; Pantazis, A.; Olcese, R.; Wiedau-Pazos, M.; Chandler, S.H.; Venugopal, S. Circuit-Specific Early Impairment of Proprioceptive Sensory Neurons in the SOD1(G93A) Mouse Model for ALS. *J. Neurosci.* **2019**, *39*, 8798–8815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Dal Canto, M.C.; Gurney, M.E. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: A model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res.* **1995**, *676*, 25–40. [[CrossRef](#)]
125. Vaughan, S.K.; Kemp, Z.; Hatzipetros, T.; Vieira, F.; Valdez, G. Degeneration of proprioceptive sensory nerve endings in mice harboring amyotrophic lateral sclerosis-causing mutations. *J. Comp. Neurol.* **2015**, *523*, 2477–2494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Boillee, S.; Yamanaka, K.; Lobsiger, C.S.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Kassiotis, G.; Kollias, G.; Cleveland, D.W. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* **2006**, *312*, 1389–1392. [[CrossRef](#)]

127. Fendrick, S.E.; Xue, Q.S.; Streit, W.J. Formation of multinucleated giant cells and microglial degeneration in rats expressing a mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *J. Neuroinflammation* **2007**, *4*, 9. [[CrossRef](#)]
128. Streit, W.J.; Xue, Q.S. Life and death of microglia. *J. Neuroimmune Pharm.* **2009**, *4*, 371–379. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

II. Article « Cytotoxic CD8 + T lymphocytes expressing ALS-causing SOD1 mutant selectively trigger death of spinal motoneurons » - Coque et al., 2019

Ce projet a permis de montrer une cytotoxicité directe des lymphocytes T CD8⁺ porteurs de la mutation *SOD1^{G93A}* envers les motoneurones. J'ai eu la chance de contribuer à ce projet en réalisant les immunomarquages et les quantifications de la survie des motoneurones au stade symptomatique chez les souris *SOD1^{G93A} ; Cd8α^{-/-}*.



Cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes expressing ALS-causing SOD1 mutant selectively trigger death of spinal motoneurons

Emmanuelle Coque^a, Céline Salsac^a, Gabriel Espinosa-Carrasco^b, Béla Varga^c, Nicolas Degauque^{d,e}, Marion Cadoux^{d,e}, Roxane Crabé^a, Anaïs Virenque^a, Claire Soulard^a, Julie K. Fierle^f, Alexandre Brodovitch^{g,h}, Margot Libralato^a, Attila G. Véghⁱ, Stéphanie Venteo^a, Frédérique Scamps^a, José Boucraut^{h,j}, David Laplaud^{d,e}, Javier Hernandez^b, Csilla Gergely^c, Thierry Vincent^{a,k}, and Cédric Raoul^{a,1}

^aThe Neuroscience Institute of Montpellier, Inserm UMR1051, University of Montpellier, Saint Eloi Hospital, 34090 Montpellier, France; ^bInserm U1183, Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy, University of Montpellier, 34090 Montpellier, France; ^cCharles Coulomb laboratory, L2C, UMR5221, University of Montpellier, CNRS, 34095 Montpellier, France; ^dCentre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, 44093 Nantes, France; ^eInstitut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), University Hospital Centre Nantes, 44093 Nantes, France; ^fLudwig Institute for Cancer Research, Lausanne University, CH 1015 Lausanne, Switzerland; ^gReferral Centre for ALS and Neuromuscular Diseases, La Timone University Hospital, Aix-Marseille University, 13005 Marseille, France; ^hImmunology Laboratory, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Conception Hospital, 13005 Marseille, France; ⁱInstitute of Biophysics, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, H 6726 Szeged, Hungary; ^jTimone Neuroscience Institute, Aix-Marseille University, 13005 Marseille, France; and ^kDepartment of Immunology, Saint Eloi Hospital, 34295 Montpellier, France

Edited by Lawrence Steinman, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, and approved December 20, 2018 (received for review September 14, 2018)

Adaptive immune response is part of the dynamic changes that accompany motoneuron loss in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). CD4⁺ T cells that regulate a protective immunity during the neurodegenerative process have received the most attention. CD8⁺ T cells are also observed in the spinal cord of patients and ALS mice although their contribution to the disease still remains elusive. Here, we found that activated CD8⁺ T lymphocytes infiltrate the central nervous system (CNS) of a mouse model of ALS at the symptomatic stage. Selective ablation of CD8⁺ T cells in mice expressing the ALS-associated superoxide dismutase-1 (SOD1)^{G93A} mutant decreased spinal motoneuron loss. Using motoneuron-CD8⁺ T cell coculture systems, we found that mutant SOD1-expressing CD8⁺ T lymphocytes selectively kill motoneurons. This cytotoxicity activity requires the recognition of the peptide-MHC-I complex (where MHC-I represents major histocompatibility complex class I). Measurement of interaction strength by atomic force microscopy-based single-cell force spectroscopy demonstrated a specific MHC-I-dependent interaction between motoneuron and SOD1^{G93A} CD8⁺ T cells. Activated mutant SOD1 CD8⁺ T cells produce interferon- γ , which elicits the expression of the MHC-I complex in motoneurons and exerts their cytotoxic function through Fas and granzyme pathways. In addition, analysis of the clonal diversity of CD8⁺ T cells in the periphery and CNS of ALS mice identified an antigen-restricted repertoire of their T cell receptor in the CNS. Our results suggest that self-directed immune response takes place during the course of the disease, contributing to the selective elimination of a subset of motoneurons in ALS.

amyotrophic lateral sclerosis | neuroimmunity | cytotoxic T lymphocytes | motoneuron | major histocompatibility complex I

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an incurable neurodegenerative disease that primarily affects upper and lower motoneurons. ALS has a complex multifactorial etiology as reflected by the large predominance of sporadic forms of the disease. Dominantly inherited mutations in the gene encoding superoxide dismutase-1 (*SOD1*) are among the most common genetic causes of hereditary ALS (1). Mice that express ALS-linked *SOD1* mutations progressively develop a severe motoneuron disease that presents the main traits of human pathology. Those ALS mouse models have provided valuable clues to the cellular pathogenesis of the disease. Whereas the neurodegenerative process selectively affects motoneurons, non-cell-autonomous determinants that implicate glial cells also contribute to the pathogenic process (2). The neuroinflammatory environment resulting from functionally aberrant glial cells is additionally accompanied by the infiltration of blood-derived immune cells (3).

Infiltration of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes has been documented in the brain and spinal cord of ALS patients (4–6). In transgenic mice expressing mutant SOD1^{G93A}, the number of CD4⁺ and CD8⁺ T cells infiltrating the spinal cord increases as the disease progresses (7, 8). CD4⁺ T lymphocytes have gained a certain interest due to their neuroprotective function in ALS. This was evidenced by the reduced number and suppressive abilities of T regulatory (Treg) lymphocytes, which are negatively correlated with the progression rate of the disease in ALS patients (9, 10), and by genetic ablation of CD4 or adoptive transfer of Treg on ALS pathogenesis in mice (7, 11, 12).

To typically mount an immune response, the T cell receptor (TCR) of CD8⁺ T cells interacts with antigens presented by heterodimeric MHC class I (MHC-I) molecules (13). MHC-I is expressed by motoneurons both under physiological conditions

Significance

CD8⁺ T lymphocytes, which are typically devoted to eliminate malignant and infected cells, have been described in the central nervous system (CNS) of patients and mice with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). However, their role in ALS pathogenesis has yet to be unraveled. Here, we show that ablation of CD8⁺ T cells in ALS mice increased the number of surviving motoneurons. CD8⁺ T cells expressing the ALS-causing superoxide dismutase-1 mutant protein recognize and selectively kill motoneurons in vitro. To exert their cytotoxic function, mutant CD8⁺ T cells required presentation of the antigen-MHC-I complex at the surface of the motoneurons. Analysis of T cell receptor diversity supports the evidence that self-reactive CD8⁺ T lymphocytes infiltrate the CNS of ALS mice to exert cytotoxic function.

Author contributions: E.C., C. Salsac, G.E.-C., B.V., N.D., F.S., J.B., D.L., J.H., C.G., T.V., and C.R. designed research; E.C., C. Salsac, G.E.-C., B.V., N.D., M.C., R.C., A.V., C. Soulard, J.K.F., M.L., S.V., J.B., J.H., and C.R. performed research; A.G.V. contributed new reagents/analytic tools; E.C., C. Salsac, G.E.-C., B.V., N.D., M.C., R.C., A.V., C. Soulard, J.K.F., A.B., M.L., S.V., F.S., J.B., D.L., J.H., C.G., T.V., and C.R. analyzed data; and E.C. and C.R. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

This open access article is distributed under [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 \(CC BY-NC-ND\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

¹To whom correspondence should be addressed. Email: cedric.raoul@inserm.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1815961116/-DCSupplemental.

Published online January 23, 2019.

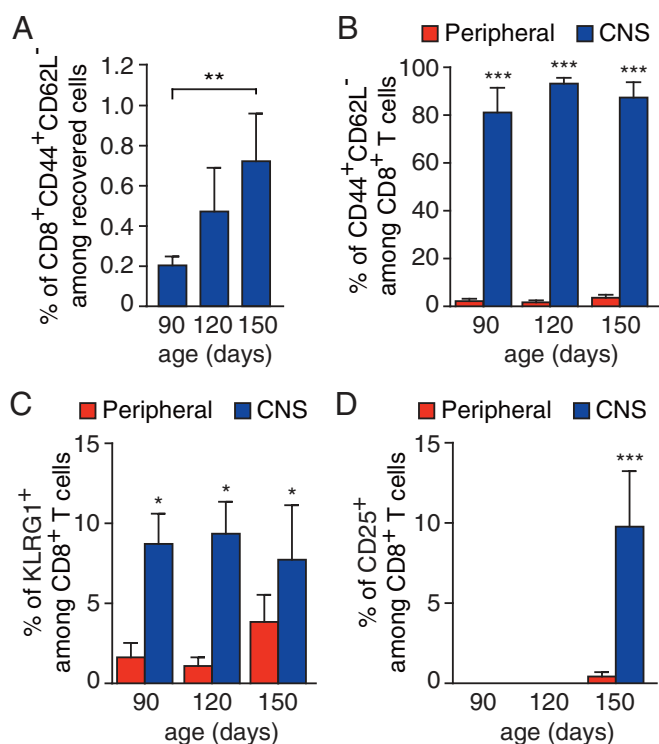


Fig. 1. Infiltration of activated CD8⁺ T cells in the CNS of SOD1^{G93A}-expressing mice. (A) Analysis of CD44 and CD62L expression on CD8⁺ T cells isolated from the CNS of SOD1^{G93A} mice at 90, 120, and 150 d of age (among viable, single event cells, *SI Appendix, Fig. S1A*). (B) Flow cytometry analysis indicating that the CD8⁺ T cells infiltrating the CNS are mainly CD44⁺CD62L⁻ compared with circulating CD8⁺ T cells (peripheral). (C and D) Percentage of infiltrating CD8⁺ cells with expression of the KLRG1 (C) and CD25 (D) activation marker at indicated ages in the CNS and blood of SOD1^{G93A} mice. Histograms show mean values ± scanning electron microscopy (SEM), *n* = 3 for each time point, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, analysis of variance (ANOVA) with Tukey–Kramer’s post hoc test (A) or multiple *t* test (B–D).

and during the asymptomatic disease stage, whereas the percentage of surviving motoneurons expressing MHC-I was found to be reduced in postmortem spinal cord samples of ALS patients as well as in the spinal cord of end-stage mutant SOD1 mice (14). The light chain of MHC-I β-2 microglobulin (β₂m) is predominantly expressed by motoneurons, and expression increases during the disease progression (15). However, the contribution of a CD8⁺ cytotoxic T cell response to ALS pathogenesis still remains elusive.

Here, we observed that activated CD8⁺ T cells infiltrate the central nervous system (CNS) of symptomatic ALS mice. SOD1^{G93A} mice depleted in CD8⁺ T cells exhibited an increased number of surviving motoneurons. We found that purified SOD1^{G93A}-expressing CD8⁺ T cells selectively trigger the death of primary motoneurons in a MHC-I-dependent manner through granzyme and Fas death pathways. Atomic force microscopy- (AFM-) based single-cell force spectroscopy (AFM-SCFS) showed increased contact force between ALS cytotoxic CD8⁺ T cells and motoneurons which implicate MHC-I recognition. Finally, spectratyping analysis of the TCR repertoire showed a restricted usage of the TCR β-chain variable region (TRBV) by CD8⁺ T cells infiltrating the CNS confirming an antigen-specific CD8⁺ T cell response in ALS mice.

Results

Activated CD8⁺ T Cells Infiltrate the CNS of ALS Mice During the Symptomatic Stage. We first sought to determine the differentiation profile of CD8⁺ T cells infiltrating the CNS of SOD1^{G93A}-expressing mice. We used a sequential gating strategy to accurately define

CD8⁺ T cells among the CD45⁺Thy1.2⁺CD49b⁻CD3⁺ T lymphocyte lineages in the CNS of ALS mice by flow cytometry (*SI Appendix, Fig. S1A*). We first confirmed a significant accumulation of CD8⁺ T cells in the CNS of SOD1^{G93A} mice at the symptomatic stage (150 d). Such an increase was not observed in the blood of age-matched SOD1 mutant mice (*SI Appendix, Fig. S1B and C*). In situ hybridization using a *Cd8a* probe revealed a widespread distribution of CD8⁺ T cells in the gray matter of the SOD1^{G93A} spinal cord (*SI Appendix, Fig. S2*). We next determined the differentiation profile of infiltrating SOD1^{G93A} CD8⁺ T cells by using CD44 and CD62L markers whose levels distinguish between naive (CD44⁻CD62L⁺) and effector/effector memory (CD44⁺CD62L⁻) T cells. The frequency of CD44⁺CD62L⁻ antigen-experienced T cells in the CNS of SOD1^{G93A} mice increased with the disease progression (Fig. 1A). The majority of CD8⁺ T cells infiltrating the CNS being mainly effector/effector memory T cells (Fig. 1B). Markers of CD8⁺ T cell activation including killer cell lectinlike receptor subfamily G member 1 (KLRG1) and CD25 were found to be expressed by CD8⁺ T cells that accumulate in the CNS of ALS mice (Fig. 1C and D).

Depletion of Cytotoxic CD8⁺ T Cells in SOD1 Mutant Mice Increases the Survival of Spinal Motoneurons. We next asked whether CD8⁺ T cells contribute to ALS pathogenesis. We bred SOD1^{G93A} with *Cd8a*-deficient mice. *Cd8a*^{-/-} mice are viable and fertile but fail to generate functional cytotoxic CD8⁺ T cells (16). We first ensured by flow cytometry analysis that the CD8⁺ T cell population was lost without the CD4⁺ T cell population being affected in the SOD1^{G93A}; *Cd8a*^{-/-} double mutant mice (*SI Appendix, Fig. S3A and B*). We did not observe any effect at disease onset, motor performance, and life expectancy (*SI Appendix, Fig. S4A–D*). However, we found that the loss of CD8⁺ T cell function significantly increased the number of surviving motoneurons in SOD1^{G93A} mice (Fig. 2). To further confirm this observation, we repeatedly administered a monoclonal anti-CD8 antibody to selectively deplete CD8⁺ T cells in mice (17). Treatment led to a marked and long-lasting reduction of blood-circulating CD8⁺ T cells without altering CD4⁺ T cells, CD19⁺ B cells, or CD11b⁺ macrophage populations (*SI Appendix, Fig. S5A–D*). However, only 40% of CD8⁺ T cells were depleted in the CNS compared

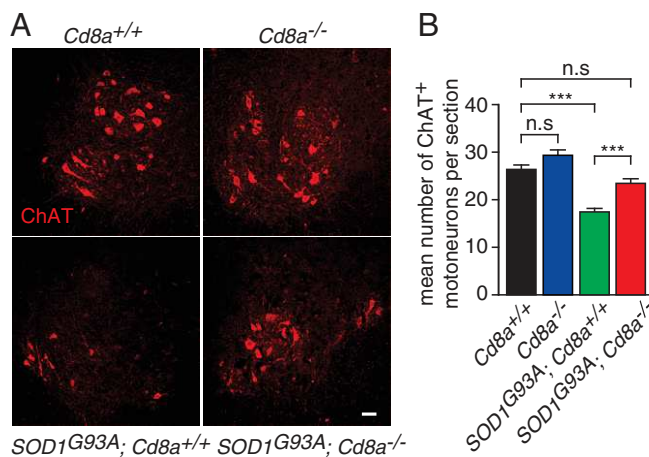


Fig. 2. Genetic depletion of CD8⁺ T lymphocytes increased the number of surviving motoneurons in ALS mice. (A) Representative images of lumbar spinal cord sections of 135-d-old mice of indicated genotype immunolabeled with choline acetyltransferase (ChAT) to visualize motoneurons. (Scale bar, 50 μm.) (B) Quantification of the number of ChAT⁺ motoneurons in 45 sections of the lumbar spinal cord of *Cd8a*^{+/+}, *Cd8a*^{-/-}, SOD1^{G93A}; *Cd8a*^{+/+} and SOD1^{G93A}; *Cd8a*^{-/-} mice (*n* = 3). Values are means ± SEM; ****P* < 0.001; n.s., nonsignificant, ANOVA with Tukey–Kramer’s post hoc test.

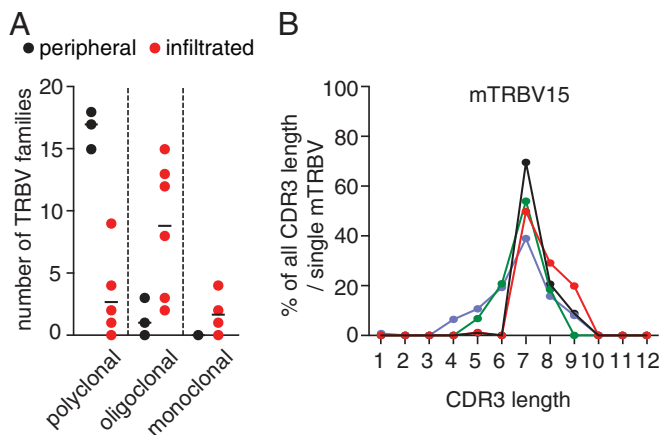


Fig. 6. CD8⁺ T cells infiltrating the spinal cord of ALS mice show a restricted T cell receptor repertoire. (A) Comparison of CDR3-LD (polyclonal, oligoclonal, or monoclonal distribution) of TRBV families in CD8⁺ T cells isolated from LNs (peripheral) and CNS (infiltrated) of 150-d-old *SOD1^{G93A}* mice ($n = 6$). (B) Distribution of the mTRBV15 CDR3 length across the CD8⁺ T cell infiltrating the CNS shared among four mice (each color corresponding to one mouse).

(SI Appendix, Fig. S11 A and B). We then analyzed the CDR3 length of the 18 TRBV individually to determine the relative use of each in the CNS of *SOD1^{G93A}* mice and observed a specific selection of mTRBV15 (Fig. 6B and SI Appendix, Fig. S12). Consistently, a targeted analysis of mTRBV15 CDR3-LD showed that CNS-infiltrating mTRBV15 CD8⁺ T cells are also selectively detected in the LNs (SI Appendix, Fig. S13).

Discussion

CD8⁺ T cell-mediated cytotoxic immune response plays a determinant role in the elimination of virally infected or tumor cells. Here, we provide evidence that *SOD1^{G93A}* CD8⁺ effector T cells recognize the self-peptide-MHC-I complex on motoneurons, independent of the expression of human *SOD1^{G93A}* by motoneurons that could have generated antigenic peptides. This might imply that motoneuron-derived antigens have to be internalized by professional antigen-presenting cells (APC) in the secondary lymphoid organs and presented in the context of MHC-I, a process termed cross presentation. Consistently, we found a mTRBV15 restricted clonal diversity within the LNs and CNS of *SOD1^{G93A}* mice. It is therefore possible that motoneuron-specific antigens released during the degenerative process may be accessible in the periphery to mount a motoneuron-targeted immune response. Peripheral capture of a self-antigen by cross-presenting APC and priming of naive T cells in LNs will then also be determinant in defining the homing phenotype of activated CD8⁺ T cells (26).

Our observations pose the puzzle of the contribution of the MHC-I/ β_2m complex in ALS pathogenesis. Indeed, as previously reported, the surviving motoneurons at the end stage of the disease show reduced levels of MHC-I and viral-mediated overexpression of MHC-I heavy chain variants in the spinal cord extended the lifespan of *SOD1^{G93A}* mice (14). The reduced levels of MHC-I on the surviving motoneurons observed (14) do not necessarily exclude MHC-I-dependent killing of some motoneuron populations by infiltrating CD8⁺ T cells. Either the proportion of motoneurons that are targeted by cytotoxic T cells have already been eliminated, those remaining that might be eliminated by a MHC-I-independent mechanism (14), or the low MHC-I expression levels are yet effective to promote recognition and cytotoxicity by CD8⁺ T cells. Two studies have explored the contribution of β_2m in ALS pathogenesis. The first observed that the genetic deletion of β_2m in *SOD1^{G93A}* mice does not influence the disease onset but significantly reduces the life span of mice

(15), whereas the second found that the deletion of β_2m in *SOD1^{G93A}* mice accelerates the disease onset and prolongs the survival of mice (27). Despite the contradictory character of these two observations, it is important to stress that, with regard to our concerns, cells from $\beta_2m^{-/-}$ are not completely devoid of MHC-I cell surface expression and that cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes can still be generated and are able to trigger the death of $\beta_2m^{-/-}$ target cells in a MHC-I-restricted manner (28, 29). We cannot exclude that subnormal levels of MHC-I are present at the surface of $\beta_2m^{-/-}$ motoneurons in the spinal cord, thus recognized and eliminated by peptide-specific cytotoxic CD8⁺ T cells. Moreover, the functions of β_2m are not exclusively limited to classical MHC-I molecules as illustrated by the phenotypic defects observed in β_2m -deficient mice with immunoglobulin (Ig) and albumin hypercatabolism reduced IFN γ production or iron overload (30).

The role of MHC-I in neuronal differentiation, synapse formation and function, and plasticity has been documented (31). MHC-I is also involved in the stabilization of inhibitory synapses on motoneurons and regeneration following nerve lesion (32). Forced expression of MHC-I negatively regulates glutamatergic and γ -aminobutyric acidergic synaptic transmission. The effect of MHC-I on synaptic density is independent of bound β_2m (33). MHC-I can also bind to the paired Ig-like receptor B and restrict synaptic plasticity as well as functional recovery following ischemic damage (34). In addition, β_2m can associate with CD1 family members, Qa, the MHC-related-1 protein MR1, the neonatal Fc receptor FcRn, and human hemochromatosis protein (30), whose functions in the CNS remain elusive. The study of these additional immune-independent mechanisms might be considered to gain further insight into ALS pathogenic mechanisms.

Our paper raises questions concerning the functional characteristics of motoneurons whose death is induced by CD8⁺ T cells in vivo. Indeed, we observed a significant increase in the number of spinal motoneurons following the depletion of CD8⁺ T cells in ALS mice without any change in motor decline or life expectancy. These findings suggest that nonfunctional motoneurons might be eliminated by an orchestrated cell death program triggered by CD8⁺ T lymphocytes for proper removal. Alternatively, aberrant motoneuron electrical activity or those committed to die by the dying-back process induce changes in gene expression that might generate new autoantigens and killing by cytotoxic CD8⁺ T cells. The latter have yet to be identified. We observed that IFN γ can elicit MHC-I expression on mouse primary motoneurons as previously observed with rat primary motoneurons (35). IFN γ can be produced by activated CD8⁺ T cells as well as ALS astrocytes (19) to elicit and/or maintain sufficient MHC-I expression levels on motoneurons allowing them to be recognized by self-reactive cytotoxic CD8⁺ T cells. It is noteworthy that somatic expression of MHC-I occurred in the presence of IFN γ only in electrically silent neurons (36). Interestingly, the cytotoxicity of mutant CD8⁺ lymphocytes is observed on electrically immature motoneurons but not on those that after 7 d in vitro become electrically mature as we showed previously (37, 38). Cytotoxic CD8⁺ T cells could thus contribute to the elimination of nonfunctional motoneurons during the disease.

Together, these results suggest that an autoimmune T cell response contributes to ALS pathogenesis. The presence of autoantibodies in the cerebrospinal fluid (CSF) or serum of patients, the cytotoxicity of the CSF from ALS patients toward neurons in vitro signs of systemic immune activation in the serum, and the CSF of ALS patients and the infiltration of T cells have suggested that autoimmunity might contribute to ALS etiology and pathogenesis (3, 39). Early clinical interventions targeting autoimmunity through the administration of cyclophosphamide (40, 41); plasmapheresis combined with immunosuppression (42); or treatment with azathioprine and prednisone (43) led to disappointing results in patients. Despite all that, the state of our current knowledge about the complexity of the immune response with respect to the

functional identity of lymphocyte subpopulations and the dynamics of this response during the course of the disease as well as our present findings prompt us to critically reconsider these early clinical data. The use of drugs with an unfocused spectrum of action (cyclophosphamide and azathioprine inhibit DNA replication and cell proliferation, and prednisone is an antiinflammatory and immunosuppressant synthetic glucocorticoid) does not afford relevant insight into the selective contribution of autoimmunity in ALS. Overall, this paper provides evidence of autoreactive CD8⁺ T cells that directly interact with and trigger the death of motoneurons. The inherent challenge is now to identify autoantigens that are recognized by those cytotoxic T cells and to define pertinent combinatorial therapeutic approaches embracing the complexity of the immune response in ALS.

Materials and Methods

Detailed information for animal experimentation, CD8⁺ T cell isolation, fluorescence-activated cell sorting, in situ hybridization, primary neuron

- Leblond CS, Kaneb HM, Dion PA, Rouleau GA (2014) Dissection of genetic factors associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 262:91–101.
- Valori CF, Brambilla L, Martorana F, Rossi D (2014) The multifaceted role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Life Sci* 71:287–297.
- Bowerman M, et al. (2013) Neuroimmunity dynamics and the development of therapeutic strategies for amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* 7:214.
- Engelhardt JI, Tajti J, Appel SH (1993) Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 50:30–36.
- Fiala M, et al. (2010) IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients. *J Neuroinflammation* 7:76.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL (1992) Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140:691–707.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Appel SH (2008) CD4⁺ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15558–15563.
- Chiu IM, et al. (2008) T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17913–17918.
- Beers DR, et al. (2017) ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI Insight* 2:e89530.
- Henkel JS, et al. (2013) Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med* 5:64–79.
- Banerjee R, et al. (2008) Adaptive immune neuroprotection in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. *PLoS One* 3:e2740.
- Beers DR, et al. (2011) Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134:1293–1314.
- Rosjohn J, et al. (2015) T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annu Rev Immunol* 33:169–200.
- Song S, et al. (2016) Major histocompatibility complex class I molecules protect motor neurons from astrocyte-induced toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 22:397–403.
- Staats KA, et al. (2013) Beta-2 microglobulin is important for disease progression in a murine model for amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* 7:249.
- Fung-Leung WP, et al. (1991) CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* 65:443–449.
- Cobbold SP, Martin G, Waldmann H (1990) The induction of skin graft tolerance in major histocompatibility complex-mismatched or primed recipients: Primed T cells can be tolerized in the periphery with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. *Eur J Immunol* 20:2747–2755.
- Bourgeois C, Stockinger B (2006) CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells and memory T cells prevent lymphopenia-induced proliferation of naive T cells in transient states of lymphopenia. *J Immunol* 177:4558–4566.
- Aebischer J, et al. (2011) IFN γ triggers a LIGHT-dependent selective death of motoneurons contributing to the non-cell-autonomous effects of mutant SOD1. *Cell Death Differ* 18:754–768.
- Golstein P, Griffiths GM (2018) An early history of T cell-mediated cytotoxicity. *Nat Rev Immunol* 18:527–535.
- Froelich CJ, Metkar SS, Raja SM (2004) Granzyme B-mediated apoptosis—The elephant and the blind men? *Cell Death Differ* 11:369–371.
- Raoul C, et al. (2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas: potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35:1067–1083.
- Cohen ES, Bodmer HC (2003) Cytotoxic T lymphocytes recognize and lyse chondrocytes under inflammatory, but not non-inflammatory conditions. *Immunology* 109:8–14.
- Ritzel RM, et al. (2016) Age-associated resident memory CD8 T cells in the central nervous system are primed to potentiate inflammation after ischemic brain injury. *J Immunol* 196:3318–3330.
- Salou M, et al. (2015) Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* 2:609–622.
- Calzascia T, et al. (2005) Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity* 22:175–184.
- Nardo G, et al. (2018) Counteracting roles of MHC1 and CD8⁺ T cells in the peripheral and central nervous system of ALS SOD1^{G93A} mice. *Mol Neurodegener* 13:42.
- Glas R, et al. (1992) Major histocompatibility complex class I-specific and -restricted killing of beta 2-microglobulin-deficient cells by CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11381–11385.
- Lamousé-Smith E, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S (1993) Beta 2M^{-/-} knockout mice contain low levels of CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte that mediate specific tumor rejection. *J Immunol* 151:6283–6290.
- Argyropoulos CP, et al. (2017) Rediscovering beta-2 microglobulin as a biomarker across the spectrum of kidney diseases. *Front Med (Lausanne)* 4:73.
- Elmer BM, McAllister AK (2012) Major histocompatibility complex class I proteins in brain development and plasticity. *Trends Neurosci* 35:660–670.
- Oliveira AL, et al. (2004) A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17843–17848.
- Glynn MW, et al. (2011) MHCI negatively regulates synapse density during the establishment of cortical connections. *Nat Neurosci* 14:442–451.
- Adelson JD, et al. (2012) Neuroprotection from stroke in the absence of MHCI or PiB. *Neuron* 73:1100–1107.
- Lindä H, et al. (1998) Expression of MHC class I and beta2-microglobulin in rat spinal motoneurons: Regulatory influences by IFN-gamma and axotomy. *Exp Neurol* 150:282–295.
- Neumann H, Cavalié A, Jenne DE, Wekerle H (1995) Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 269:549–552.
- Camu W, et al. (2014) Vitamin D confers protection to motoneurons and is a prognostic factor of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 35:1198–1205.
- Bowerman M, et al. (2017) KCC3 loss-of-function contributes to Andermann syndrome by inducing activity-dependent neuromuscular junction defects. *Neurobiol Dis* 106:35–48.
- Couratier P, Hugon J, Sindou P, Vallat JM, Dumas M (1993) Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet* 341:265–268.
- Smith SA, Miller RG, Murphy JR, Ringel SP (1994) Treatment of ALS with high dose pulse cyclophosphamide. *J Neurol Sci* 124:84–87.
- Brown RH, Jr, Hauser SL, Harrington H, Weiner HL (1986) Failure of immunosuppression with a ten- to 14-day course of high-dose intravenous cyclophosphamide to alter the progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 43:383–384.
- Kelemen J, Hedlund W, Orlin JB, Berkman EM, Munsat TL (1983) Plasmapheresis with immunosuppression in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 40:752–753.
- Werdelin L, Boysen G, Jensen TS, Mogensen P (1990) Immunosuppressive treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 82:132–134.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abati, E., Bresolin, N., Comi, G. & Corti, S. Silence superoxide dismutase 1 (SOD1): a promising therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 24, 295–310 (2020).
2. Abe, K. et al. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* 16, 505–512 (2017).
3. Abe, K. et al. Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* 15, 610–617 (2014).
4. Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S. & Malarkannan, S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* 9, (2018).
5. Abudara, V. et al. Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *Glia* 63, 795–811 (2015).
6. Aderem, A. & Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593–623 (1999).
7. Adler, D. D., Contal, O. & Janssens, P. J.-P. Le pneumologue dans la prise en charge de la sclérose latérale amyotrophique : vers moins de pessimisme. *Revue Médicale Suisse* 6 (2009).
8. Aebischer, J. et al. IFN γ triggers a LIGHT-dependent selective death of motoneurons contributing to the non-cell-autonomous effects of mutant SOD1. *Cell Death Differ* 18, 754–768 (2011).
9. Aebischer, J. et al. Elevated levels of IFN γ and LIGHT in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neurology* 19, 752–759 (2012).
10. Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W. & Rossi, F. M. V. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10, 1538–1543 (2007).
11. Ajami, B. et al. Single-cell mass cytometry reveals distinct populations of brain myeloid cells in mouse neuroinflammation and neurodegeneration models. *Nat Neurosci* 21, 541–551 (2018).
12. Al-Mozaini, M. A. et al. Human Properdin Modulates Macrophage: Mycobacterium bovis BCG Interaction via Thrombospondin Repeats 4 and 5. *Front. Immunol.* 9, (2018).
13. Al-Rayahi, I. A. M., Browning, M. J. & Stover, C. Tumour cell conditioned medium reveals greater M2 skewing of macrophages in the absence of properdin. *Immunity, Inflammation and Disease* 5, 68–77 (2017).
14. Alexianu, M. E., Kozovska, M. & Appel, S. H. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57, 1282–1289 (2001).
15. Almad, A. A. et al. Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis: Connexin 43 Plays a Role in Loss of Motor Neurons in ALS. *Glia* 64, 1154–1169 (2016).
16. Alter, G., Malenfant, J. M. & Altfeld, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods* 294, 15–22 (2004).
17. Apostolski, S. et al. Serum and CSF immunological findings in ALS. *Acta Neurologica Scandinavica* 83, 96–98 (1991).
18. Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. & Haydon, P. G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences* 22, 208–215 (1999).
19. Arber, S. et al. Requirement for the Homeobox Gene Hb9 in the Consolidation of

- Motor Neuron Identity. *Neuron* 23, 659–674 (1999).
25. Armada-Moreira, A. et al. Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 14, (2020).
26. Asch, A. S., Silbiger, S., Heimer, E. & Nachman, R. L. Sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochemical and biophysical research communications* 182, 10 (1992).
28. Ash, S., Johnson, C., Shohat, M., Shohat, T. & Schlesinger, M. Further mapping of the properdin deficiency gene in a Tunisian Jewish family--evidence for genetic homogeneity. *Isr J Med Sci* 30, 626–628 (1994).
29. Ashkenazi, A. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* 281, 1305–1308 (1998).
31. Avery, V. M., Adrian, D. L. & Gordon, D. L. Detection of mosaic protein mRNA in human astrocytes. *Immunology and Cell Biology* 71, 215–219 (1993).
32. Aw Yeang, H. X. et al. Cutting Edge : Human CD49e– NK Cells Are Tissue Resident in the Liver. *J.I.* 198, 1417–1422 (2017).
33. Bahia El Idrissi, N. et al. Complement activation at the motor end-plates in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 13, 72 (2016).
34. Bang, J., Spina, S. & Miller, B. L. Frontotemporal dementia. *The Lancet* 386, 1672–1682 (2015).
35. Barber, S. C., Mead, R. J. & Shaw, P. J. Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1762, 1051–1067 (2006).
37. Barrow, A. D., Martin, C. J. & Colonna, M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front. Immunol.* 10, (2019).
38. Battaglia, G. et al. Activation of mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances GDNF and GLT-1 formation in the spinal cord and rescues motor neurons in the SOD-1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* 74, 126–136 (2015).
40. Beers, D. R. et al. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 16021–16026 (2006).
41. Beers, D. R., Henkel, J. S., Zhao, W., Wang, J. & Appel, S. H. CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *PNAS* 105, 15558–15563 (2008).
42. Beers, D. R. et al. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134, 1293–1314 (2011).
43. Bendotti, C. et al. Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *Journal of Neurochemistry* 79, 737–746 (2001).
44. Bensimon, G., Lacomblez, L. & Meininger, V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 330, 585–591 (1994).
45. Bernard, E. et al. Clinical and Molecular Landscape of ALS Patients with SOD1 Mutations: Novel Pathogenic Variants and Novel Phenotypes. A Single ALS Center Study. *IJMS* 21, 6807 (2020).
46. Bezzi, P. et al. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391, 281–285 (1998).
47. Bialas, A. R. & Stevens, B. TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nat Neurosci* 16, 1773–1782 (2013).
48. Bianchin, M. M., Martin, K. C., de Souza, A. C., de Oliveira, M. A. & de Mello Rieder, C. R. Nasu–Hakola disease and primary microglial dysfunction. *Nat Rev Neurol* 6, 523–523 (2010).

49. Blander, J. M. & Medzhitov, R. Regulation of Phagosome Maturation by Signals from Toll-Like Receptors. *Science* 304, 1014–1018 (2004).
50. Blasco, H. et al. Vitamin D is Not a Protective Factor in ALS. *CNS Neurosci Ther* 21, 651–656 (2015).
51. Boillée, S. et al. Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. *Science* 312, 1389–1392 (2006).
52. Boillée, S. & Cleveland, D. W. Revisiting oxidative damage in ALS: microglia, Nox, and mutant SOD1. *J. Clin. Invest.* JCI34613 (2008) doi:10.1172/JCI34613.
53. Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, S33–S40 (2010).
55. Bouche, P. Électromyographie clinique. *EMC - Neurologie* 5, 1–32 (2008).
56. Brack, C., Hiramata, M., Lenhard-Schuller, R. & Tonegawa, S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15, 1–14 (1978).
58. Brand-Schieber, E. et al. Connexin43, the major gap junction protein of astrocytes, is down-regulated in inflamed white matter in an animal model of multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 80, 798–808 (2005).
59. Brandsma, A. M., Jacobino, S. R., Meyer, S., Broeke, T. ten & Leusen, J. H. W. Fc receptor inside-out signaling and possible impact on antibody therapy. *Immunological Reviews* 268, 74–87 (2015).
60. Brinkmann, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303, 1532–1535 (2004).
61. Brooks, B. R. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial ‘Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis’ workshop contributors. *J Neurol Sci* 124 Suppl, 96–107 (1994).
62. Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M. & Munsat, T. L. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders* 1, 293–299 (2000).
63. Brown, R. H. & Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 377, 162–172 (2017).
64. Brown, S. et al. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 418, 200–203 (2002).
65. Bruijn, L. I. et al. ALS-Linked SOD1 Mutant G85R Mediates Damage to Astrocytes and Promotes Rapidly Progressive Disease with SOD1-Containing Inclusions. *Neuron* 18, 327–338 (1997).
67. Burke, R. E., Levine, D. N., Tsairis, P. & Zajac, F. E. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234, 723–748 (1973).
68. Butovsky, O. et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 17, 131–143 (2014).
69. Butovsky, O. et al. Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *J Clin Invest* 122, 3063–3087 (2012).
70. Camous, L. et al. Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation. 117, 10 (2011).
71. Campbell, K. S., Hager, E. J., Friedrich, R. J. & Cambier, J. C. IgM antigen receptor complex contains phosphoprotein products of B29 and mb-1 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 5 (1991).
72. Cappella, M., Ciotti, C., Cohen-Tannoudji, M. & Biferi, M. G. Gene Therapy for ALS—A Perspective. *IJMS* 20, 4388 (2019).

73. Cedarbaum, J. M. et al. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. *Journal of the Neurological Sciences* 169, 13–21 (1999).
75. Chen, H.-J. et al. The heat shock response plays an important role in TDP-43 clearance: evidence for dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 139, 1417–1432 (2016).
76. Chen, J. Y., Cortes, C. & Ferreira, V. P. Properdin: A multifaceted molecule involved in inflammation and diseases. *Mol Immunol* 102, 58–72 (2018).
77. Chiò, A. et al. Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature. *Neuroepidemiology* 41, 118–130 (2013).
78. Chiot, A. et al. Modifying macrophages at the periphery has the capacity to change microglial reactivity and to extend ALS survival. *Nat Neurosci* 23, 1339–1351 (2020).
79. Chiu, A. Y. et al. Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 6, 349–362 (1995).
80. Chiu, A. S. et al. Excitotoxic potential of the cyanotoxin β -methyl-amino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. *Toxicol* 60, 1159–1165 (2012).
82. Chiu, A. S. et al. Gliotoxicity of the cyanotoxin, β -methyl-amino-L-alanine (BMAA). *Sci Rep* 3, 1482 (2013).
83. Chiu, I. M. et al. Activation of innate and humoral immunity in the peripheral nervous system of ALS transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 20960–20965 (2009).
84. Chiu, I. M. et al. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *PNAS* 105, 17913–17918 (2008).
85. Chiu, I. M. et al. A Neurodegeneration-Specific Gene-Expression Signature of Acutely Isolated Microglia from an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *Cell Reports* 4, 385–401 (2013).
86. Christopherson, K. S. et al. Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433 (2005).
88. Clark, C. M. & Forman, M. S. Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease: a clinical and pathological spectrum. *Arch Neurol* 63, 489–490 (2006).
89. Clausen, J. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology* 207, 85–93 (2003).
91. Cleveland, D. W., Laing, N., Hulse, P. V. & Brown, R. H. Toxic mutants in Charcot's sclerosis. *Nature* 378, 342–343 (1995).
92. Conner, S. D. & Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37–44 (2003).
93. Coque, E. et al. Cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes expressing ALS-causing SOD1 mutant selectively trigger death of spinal motoneurons. 6.
94. Coraci, I. S. et al. CD36, a Class B Scavenger Receptor, Is Expressed on Microglia in Alzheimer's Disease Brains and Can Mediate Production of Reactive Oxygen Species in Response to β -Amyloid Fibrils. 160, 12 (2002).
95. Cornell-Bell, A., Finkbeiner, S., Cooper, M. & Smith, S. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247, 470–473 (1990).
96. Cortes, C., Ohtola, J. A., Saggi, G. & Ferreira, V. P. Local release of properdin in the cellular microenvironment: role in pattern recognition and amplification of the alternative pathway of complement. *Front. Immun.* 3, (2013).
97. Corti, S. et al. Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* 127, 2518–2532 (2004).
98. Cox, P. A. et al. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: A possible link to

- sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 10, 109–117 (2009).
- 99.Crabé, R., Aimond, F., Gosset, P., Scamps, F. & Raoul, C. How Degeneration of Cells Surrounding Motoneurons Contributes to Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells* 9, (2020).
- 100.Crowley, M. T. et al. A Critical Role for Syk in Signal Transduction and Phagocytosis Mediated by Fc γ Receptors on Macrophages. *J. Biol. Chem.* 272, 13113–13117 (1997).
- 101.Cudkowicz, M. E. et al. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 41, 210–221 (1997).
- 102.Cunnion, K. M., Hair, P. S. & Buescher, E. S. Cleavage of Complement C3b to iC3b on the Surface of *Staphylococcus aureus* Is Mediated by Serum Complement Factor I. *INFECT. IMMUN.* 72, 6 (2004).
- 103.D’Orsi, B. et al. Calpains Are Downstream Effectors of bax-Dependent Excitotoxic Apoptosis. *Journal of Neuroscience* 32, 1847–1858 (2012).
- 104.Davalos, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8, 752–758 (2005).
- 105.DeJesus-Hernandez, M. et al. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256 (2011).
- 106.Derry, J. M. J. & Barnard, P. J. Physical linkage of the A-raf-1, properdin, synapsin I, and TIMP genes on the human and mouse X chromosomes. *Genomics* 12, 632–638 (1992).
- 107.Devenney, E. M., Ahmed, R. M. & Hodges, J. R. Chapter 15 - Frontotemporal dementia. in *Handbook of Clinical Neurology* (eds. Dekosky, S. T. & Asthana, S.) vol. 167 279–299 (Elsevier, 2019).
- 110.Di Giorgio, F. P., Carrasco, M. A., Siao, M. C., Maniatis, T. & Eggan, K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10, 608–614 (2007).
- 111.Diaz-Amarilla, P. et al. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 18126–18131 (2011).
- 112.Dibaj, P. et al. In Vivo Imaging Reveals Distinct Inflammatory Activity of CNS Microglia versus PNS Macrophages in a Mouse Model for ALS. *PLoS ONE* 6, e17910 (2011).
- 113.Dibaj, P. et al. In vivo imaging reveals rapid morphological reactions of astrocytes towards focal lesions in an ALS mouse model. *Neuroscience Letters* 497, 148–151 (2011).
- 115.Diebold, C. A. et al. Complement Is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface. *Science* 343, 1260–1263 (2014).
- 116.Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N. & Raulet, D. H. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 1, 119–126 (2000).
- 117.Donnely, R. P. et al. mTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Is a Prerequisite for NK Cell Effector Function. *J. Immunol.* 193, 4477–4484 (2014).
- 118.Donnenfeld, H., Kascsak, R. J. & Bartfeld, H. Deposits of IgG and C3 in the spinal cord and motor cortex of ALS patients. *Journal of Neuroimmunology* 6, 51–57 (1984).
- 119.Donnenfeld et al. - 1984 - Deposits of IgG and C3 in the spinal cord and moto.pdf.
- 120.Doyle, A. G. et al. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: Comparison with interleukin-4 and interferon- γ . *European Journal of Immunology* 24, 1441–1445 (1994).
- 121.Duffy, H. S., John, G. R., Lee, S. C., Brosnan, C. F. & Spray, D. C. Reciprocal Regulation of the Junctional Proteins Claudin-1 and Connexin43 by Interleukin-1 β in Primary Human Fetal Astrocytes. *J. Neurosci.* 20, RC114–RC114 (2000).

122. Dupont, A. et al. Septicaemia models using *Streptococcus pneumoniae* and *Listeria monocytogenes*: understanding the role of complement properdin. *Med Microbiol Immunol* 203, 257–271 (2014).
123. Dupont, L. The characterisation of the murine gene for properdin. (University of Leicester, 2000).
124. Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., de Aguilar, J.-L. G. & Loeffler, J.-P. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: Benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 11159–11164 (2004).
125. Hirbec, H., Noristani, H. N. & Perrin, F. E. Microglia Responses in Acute and Chronic Neurological Diseases: What Microglia-Specific Transcriptomic Studies Taught (and did Not Teach) Us. *Front. Aging Neurosci.* 9, 227 (2017).
126. El Oussini, H. et al. Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 82, 444–456 (2017).
127. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35, 495–516 (2007).
128. Engelhardt, J. I., Tajti, J. & Appel, S. H. Lymphocytic Infiltrates in the Spinal Cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Archives of Neurology* 50, 30–36 (1993).
129. Ezzi, S. A., Urushitani, M. & Julien, J.-P. Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *Journal of Neurochemistry* 102, 170–178 (2007).
130. Farries, T. C., Finch, J. T., Lachmann, P. J. & Harrison, R. A. Resolution and analysis of ‘native’ and ‘activated’ properdin. *Biochem J* 243, 507–517 (1987).
131. Farries, T. C., Lachmann, P. J. & Harrison, R. A. Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products. *Biochemical Journal* 252, 47–54 (1988).
132. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H.-G. & Bryceson, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167–2176 (2010).
133. Fearon, D. T. & Austen, K. F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *Journal of Experimental Medicine* 142, 856–863 (1975).
134. Fijen, C. A. P. et al. Properdin deficiency: molecular basis and disease association. *Molecular Immunology* 36, 863–867 (1999).
135. Fonseca, M. I. et al. Contribution of complement activation pathways to neuropathology differs among mouse models of Alzheimer’s disease. *J Neuroinflammation* 8, 4 (2011).
136. Fontainhas, A. M. et al. Microglial Morphology and Dynamic Behavior Is Regulated by Ionotropic Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission. *PLoS ONE* 6, 14 (2011).
137. Fourgeaud, L. et al. TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. *Nature* 532, 240–244 (2016).
138. Fredrikson, G. N. et al. Expression of properdin in complete and incomplete deficiency: normal in vitro synthesis by monocytes in two cases with properdin deficiency type II due to distinct mutations. *J Clin Immunol* 18, 272–282 (1998).
139. Fredrikson, G. N. et al. Molecular characterization of properdin deficiency type III: dysfunction produced by a single point mutation in exon 9 of the structural gene causing a tyrosine to aspartic acid interchange. *J Immunol* 157, 3666–3671 (1996).
140. Freeman, S. A. & Grinstein, S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological Reviews* 262, 193–215 (2014).
141. Fu, R., Shen, Q., Xu, P., Luo, J. J. & Tang, Y. Phagocytosis of Microglia in the Central Nervous System Diseases. *Mol Neurobiol* 49, 1422–1434 (2014).

142. Funalot, B., Desport, J.-C., Sturtz, F., Camu, W. & Couratier, P. High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 10, 113–117 (2009).
143. Garbuzova-Davis, S. et al. Ultrastructure of blood–brain barrier and blood–spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain Research* 1157, 126–137 (2007).
144. Garbuzova-Davis et al. - 2007 - Ultrastructure of blood–brain barrier and blood–sp.pdf.
145. Garbuzova-Davis, S. et al. Evidence of Compromised Blood-Spinal Cord Barrier in Early and Late Symptomatic SOD1 Mice Modeling ALS. *PLoS ONE* 2, e1205 (2007).
146. Garg, A. et al. Vimentin Expressed on Mycobacterium tuberculosis-Infected Human Monocytes Is Involved in Binding to the NKp46 Receptor. *J Immunol* 177, 6192–6198 (2006).
147. Garofalo, S. et al. Natural killer cells modulate motor neuron-immune cell cross talk in models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nat Commun* 11, 1773 (2020).
148. Garrido, C. et al. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13, 1423–1433 (2006).
149. Gauvreau, D. et al. A new effector of lipid metabolism: Complement factor properdin. *Molecular Immunology* 51, 73–81 (2012).
150. Gauvreau et al. - 2012 - A new effector of lipid metabolism Complement fac.pdf.
151. Geloso, M. C. et al. The Dual Role of Microglia in ALS: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front. Aging Neurosci.* 9, (2017).
152. Gerber, Y. N., Sabourin, J.-C., Rabano, M., Vivanco, M. d M. & Perrin, F. E. Early Functional Deficit and Microglial Disturbances in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* 7, e36000 (2012).
153. Gerber, Y. N. et al. CSF1R Inhibition Reduces Microglia Proliferation, Promotes Tissue Preservation and Improves Motor Recovery After Spinal Cord Injury. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 368 (2018).
154. Gil, J. et al. Causes of death amongst French patients with amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *European Journal of Neurology* 15, 1245–1251 (2008).
155. Ginhoux, F. et al. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330, 841–845 (2010).
156. Ginhoux, F. & Williams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449 (2016).
157. Glasner, A. et al. Recognition and Prevention of Tumor Metastasis by the NK Receptor NKp46/NCR. 8 (2012).
158. Gonzalez de Peredo, A. et al. C-Mannosylation and O-Fucosylation of Thrombospondin Type 1 Repeats. *Molecular & Cellular Proteomics* 1, 11–18 (2002).
159. Gonzalez de Peredo et al. - 2002 - C-Mannosylation and O-Fucosylation of Thrombospond.pdf.
160. Gordon, S. M. et al. The Transcription Factors T-bet and Eomes Control Key Checkpoints of Natural Killer Cell Maturation. *Immunity* 36, 55–67 (2012).
161. Gordon et al. - 2012 - The Transcription Factors T-bet and Eomes Control .pdf.
162. Goundis, D., Holt, M., Boyd, Y. & Reid, K. B. M. Localization of the Properdin Structural Locus to Xp11.23-Xp21 .I. 5 (1989).
163. Goundis et HoLT - Localization of the Properdin Structural Locus to .pdf.
164. Goundis, D. & Reid, K. B. M. Properdin, the terminal complement components, thrombospondin and the circumsporozoite protein of malaria parasites contain similar sequence motifs. 4 (1988).
165. Gowing, G., Dequen, F., Soucy, G. & Julien, J.-P. Absence of Tumor Necrosis Factor-Does Not Affect Motor Neuron Disease Caused by Superoxide Dismutase 1 Mutations. *Journal of Neuroscience* 26, 11397–11402 (2006).

166. Gowing, G., Lalancette-Hébert, M., Audet, J.-N., Dequen, F. & Julien, J.-P. Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) exacerbates ALS disease in a mouse model through altered responses of microglia expressing mutant superoxide dismutase. *Experimental Neurology* 220, 267–275 (2009).
167. Gowing et al. - 2009 - Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) exace.pdf.
168. Grad, L. I., Pokrishevsky, E., Silverman, J. M. & Cashman, N. R. Exosome-dependent and independent mechanisms are involved in prion-like transmission of propagated Cu/Zn superoxide dismutase misfolding. *Prion* 8, 331–335 (2014).
169. Grajchen, E., Hendriks, J. J. A. & Bogie, J. F. J. The physiology of foamy phagocytes in multiple sclerosis. *acta neuropathol commun* 6, 124 (2018).
170. Gray, D. & Woulfe, J. Structural disorder and the loss of RNA homeostasis in aging and neurodegenerative disease. *Front. Genet.* 4, (2013).
171. Gur, C. et al. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol* 11, 121–128 (2010).
172. Gurney, M. et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–1775 (1994).
173. Gustafson, M. P. et al. Comprehensive immune profiling reveals substantial immune system alterations in a subset of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 12, e0182002 (2017).
174. Guttenplan, K. A. et al. Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model. *Nat Commun* 11, 3753 (2020).
175. Haidet-Phillips, A. M. et al. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *nature biotechnology* 29, 7 (2011).
176. Haines, A. L. & Lepow, I. H. Studies on Human C' 1-Esterase: II. Function of Purified C' 1-Esterase in the Human Complement System. *J. Biol. Chem.* 239, 12 (1964).
177. Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H. & Haydon, P. G. Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte. *Journal of Neuroscience* 27, 6473–6477 (2007).
178. Hall, E. D., Oostveen, J. A. & Gurney, M. E. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23, 249–256 (1998).
179. Harraz, M. M. et al. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. <http://www.jci.org/articles/view/34060/pdf> (2008) doi:10.1172/JCI34060.
180. Hartmann, S. & Hofsteenge, J. Properdin, the Positive Regulator of Complement, Is Highly C-Mannosylated*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 28569–28574 (2000).
181. ScienceDirect Full Text PDF.
182. ScienceDirect Snapshot.
183. Hashimoto, W. et al. Differential Antitumor Effects of Administration of Recombinant IL-18 or Recombinant IL-12 Are Mediated Primarily by Fas-Fas Ligand- and Perforin-Induced Tumor Apoptosis, Respectively. *The Journal of Immunology* 163, 583–589 (1999).
184. Hegedus, J., Putman, C. T., Tyreman, N. & Gordon, T. Preferential motor unit loss in the SOD1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Motor units in mouse ALS. *The Journal of Physiology* 586, 3337–3351 (2008).
185. Helminen, M., Seitsonen, S., Jarva, H., Meri, S. & Järvelä, I. E. A Novel Mutation W388X Underlying Properdin Deficiency in a Finnish Family: A Novel Mutation Underlying Properdin Deficiency. *Scandinavian Journal of Immunology* 75, 445–448 (2012).
186. Hertwig, L. et al. CX3CR1-dependent recruitment of mature NK cells into the central nervous system contributes to control

- autoimmune neuroinflammation. *European Journal of Immunology* 46, 1984–1996 (2016).
- 187.Higgins, J. M., Wiedemann, H., Timpl, R. & Reid, K. B. Characterization of mutant forms of recombinant human properdin lacking single thrombospondin type I repeats. Identification of modules important for function. *J Biol Chem* 270, 10 (1995).
- 188.Hogden, A., Foley, G., Henderson, R. D., James, N. & Aoun, S. M. Amyotrophic lateral sclerosis: improving care with a multidisciplinary approach. *J Multidiscip Healthc* 10, 205–215 (2017).
- 189.Hogg, M. C., Halang, L., Woods, I., Coughlan, K. S. & Prehn, J. H. M. Riluzole does not improve lifespan or motor function in three ALS mouse models. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* 19, 438–445 (2018).
- 190.Holt, G. D., Pangburn, M. K. & Ginsburg, V. Properdin binds to sulfatide [Gal(3-SO₄)beta 1-1 Cer] and has a sequence homology with other proteins that bind sulfated glycoconjugates. *Journal of Biological Chemistry* 265, 2852–2855 (1990).
- 191.Holt et al. - 1990 - Properdin binds to sulfatide [Gal(3-SO₄)beta 1-1 C.pdf.
- 192.Holtman, I. R. et al. Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *acta neuropathol commun* 3, 31 (2015).
- 193.Hörnberg, A., Logan, D. T., Marklund, S. L. & Oliveberg, M. The Coupling between Disulphide Status, Metallation and Dimer Interface Strength in Cu/Zn Superoxide Dismutase. *Journal of Molecular Biology* 365, 333–342 (2007).
- 194.Hörnberg et al. - 2007 - The Coupling between Disulphide Status, Metallatio.pdf.
- 195.Hourcade, D. E. The Role of Properdin in the Assembly of the Alternative Pathway C3 Convertases of Complement. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2128–2132 (2006).
- 196.Hourcade - 2006 - The Role of Properdin in the Assembly of the Alter.pdf.
- 197.Huang, Z.-Y. et al. Interaction of Two Phagocytic Host Defense Systems. *Journal of Biological Chemistry* 286, 160–168 (2011).
- 198.Iadecola, C. & Nedergaard, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10, 1369–1376 (2007).
- 199.Indik, Z., Park, J., Hunter, S. & Schreiber, A. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86, 4389–4399 (1995).
- 200.Indik et al. - 1995 - The molecular dissection of Fc gamma receptor medi.pdf.
- 201.Ito, H. et al. Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. *Experimental Neurology* 213, 448–455 (2008).
- 202.Ito et al. - 2008 - Treatment with edaravone, initiated at symptom ons.pdf.
- 203.Ivanova, M. I. et al. Aggregation-triggering segments of SOD1 fibril formation support a common pathway for familial and sporadic ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 197–201 (2014).
- 204.Jacobs, R. et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *European Journal of Immunology* 31, 3121–3126 (2001).
- 205.Jaiswal, M. K. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Medicinal Research Reviews* 39, 733–748 (2019).
- 206.Jay, V. The Legacy of Jean-Martin Charcot. *Neuron* 2 (2000).
- 207.Jiang, J. et al. Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron* 90, 535–550 (2016).
- 208.Jiang, L.-L. et al. Membralin deficiency dysregulates astrocytic glutamate homeostasis, leading to ALS-like impairment. *Journal of Clinical Investigation* 129, 3103–3120 (2019).
- 209.Jin, M., Günther, R., Akgün, K., Hermann, A. & Ziemssen, T. Peripheral proinflammatory

- Th1/Th17 immune cell shift is linked to disease severity in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* 10, 5941 (2020).
210. Jongstra-Bilen, J., Harrison, R. & Grinstein, S. Fcγ-receptors Induce Mac-1 (CD11b/CD18) Mobilization and Accumulation in the Phagocytic Cup for Optimal Phagocytosis*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 45720–45729 (2003).
211. ScienceDirect Full Text PDF.
212. ScienceDirect Snapshot.
213. Joshi, A. U. et al. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nat Neurosci* 22, 1635–1648 (2019).
214. Kab, S., Moisan, F., Preux, P.-M., Marin, B. & Elbaz, A. Nationwide incidence of motor neuron disease using the French health insurance information system database. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* 18, 426–433 (2017).
215. Kabashi, E. et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40, 572–574 (2008).
216. Kabashi et al. - 2008 - TARDBP mutations in individuals with sporadic and .pdf.
217. Kanning, K. C., Kaplan, A. & Henderson, C. E. Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 409–440 (2010).
218. Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T. & McGeer, P. L. Immunologic Reactions in Amyotrophic Lateral Sclerosis Brain and Spinal Cord Tissue. 140, 17 (1992).
219. Kemper, C., Mitchell, L. M., Zhang, L. & Hourcade, D. E. The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis. *PNAS* 105, 9023–9028 (2008).
220. Keren-Shaul, H. et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 169, 1276–1290.e17 (2017).
221. ScienceDirect Full Text PDF.
222. ScienceDirect Snapshot.
223. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* 26, 239–257 (1972).
224. Khakh, B. S. & Deneen, B. The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* 42, 187–207 (2019).
225. Kirkham, C. L. & Carlyle, J. R. Complexity and Diversity of the NKR-P1:Clr (Klrb1:Clec2) Recognition Systems. *Front. Immunol.* 5, (2014).
226. Kirwan, S. E. & Burshtyn, D. N. Regulation of natural killer cell activity. *Current Opinion in Immunology* 19, 46–54 (2007).
227. Kirwan et Burshtyn - 2007 - Regulation of natural killer cell activity.pdf.
228. Klos, A. et al. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Molecular Immunology* 46, 2753–2766 (2009).
229. Koch, J., Steinle, A., Watzl, C. & Mandelboim, O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends in Immunology* 34, 182–191 (2013).
230. Koch et al. - 2013 - Activating natural cytotoxicity receptors of natur.pdf.
231. Koeglperger, T. et al. Impaired glutamate recycling and GluN2B-mediated neuronal calcium overload in mice lacking TGF-β1 in the CNS: Tgf-β1 and hippocampal glutamate homeostasis. *Glia* 61, 985–1002 (2013).
232. Komine, O. et al. Innate immune adaptor TRIF deficiency accelerates disease progression of ALS mice with accumulation of aberrantly activated astrocytes. *Cell Death Differ* 25, 2130–2146 (2018).
233. Kotsias, F., Cebrian, I. & Alloatti, A. Antigen processing and presentation. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 348 69–121 (Elsevier, 2019).

- 234.Kotsias et al. - 2019 - Antigen processing and presentation.pdf.
- 235.Kouser, L. et al. Human Properdin Oponizes Nanoparticles and Triggers a Potent Pro-inflammatory Response by Macrophages without Involving Complement Activation. *Front. Immunol.* 9, (2018).
- 236.Kruidering, M. & Evan, G. I. Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of “The End”? *IUBMB Life* 50, 85–90 (2000).
- 237.Kulkarni, H. S., Liszewski, M. K., Brody, S. L. & Atkinson, J. P. The complement system in the airway epithelium: An overlooked host defense mechanism and therapeutic target? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141, 1582-1586.e1 (2018).
- 238.Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N. & Kobayashi, Y. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *J Immunol* 171, 4672–4679 (2003).
- 239.Kushnareva, Y. E., Wiley, S. E., Ward, M. W., Andreyev, A. Y. & Murphy, A. N. Excitotoxic Injury to Mitochondria Isolated from Cultured Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 280, 28894–28902 (2005).
- 240.Kushnareva et al. - 2005 - Excitotoxic Injury to Mitochondria Isolated from C.pdf.
- 241.Kwiatkowski, T. J. et al. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 323, 1205–1208 (2009).
- 242.Lai, C. B. & Mager, D. L. Role of Runt-related Transcription Factor 3 (RUNX3) in Transcription Regulation of Natural Cytotoxicity Receptor 1 (NCR1/NKp46), an Activating Natural Killer (NK) Cell Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 287, 7324–7334 (2012).
- 243.Lam, K.-P., Kühn, R. & Rajewsky, K. In Vivo Ablation of Surface Immunoglobulin on Mature B Cells by Inducible Gene Targeting Results in Rapid Cell Death. *Cell* 90, 1073–1083 (1997).
- 244.Lam et al. - 1997 - In Vivo Ablation of Surface Immunoglobulin on Matu.pdf.
- 245.Lang, L. et al. SOD1 aggregation in ALS mice shows simplistic test tube behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 9878–9883 (2015).
- 246.Lauria, G. et al. Erythropoietin in amyotrophic lateral sclerosis: a multicentre, randomised, double blind, placebo controlled, phase III study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86, 879–886 (2015).
- 247.Lee, J. D. et al. Dysregulation of the complement cascade in the hSOD1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 10, 119 (2013).
- 248.Lee, J. D. et al. Pharmacological inhibition of complement C5a-C5a1 receptor signalling ameliorates disease pathology in the hSOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: C5a1 receptor antagonism is protective in ALS mice. *British Journal of Pharmacology* 174, 689–699 (2017).
- 249.Lee, J. D. et al. Complement components are upregulated and correlate with disease progression in the TDP-43Q331K mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 15, 171 (2018).
- 250.Lee, J. et al. Astrocytes and Microglia as Non-cell Autonomous Players in the Pathogenesis of ALS. *Exp Neurobiol* 25, 233–240 (2016).
- 251.Lee, M. & McCambridge, A. Clinimetrics: Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale-revised (ALSFRS-R). *Journal of Physiotherapy* 64, 269–270 (2018).
- 252.Lee et McCambridge - 2018 - Clinimetrics Amyotrophic Lateral Sclerosis Functi.pdf.
- 253.Lewis, C.-A. B., Solomon, J. N., Rossi, F. M. & Krieger, C. Bone marrow-derived cells in the central nervous system of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis are associated with blood vessels and express CX3CR1. *Glia* 57, 1410–1419 (2009).
- 254.Li, K. et al. GLT1 overexpression in SOD1G93A mouse cervical spinal cord does not preserve diaphragm function or extend disease. *Neurobiology of Disease* 78, 12–23 (2015).

- 255.Li et al. - 2015 - GLT1 overexpression in SOD1G93A mouse cervical spi.pdf.
- 256.Liao, B., Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S. & Appel, S. H. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental Neurology* 237, 147–152 (2012).
- 257.Liddelow, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487 (2017).
- 258.Ling, S.-C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* 79, 416–438 (2013).
- 259.Ling et al. - 2013 - Converging Mechanisms in ALS and FTD Disrupted RN.pdf.
- 260.Lino, M. M., Schneider, C. & Caroni, P. Accumulation of SOD1 Mutants in Postnatal Motoneurons Does Not Cause Motoneuron Pathology or Motoneuron Disease. *J. Neurosci.* 22, 4825–4832 (2002).
- 261.Lobato-Pascual, A., Saether, P. C., Fossum, S., Dissen, E. & Daws, M. R. Mincle, the receptor for mycobacterial cord factor, forms a functional receptor complex with MCL and FcεRI-γ. *European Journal of Immunology* 43, 3167–3174 (2013).
- 262.Lobsiger, C. S. et al. C1q induction and global complement pathway activation do not contribute to ALS toxicity in mutant SOD1 mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E4385–E4392 (2013).
- 263.Lobsiger, C. S. & Cleveland, D. W. Reply to Woodruff et al.: C1q and C3-dependent complement pathway activation does not contribute to disease in SOD1 mutant ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E5–E5 (2014).
- 264.Locatelli, F. et al. Fas small interfering RNA reduces motoneuron death in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Annals of Neurology* 62, 81–92 (2007).
- 265.Longinetti, E. & Fang, F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Curr Opin Neurol* 32, 771–776 (2019).
- 266.Ludolph, A. C. et al. Effect of High-Caloric Nutrition on Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology* 87, 206–216 (2020).
- 267.Luna, J. et al. Clinical features and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis in Africa: the TROPALS study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 90, 20–29 (2019).
- 268.Lutz, S. E. et al. Deletion of Astrocyte Connexins 43 and 30 Leads to a Dysmyelinating Phenotype and Hippocampal CA1 Vacuolation. *Journal of Neuroscience* 29, 7743–7752 (2009).
- 269.Malnati, M. S. et al. Recognition of virus-infected cells by natural killer cell clones is controlled by polymorphic target cell elements. *J Exp Med* 178, 961–969 (1993).
- 270.Mandel-Brehm, C. et al. Exploratory proteomic analysis implicates the alternative complement cascade in primary CNS vasculitis. *Neurology* 93, e433–e444 (2019).
- 271.Mandelboim, O. et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055–1060 (2001).
- 272.Mantovani, S. et al. Elevation of the terminal complement activation products C5a and C5b-9 in ALS patient blood. *Journal of Neuroimmunology* 276, 213–218 (2014).
- 273.Mantovani et al. - 2014 - Elevation of the terminal complement activation pr.pdf.
- 274.Marangi, G. & Traynor, B. J. Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: new genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges. 32 (2015).
- 275.Marchetto, M. C. N. et al. Non-Cell-Autonomous Effect of Human SOD1G37R Astrocytes on Motor Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 649–657 (2008).
- 276.Marchetto et al. - 2008 - Non-Cell-Autonomous Effect of Human SOD1G37R Astro.pdf.

- 277.Marden, J. J. et al. Redox modifier genes in amyotrophic lateral sclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 2913–2919 (2007).
- 278.Marrón-Liñares, G. M. et al. Polymorphisms in genes related to the complement system and antibody-mediated cardiac allograft rejection. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 37, 477–485 (2018).
- 279.Marrón-Liñares et al. - 2018 - Polymorphisms in genes related to the complement s.pdf.
- 280.Martínez-Muriana, A. et al. CSF1R blockade slows the progression of amyotrophic lateral sclerosis by reducing microgliosis and invasion of macrophages into peripheral nerves. *Sci Rep* 6, 25663 (2016).
- 281.Masilamani, M., Nguyen, C., Kabat, J., Borrego, F. & Coligan, J. E. CD94/NKG2A Inhibits NK Cell Activation by Disrupting the Actin Network at the Immunological Synapse. *J Immunol* 177, 3590–3596 (2006).
- 282.McCampbell, A. et al. Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models. *Journal of Clinical Investigation* 128, 3558–3567 (2018).
- 283.McCord, J. M. & Fridovich, I. Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049–6055 (1969).
- 284.McCord et Fridovich - 1969 - Superoxide Dismutase.pdf.
- 285.McKee, A. C., Stein, T. D., Kiernan, P. T. & Alvarez, V. E. The Neuropathology of Chronic Traumatic Encephalopathy. *Brain Pathology* 25, 350–364 (2015).
- 286.Medicus, R. G., Götze, O. & Müller-Eberhard, H. J. Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *Journal of Experimental Medicine* 144, 1076–1093 (1976).
- 287.Mennerick, S. & Zorumski, C. F. Glial contributions to excitatory neurotransmission in cultured hippocampal cells. *Nature* 368, 59–62 (1994).
- 288.Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* 6, (2015).
- 289.Mezoian, T. et al. Loss of appetite in amyotrophic lateral sclerosis is associated with weight loss and decreased calorie consumption independent of dysphagia. *Muscle & Nerve* 61, 230–234 (2020).
- 290.Mezoian, T. et al. Loss of appetite in amyotrophic lateral sclerosis is associated with weight loss and decreased calorie consumption independent of dysphagia. *Muscle & Nerve* 61, 230–234 (2020).
- 291.Millecamps, S. et al. SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* 7 (2010).
- 292.Miller, R. G., Mitchell, J. D. & Moore, D. H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2012) doi:10.1002/14651858.CD001447.pub3.
- 293.Miller, T. M. et al. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *The Lancet Neurology* 12, 435–442 (2013).
- 294.Miller et al. - 2013 - An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered.pdf.
- 295.Miller, T. M. et al. Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 57, 773–776 (2005).
- 296.Moffett, A. & Colucci, F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.* 124, 1872–1879 (2014).
- 297.Mora, J. S. et al. Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial.

- Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener 21, 5–14 (2020).
- 298.Morandi, B., Bougras, G., Muller, W. A., Ferlazzo, G. & Münz, C. NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN- γ secretion. *European Journal of Immunology* 36, 2394–2400 (2006).
- 299.Morgan, B. P. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochemical Journal* 264, 1–14 (1989).
- 300.Morrison, H. W. & Filosa, J. A. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation* 10, 782 (2013).
- 301.Mrdjen, D. et al. High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease. *Immunity* 48, 380-395.e6 (2018).
- 302.main.pdf.
- 303.Münch, C., O'Brien, J. & Bertolotti, A. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 3548–3553 (2011).
- 304.Murdock, B. J. et al. Correlation of Peripheral Immunity With Rapid Amyotrophic Lateral Sclerosis Progression. *JAMA Neurol* 74, 1446–1454 (2017).
- 305.Nagai, M. et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10, 615–622 (2007).
- 306.Nagy, D., Kato, T. & Kushner, P. D. Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research* 38, 336–347 (1994).
- 307.Nakanishi, M. et al. Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *European Journal of Neuroscience* 25, 649–658 (2007).
- 308.Naor, S. et al. Development of ALS-like disease in SOD-1 mice deficient of B lymphocytes. *J Neurol* 256, 1228–1235 (2009).
- 309.Napoli, I. & Neumann, H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158, 1030–1038 (2009).
- 310.Napoli et Neumann - 2009 - Microglial clearance function in health and diseases.pdf.
- 311.Nardo, G. et al. Transcriptomic indices of fast and slow disease progression in two mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. 28 (2013).
- 312.Narni-Mancinelli, E. et al. Complement factor P is a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp46. *Sci. Immunol.* 2, eaam9628 (2017).
- 313.Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E. & Rubin, B. Y. Identification of interferon- γ , as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. 20 (1983).
- 314.Nauta, A. J. et al. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *European Journal of Immunology* 33, 2853–2863 (2003).
- 315.Nayak, D., Zinselmeyer, B. H., Corps, K. N. & McGavern, D. B. In vivo dynamics of innate immune sentinels in the CNS. *IntraVital* 1, 95–106 (2012).
- 316.Neumann, M. et al. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 314, 130–133 (2006).
- 317.Nicolas, A. et al. Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. 36 (2019).
- 318.Niebroj-Dobosz, I., Jamrozik, Z., Janik, P., Hausmanowa-Petrusewicz, I. & Kwiecinski, H. Anti-neural antibodies in serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. *Acta Neurologica Scandinavica* 100, 238–243 (1999).
- 319.Niedermeyer, S., Murn, M. & Choi, P. J. Respiratory Failure in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Chest* 155, 401–408 (2019).

- 320.Niedermeyer et al. - 2019 - Respiratory Failure in Amyotrophic Lateral Sclerosis.pdf.
- 321.Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *308*, 6 (2005).
- 322.Nolan, K. F., Kaluz, S., Higgins, J. M., Goundis, D. & Reid, K. B. Characterization of the human properdin gene. *Biochem J* *287*, 291–297 (1992).
- 323.Noristani, H. N. et al. Brca1 is expressed in human microglia and is dysregulated in human and animal model of ALS. *Mol Neurodegeneration* *10*, 34 (2015).
- 324.O’Barr, S. A. et al. Neuronal Expression of a Functional Receptor for the C5a Complement Activation Fragment. *J Immunol* *166*, 4154–4162 (2001).
- 325.Oberheim, N. A. et al. Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *Journal of Neuroscience* *29*, 3276–3287 (2009).
- 326.Pace, M. C. et al. Differential induction of mutant SOD1 misfolding and aggregation by tau and α -synuclein pathology. *Mol Neurodegeneration* *13*, 23 (2018).
- 327.Pangburn, M. K. Analysis of the natural polymeric forms of human properdin and their functions in complement activation. *7* (1989).
- 328.Pangburn, M. K. & Müller-Eberhard, H. J. Complement C3 convertase: Cell surface restriction of β 1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. *5*.
- 329.Pangburn, M. K. & Müller-Eberhard, H. J. Initiation of the alternative complement pathway due to spontaneous hydrolysis of the thioester of C3a. *Annals of the New York Academy of Sciences* *421*, 291–298 (1983).
- 330.Pardo, J., Balkow, S., Anel, A. & Simon, M. M. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perfacilitated tumor control. *European Journal of Immunology* *32*, 2881–2886 (2002).
- 331.Parker, S. E. et al. Revisiting the role of the innate immune complement system in ALS. *Neurobiology of Disease* *127*, 223–232 (2019).
- 332.Parker et al. - 2019 - Revisiting the role of the innate immune complement.pdf.
- 333.Parone, P. A. et al. Enhancing Mitochondrial Calcium Buffering Capacity Reduces Aggregation of Misfolded SOD1 and Motor Neuron Cell Death without Extending Survival in Mouse Models of Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroscience* *33*, 4657–4671 (2013).
- 334.Pasinelli, P., Houseweart, M. K., Brown, R. H. & Cleveland, D. W. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 13901–13906 (2000).
- 335.Pedersen, D. V. et al. Properdin oligomers adopt rigid extended conformations supporting function. *eLife* *10*, e63356 (2021).
- 336.Pedersen, D. V. et al. Functional and structural insight into properdin control of complement alternative pathway amplification. *EMBO J* *36*, 1084–1099 (2017).
- 337.Pedersen, D. V. et al. Structural Basis for Properdin Oligomerization and Convertase Stimulation in the Human Complement System. *Front Immunol* *10*, (2019).
- 338.Pedersen, D. V., Revel, M., Gadeberg, T. A. F. & Andersen, G. R. Crystallization and X-ray analysis of monodisperse human properdin. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* *75*, 0 (2019).
- 339.Pehar, M. et al. Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry* *89*, 464–473 (2004).
- 340.Pellerin, L. & Magistretti, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *91*, 10625–10629 (1994).
- 341.Peng, A. Y. T. et al. Loss of TDP-43 in astrocytes leads to motor deficits by triggering A1-like reactive phenotype and triglial

- dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 117, 29101–29112 (2020).
- 342.Perry, V. H., Hume, D. A. & Gordon, S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15, 313–326 (1985).
- 343.Perry et al. - 1985 - Immunohistochemical localization of macrophages an.pdf.
- 344.Pessino, A. et al. Molecular Cloning of NKp46: A Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily Involved in Triggering of Natural Cytotoxicity. *Journal of Experimental Medicine* 188, 953–960 (1998).
- 345.Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A. & Hermine, O. ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? *Front. Aging Neurosci.* 9, (2017).
- 346.Phelps, P. E., Barber, R. P. & Vaughn, J. E. Embryonic development of choline acetyltransferase in thoracic spinal motor neurons: Somatic and autonomic neurons may be derived from a common cellular group. *Journal of Comparative Neurology* 307, 77–86 (1991).
- 347.Picher-Martel, V., Valdmanis, P. N., Gould, P. V., Julien, J.-P. & Dupré, N. From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS. *acta neuropathol commun* 4, 70 (2016).
- 348.Pillemer, L. et al. The Properdin System and Immunity: I. Demonstration and Isolation of a New Serum Protein, Properdin, and Its Role in Immune Phenomena. *Science* 120, 279–285 (1954).
- 349.Piñeiro Fernández, J., Luddy, K. A., Harmon, C. & O’Farrelly, C. Hepatic Tumor Microenvironments and Effects on NK Cell Phenotype and Function. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 4131 (2019).
- 350.Podack, E. R., Kolb, W. P. & Muller-Eberhard, H. J. The C5b-9 complex: subunit composition of the classical and alternative pathway-generated complex. *J Immunol* 116, 1431–1434 (1976).
- 351.Pokrishevsky, E. et al. Aberrant Localization of FUS and TDP43 Is Associated with Misfolding of SOD1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* 7, e35050 (2012).
- 352.Poliani, P. L. et al. TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination. *J. Clin. Invest.* 125, 2161–2170 (2015).
- 353.Poltorak, A. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* 282, 2085–2088 (1998).
- 354.Powell, E. M. & Geller, H. M. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia* 26, 73–83 (1999).
- 355.Poznanski, S. M. & Ashkar, A. A. What Defines NK Cell Functional Fate: Phenotype or Metabolism? *Front. Immunol.* 10, 1414 (2019).
- 356.Poznanski et Ashkar - 2019 - What Defines NK Cell Functional Fate Phenotype or.pdf.
- 357.Prado, L. de G. R. et al. C9ORF72 and the FTD-ALS spectrum: a systematic review of neuroimaging studies. *Dement. neuropsychol.* 9, 413–421 (2015).
- 358.Prager, I. et al. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *Journal of Experimental Medicine* 216, 2113–2127 (2019).
- 359.Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K. & Rouleau, G. A. Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase 1 in Transgenic Mice Does Not Lead to Motor Impairment. *J. Neurosci.* 21, 3369–3374 (2001).
- 360.Pun, S., Santos, A. F., Saxena, S., Xu, L. & Caroni, P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9, 408–419 (2006).
- 361.Radic, M., Marion, T. & Monestier, M. Nucleosomes Are Exposed at the Cell Surface in Apoptosis. *J Immunol* 172, 6692–6700 (2004).

362. Raoul, C. et al. Chronic activation in presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice of a feedback loop involving Fas, Daxx, and FasL. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 6007–6012 (2006).
363. Raoul, C. et al. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35, 1067–1083 (2002).
364. Reaume, Andrew. G. et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13, 43–47 (1996).
365. Reichert, F. & Rotshenker, S. Galectin-3 (MAC-2) Controls Microglia Phenotype Whether Amoeboid and Phagocytic or Branched and Non-phagocytic by Regulating the Cytoskeleton. *Front. Cell. Neurosci.* 13, (2019).
366. Renton, A. E., Chiò, A. & Traynor, B. J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 17, 17–23 (2014).
367. Richter, M. et al. Collagen Distribution and Expression of Collagen-Binding $\alpha 1 \beta 1$ (VLA-1) and $\alpha 2 \beta 1$ (VLA-2) Integrins on CD4 and CD8 T Cells during Influenza Infection. *J Immunol* 178, 4506–4516 (2007).
368. Rieger, M. A. & Schroeder, T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a008250–a008250 (2012).
369. Roberts, K. et al. Extracellular aggregated Cu/Zn superoxide dismutase activates microglia to give a cytotoxic phenotype. *Glia* 61, 409–419 (2013).
370. Rooney, I. A. et al. The Lymphotoxin- β Receptor Is Necessary and Sufficient for LIGHT-mediated Apoptosis of Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry* 275, 14307–14315 (2000).
371. Rosen, D. R. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62 (1993).
372. Rosenblum, L. T. & Trotti, D. EAAT2 and the Molecular Signature of Amyotrophic Lateral Sclerosis. in *Glial Amino Acid Transporters* (eds. Ortega, A. & Schousboe, A.) vol. 16 117–136 (Springer International Publishing, 2017).
373. Rossi, D. et al. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ* 15, 1691–1700 (2008).
374. Rothstein, J. D. Of mice and men: Reconciling preclinical ALS mouse studies and human clinical trials. *Annals of Neurology* 53, 423–426 (2003).
375. Rothstein, J. D., Kammen, M. V., Levey, A. I., Martin, L. J. & Kuncl, R. W. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 38, 73–84 (1995).
376. Roumier, A. Impaired Synaptic Function in the Microglial KARAP/DAP12-Deficient Mouse. *Journal of Neuroscience* 24, 11421–11428 (2004).
377. Sarma, J. V. & Ward, P. A. The complement system. *Cell Tissue Res* 343, 227–235 (2011).
378. Savill, J. & Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784–788 (2000).
379. Schaefer, A. M., Sanes, J. R. & Lichtman, J. W. A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Comparative Neurology* 490, 209–219 (2005).
380. Schafer, D. P. et al. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 74, 691–705 (2012).
381. Schafer et al. - 2012 - Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an A.pdf.
382. Schreiber, R. D., Medicus, R. G. & Gotze, O. Properdin- and nephritic factor-dependent C3 convertases: requirement of native C3 for enzyme formation and the function of bound C3b as properdin receptor. 13 (1975).

383. Screpanti, V., Wallin, R. P. A., Ljunggren, H.-G. & Grandien, A. A Central Role for Death Receptor-Mediated Apoptosis in the Rejection of Tumors by NK Cells. *J Immunol* 167, 2068–2073 (2001).
384. Sedel, F., Béchade, C. & Triller, A. Nerve growth factor (NGF) induces motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro. *European Journal of Neuroscience* 11, 3904–3912 (1999).
385. Segal, B. M. The role of natural killer cells in curbing neuroinflammation. *Journal of Neuroimmunology* 191, 2–7 (2007).
386. Sheppard, S. et al. The Murine Natural Cytotoxic Receptor NKp46/NCR1 Controls TRAIL Protein Expression in NK Cells and ILC1s. *Cell Reports* 22, 3385–3392 (2018).
387. Sheppard et al. - 2018 - The Murine Natural Cytotoxic Receptor NKp46NCR1 C.pdf.
388. Shvil, N. et al. MIF inhibits the formation and toxicity of misfolded SOD1 amyloid aggregates: implications for familial ALS. *Cell Death Dis* 9, 107 (2018).
389. Silverman, J. M. et al. Disease Mechanisms in ALS: Misfolded SOD1 Transferred Through Exosome-Dependent and Exosome-Independent Pathways. *Cell Mol Neurobiol* 36, 377–381 (2016).
390. Sisa, C. et al. Properdin: A Novel Target for Neuroprotection in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Front. Immunol.* 10, (2019).
391. Sivori, S. et al. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *European Journal of Immunology* 29, 1656–1666 (1999).
392. Sivori, S. et al. p46, a Novel Natural Killer Cell-specific Surface Molecule That Mediates Cell Activation. *Journal of Experimental Medicine* 186, 1129–1136 (1997).
393. Sjöholm, A. G., Braconier, J. H. & Söderström, C. Properdin deficiency in a family with fulminant meningococcal infections. *J Clin Invest* 7 (1982).
394. Smith, C. A., Pangburn, M. K., Vogel, C. & Müller-Eberhard, H. J. Molecular architecture of human properdin, a positive regulator of the alternative pathway of complement. *Journal of Biological Chemistry* 259, 4582–4588 (1984).
395. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7–35 (2010).
396. Solomon, J. N. et al. Origin and distribution of bone marrow-derived cells in the central nervous system in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 53, 744–753 (2006).
397. Song, W. M. & Colonna, M. The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nat Immunol* 19, 1048–1058 (2018).
398. Soulard, C. et al. Spinal Motoneuron TMEM16F Acts at C-boutons to Modulate Motor Resistance and Contributes to ALS Pathogenesis. *Cell Rep* 30, 2581–2593.e7 (2020).
399. Souza, P. V. S. de, Pinto, W. B. V. de R., Rezende Filho, F. M. & Oliveira, A. S. B. Far beyond the motor neuron: the role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 74, 849–854 (2016).
400. Spencer, P. S. Guam ALS/parkinsonism-dementia: a long-latency neurotoxic disorder caused by ‘slow toxin(s)’ in food? *Can J Neurol Sci* 14, 347–357 (1987).
401. Spits, H. et al. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 145–149 (2013).
402. Spitzer, D., Mitchell, L. M., Atkinson, J. P. & Hourcade, D. E. Properdin Can Initiate Complement Activation by Binding Specific Target Surfaces and Providing a Platform for De Novo Convertase Assembly. *J Immunol* 179, 2600–2608 (2007).
403. Sta, M. et al. Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis: Evidence of complement activation. *Neurobiology of Disease* 42, 211–220 (2011).

- 404.ScienceDirect Full Text PDF.
- 405.ScienceDirect Snapshot.
- 406.Stebegg, M. et al. Regulation of the Germinal Center Response. *Front. Immunol.* 9, (2018).
- 407.Steiger, S., Kuhn, S., Ronchese, F. & Harper, J. L. Monosodium Urate Crystals Induce Upregulation of NK1.1-Dependent Killing by Macrophages and Support Tumor-Resident NK1.1+ Monocyte/Macrophage Populations in Antitumor Therapy. *The Journal of Immunology* 195, 5495–5502 (2015).
- 408.Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176, 287–292 (1992).
- 409.Stevens, B. et al. The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 131, 1164–1178 (2007).
- 410.Stevens et al. - 2007 - The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination.pdf.
- 411.Stewart, C. A. et al. Germ-line and rearranged Tcrd transcription distinguish bona fide NK cells and NK-like $\gamma\delta$ T cells. *European Journal of Immunology* 37, 1442–1452 (2007).
- 412.Stover, C. M. et al. Properdin Plays a Protective Role in Polymicrobial Septic Peritonitis. *J Immunol* 180, 3313–3318 (2008).
- 413.Sun, X. et al. Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6 (1999).
- 414.Sun, Z., Reid, K. B. M. & Perkins, S. J. The dimeric and trimeric solution structures of the multidomain complement protein properdin by X-ray scattering, analytical ultracentrifugation and constrained modelling. *J Mol Biol* 343, 1327–1343 (2004).
- 415.Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 17, 1–14 (2005).
- 416.Takeda, K. et al. Critical Role for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand in Immune Surveillance Against Tumor Development. *Journal of Experimental Medicine* 195, 161–169 (2002).
- 417.Tan, C.-F. et al. TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol* 113, 535–542 (2007).
- 418.Tang, Y. & Le, W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53, 1181–1194 (2016).
- 419.Theparambil, S. M. et al. Astrocytes regulate brain extracellular pH via a neuronal activity-dependent bicarbonate shuttle. *Nat Commun* 11, 5073 (2020).
- 420.Tohyama, Y. & Yamamura, H. Protein Tyrosine Kinase, Syk: A Key Player in Phagocytic Cells. *Journal of Biochemistry* 145, 267–273 (2009).
- 421.Tomasello, E. & Vivier, E. KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions. *European Journal of Immunology* 35, 1670–1677 (2005).
- 422.Torreilles, F., Salman-Tabcheh, S., Guérin, M.-C. & Torreilles, J. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Research Reviews* 30, 153–163 (1999).
- 423.Torreilles et al. - 1999 - Neurodegenerative disorders the role of peroxynitrite.pdf.
- 424.Traxinger, K., Kelly, C., Johnson, B. A., Lyles, R. H. & Glass, J. D. Prognosis and epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: Analysis of a clinic population, 1997–2011. *Neurology: Clinical Practice* 3, 313–320 (2013).
- 425.Trias, E. et al. Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. *Front. Cell. Neurosci.* 7, (2013).
- 426.Trojsi, F. et al. Vitamin D supplementation has no effects on progression of motor dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Eur J Clin Nutr* 74, 167–175 (2020).

427. Troost, D., van den Oord, J. J., de Jong, J. M. & Swaab, D. F. Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol* 8, 289–294 (1989).
428. Trumbull, K. A. et al. Diapocynin and apocynin administration fails to significantly extend survival in G93A SOD1 ALS mice. *Neurobiology of Disease* 45, 137–144 (2012).
429. Tsai, R. K. & Discher, D. E. Inhibition of “self” engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *Journal of Cell Biology* 180, 989–1003 (2008).
430. Turner, B. J. et al. Antisense peptide nucleic acid-mediated knockdown of the p75 neurotrophin receptor delays motor neuron disease in mutant SOD1 transgenic mice. *Journal of Neurochemistry* 87, 752–763 (2003).
431. Ueno, M. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *nature NEUROSCIENCE* 16, 11 (2013).
432. Uribe-Querol, E. & Rosales, C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.* 11, (2020).
433. Van Den Bogaard, R. et al. Molecular characterisation of 10 Dutch properdin type I deficient families: mutation analysis and X-inactivation studies. *Eur J Hum Genet* 8, 513–518 (2000).
434. Van Den Bos, R. M., Pearce, N. M., Granneman, J., Brondijk, T. H. C. & Gros, P. Insights Into Enhanced Complement Activation by Structures of Properdin and Its Complex With the C-Terminal Domain of C3b. *Front Immunol* 10, (2019).
435. Vankaer, L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Current Opinion in Immunology* 19, 354–364 (2007).
436. Vankaer - 2007 - NKT cells T lymphocytes with innate effector func.pdf.
437. Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T. & Castegna, A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front. Immunol.* 10, (2019).
438. Vorup-Jensen, T., Jensenius, J. C. & Thiel, S. MASP-2, the C3 Convertase Generating Protease of the MBLectin Complement Activating Pathway. *Immunobiology* 199, 348–357 (1998).
439. Vorup-Jensen et al. - 1998 - MASP-2, the C3 Convertase Generating Protease of t.pdf.
440. Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S. & Nabekura, J. Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *Journal of Neuroscience* 29, 3974–3980 (2009).
441. Walton, N. M. et al. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54, 815–825 (2006).
442. Walzer, T. et al. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via Nkp46. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 3384–3389 (2007).
443. Wang, J. et al. Fibrillar Inclusions and Motor Neuron Degeneration in Transgenic Mice Expressing Superoxide Dismutase 1 with a Disrupted Copper-Binding Site. *Neurobiology of Disease* 10, 128–138 (2002).
444. Wang et al. - 2002 - Fibrillar Inclusions and Motor Neuron Degeneration.pdf.
445. Wang, L., Gutmann, D. H. & Roos, R. P. Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Human Molecular Genetics* 20, 286–293 (2011).
446. Weisskopf, M. G. et al. Prospective study of military service and mortality from ALS. *Neurology* 64, 32–37 (2005).
447. Westberg, J., Fredrikson, G. N., Truedsson, L., Sjöholm, A. G. & Uhlén, M. Sequence-based analysis of properdin deficiency: identification of point mutations in two phenotypic forms of an X-linked immunodeficiency. *Genomics* 29, 1–8 (1995).
448. Whaley, K. & Ruddy, S. Modulation of C3b hemolytic activity by a plasma protein

- distinct from C3b inactivator. *Science* 193, 1011–1013 (1976).
449. Wirthmueller, U. et al. Properdin, a positive regulator of complement activation, is released from secondary granules of stimulated peripheral blood neutrophils. *J Immunol* 158, 4444–4451 (1997).
450. Woodruff, T. M., Lee, J. D. & Noakes, P. G. Role for terminal complement activation in amyotrophic lateral sclerosis disease progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E3–E4 (2014).
451. Wu, D.-C., Re, D. B., Nagai, M., Ischiropoulos, H. & Przedborski, S. The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 12132–12137 (2006).
452. Xiao, Q. et al. Mutant SOD1G93A microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *Journal of Neurochemistry* 102, 2008–2019 (2007).
453. Xu, W. et al. Properdin Binds to Late Apoptotic and Necrotic Cells Independently of C3b and Regulates Alternative Pathway Complement Activation. *J Immunol* 180, 7613–7621 (2008).
454. Yamanaka, K. et al. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11, 251–253 (2008).
455. Yan, Q. & Johnson, M. An Immunohistochemical Study of the Nerve Growth Factor Receptor in Developing Rats. *The Journal of Neuroscience* 18.
456. Yang, Y. et al. Hybrid mass spectrometry approaches in glycoprotein analysis and their usage in scoring biosimilarity. *Nat Commun* 7, 13397 (2016).
457. Yin, J. et al. DNA-Triggered Aggregation of Copper, Zinc Superoxide Dismutase in the Presence of Ascorbate. *PLoS ONE* 5, e12328 (2010).
458. Yu, H., Munoz, E., Edens, R. & Linhardt, R. Kinetic studies on the interactions of heparin and complement proteins using surface plasmon resonance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1726, 168–176 (2005).
459. Yu et al. - 2005 - Kinetic studies on the interactions of heparin and.pdf.
460. Zagórska, A., Través, P. G., Lew, E. D., Dransfield, I. & Lemke, G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat Immunol* 15, 920–928 (2014).
461. Zamanian, J. L. et al. Genomic Analysis of Reactive Astroglia. *Journal of Neuroscience* 32, 6391–6410 (2012).
462. Zeiss, C. J. The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Vet Pathol* 15 (2003).
463. Zhang, B., Yamamura, T., Kondo, T., Fujiwara, M. & Tabira, T. Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Natural Killer (NK) Cells. 11 (1997).
464. Zhang, Y. et al. In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology* 121, 258–265 (2007).
465. Zhao, W. et al. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* 58, 231–243 (2010).
466. Zhao, W., Beers, D. R., Liao, B., Henkel, J. S. & Appel, S. H. Regulatory T lymphocytes from ALS mice suppress microglia and effector T lymphocytes through different cytokine-mediated mechanisms. *Neurobiology of Disease* 48, 418–428 (2012).
467. Zhong, Z. et al. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci* 11, 420–422 (2008).
468. Zhu, C., Beck, M. V., Griffith, J. D., Deshmukh, M. & Dokholyan, N. V. Large SOD1 aggregates, unlike trimeric SOD1, do not impact cell viability in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 4661–4665 (2018).

469. Zhu, C., Beck, M. V., Griffith, J. D., Deshmukh, M. & Dokholyan, N. V. Large SOD1 aggregates, unlike trimeric SOD1, do not impact cell viability in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 4661–4665 (2018).

470. Ziccardi, R. J. Activation of the early components of the classical complement pathway under physiologic conditions. 6 (1981).