



# **Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des neutrophiles par le récepteur inhibiteur CLEC12A**

**Thèse**

**Julien Pierre Vitry**

**Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire**  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Julien Pierre Vitry, 2022

**Caractérisation des mécanismes moléculaires  
impliqués dans la régulation des neutrophiles par le  
récepteur inhibiteur CLEC12A**

**Thèse**

**Julien Vitry**

Sous la direction de :

Maria J Fernandes, directrice de recherche  
Paul H Naccache, codirecteur de recherche

## Résumé

L'arthrite est une des principales causes d'invalidité et d'utilisation des soins de santé au Canada. Environ 16 % des Canadiens âgés de 15 ans et plus souffrent d'arthrite et l'incidence devrait atteindre 20 % de la population d'ici 2031. Les médicaments utilisés pour traiter l'arthrite ciblent les médiateurs pro-inflammatoires. Malheureusement, tous les patients ne répondent pas bien à ces médicaments et beaucoup souffrent d'effets secondaires indésirables. L'inflammation étant régulée par un équilibre délicat entre les voies d'inhibition et d'activation des cellules immunitaires, une stratégie thérapeutique alternative consiste à cibler les molécules et les voies de signalisation anti-inflammatoires. Les récepteurs inhibiteurs sont ainsi devenus un sujet d'étude important étant donné leur potentiel thérapeutique. Toutefois, leur fonctionnement et leur rôle dans les maladies inflammatoires demeurent peu connus, nécessitant ainsi leur étude. C'est dans ce but scientifique que cette thèse s'est déroulée.

Mes travaux se sont basés sur l'identification du récepteur inhibiteur CLEC12A appartenant à la famille des lectines, dont notre laboratoire a montré qu'il était impliqué dans la pathogenèse de la goutte. Le récepteur CLEC12A est un récepteur inhibiteur exprimé chez les cellules d'origine myéloïde, dont les ligands naturels et la voie de signalisation restent à identifier. Toutefois, CLEC12A possède un motif ITIM ("Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif") caractéristique des récepteurs inhibiteurs. Les motifs ITIM recrutent des phosphatases qui, à leur tour, inhibent les voies de signalisation activatrices des cellules immunitaires et permettent ainsi de moduler leurs fonctions. Cette capacité de modulation négative de l'activation des cellules myéloïdes du récepteur CLEC12A a été observée dans plusieurs études faisant de lui un candidat pertinent à étudier. CLEC12A apparaît notamment comme un facteur commun dans le syndrome de Behçet's, l'arthrite rhumatoïde et la goutte qui sont caractérisés par des épisodes inflammatoires aigus impliquant le neutrophile. Les études montrent que la diminution ou l'altération du récepteur CLEC12A est associée avec une inflammation exacerbée dans ces pathologies. De plus, en absence de CLEC12A, le neutrophile arbore une réponse accrue à des stimuli pro-inflammatoires.

De ce fait, le laboratoire a étudié le rôle du récepteur CLEC12A dans la pathologie de la goutte dont l'agent étiologique connu, les cristaux d'urate monosodique (UMS) provoquent une inflammation exacerbée caractérisée par la suractivation des neutrophiles. Les cristaux d'UMS

diminuent l'expression de CLEC12A à la surface des neutrophiles ce qui aboutit à une réponse inflammatoire accrue. De plus, nous savons que l'une des molécules (la colchicine) utilisées pour traiter les patients souffrant de la goutte prévient la diminution de l'expression de CLEC12A à la surface des neutrophiles par les cristaux d'UMS. Or, chez le neutrophile, notre laboratoire a démontré qu'en réponse aux cristaux d'UMS CLEC12A régule négativement l'influx de calcium intracellulaire, la phosphorylation des protéines intracellulaires ainsi que la production d'IL-8. Ceci a mené à notre hypothèse que CLEC12A modulerait la réponse des neutrophiles en ciblant les différentes voies de signalisation intracellulaires activées par les cristaux d'UMS.

Ainsi, notre premier objectif était de mieux identifier les voies de signalisation modulées par CLEC12A chez le neutrophile en réponse aux cristaux d'UMS. Cependant, le manque de connaissance sur la signalisation du récepteur CLEC12A limitait notre approche afin de comprendre son rôle et les mécanismes altérant son expression dans la pathogenèse de la goutte. Ainsi, notre deuxième objectif était de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la signalisation de CLEC12A.

Dans la pathologie de la goutte, nos travaux ont identifié l'axe de signalisation p38-MAPK-PI3K-Akt dans la production de l'IL-8 par les neutrophiles en réponse aux cristaux d'UMS. Nous avons démontré la rapide phosphorylation du récepteur CLEC12A par une kinase Src dans les domaines membranaires résistants aux détergents (DRM) enrichies en flotilline-1 en réponse aux cristaux d'UMS, ce qui révèle qu'avant d'être dégradé par les cristaux, le récepteur module l'activation des neutrophiles par l'axe de signalisation p38-MAPK-PI3K-Akt. Afin de pouvoir comprendre les mécanismes dérégulant l'expression de CLEC12A dans la goutte, nos travaux ont identifié des mécanismes de signalisation du récepteur qui étaient encore méconnus. Nos résultats rapportent les premières évidences des mécanismes de signalisation du récepteur CLEC12A. Nous démontrons le rôle des cystéines 118 et 130 de la tige extracellulaire de CLEC12A dans son oligomérisation, expression, et signalisation selon un mécanisme de modification post-traductionnel des cystéines.

# Table des matières

Résumé .....	ii
Liste des figures, tableaux, illustrations.....	x
Liste des abréviations, sigles, acronymes .....	xiii
Remerciements.....	xvii
Avant-propos .....	xx
Introduction.....	1
Le système immunitaire .....	1
La réponse inflammatoire du système immunitaire .....	1
La composante innée du système immunitaire .....	4
Les cellules du système immunitaire innée .....	4
Les neutrophiles .....	6
A] Reconnaissance des pathogènes et initiation de l'inflammation .....	6
B] Recrutement et activation des neutrophiles .....	6
B] Phagocytose .....	8
C] Dégranulation.....	9
D] Explosion oxydative du neutrophile.....	10
E] Production de pièges extracellulaires par les neutrophiles (NETs pour « Neutrophils Extracellular Traps »).....	10
F] Médiateurs inflammatoires produits par le neutrophile .....	12
G] Apoptose des neutrophiles.....	14
Récepteurs immunomodulateurs .....	15
Les CLR (« C-type Lectin Receptor » ou « C-type Lectin-like Receptor »).....	16
Nature des ligands reconnus par les CLR .....	16
Les CLR modulant les cellules immunitaires .....	17
Signalisation des CLR à motif ITAM ou hemITAM.....	18

Signalisation des CLR à motif ITIM.....	19
Le récepteur inhibiteur CLEC12A .....	21
Expression et structure du récepteur CLEC12A.....	21
CLEC12A est un récepteur inhibiteur des cellules myéloïdes .....	22
Mécanisme de signalisation des récepteurs immunomodulateurs .....	23
Liaison du ligand et oligomérisation des récepteurs .....	24
Rôle des plateformes de signalisation, les radeaux lipidiques .....	25
Activation des messagers et transduction du signal .....	27
La phosphorylation des protéines.....	27
Les ions Calcium.....	30
cAMP .....	30
Les lipides (les inositols phosphates).....	31
Les lipides (les inositols phosphates) et la voie de signalisation PI3K- Akt .....	32
<b>La pathologie de la goutte.....</b>	<b>33</b>
Prévalence.....	34
Facteurs de risque .....	35
Hyperuricémie chronique .....	36
Facteurs influençant la sous-excrétion des urates.....	36
Facteurs influençant le métabolisme des urates.....	36
Diète, âge, sexe et comorbidité.....	37
Caractérisation clinique.....	38
Hyperuricémie asymptomatique.....	38
Crise de goutte aiguë .....	38
Phase intercritique.....	38
La goutte tophacée chronique .....	39

La réaction inflammatoire d'une crise de goutte aigüe.....	39
Cristallisation de l'UMS .....	39
Initiation de la réponse inflammatoire .....	40
Production de cytokines pro-inflammatoires .....	40
Recrutement des neutrophiles .....	42
Activation des neutrophiles.....	43
Résolution de la crise de goutte.....	45
Traitement d'une crise de goutte aigüe.....	45
Rôle de CLEC12A dans la goutte .....	46
Contexte et hypothèse .....	48
Chapitre 1: Le récepteur inhibiteur CLEC12A régule la signalisation de PI3K-Akt pour moduler l'activation des neutrophiles et le relargage de cytokine. ....	50
1.1 Résumé .....	51
1.2 Abstract .....	51
1.3 Introduction.....	52
1.4 Materials and Methods.....	53
1.4.1 Antibodies.....	53
1.4.2 Reagents.....	54
1.4.3 Cells.....	55
1.4.4 Neutrophil stimulation.....	55
1.4.5 Plasma membrane preparations.....	55
1.4.6 Isolation of detergent-resistant membrane domains.....	56
1.4.7 Isolation of detergent-resistant membrane domains.....	57
1.4.8 Preparation of detergents-resistant cell lysates pellets.....	57
1.4.9 Antibody-induced internalization of CLEC12A in neutrophils.....	58
1.4.10 Plasmid construct.....	58

1.4.11 Transfection of HEK-293T and HeLa cells.....	59
1.4.12 CLEC12A immunoprecipitation. ....	59
1.4.13 CLEC12A cross-linking on HEK-293T cells. ....	60
1.4.14 Electrophoresis and immunoblotting. ....	60
1.4.15 Confocal microscopy. ....	61
1.4.16 Phosphoproteomics and analysis. ....	61
1.4.17 Enzyme-linked immunosorbent assays. ....	63
1.4.18 Statistical analysis.....	63
<b>1.5 Results. ....</b>	<b>63</b>
<b>1.5.1 CLEC12A cross-linking induces its translocation to detergent-resistant membrane domains.....</b>	<b>63</b>
<b>1.5.2 CLEC12A is phosphorylated following translocation.....</b>	<b>65</b>
<b>1.5.3 Reduced expression of cell-surface CLEC12A enhances MSU-stimulated kinase activity in human neutrophils.....</b>	<b>71</b>
<b>1.5.4 Proteomic analysis of protein phosphorylation after CLEC12A cross-linking on human neutrophils. ....</b>	<b>71</b>
<b>1.5.5 CLEC12A targets the PI3K-Akt pathway. ....</b>	<b>73</b>
<b>1.6 Discussion.....</b>	<b>73</b>
<b>1.6 Data availability statement.....</b>	<b>77</b>
<b>1.7 Ethics statement.....</b>	<b>77</b>
<b>1.8 Authors contributions. ....</b>	<b>77</b>
<b>1.9 Funding.....</b>	<b>78</b>
<b>1.10 Conflict of interest.....</b>	<b>78</b>
<b>1.11 Acknowledgments.....</b>	<b>78</b>
<b>1.12 Supplementary material.....</b>	<b>78</b>
<b>1.13 Abbreviations.....</b>	<b>92</b>

1.14 References.....	93
<b>Chapitre 2 : Régulation de l'expression, l'oligomérisation et la signalisation du récepteur CLEC12A par les résidus de cystéines localisés dans sa tige extracellulaire. ....</b>	<b>96</b>
2.1 Résumé.....	97
2.2 Abstract.....	97
2.2 Introduction.....	98
2.3 Materials and methods.....	99
2.3.1 Antibodies.....	99
2.3.2 Reagents. ....	100
2.3.3 Plasmid construct and SiRNA stealth™ RNAi.....	100
2.3.4 Cell culture and transfection.....	101
2.3.5 Co-Transfection of cell lines with CLEC12A-HA-WT and the SiRNA stealth™ RNAi.....	102
2.3.6 Lysis of transiently transfected Hek 293T cells prior to immunoblotting. ....	102
2.3.7 Electrophoresis and Immunoblotting. ....	103
2.3.8 Confocal microscopy.....	103
2.3.9 Quantitation of antibody-induced CLEC12A internalisation by flow cytometry.....	104
2.3.10 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treatment.....	104
2.3.11 Three dimensional modeling of CLEC12A.....	104
2.4 Results.....	105
2.4.1 Constructions of mutant CLEC12A receptors. ....	105
2.4.2 Stalk Domain C118 and C130 Regulate CLEC12A Cell-Surface Expression and oligomerization. ....	107
2.4.3 CLEC12A phosphorylation and phosphatase recruitment is regulated by C130.....	109

2.4.4 Modeling of CLEC12A mutants.....	112
2.4.5 Regulation of CLEC12A oligomerisation by oxidation .....	115
2.4.6 Flotillin regulates CLEC12A phosphorylation.....	116
2.5 Discussion.....	118
2.6 Supplementary Materials.....	120
2.7 Author contributions.....	120
2.8 Funding.....	121
2.9 Acknowledgments.....	121
2.10 Conflicts of interest: .....	121
2.11 References: .....	121
<b>Discussion et perspective .....</b>	<b>124</b>
Contexte .....	124
Le rôle des cystéines 118 et 130 de la tige extracellulaire dans la signalisation de CLEC12A .....	124
Les modifications post-traductionnelles des cystéines 118 et 130 de CLEC12A modulent sa signalisation .....	128
Le rôle des DRM enrichies en flotillines dans la signalisation de CLEC12A.....	131
CLEC12A module la production d'IL-8 chez le neutrophile en réponse aux cristaux d'UMS en régulant la voie p38-MAPK-PI3K-Akt.....	133
Rôle de CLEC12A dans l'arthrite rhumatoïde ? .....	137
CLEC12A jouerait un rôle dans les cristallogénies ? .....	138
Mécanisme d'internalisation de CLEC12A ?.....	139
CLEC12A pourrait jouer un rôle activateur ? .....	140
<b>Conclusion.....</b>	<b>144</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>146</b>

# Liste des figures, tableaux, illustrations

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> La réponse inflammatoire du système immunitaire inné et adaptatif.....	3
<b>Figure 2</b> Différentiation des cellules souches hématopoïétiques.....	5
<b>Figure 3</b> Les fonctions effectrices du neutrophile. ....	8
<b>Figure 4</b> Liste des médiateurs peptidiques produit par le neutrophile.....	14
<b>Figure 5</b> Les motifs de signalisation par les tyrosines des CLR.....	18
<b>Figure 6</b> Illustration de quelques CLR, leur ligand et voie de signalisation. ....	20
<b>Figure 7</b> Structure de CLEC12A.....	22
<b>Figure 8</b> Fonctions des radeaux lipidiques dans la signalisation.....	26
<b>Figure 9</b> Illustration d'une voie de signalisation induite par un récepteur membranaire. ....	27
<b>Figure 10</b> Phosphorylation et déphosphorylation d'une protéine par une kinase et une phosphatase. ....	29
<b>Figure 11</b> Un PtdIns peut former 7 PI différents selon les phosphorylations et déphosphorylation de son noyau inositol.....	32
<b>Figure 12</b> Représentation de l'inflammation provoquée par les cristaux d'UMS dans l'articulation d'un gros orteil (Podagra). ....	34
<b>Figure 13</b> Prévalence de la goutte dans 7 pays représentatifs.....	35
<b>Figure 14</b> Le métabolisme des purines et d'excrétion de l'urate dans la pathologie de la goutte. ....	37
<b>Figure 15</b> Les macrophages interagissent avec les cristaux d'UMS et initient l'inflammation et le recrutement des neutrophiles.....	42
<b>Figure 16</b> Voies de signalisation activées par les cristaux d'UMS chez le neutrophile .....	44
<b>Figure 1.1</b> CLEC12A translocates to detergent-resistant membrane domains after antibody-induced cross-linking.....	64
<b>Figure 1.2</b> Antibody-induced cross-linking and internalization of CLEC12A is dependent on cholesterol-rich, membrane domains and microtubules. ....	65
<b>Figure 1.3</b> Antibody-induced cross-linking of CLEC12A induces the phosphorylation of its ITIM in HEK-293T cells.....	66

<b>Figure 1.4</b> CLEC12A phosphorylation upon antibody-induced cross-linking and MSU stimulation in human neutrophils.....	68
<b>Figure 1.5</b> CLEC12A is phosphorylated upon its antibody-induced translocation to the flotillin-rich, detergent-insoluble cell pellet.....	69
<b>Figure 1.6</b> Antibody-induced cross-linking of CLEC12A enhances the phosphorylation of tyrosine residues, PKC substrates, Akt and p38 to regulate MSU-induced IL-8 production in human neutrophils.....	70
<b>Figure 1.7</b> Schematic representation of the MSU-induced signaling pathways negatively regulated by CLEC12A upon its translocation to flotillin-rich membrane domains and its internalization.....	77
<b>Supplementary figure 1.1</b> HEK-293T cells express CLEC12A-HA-wt on their surface that can be internalised by antibody-induced cross-linking as in human neutrophils. ....	79
<b>Supplementary figure 1.2</b> Quantification of Western blots by densitometry.....	80
<b>Supplementary figure 1.3</b> STRING analysis of proteins with increased phosphorylation after CLEC12A cross-linking compared to isotype cross-linking.....	81
<b>Supplementary figure 1.4</b> STRING analysis of kinases with increased phosphorylation in human neutrophils stimulated with TNF- $\alpha$ compared to neutrophils stimulated with TNF- $\alpha$ and cross-linked for CLEC12A cross-linking.....	82
<b>Supplementary figure 1.5</b> MSU induce the phosphorylation of Akt via p38 in human neutrophils.....	83
<b>Supplementary figure 1.6</b> CLEC12A knock-down in THP-1 cells enhances MSU-induced global tyrosine phosphorylation and the phosphorylation of Akt and p38.....	84
<b>Supplementary figure 1.7</b> MSU-induced IL-8 production in human neutrophils is p38-dependent.....	85
<b>Supplementary Table 1.1</b> GO molecular functions of CLEC12A-Induced Phosphoproteins. Enrichment of phosphoproteins CLEC12A>isotype GO molecular function.....	86
<b>Supplementary Table 1.2</b> Protein Kinases and Phosphatases Phosphorylated upon CLEC12A Cross-linking.....	88
<b>Supplementary Table 1.3</b> Molecular Functions of TNF- $\alpha$ Phosphoproteins Reduced by CLEC12A Cross-linking.....	90

<b>Supplementary Table 1.4</b> Protein Kinases and Phosphatases with Reduced Phosphorylation following CLEC12A Cross-linking .....	92
--	----

<b>Figure 2. 1</b> Stalk domain C118 and C130 residues regulate CLEC12A cell-surface expression and oligomerisation.....	107
--	-----

<b>Figure 2. 2</b> CLEC12A oligomerisation is dependent on C118 and C130. ....	109
--	-----

<b>Figure 2. 3</b> C118 and C130 mutants are phosphorylated and do not alter antibody-induced CLEC12A internalization. ....	110
---	-----

<b>Figure 2. 4</b> Involvement of neck domain C118 and C130 in early signaling initiated by antibody-induced clustering of CLEC12A.....	113
---	-----

<b>Figure 2. 5</b> The C130 mutant enhances the recruitment of SHP-2 to the insoluble membrane fraction.....	114
--	-----

<b>Figure 2. 6</b> 3D models of CLEC12A in different conformations.....	115
---	-----

<b>Figure 2. 7</b> Oxidation induces CLEC12A WT oligomerisation. ....	116
---	-----

<b>Figure 2. 8</b> Flotillin depletion downregulates antibody-induced CLEC12A phosphorylation. ....	117
---	-----

<b>Supplementary figure 2. 1</b> The effect of C118A and C130A on CLEC12A antibody-induced internalization. ....	120
--	-----

## Liste des tableaux

<b>Supplementary Table 1.1</b> GO molecular functions of CLEC12A-Induced Phosphoproteins. Enrichment of phosphoproteins CLEC12A>isotype GO molecular function.....	86
--	----

<b>Supplementary Table 1.2</b> Protein Kinases and Phosphatases Phosphorylated upon CLEC12A Cross-linking .....	88
---	----

<b>Supplementary Table 1.3</b> Molecular Functions of TNF- $\alpha$ Phosphoproteins Reduced by CLEC12A Cross-linking .....	90
--	----

<b>Supplementary Table 1.4</b> Protein Kinases and Phosphatases with Reduced Phosphorylation following CLEC12A Cross-linking .....	92
--	----

## Liste des abréviations, sigles, acronymes

ATP : Adénosine TriPhosphate

ADP : Adénosine DiPhosphate

BCL-10 : « *B cell lymphoma 10* »

CARD9 : « *caspase recruitment domain family member 9* »

CD: Classes de différenciation

CLR : « *C-type Lectin Receptor* »/« *C-type Lectin-like Receptor* »

CRD: domaines riches en cystéines

CSH: Cellule(s) souche(s) hématopoïétique(s)

CTLD : « *C-type Lectin Domain* »/« *C-type Lectin-like Domain* »

DAMPs: « *Damaged Associated Molecular Patterns* »

DCIR : « *DC Inhibitory Receptor* »

DRM : « *Detergents Resistant Membranes* »

ICAM-1 : « *InterCellular Adhesion Molecule* »

I : Isoleucine

IL : interleukine

ITAM : « *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* »

ITIM : « *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif* »

JAK-STAT : « *Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription* »

K.O : « *Knock-Out* »

L : Leucine

LFA-1 : « *Leucocyte Function associated Antigen* »

LPS : Lipopolysaccharide

MALT1 : « *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1* »

MAPK : « *Mitogen-Activated Protein Kinase* »

MICL : « *Myeloid Inhibitory Cell Receptor* »

MMPs : Métalloprotéinases matricielles

NADPH : « *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* »

NETs : « *Neutrophils Extracellular Traps* »

NF- $\kappa$ B : « *Nuclear factor-kappa B* »

NLRP3 : « *Nucleotide Oligomerization Domain-like receptor family, pyrin domain containing 3* »

PAMPs : « *Pathogen-Associated Molecular Patterns* »

PI3K : « *Phosphatidylinositol-3-kinase* »

PRR : « *Pattern Recognition Receptors* »

PSGL-1 : P-selectine 1

UMS : Urate monosodique

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène

S : Sérine

TLR : « *Toll-Like Receptor* »

TNF- $\alpha$  : « *Tumor Necrosis Factor* »

TREM : « *Triggering Receptors Expressed on Myeloid cell-1* »

V : Valine

Y : Tyrosine

X : un acide amine

“On ne force pas une curiosité, on l’éveille.” De Daniel Pennac/ Comme un roman.

## Remerciements

Cette thèse est le fruit d'efforts et de partage avec un nombre important de personnes qui ont contribué à faire de cette aventure en pays étranger, une aventure incroyable.

Rien de tout ceci n'aurait été possible si Maria ne m'avait pas accueilli dans son laboratoire. J'ai pu grandir personnellement et développer ma qualité de scientifique sous la tutelle de ma directrice de recherche Maria Fernandes et de mon co-directeur de recherche Paul Naccache. Ils ont su partager avec moi leur passion pour la science tout en me guidant sur mon projet afin que je puisse apprendre à leurs côtés. Je me rappelle encore ma première discussion avec Maria au sujet du choix de mon projet de thèse, et nous nous étions fixés un an pour vérifier si le projet sur CLEC12A était réalisable pour mon doctorat. Aujourd'hui je suis heureux de pouvoir présenter ce projet de recherche dans le cadre de ma thèse signifiant que nous avons réussi à développer ce projet, malgré les énormes défis que représentait ce projet. Maintenant que nous avons publié deux articles de recherche avec le projet CLEC12A, bien d'autres résultats vous attendent et nous pouvons dire fièrement ROGER, comme le dit si bien cette équipe de recherche.

Les années d'expériences furent rythmées par l'équipe de Maria, avec Guillaume Paré (Sire Paré de Cornouailles), Myriam Vaillancourt (« *The cell master* »), Andréa Murru (La sainte trinité). Dans la dernière année de ma thèse le laboratoire a accueilli Marie Michèle Labrecque à qui je souhaite une belle maîtrise au sein de l'équipe. Je me dois surtout de ne pas oublier un membre à part entière de cette équipe de recherche, la boulangerie chez Paul et son chef Jesus qui ont rempli nos estomacs de leurs pâtisseries sucrées pendant presque toutes nos réunions d'équipe. J'ai pu être épaulé par des scientifiques aguerris, former Andréa pendant son stage et la voir progresser à une vitesse fulgurante, partager des congrès avec Guillaume où le SPA était notre royaume, continuer d'embêter Myriam avec mon accent anglais fantastique, et surtout... SURTOUT.. maîtriser l'art subtil du plan d'action ou du label « Guillaume Paré *Approved* ». Je vous remercie de votre solidarité durant ces années, et d'avoir partagé des beaux moments complices avec moi. Notre petite équipe travailleuse et ravageuse fût un des rouages clés pour la réussite de mon doctorat et pour ça je vous remercie chaleureusement. Les chansons de Céline Dion (et de son miroir) ne me manqueront pas elles, mais vous cependant oui. « Mi aim a zot » comme on dit chez moi.

Il serait difficile de citer tous mes amis rencontrés à Québec et ceux venant de l'île de la Réunion que je retrouvais en vacances. Je vous remercie tous pour m'avoir accompagné durant mes vacances et pour ceux m'ayant accompagné à Québec, tous nos souvenirs forgés ensemble m'accompagneront longtemps.

Je remercie mon ami d'enfance Grégoire Gaston, car il est resté pour moi le même « *zourite* » qu'à nos années lycée. Rien que sa grosse voix qui me crie VITRY à chacune de nos retrouvailles me fais rire et me rappelle de bons souvenirs.

Merci à Ludivine et Fabien pour leur amitié fidèle, et à tous les apéros dînatoires que nous avons passé à Québec. Je vous suis plus que reconnaissant de votre soutien pour notre arrivée prochaine à Bordeaux, et j'attends avec impatience d'ouvrir une bonne bouteille de vin pour fêter ça.

Merci, à Jonathan Laugier et Estefania Grimaldi, que ce soit sur Québec ou au Mexique, vous étiez toujours prêt à boire du rhum, de la tequila, manger du rougail saucisse ou des tacos. Toujours prêt pour un mario party, à nous partager votre énergie positive et joyeuse. Merci de prendre soin de notre filleul, bien qu'il devra faire attention à ne pas zouker Léna trop fort!!! Ça va que c'est lui. « Gracias amigos míos, sois los mejores y Theo es el más bello ».

Je remercie Stephan Hasse et Geneviève Marcoux, mon voisin de cube (« Bureau »), nous avons pu nous épauler et partager les moments les plus difficiles, mais aussi les plus joyeux de nos doctorats. Tu es un ami précieux à mes yeux, et nos longues discussions de laboratoire me manquent. Heureusement, je n'ai plus besoin de veiller sur toi, car c'est Geneviève qui le fait maintenant. Je vous souhaite le meilleur à tous les deux, et je vous remercie d'avoir été là pour m'aider dans mon doctorat. Je tiens également à saluer les talents de pilotage de Geneviève à la zamboni.

Les trois caballeros, Romain Devillers et Morgan Gazzola. Ça y est deux docteurs sur trois, romain il manque plus que toi, ne fais pas trop la feignasse et rejoins vite le club premiums des Dr mickey parade. Même si nous avons excellé en « PARKOUR », nous avons aussi retourné les pistes de ski Québécoise (et nous-même d'ailleurs). J'ai passé une bonne partie du Québec avec vous, et ne plus être à vos côtés pour recevoir une dose de sel et de mauvaise foi me manque

terriblement. Ne changez pas les coupaings, restez suacoche et désolé pour tes remerciements momo, mais j'ai atteint le niveau 120 hein !

La coloc, avec Morgan, Laurent, Gaëtan, MK, Manue, Marine. Entre soirée et activité, nous avons presque fait les 400 coups avec cette coloc. J'ai pu partager une amitié chaleureuse et rigoler à n'en plus finir avec chacun des membres de cette exceptionnelle colloc. Je garderai précieusement les souvenirs que j'ai pu forger avec vous les amis.

Je remercie les personnes du centre de recherche (Yann, Audrey, Étienne, Julie, Tania, Isabelle Dubuc, Xavier, Vanessa, Geneviève, Stephan, Jonathan, Abde et tous les autres) ainsi que mes amis rencontrés ici qui sont devenus une deuxième famille avec qui j'ai pu partager mes joies, mes peines et mes réussites. Je n'ai pas la place de citer chaque personne que j'ai côtoyée, mais ils se reconnaîtront tous. Je tiens à vous remercier d'avoir fait de mon expérience au doctorat une belle aventure dont je me souviendrai toujours.

J'ai pu compter sur le soutien infailible de ma famille. C'est ironique de se dire que je suis parti loin de ma famille pour vivre mon aventure et me trouver moi-même, et que j'ai réalisé que ma famille faisait partie de moi et me définissait. J'ai eu besoin d'eux pour vivre cette aventure et je les remercie du soutien et de l'amour qu'ils me donnent. Je suis reconnaissant et je réalise la chance que j'ai, que mes parents m'ont donnée. Maman, Papa, je sais que vous êtes déjà fiers de moi et que vous allez me le redire encore, mais quand je repense à tout ce que vous avez fait pour moi et mes frères, j'ai envie de vous dire que cette réussite est la vôtre que c'est nous qui sommes fiers de vous.

Je remercie en dernier celle sans qui rien n'aurait été pareil ou possible, Aurélie Louit celle avec qui je partage ma vie depuis 8 ans au moment où j'écris ces lignes. J'ai traversé toutes ces épreuves, avec joie, avec des doutes, de la peur, mais aussi de la fierté envers notre réussite, du bonheur avec nos voyages, et nos découvertes des paysages et cultures de l'Amérique du Nord. Aurélie fut un pilier pour ma réussite, et je ne pourrai être plus satisfait de continuer ma vie à tes côtés. Bien que la fin de nos doctorats et notre retour en France soient stressants et compliqués, nous surmonterons cette épreuve comme les autres parce que tu es à mes côtés. Merci pour tout ce que tu m'as donné et tout ce que tu me donnes.

## Avant-propos

Les travaux réalisés au cours de ma thèse font l'objet de deux articles publiés. Ces résultats ont été obtenus grâce à la collaboration de tous les auteurs cités, dont le rôle est précisé dans cette section.

### **Titre de l'article: “The inhibitory receptor CLEC12A regulates PI3K-Akt signaling to inhibit neutrophil activation and cytokine release.”**

Guillaume Paré<sup>1,\*</sup>, Julien Vitry<sup>1-2,\*</sup>, Michael L. Merchant<sup>3</sup>, Myriam Vaillancourt<sup>1</sup>, Andréa Murru<sup>1-2</sup>, Yunyun Shen<sup>1-2</sup>, Sabine Elowe<sup>4-5</sup>, Mireille H. Lahoud<sup>6</sup>, Paul H. Naccache<sup>1-2</sup>, Kenneth R. McLeish<sup>3</sup>, Maria J. Fernandes<sup>1-2</sup>

<sup>1</sup> Infectious and Immune Diseases Division, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

<sup>2</sup> Department of Microbiology-Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Medicine, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

<sup>3</sup> Department of Medicine, University of Louisville School of Medicine, Louisville, KY, USA

<sup>4</sup> Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

<sup>5</sup> Reproduction, Mother and Youth Health Division, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

<sup>6</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash Biomedicine Discovery Institute, Monash University, Clayton, VIC 3800, Australia

**Co-premier auteurs:** Guillaume Paré et Julien Vitry ont contribué également à ce manuscrit.

**Journal:** “Frontier in Immunology, Molecular Innate Immunity”

**Publication:** Le 21 Juin 2021

#### **Contribution des auteurs:**

**-Conception et planification des expériences :** Maria J Fernandes, Kenneth R McLeish et Paul H Naccache.

**-Réalisation des expériences et analyse des données :** Guillaume Paré, Julien Vitry, Kenneth R McLeish, Michael L Merchant, Myriam Vaillancourt, Andréa Murru, Yunyun Shen, et Maria J Fernandes.

**-Supervision :** Maria J Fernandes et Paul H Naccache.

**-Conception des figures et rédaction du manuscrits** : Contribution majeure par Kenneth R McLeish et Maria J Fernandes. Contribution par Guillaume Paré, Julien Vitry, Myriam Vaillancourt, Sabine Elowe, Michael L Merchant, Paul H Naccache.

**-Acquisition des fonds et ressources** : Maria J Fernandes.

**Titre de l'article: “Regulation of the Expression, Oligomerisation and Signaling of the Inhibitory Receptor CLEC12A by Cysteine Residues in the Stalk Region.”**

Julien Vitry<sup>1-2,\*</sup>, Guillaume Paré<sup>1,2</sup>, Andréa Murru<sup>1-2</sup>, Charest-Morin Xavier<sup>1-2</sup>, Halim Maaroufi<sup>3</sup>, Kenneth R. McLeish<sup>4</sup>, Paul H. Naccache<sup>1-2</sup>, Maria J. Fernandes<sup>1-2</sup>

1 Infectious and Immune Diseases Division, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

2 Department of Microbiology-Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Medicine, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

3 Institute of integrative biology and systems, Laval University, Canada, G1V 0A6

4 Department of Medicine, University of Louisville School of Medicine, Louisville, KY, USA

**Premier auteur** : Vitry Julien

**Journal**: “International Journal of Molecular Science (MDPI)”

**Publication**: Le 22 septembre 2021

Cet article appartient au numéro spécial Réseaux de signalisation des récepteurs immunorégulateurs 2.0

**Contribution des auteurs**:

**-Conception et planification des expériences** : Julien Vitry, Maria J Fernandes et Paul H Naccache.

**-Réalisation des expériences et analyse des données** : Contribution majeure par Julien Vitry et Maria J Fernandes. Contribution par Guillaume Paré, André Murru, Xavier Charest-Morin, Halim Maaroufi, Paul H Naccache et Kenneth R McLeish.

**-Supervision** : Maria J Fernandes et Paul H Naccache.

**-Modélisation en 3 dimensions** : Halim Maaroufi.

**-Conception des figures et rédaction du manuscrits** : Contribution majeure par Julien Vitry et Maria J Fernandes. Contribution par Guillaume Paré, Halim Maaroufi, Kenneth R McLeish et Paul H Naccache.

**-Acquisition des fonds et ressources** : Maria J Fernandes.

Pendant mon doctorat j'ai pu participer aux projets du laboratoire et j'ai pu également travailler avec des collaborateurs sur des projets qui ne font pas partie de cette thèse. Voici les travaux déjà publiés sur lesquelles j'ai apporté ma collaboration.

**Titre de l'article: "The development of a targeted and more potent, anti-Inflammatory derivative of colchicine: Implications for gout"**

Guillaume Paré<sup>1</sup>, Julien Vitry<sup>1</sup>, François Marceau<sup>1</sup>, Myriam Vaillancourt<sup>1</sup>, Philip Winter<sup>2</sup>, Hélène Bachelard<sup>3</sup>, Paul H Naccache<sup>1</sup>, Jack A Tuszyński<sup>2</sup>, Maria J Fernandes<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CHU de Québec Research Center-Université Laval, 2705 boulevard Laurier, Bloc T1-49, Québec, PQ, G1V 4G2, Canada; Department of Microbiology-Infectious Diseases and Immunology, Université Laval, Pavillon Ferdinand-Vandry, 1050 avenue de la Médecine, Université Laval, Québec G1V 0A6, PQ, Canada.

<sup>2</sup>Department of Oncology, Cross Cancer Institute, University of Alberta, 11560 University Ave NW, Edmonton, AB, T6G 1Z2, Alberta, Canada.

<sup>3</sup>CHU de Québec Research Center-Université Laval, 2705 boulevard Laurier, Bloc T1-49, Québec, PQ, G1V 4G2, Canada; Department of Medicine, Université Laval, Québec, Canada.

<sup>4</sup>CHU de Québec Research Center-Université Laval, 2705 boulevard Laurier, Bloc T1-49, Québec, PQ, G1V 4G2, Canada; Department of Microbiology-Infectious Diseases and Immunology, Université Laval, Pavillon Ferdinand-Vandry, 1050 avenue de la Médecine, Université Laval, Québec G1V 0A6, PQ, Canada. Electronic address: maria.fernandes@crchul.ulaval.ca.

**Journal:** "Biochemical Pharmacology" Volume 180, Octobre 2020, 114125

**Publication:** Le 26 juin 2020

**Titre de l'article : "Plasma Extracellular Vesicle Subtypes May be Useful as Potential Biomarkers of Immune Activation in People With HIV"**

Wilfried Wenceslas Bazié<sup>1,2,3</sup>, Julien Boucher<sup>1,2</sup>, Julien Vitry<sup>1,2</sup>, Benjamin Goyer<sup>1</sup>, Jean Pierre Routy<sup>4,5</sup>, Cécile Tremblay<sup>6,7</sup>, Sylvie Trottier<sup>1,2</sup>, Mohammad-Ali Jenabian<sup>8</sup>, Patrick Provost<sup>1,2</sup>, Michel Alary<sup>1,9,10</sup>, Caroline Gilbert<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval, Québec, QC, Canada.

<sup>2</sup>Département de microbiologie-infectiologie et d'immunologie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada.

<sup>3</sup>Programme de recherche sur les maladies infectieuses, Centre Muraz, Institut National de Santé Publique, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

<sup>4</sup>Chronic Viral Illness Service and Division of Hematology, McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada.

<sup>5</sup>Infectious Diseases and Immunity in Global Health Program, Research Institute, McGill University Health Centre, Montréal, QC, Canada.

<sup>6</sup>Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

<sup>7</sup>Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

<sup>8</sup>Département des sciences biologiques, Université de Québec à Montréal (UQAM), Montréal, QC, Canada.

<sup>9</sup>Département de médecine sociale et préventive, Faculté de médecine, Université de Laval, Québec, C, Canada.

<sup>10</sup>Institut national de santé publique du Québec, Québec, QC, Canada.

**Journal:** "Pathogens and Immunity"

**Publication:** Le 14 Janvier 2021

## **Titre de l'article : « Velocity Gradient Separation Reveals a New Extracellular Vesicle Population Enriched in miR-155 and Mitochondrial DNA »**

Myriam Vaillancourt<sup>1</sup>, Audrey Hubert<sup>1</sup>, Caroline Subra<sup>1 2 3</sup>, Julien Boucher<sup>1</sup>, Wilfried Wenceslas Bazié<sup>1 4</sup>, Julien Vitry<sup>1</sup>, Sofiane Berrazouane<sup>1</sup>, Jean-Pierre Routy<sup>5 6</sup>, Sylvie Trottier<sup>1 7</sup>, Cécile Tremblay<sup>8 9</sup>, Mohammad-Ali Jenabian<sup>10</sup>, Abderrahim Benmoussa<sup>1 11</sup>, Patrick Provost<sup>1 7</sup>, Philippe A Tessier<sup>1 7</sup>, Caroline Gilbert<sup>1 7</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche du CHU de Québec-Université Laval, T1-49, 2705 boulevard Laurier, Québec, QC G1V 4G2, Canada.

<sup>2</sup>The Henry M. Jackson Foundation for the Advancement of Military Medicine, Bethesda, MD 20817, USA.

<sup>3</sup>U.S. Military HIV Research Program, Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, MD 20910, USA.

<sup>4</sup>Programme de Recherche sur les Maladies Infectieuses, Centre Muraz, Institut National de Santé Publique, Bobo-Dioulasso 01 BP 390, Burkina Faso.

<sup>5</sup>Chronic Viral Illness Service and Division of Hematology, McGill University Health Centre, Montréal, QC H4A 3J1, Canada.

<sup>6</sup>Infectious Diseases and Immunity in Global Health Program, Research Institute, McGill University Health Centre, Montréal, QC H4A 3J1, Canada.

<sup>7</sup>Centre de Recherche du CHU de Québec, Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université Laval, T1-49, 2705 boulevard Laurier, Québec, QC G1V 4G2, Canada.

<sup>8</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada.

<sup>9</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada.

<sup>10</sup>Département des Sciences Biologiques et Centre de Recherche CERMO-FC, Université du Québec à Montréal (UQAM), Montréal, QC H2L 2C4, Canada.

<sup>11</sup>Department of Nutrition, CHU Sainte-Justine-Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada.

**Journal:** “Pathogens (MDPI)”

**Publication:** Le 27 Avril 2021

Certains des projets du laboratoire sont en cours de publication et ne seront donc pas présent dans l'avant-propos.

# **Introduction**

Le sujet de cette thèse est l'étude du récepteur CLEC12A et vise à élucider sa voie de signalisation et son rôle dans la pathologie de la goutte. Nous verrons ainsi dans cette introduction le rôle du système immunitaire et le rôle du récepteur CLEC12A pour moduler l'activation des cellules immunitaires d'origines myéloïdes et plus précisément les neutrophiles dans la réponse inflammatoire. Ceci dans le but de dresser le rôle important que ce récepteur joue dans la modulation des neutrophiles dans la pathologie de la goutte.

## **Le système immunitaire**

Nous évoluons dans un monde en contact permanent avec des microorganismes, qu'ils soient pathogéniques ou non, et un panel de molécules toxiques ou d'allergènes constituant une menace pour notre organisme. Notre système immunitaire constitue notre défense envers les maladies potentielles que peuvent nous causer ces pathogènes. Toutefois, son rôle est plus complexe que simplement nous défendre en éliminant les virus et bactéries pathogènes, puisque certains microorganismes nous sont bénéfiques et d'autres commensaux. Le système immunitaire régule notre homéostasie en tolérant et en maintenant certains microorganismes supportant le fonctionnement de nos tissus et organes. Le système immunitaire permet donc dans un même temps, d'éliminer les microbes pathologiques ainsi que les protéines allergènes ou toxiques tout en préservant l'intégrité de nos propres tissus et les microbes nous étant bénéfiques ou commensaux.

Afin de contrôler les différentes substances et microbes pathogènes de son environnement tout en préservant l'homéostasie de l'hôte, les cellules du système immunitaire utilisent une multitude de mécanismes complexes pour reconnaître les pathogènes, initier la réponse inflammatoire, éliminer les pathogènes et réparer les dégâts tissulaires.

### **La réponse inflammatoire du système immunitaire**

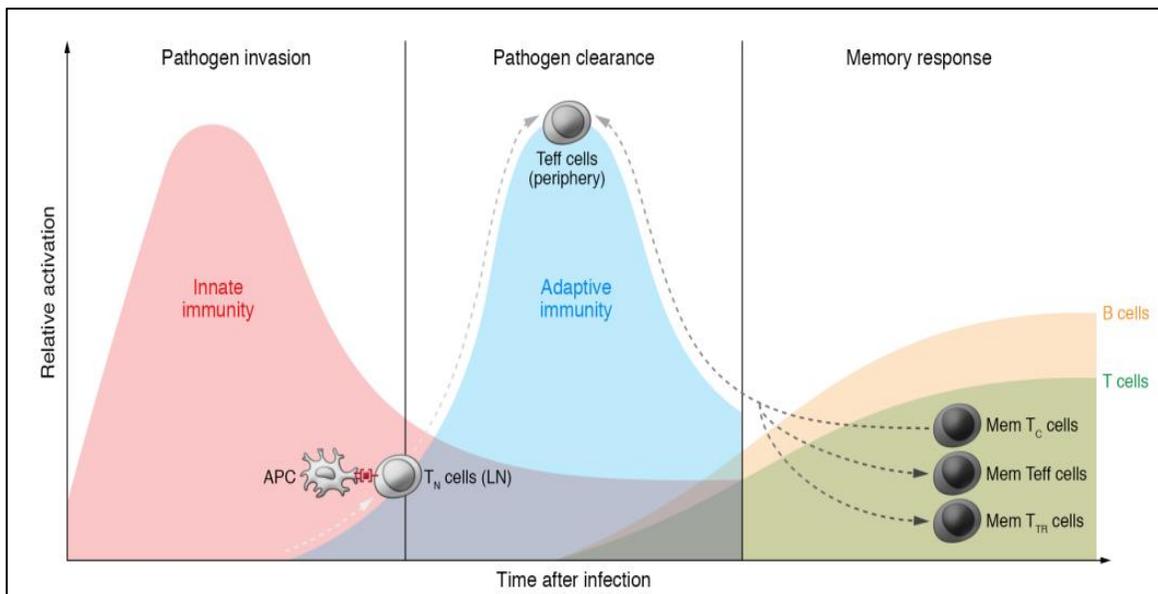
La réponse inflammatoire orchestrée par le système immunitaire possède deux composantes, la partie innée et la partie adaptative (Voir figure 1). Toutefois, bien que la réponse du système inné et adaptatif puisse être considérée comme propre et indépendante à chacune, ces dernières fonctionnent ensemble. La réponse innée constitue la première barrière de défense de

l'hôte et contribue à l'activation de la composante adaptative antigène spécifique du système adaptatif.

Lors de l'infection de notre organisme par un pathogène, c'est le système immunitaire inné qui initie la réponse inflammatoire. Ce sont les cellules du système immunitaire inné qui jouent le rôle de surveillance et qui vont reconnaître les pathogènes. Cette reconnaissance s'effectue par des récepteurs de reconnaissances des motifs (PRR pour « Pattern Recognition Receptor ») qui se lient avec des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs pour « Pathogen associated molecular Patterns ») ou des signaux de danger (DAMPs pour « Damage Associated Molecular Patterns »). La réponse du système inné est rapide et non spécifique, et fait intervenir des étapes clé dans la réponse inflammatoire. La reconnaissance des pathogènes par les PRR à la surface des cellules de l'immunité innée comme les macrophages permet de les activer. Cette activation des cellules induit la libération de messagers chimiques (tels que des cytokines pro-inflammatoires et des chimioattractants) et initie la réponse inflammatoire. Cette réponse inflammatoire est caractérisée par la génération de chaleur, un gonflement, de la rougeur et de la douleur. Le but de la réponse inflammatoire est d'induire la vasodilatation et la perméabilité des vaisseaux sanguins environnant afin de recruter des cellules immunitaires au site d'infection pour lutter contre les pathogènes. La migration des cellules immunitaires constitue une étape importante puisque leur recrutement au site inflammatoire est nécessaire pour éliminer les pathogènes par leurs différentes fonctions (comme la phagocytose, ou la dégranulation libérant des molécules aux propriétés antibactériennes). Une fois les pathogènes éliminés, le système immunitaire inné organise la phase de résolution qui permet d'inhiber l'inflammation et de réparer les tissus endommagés.

Cependant, lorsque l'infection persiste, le système inné va recruter le système adaptatif pour lutter de manière plus spécifique contre le pathogène. La réponse adaptative se divise en deux, à savoir la réponse humorale et cellulaire. À l'inverse du système inné, le système adaptatif possède une réponse plus lente dans le cas d'un premier contact avec un pathogène. Celui-ci doit reconnaître le pathogène par des antigènes spécifiques présentés dans les organes lymphoïdes par des cellules présentatrices d'antigènes (les cellules dendritiques). Parmi les multiples lymphocytes T et B, seul ceux reconnaissant spécifiquement l'antigène seront activés. Ceci induit une prolifération des cellules B qui vont ensuite donner lieu à une production d'anticorps spécifiques contre l'antigène du pathogène (c'est la réponse humorale.), tandis que la réponse

cellulaire consiste en la prolifération des cellules T capable de reconnaître le pathogènes ou les cellules de l'organisme infecté (par un virus par exemple) et à les éliminer. Une caractéristique du système adaptatif est sa faculté de mémoire comparativement au système inné qui reconnaît non-spécifiquement les pathogènes et effectuera toujours la même réponse. Le système adaptatif après avoir eu un premier contact avec un pathogène spécifique, va rester en surveillance pendant des années ce qui permet en cas de deuxième contact une réponse rapide et spécifique contre le même pathogène.



**Figure 1** La réponse inflammatoire du système immunitaire inné et adaptatif

Représentation de la réponse inflammatoire et de l'activation séquentielle des systèmes immunitaire inné et adaptatif. Le système inné initie l'inflammation dès les premières minutes après l'infection et lutte pour éliminer les pathogènes. Cette inflammation du système inné finit par se résorber d'elle-même entre 2 à 14 jours. Le système adaptatif, lors d'un premier contact interviendra au bout de plusieurs jours et luttera contre l'infection (réponse humorale et cellulaire). À la fin de l'inflammation le système immunitaire adaptatif développe une réponse mémoire avec des cellules T et B mémoires qui perdureront plusieurs années afin de répondre plus rapidement en cas de réinfection par le même pathogène. Adaptée de [1].

Bien que son rôle soit tout aussi important, nous n'aborderons pas la partie adaptative du système immunitaire. Le récepteur CLEC12A qui est le sujet principal de cette thèse n'est pas exprimé dans les cellules du système immunitaire adaptatif chez l'humain mais est exprimé dans les cellules du système inné.

## **La composante innée du système immunitaire**

Cette composante joue un rôle primordial dans notre système de défense contre les pathogènes infectieux (bactéries, champignons, virus, parasites). En effet ce système immunitaire inné, conservé au cours de l'évolution, partage des caractéristiques principales entre les plantes, les invertébrés et les mammifères. Une preuve supplémentaire de son importance indiscutable vient du fait que seuls les vertébrés possèdent les bénéfices de l'immunité adaptative; la plupart des organismes de notre planète survivent avec l'immunité innée seule.

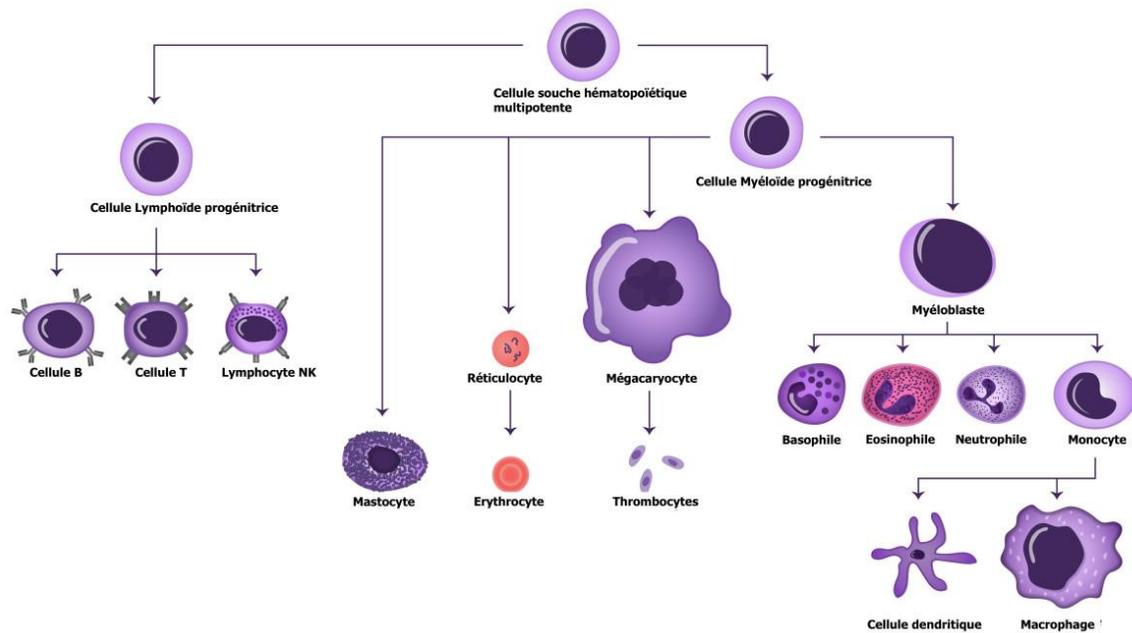
Bien que les découvertes majeures de l'immunité adaptative aient quelque peu accaparé l'attention, nos récentes découvertes de ces dernières décennies ont amélioré notre compréhension de l'immunité innée et de son importance. Ceci grâce aux travaux sur l'activation du système immunitaire inné par les « Toll-Like Receptor » (TLR), le lipopolysaccharide, et de la découverte du rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative[2]. Ces découvertes soulignent le rôle du système inné dans la reconnaissance des pathogènes et dans l'organisation de la réponse adaptative révélant un réseau immunologique coordonné.

La réponse immune innée est rapide face à une infection par un pathogène, grâce aux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires tels que les TLRs appartenant aux PRR, qui reconnaissent les PAMPs ou les DAMPs[3], et qui activeront les cellules immunitaires et la réponse inflammatoire.

## **Les cellules du système immunitaire innée**

La première ligne de défense du système immunitaire inné vient des cellules épithéliales capables d'initier la réponse inflammatoire et qui protègent des infections en formant une barrière physique telle que la peau, les muqueuses respiratoires ou intestinales. Les cellules immunitaires quant à elles sont également capables d'initier la réponse inflammatoire en reconnaissance des pathogènes avec les PRR et surtout d'éliminer les pathogènes avec divers mécanismes spécifiques (exemple; phagocytose, cytotoxicité). Ces cellules immunitaires spécialisées appartiennent aux cellules myéloïdes et lymphoïdes. Ce sont deux lignées produites dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques[4] (Voir figure 2). Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) peuvent se différencier en progéniteurs lymphoïdes communs[5] qui aboutiront à la formation des cellules « Natural Killer » et « Natural Killer T »

faisant partie du système immunitaire inné, tandis que les lymphocytes T et B produits feront partie de la composante adaptative. Les CSH peuvent également se différencier en cellules souches d'origine myéloïde[6] qui se différencieront à leur tour en différentes lignées cellulaires pour développer les cellules de l'immunité innée suivantes, les neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, éosinophiles et basophiles.



**Figure 2** Différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

Les cellules souches hématopoïétiques multipotentes de la moëlle osseuse peuvent se différencier en plusieurs cellules appartenant à l'immunité innée et acquise, ainsi qu'au système sanguin (les érythrocytes). Les cellules souches en réponse à des facteurs de croissance et des cytokines vont se différencier en cellules myéloïdes ou lymphoïdes progénitrices. La lignée des cellules lymphoïdes générera les lymphocytes T, B, NK et NKT. La lignée myéloïde progénitrice peut se différencier en diverses cellules telles que les mégacaryocytes, et réticulocytes qui se différencieront en thrombocytes et érythrocytes respectivement. Elles peuvent également devenir des mastocytes ou des myéloblastes. Ce sont les myéloblastes qui deviendront des basophiles, éosinophiles et neutrophiles formant les granulocytes ou des cellules dendritiques et macrophage formant la lignée des monocytes. Adaptée de [7].

Puisque le sujet de cette thèse porte sur le récepteur CLEC12A et sa modulation de l'activation des neutrophiles dans la pathologie de la goutte, nous allons donc nous concentrer sur le rôle des neutrophiles dans l'immunité innée et dans la réponse inflammatoire.

## Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent environ 95% des cellules de la sous-famille des granulocytes, tandis que les éosinophiles représentent 4% et les basophiles environ 1%. Le neutrophile est le leucocyte que l'on retrouve en plus grande quantité dans la circulation sanguine, où il représente 50% à 70% des leucocytes. Bien qu'il possède une durée de vie limitée, la proportion de neutrophiles renouvelés depuis la moelle osseuse par jour avoisine les  $10^{11}$  cellules[8]. Les neutrophiles sont donc disponibles en grande quantité et renouvelés constamment dans la circulation sanguine pour agir rapidement contre de possibles infections.

### A] Reconnaissance des pathogènes et initiation de l'inflammation

Lors d'une infection, les cellules résidentes des tissus comme les macrophages vont reconnaître les pathogènes grâce aux PRR (Exemple : le TLR4 reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) à la surface des bactéries) et activer la réponse inflammatoire par la production de chimioattractants et de cytokines pro-inflammatoires. L'abondance des signaux (d'origine bactérienne ou endogène) tels que le LPS[9], le fMLP ou FMLF (« formyl-méthionyl-leucinyl-phenylalanine »)[10], des cytokines et chimioattractants classiques comme le TNF- $\alpha$  (« Tumor Necrosis Factor »), l'interleukine (IL)-1 $\beta$  et IL-17 vont activer les cellules endothéliales environnantes et initier le recrutement de cellules immunitaires pour éliminer le pathogène[11]. Les cellules endothéliales environnantes vont s'activer et commencer à exprimer à leur surface luminale, les molécules d'adhésion suivantes, l'E-sélectine, la P-sélectine et plusieurs molécules de la famille des intégrines les ICAMs (« InterCellular Adhesion Molecule ») afin de permettre la capture et la migration des leucocytes, notamment les neutrophiles[12].

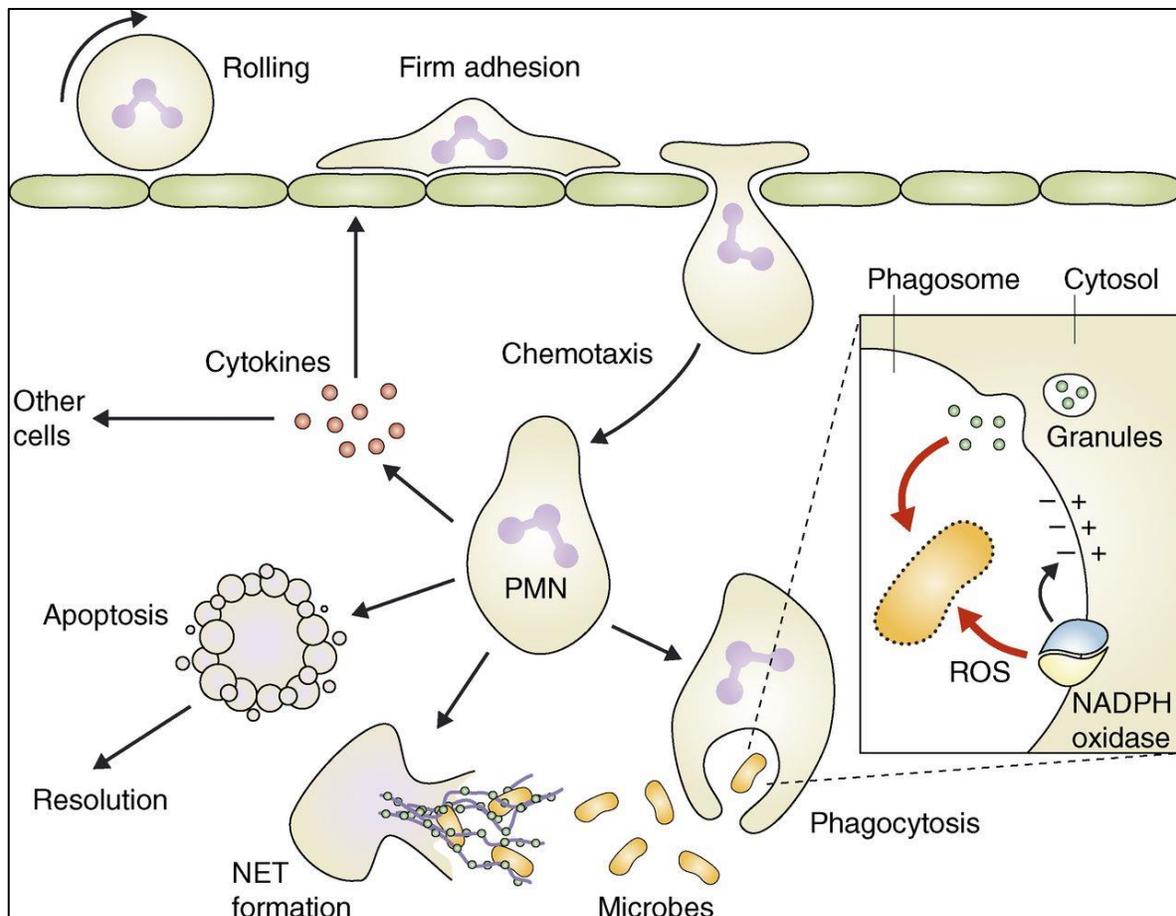
### B] Recrutement et activation des neutrophiles

La migration du neutrophile se résume en 3 étapes (Voir figure 3). La première consiste en la capture des neutrophiles en circulation dans le réseau vasculaire. Cette capture est possible car les neutrophiles expriment de manière constitutive deux protéines, la P-sélectine 1 (PSGL-1) et la L-sélectine, permettant de reconnaître les sélectines exprimées sur la surface des cellules endothéliales activées par l'inflammation [13, 14].

La deuxième étape consiste au roulement des neutrophiles le long des cellules endothéliales afin de ralentir puis de se pré-activer (appelée l'étape du « priming ») par l'interaction des PSGL-1 et L-sélectine du neutrophile et du contact avec des cytokines et chimioattractants (exemple : TNF- $\alpha$ , IL-8)[15, 16]. Ceci va déclencher par le biais des récepteurs de cytokines et chimioattractants, des cascades de signalisation intracellulaire, qui vont activer différentes voies dont la famille des Src kinases (Syk), les PI3K (« phosphatidylinositol-3-kinase »), et la famille des MAPK (« *Mitogen-Activated Protein Kinase* ») (p38 MAPK)[17-21]. L'activation de ces voies de signalisations prépare le neutrophile (« priming ») à jouer son rôle dans l'élimination des pathogènes au site inflammatoire, mais induit aussi des changements physiologiques afin d'exprimer les molécules d'adhésions fermes de la famille des intégrines. Les protéines comme LFA-1 (« Leucocyte Function associated Antigen ») et Mac-1 (appartenant à la famille  $\beta$ 2 des intégrines) permettent aux neutrophiles d'adhérer fermement aux cellules endothéliales par l'interaction avec les molécules intercellulaires d'adhésions (ICAM-1), et de s'arrêter afin de commencer la dernière étape la diapédèse[22, 23].

Cette dernière étape nécessite une réorganisation du cytosquelette du neutrophile pour permettre à celui-ci de migrer à travers la barrière endothéliale vers le site inflammatoire, guidé par des gradients de concentration de chimioattractants (le leucotriène B4, C5a, IL-8, fMLP). Durant la phase de recrutement, les cytokines et chimioattractants vont ainsi pouvoir moduler l'activation, la réponse inflammatoire (phagocytose, production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), libération de granules), la production de cytokines, de chimiokines, la différenciation, la survie et l'apoptose du neutrophile par l'activation de la transcription de gènes pro ou anti-inflammatoires[24-32]

Une fois arrivé au site inflammatoire, le neutrophile a pour rôle de lutter contre les pathogènes infectieux afin de limiter et stopper l'invasion des bactéries, virus et autres particules étrangères néfastes pour le tissu. Pour ce faire, le neutrophile possède plusieurs fonctions, telles que la phagocytose, la dégranulation, l'explosion oxydative et la formation de pièges extracellulaires pour éliminer les pathogènes, et sécrète des médiateurs pro-inflammatoires pour orchestrer la réponse immunitaire (recrutement et activation d'autres leucocytes par exemple).



**Figure 3** Les fonctions effectrices du neutrophile.

Les neutrophiles migrent en 3 étapes à savoir la capture suivie du roulement et de l'adhésion ferme, avant la transmigration vers le site inflammatoire. Une fois que le neutrophile a migré, ce dernier participe à l'élimination des pathogènes grâce à ses fonctions de phagocytose, dégranulation, d'explosion oxydative, formation de piège extracellulaire et production de médiateurs inflammatoire. Le neutrophile participe ensuite à la résolution de l'inflammation par son apoptose. Adaptée de[33].

### **B]** Phagocytose

Cette capacité se définit comme l'absorption de débris cellulaires ou de microorganismes, les confinant dans des compartiments spéciaux nommés les phagosomes qui fusionneront avec des granules afin d'en libérer leur contenu nécessaire pour éliminer les microorganismes (Voir figure 9)[34, 35]. Simultanément, le phagosome va subir une puissante explosion oxydative initiée par un complexe enzymatique nommé la NADPH-oxydase (« Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate ») à la suite de l'activation de récepteurs spécifiques à la surface du neutrophile

général ROS[36]. Le contenu des granules et les ROS permettent d'éliminer les microorganismes phagocytés (voir figure 3).

### C] Dégranulation

Les différents granules du neutrophile peuvent-être classés en quatre types selon leur contenu. Les granules primaires ou azurophiles formés en premiers pendant la maturation de la cellule, ils peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire mais vont préférentiellement fusionner avec le phagosome pour détruire les microorganismes grâce à la myéloperoxydase (MPO), aux élastases, défensines, protéases à sérines (la cathepsine G, la protéinase 3), lysozymes et à l'azurocidine qu'ils contiennent[37-39].

Les granules spécifiques ou secondaires sont plus facilement relargués dans le milieu extracellulaire et bien qu'ils ne contiennent pas de MPO, ils sont enrichis en molécules aux propriétés antimicrobiennes (lactoferrine, cathélicidine) [40].

Les granules gélatinases ou tertiaires ainsi que les vésicules sécrétoires apparaissent plus tard, vers la fin de la maturation du neutrophile[41]. Lors de la diapédèse du neutrophile, la transmigration de ceux-ci au travers de la barrière endothéliale est facilitée par le contenu des granules gélatineux. Ces derniers aident à dégrader la matrice extracellulaire tout en renouvelant la réserve de récepteurs membranaires à la surface des neutrophiles nécessaire à cette migration vers le site inflammatoire.

Ce sont les vésicules sécrétoires qui seront les premières à être libérées en réponse à un stimulus inflammatoire. Celles-ci vont participer à la modification des récepteurs de surface du neutrophile, favorisant l'étape de pré-activation (« priming ») du neutrophile lui permettant d'adhérer aux cellules endothéliales et de migrer vers le site inflammatoire. Elles contiennent notamment la  $\beta 2$  intégrine, le récepteur du fMLP, du LPS (classe de différenciation 14 (CD14)) et le récepteur du Fc $\gamma$ III[42, 43]. Ceci nous montre le rôle important des granules dans l'activation, la migration et l'élimination des microorganismes par le neutrophile et sa capacité dynamique à répondre et s'activer face à un stimulus inflammatoire (voir figure 3).

## **D]** Explosion oxydative du neutrophile

L'efficacité du neutrophile à éliminer les pathogènes lors d'infection est aussi liée à sa fonction d'explosion oxydative provenant d'un mécanisme de production de ROS constituées d'anions superoxyde ( $O_2^-$ ) et de dérivés radicaux de l'oxygène[44, 45]. La production des ROS dépend du complexe NADPH-oxydase qui se forme de la pré-activation à l'activation du neutrophile par le biais de différentes voies de signalisation. L'activation de ces voies s'effectue par les récepteurs de cytokine, les intégrines, les récepteurs Fc, les TLRs, la phagocytose elle-même, et contribue à la formation du complexe NADPH-oxydase. Une fois le complexe NADPH formé, ce dernier produit des anions superoxyde ( $O_2^-$ ) par transfert d'électron de la NADPH vers les molécules d'oxygène. Les anions superoxyde ( $O_2^-$ ) servent également à produire du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) pouvant former avec les granules contenant la MPO de l'acide hypochloreux (HOCl). En addition, l'ion ferreux ( $Fe^{3+}$ ) peut oxyder l' $H_2O_2$  et l' $O_2^-$  pour former un radical hydroxyle (OH $\cdot$ ). Le neutrophile utilise ensuite les ROS produits pour éliminer les pathogènes contenus dans les phagosomes suite à leur phagocytose, ou les libère depuis la membrane vers le milieu extracellulaire (voir figure 3). Cette fonction du neutrophile est finement régulée par la formation du complexe NADPH-oxydase, et ceci car cet outil peut s'avérer très dangereux pour le tissu de l'hôte. L'explosion oxydative n'est toutefois pas la seule arme à disposition du neutrophile pour lutter contre les infections, ce dernier peut également former des pièges extracellulaires favorisant la capture et l'élimination des pathogènes.

## **E]** Production de pièges extracellulaires par les neutrophiles (NETs pour « Neutrophils Extracellular Traps »).

Cette fonction antimicrobienne des neutrophiles a été découverte en 2004 et consiste en un piège extracellulaire qui leur permet de capturer et d'éliminer les pathogènes par le relargage de leur chromatine et d'autres molécules intracellulaires dans le milieu extracellulaire[46] (voir figure 3). Les NETs sont composés de la chromatine, des histones (H1, H2A, H2B et H4), du contenu des granules azurophiles (élastase, MPO, cathepsine G), secondaires (lactoferrine, cathélicidine) et tertiaires (métalloprotéinases matricielles (MMPs))[47]. Bien que cette fonction des NETs soit efficace pour lutter contre les pathogènes, nous n'avons pas encore élucidé complètement leur rôle ou leur mécanisme d'activation. À ce jour, le mécanisme de leur formation semble complexe et varié puisque selon les stimuli, ou pathogènes (microbes, champignons etc.) rencontrés, leur

formation serait dépendante ou indépendante de PAD4 (« Peptidyl arginine deaminase 4 ») et aussi, simultanément dépendante ou non, du complexe NADPH-oxydase[48-53]. Il existe pour l'instant trois différents types de NETs classifiés selon les changements morphologiques du neutrophile.

Les NETs formés durant la mort du neutrophile de manière dépendante du complexe NADPH sont appelés les NETosis suicides (« Suicidal » NETosis)[54], et sont activés par différents stimuli (PMA (« phorbol 12-myristate 13-acetate »), IL-8, bactéries, champignons, virus, complexes immuns (Antigène et anticorps) et auto-anticorps [46, 54-60]. La formation de ces NETs suicides survient avec la dissolution des membranes nucléaires et des granules, suivie de la décondensation de la chromatine qui se disperse dans le cytoplasme se mélangeant avec les protéines cytoplasmiques. La dissolution de la membrane plasmique survient en dernier et libère ce contenu dans le milieu extracellulaire formant le NETosis[54].

Un deuxième type de NETs est formé sans induire la mort du neutrophile et est nommé les NETosis vitaux (« Vitals NETosis »). À l'inverse des NETosis suicides, les NETosis vitaux se forment plus rapidement et conservent le neutrophile ainsi que ses fonctions intactes[58, 61, 62]. Le neutrophile libère les NETs vitaux sans induire sa mort cellulaire et sans rupture de sa membrane. Ce serait un mécanisme TLR-2-dépendant qui régulerait la formation des NETosis[58, 62].

Le troisième type de NETs se nomme les NETs mitochondriaux puisque le neutrophile libère l'ADN mitochondrial dans le milieu extracellulaire en guise de piège extracellulaire[63]. Ce relargage de l'ADN mitochondrial de manière dépendante des ROS a été observé lorsque les neutrophiles étaient traités au GM-CSF (« Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor ») et stimulés au LPS ou avec le facteur du complément 5a[63]. Les NETs mitochondriaux n'induisent pas la mort cellulaire du neutrophile, et bien que plusieurs études commencent à s'intéresser à ce mécanisme en particulier dans différents contextes, ce dernier n'est pas encore précisément connu[64, 65].

Ceci montre la capacité du neutrophile à produire des NETs de façon adaptée au contexte inflammatoire ou au pathogène à éliminer. Le contenu des NETs leur confère leur rôle antimicrobien d'une part, mais d'autre part certaines molécules relarguées par la formation des NETs constituent des DAMPS, qui vont accentuer l'inflammation et risquer de causer des

dommages au tissu sain, ce qui fait des NETs une arme dangereuse qui, lorsque mal régulée, serait impliquée dans diverses maladies[66].

Le neutrophile, bien que redoutable dans cette fonction d'élimination des pathogènes, possède un atout supplémentaire dans la réponse inflammatoire puisqu'il participe aussi à l'organisation de celle-ci.

#### **F] Médiateurs inflammatoires produits par le neutrophile**

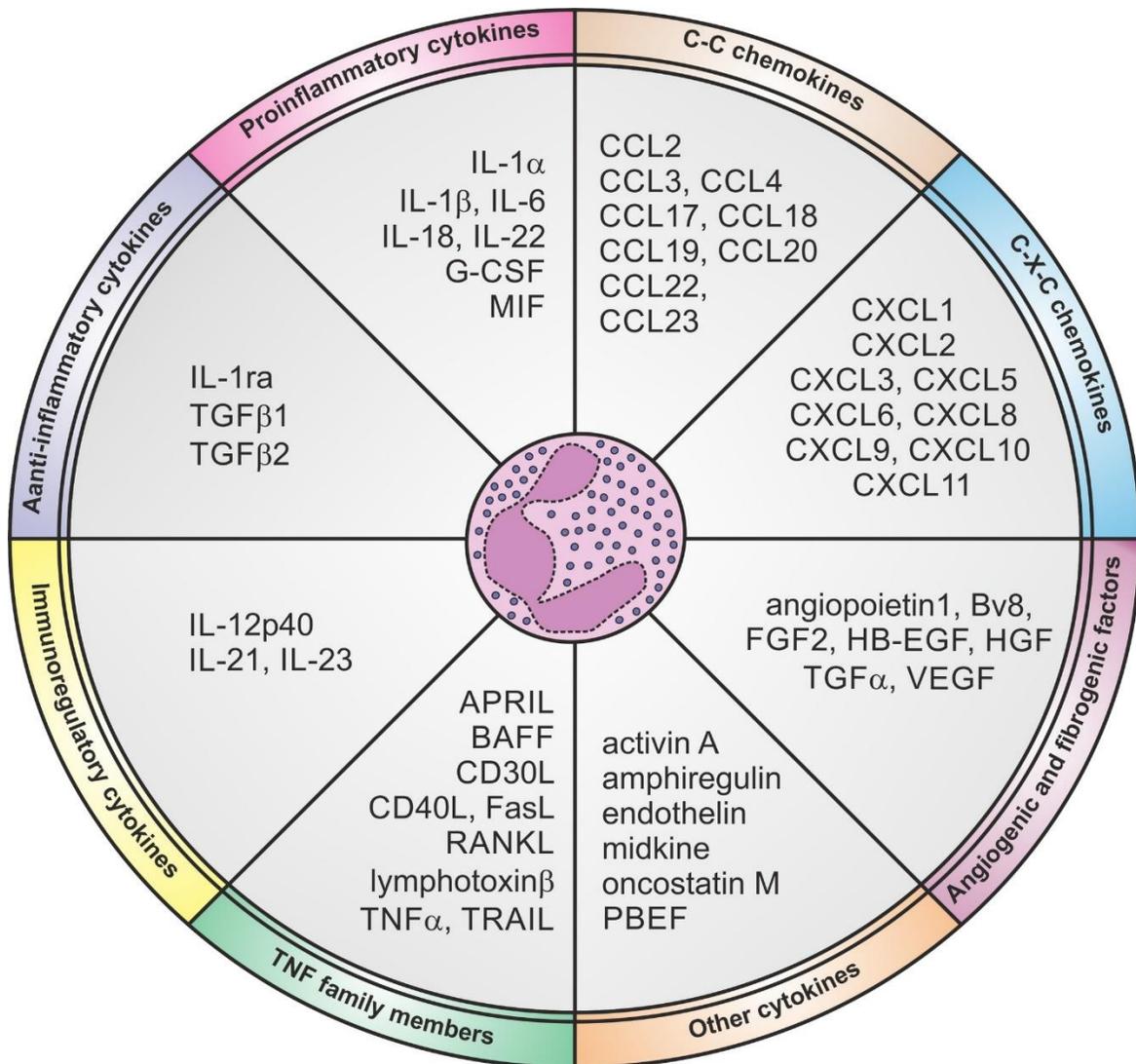
Le neutrophile participe et orchestre la réponse inflammatoire par la production et libération de médiateurs peptidiques (cytokines et chimiokines) ou lipidiques[67-69] (voir figure 3). La liste exhaustive des différentes molécules exprimées ou excrétées par le neutrophile, observées *in vitro* ou *in vivo*, est détaillée dans plusieurs revues dans la littérature (voir figure 4) [70, 71]. Nous allons nous intéresser rapidement aux fonctions de la réponse inflammatoire que le neutrophile peut moduler *via* les médiateurs qu'il produit. Les multiples cytokines que le neutrophile peut produire appartiennent à plusieurs familles se regroupant en cytokines pro-inflammatoires, anti-inflammatoire, les membres de la superfamille des TNF, des facteurs de croissance angiogènes et fibrinogènes. Ce panel de cytokines suggère la capacité du neutrophile à influencer bien plus que l'inflammation et la réponse immune innée, mais aussi la défense contre les virus, la guérison des blessures, l'hématopoïèse, l'angiogénèse et la fibrinogénèse.

La production de chimiokines par le neutrophile est essentielle car cela permet aux neutrophiles d'influencer leur propre recrutement ainsi que celui de différentes populations cellulaires au site inflammatoire. Ceci est d'autant plus pertinent que les neutrophiles font partie des premières cellules recrutées au site inflammatoire et cela leur permettrait de réguler le flux de cellules recrutées[68, 72, 73] et d'orchestrer la réponse inflammatoire par la production de médiateurs lipidiques ou de cytokines pro-inflammatoires, anti-inflammatoires ainsi que celle de la famille des TNF qui activeront les cellules recrutées. Par exemple, les neutrophiles produisent du leucotriène B4 un lipide inflammatoire qui favorise l'activation et l'agrégation des macrophages[74]. Les neutrophiles sont aussi les cellules produisant le plus de CXCL8 (ou IL-8), qui est la chimiokine majeure dans le recrutement et l'activation des neutrophiles [75]. Les différentes chimiokines libérées par les neutrophiles au site inflammatoire vont favoriser le recrutement de ces derniers ainsi que celui des monocytes, cellules dendritiques, NK, et des cellules T, ce qui suggère leur rôle à orchestrer le recrutement et l'activation sur le site

inflammatoire des différentes populations leucocytaires[68, 72, 76]. Cette idée est renforcée également par le rôle supplémentaire attribué aux chimiokines qui confèrerait la capacité aux neutrophiles de coordonner la réponse immune adaptative, car celles-ci peuvent réguler le développement et la réponse des cellules B et T ainsi que l'angiogenèse[77].

Les cytokines pro-inflammatoires produites par le neutrophile quant à elles jouent un rôle important dans leur activation et dans celle des autres leucocytes recrutés. Les neutrophiles sont par exemple les producteurs majeurs des cytokines BAFF et APRIL (« B Cell-Activating Factor » et « A Proliferation-Inducing Ligand » respectivement) qui sont responsables de la survie et de l'activation des cellules B[78]. Sur le site inflammatoire les cytokines pro-inflammatoires, anti-inflammatoires et immuno-régulatrices produites par les neutrophiles (exemple : IL-1 $\beta$  ; TNF- $\alpha$ ) vont agir directement sur le recrutement et l'activation des différents leucocytes[79, 80]. Ces cytokines peuvent avoir des effets pléiotropes qui vont varier selon le contexte inflammatoire et le cocktail de stimuli présent.

Les neutrophiles sont souvent considérés pour leur rôle à induire l'inflammation, mais il est important de reconnaître leur rôle dans la résolution de cette dernière. Ce rôle est possible notamment par la production de médiateurs favorisant la résolution de la réponse inflammatoire[81]. Durant la phase finale de l'inflammation les neutrophiles vont modifier leur production de médiateurs pro-inflammatoires, vers une production de médiateurs anti-inflammatoire, que ce soit en termes de cytokines (exemple : IL-1RA) ou de lipides (exemple : lipoxine A4; résolvines E1; E2; D1; D2, protectine D1), permettant d'inhiber la migration et l'activation des neutrophiles[81-85].



**Figure 4** Liste des médiateurs peptidiques produit par le neutrophile

Illustration qui regroupe les différentes cytokines potentiellement produites par les neutrophiles selon leur effet. Cette illustration montre la capacité du neutrophile à pouvoir influencer la réponse inflammatoire et immune, ainsi que l'hématopoïèse, l'angiogénèse et la fibrinogénèse, adapté de [70].

### G] Apoptose des neutrophiles

L'apoptose des neutrophiles est un mécanisme impliqué dans la phase finale de l'inflammation et dans sa résolution (voir figure 3). L'élimination des neutrophiles apoptotiques est une étape importante dans la résolution de l'inflammation[86]. Les corps apoptotiques des neutrophiles vont induire des signaux (appelés les signaux mangez-moi pour « eat-me signals ») pour être

phagocytés par les macrophages et permettre de modifier le phénotype de ces phagocytes[87, 88]. Les macrophages vont ainsi se mettre à produire des cytokines anti-inflammatoires (TGF- $\beta$  (« Transforming Growth Factor- $\beta$  »), IL-10)[89]. Le phénotype régulateur de ces macrophages ayant phagocytés les corps apoptotiques des neutrophiles permet de réguler négativement l'inflammation et d'induire la réparation tissulaires[90, 91].

Les neutrophiles sont des acteurs majeurs dans l'immunité innée et dans l'organisation de la réponse inflammatoire et dans la coordination de la réponse adaptative[73, 92-100]. Le neutrophile est une cellule active complexe[101] capable d'éliminer les pathogènes, de produire des cytokines[102], et de moduler l'activité des cellules environnantes et de contribuer également à la réponse immune adaptative[103, 104] ainsi qu'à la résolution de l'inflammation[105, 106]. Les différentes fonctions du neutrophile sont modulées par des récepteurs activateurs et inhibiteurs regroupés sous l'appellation de récepteurs immunomodulateurs qui activent le neutrophile dans la réponse inflammatoire. Parmi les multiples récepteurs capables de moduler l'activation des neutrophiles, nous aborderons seulement la famille des lectines dont CLEC12A fais partie.

### **Récepteurs immunomodulateurs**

La réponse inflammatoire des cellules immunitaires s'orchestre par les récepteurs présents à leur surface modulant leur activation et permettant un équilibre entre homéostasie immunitaire et dommage tissulaire. Ce processus est régulé par les récepteurs immunomodulateurs qui induisent des signaux activateurs ou inhibiteurs dans les cellules immunitaires. Les signaux activateurs et inhibiteurs induits par les récepteurs constituent un équilibre nécessaire pour maintenir l'homéostasie immunitaire. Il existe plusieurs familles de récepteurs tels que les récepteurs couplés aux protéines G, les PRR, les récepteurs à motif tyrosine activateurs ou inhibiteurs, intervenant dans l'activation, l'inhibition, la différenciation ou encore la survie cellulaire. La capacité de ces récepteurs à reconnaître des ligands du soi ou du non soi, tels que les cytokines, les facteurs chimiotactiques, les chimiokines ou encore les PAMPs et les DAMPs permettent de moduler les fonctions des cellules immunitaires et la réponse inflammatoire. Nous aborderons les récepteurs à motifs activateurs et inhibiteurs qui se divisent en deux familles majeures à savoir les immunoglobulines et les lectines. CLEC12A faisant partie de la famille des lectines, nous nous intéresserons à cette dernière.

## **Les CLR (« C-type Lectin Receptor » ou « C-type Lectin-like Receptor »)**

La famille des lectines de type C représente une famille importante de PRR jouant un rôle primordial dans l'homéostasie et l'immunité anti-microbienne[107]. Cette famille de récepteur est diversifiée car elle se divise en 17 groupes (nommés en chiffres romains de I à XVII) regroupant environ mille protéines[107, 108]. Les différences structurelles et les diverses fonctionnalités de cette famille ont permis de les classer pour développer une nomenclature.

### **Nature des ligands reconnus par les CLR**

Il est important de se rappeler qu'à l'origine le terme CLR désignait les récepteurs calcium dépendant (de type C) reconnaissant des carbohydrates (lectine). La liaison calcium dépendante était caractéristique de ce groupe par la présence d'un domaine spécifique compact de reconnaissance des carbohydrates CRD (« Carbohydrates Recognition Domain »), absent des autres lectines indépendantes du calcium[109-112]. Ce domaine contenant les CRD fut renommé CRD de type C pour les liaisons aux carbohydrates de type calcium dépendante et celui n'en possédant pas CTLD pour « C-type Lectin Domain » pour les liaisons indépendantes du calcium[110, 113].

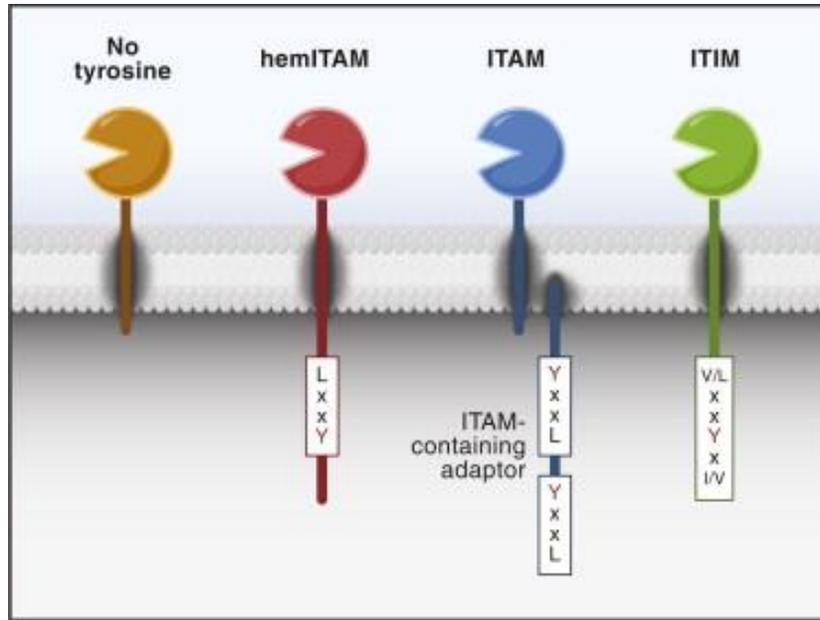
Cependant, dû à l'augmentation des découvertes et de l'ajout de nouvelles séquences de CLR, il devient évident que les CLR sont capable de reconnaître d'autres motifs que les carbohydrates, bien que possédant un CRD ou CTLD. À cause de cette contradiction, le terme de domaine similaire aux lectines de type C apparut, s'abrégant aussi CTLD pour « C-type Lectin-like Domain », pouvant prêter à confusion. Les CLR capables de reconnaître des motifs exogènes et endogènes tels que des glycanes, des lipides et des protéines notamment[114, 115] ne se lient pas exclusivement aux carbohydrates. Ces récepteurs ne liant pas les carbohydrates ne sont donc pas des lectines et font tout de même partie de cette famille de CLR et sont appelés des récepteurs similaires aux lectines de type C communément appelés sous la même abréviation de CLR pour « C-type Lectin-like receptors »[116-118]. Nous retrouvons ainsi dans la littérature la dénomination de CLR pour les récepteurs lectines de type C ou les récepteurs similaires aux lectines de type C (dépendants et indépendants du calcium), possédant un ou plusieurs CTLD pour les domaines de lectine de type C (dépendants et indépendants du calcium) et les domaines similaires aux lectines de type C (liant d'autres ligands que les carbohydrates).

## Les CLR modulant les cellules immunitaires

Les CLR peuvent être solubles ou des récepteurs transmembranaires de type 1 et 2. Les récepteurs transmembranaires de type 1 regroupent la famille des récepteurs de reconnaissance du mannose (groupe : II) et le type 2 vient de différents groupes comme les asialoglycoprotéines (ou glycoprotéines désialysées du groupe : II) ou du groupe des récepteurs du complexe de gène NK (« Natural Killer ») (groupe : V, qui malgré son appellation n'est pas exclusif à l'expression dans les cellules NK). Ces différents groupes de CLR peuvent reconnaître un panel varié de PAMPs, et participent ainsi à reconnaître les bactéries[108], les champignons[119], les virus[120, 121], les parasites[122, 123], des DAMPs[3, 124] tels que les cellules mortes, et à activer les cellules immunitaires d'origine majoritairement myéloïde (voir figure 6).

Les CLR suite à la reconnaissance de leur ligand (PAMPs ou DAMPs) vont induire une voie de signalisation activatrice ou inhibitrice selon le motif intracellulaire qu'ils possèdent. Le motif activateur est un ITAM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif ») tandis que le motif inhibiteur est un ITIM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif ») (Voir figure 5).

Certains CLR ne possèdent aucun de ces deux motifs, et vont former des hétérodimères avec d'autres récepteurs possédant un motif ITAM (tels que d'autres CLR, ou le récepteur FcRγ de la famille des immunoglobulines)[125]. Les CLR sont donc capables de se déplacer à la surface membranaire des cellules et de former des homo ou hétéro-oligomères. L'activation des CLR par la reconnaissance de leur ligand induit un regroupement des récepteurs (appelé « clustering ») entre eux dans des domaines membranaires spécifiques (connus sous le nom de radeaux lipidiques) permettant à une kinase de la famille des Src kinases de phosphoryler les résidus tyrosines présents dans le motif ITAM ou ITIM intracellulaire[107, 126, 127].



**Figure 5** Les motifs de signalisation par les tyrosines des CLR.

Les CLR peuvent se regrouper selon le motif intracellulaire basé sur les tyrosines qu'ils possèdent, à savoir un motif ITAM (YxxL/Ix(6-12)YxxL/I (Y= tyrosine; L= leucine; I= Isoleucine; X= un acide aminé)) ou ITIM S/I/V/LxYxxL/V (Y= tyrosine; L= leucine; I= Isoleucine ; S = Sérine ; V= Valine ; X= un acide aminé). Il y a les CLR sans motif, ceux avec un motif hemITAM (YxxL/I (Y= tyrosine; L= leucine; I= Isoleucine)), ceux utilisant une protéine adaptatrice avec un motif ITAM complet (DAP12 ou FcRγ), ou un motif ITIM. Adapté de [128].

### Signalisation des CLR à motif ITAM ou hemITAM

Le motif intracellulaire ITAM correspond au motif YxxL/Ix(6-12)YxxL/I (Y= tyrosine; L= leucine; I= Isoleucine; X= un acide aminé), un motif dit activateur (voir figure 5). Lorsque les deux tyrosines sont phosphorylées par une kinase de la famille des Src kinases, elles vont pouvoir recruter la tyrosine kinase Syk. C'est majoritairement la tyrosine kinase Syk qui sera recrutée par la liaison de ses deux domaines SH2 aux tyrosines phosphorylées du motif ITAM[129, 130]. Certains CLR possèdent un hemITAM qui correspond à un seul motif YxxL/I, comme dectin-1 connu sous le nom de CLEC7a, qui va se dimériser après la reconnaissance des β-1-3 glucanes exprimés sur les champignons pour recruter Syk[131, 132]. Le recrutement de Syk par les motifs ITAM va généralement permettre l'activation de la voie NF-κβ (« *Nuclear factor-kappa β* ») par la formation d'un complexe avec CARD9 (« caspase recruitment domain family member 9 »), MALT1 (« mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1 ») et BCL-10 (« B

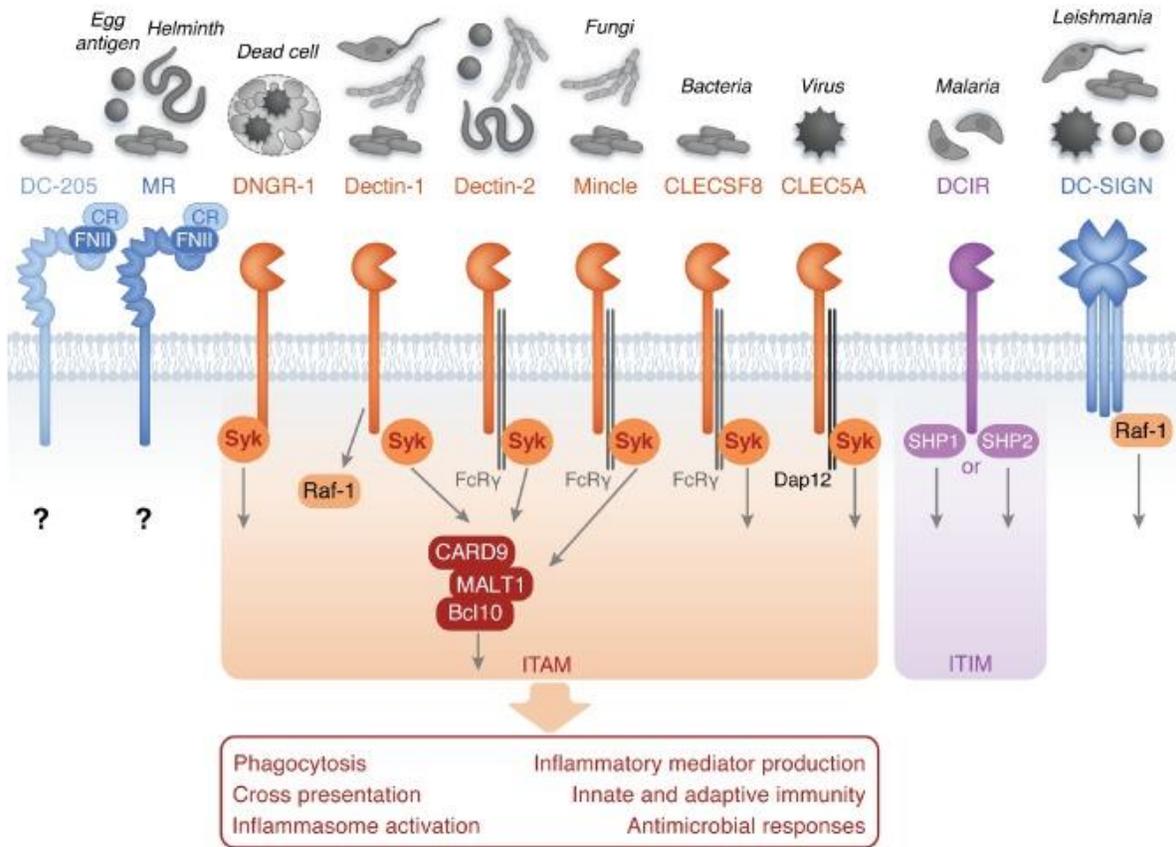
cell lymphoma 10 »)[107, 133, 134] (voir figure 3). Bien que la voie NF- $\kappa$ B semble être la voie majeure activée par les CLR, ceux-ci vont activer d'autres voies telles que les MAPK, les PI3K-Akt, le complexe NLRP3 (« *Nucleotide Oligomerization Domain*-like receptor family, pyrin domain containing 3 ») inflammasome ou la sérine/thréonine kinase RAF1[135-139] (voir figure 6).

Les CLR sans motif vont s'associer à d'autres récepteurs, tels que DAP12 et Fc $\gamma$ R qui possèdent un motif ITAM et jouent le rôle de protéines adaptatrices porteuses du motif ITAM (voir figure 3). Le recrutement de Syk par les CLR associés avec les protéines adaptatrices avec un motif ITAM, va pouvoir influencer également les voies d'activation décrites précédemment[128].

### **Signalisation des CLR à motif ITIM**

Le motif ITIM correspondant à la séquence S/I/V/LxYxxL/V (Y= tyrosine; L= leucine; I= Isoleucine ; S = Sérine ; V= Valine ; X= un acide aminé) est un motif dit inhibiteur (voir figure 5). Les CLR arborant un motif ITIM ne sont que peu connus à l'heure actuelle, et à notre connaissance actuelle il y a le DCIR (« DC Inhibitory Receptor »), CLEC12A (connu sous le nom de MICL pour « Myeloid Inhibitory C-type Lectin-like Receptor »), et CLEC12B ou Ly49Q[128]. L'activation de ces récepteurs induirait la phosphorylation de leur motif ITIM, qui vont recruter des phosphatases (exemple : SHP-1 ; SHP-2, SHIP-1). Les phosphatases recrutées au motif ITIM pourront être phosphorylées par des kinases afin de les activer à leur tour. Les phosphatases activées iront directement déphosphoryler des voies d'activations subséquentes responsables de la production de cytokines pro-inflammatoires comme celles induites par les TLRs par exemple[140-143].

Le manque de connaissances sur les voies de signalisation de ces CLR avec un motif ITIM, ne nous empêche pas de réaliser que ces récepteurs servent à contrôler l'intensité d'activation des cellules myéloïdes[144, 145] et jouent un rôle crucial dans la réponse inflammatoire. Les CLR, suite à la reconnaissance de PAMPs ou de DAMPs, vont pouvoir moduler les fonctions de phagocytose, de production de médiateurs pro-inflammatoires, de ROS et d'autres molécules aux propriétés anti-microbiennes[132, 146-148] durant la réponse inflammatoire (voir figure 6).



**Figure 6** Illustration de quelques CLR, leur ligand et voie de signalisation.

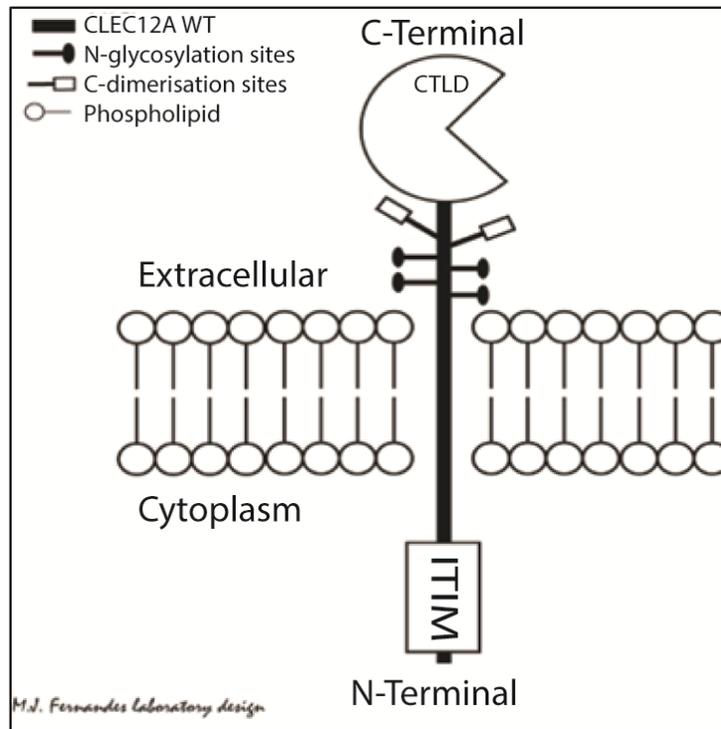
Illustration de différents CLR et de leur ligand dont la reconnaissance permet la phosphorylation de leur motif ITAM ou ITIM par une kinase, ici Syk, et ceux n'en possédant pas s'associant à DAP12 ou au FcR $\gamma$  pour induire leur signal intracellulaire permettant de modifier la réponse cellulaire (exemple : phagocytose, activation de l'inflammasome, réponse antimicrobienne, production de cytokines pro-inflammatoires, ou inhibition des voies d'activation par le recrutement de déphosphatases). Adaptés de [115].

Le rôle des récepteurs activateurs et inhibiteurs est étudié pour leur capacité à moduler les cellules immunitaires, ce qui leur confère un potentiel thérapeutique pour traiter les maladies inflammatoires[149]. Parmi les multiples récepteurs, l'équipe de Marshall a identifié le récepteur CLEC12A en 2004 qui possède le potentiel de réguler négativement l'activation des cellules d'origines myéloïdes[143].

## **Le récepteur inhibiteur CLEC12A**

### **Expression et structure du récepteur CLEC12A**

CLEC12A est un récepteur inhibiteur transmembranaire de type II exprimé chez les cellules d'origines myéloïdes (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques) appartenant au groupe V de la famille des CLR [143]. La caractérisation en 2004 de CLEC12A par Andrew S.J. Marshall et al, révèle les éléments structuraux du récepteur. CLEC12A possède une portion cytoplasmique contenant un motif ITIM lui conférant sa nature de récepteur immunomodulateur, une portion transmembranaire suivie d'une portion extracellulaire contenant une tige extracellulaire et un motif CLTD propre aux lectines. La séquence de CLEC12A comporte 265 acides aminés avec une masse approximative de 31 kDa. La tige extracellulaire (ou région du cou) contient 4 sites de N-glycosylation ainsi que deux cystéines supposées jouer un rôle dans l'oligomérisation du récepteur (Voir figure 7)[143]. Le récepteur apparaît fortement glycosylé sur ces 4 sites de N-glycosylation, et cette glycosylation varie entre les types cellulaires (monocytes, macrophages M1 et M2, cellules dendritiques et neutrophiles)[150]. Le gène codant la protéine de CLEC12A se situe dans le chromosome 12 (locus 12p13.31), situé dans le complexe de gènes « natural killer » qui exprime plusieurs lectines du groupe V dont celle possédant le plus d'homologie avec la séquence de CLEC12A (LOX-1, BGR, CLEC-1 et CLEC-2)[143]. Le fait que la séquence de CLEC12A appartienne à ce complexe de gènes signifie que, CLEC12A est un récepteur immunomodulateur, comme beaucoup de CLR, jouant un rôle important dans l'homéostasie immunitaire.



**Figure 7** Structure de CLEC12A

La portion N-terminale est localisée dans le cytoplasme et possède le motif ITIM (séquence VTYADL), la portion transmembranaire est suivie de la région du cou composée de 4 motifs de N-glycosylation ainsi que de sites d'oligomérisation avec deux cystéines. La portion C-terminale possède le motif CTLD de la famille des lectines.

### **CLEC12A est un récepteur inhibiteur des cellules myéloïdes**

CLEC12A est un récepteur inhibiteur qui suscite de l'intérêt en raison de son potentiel de contrôle de l'activation des cellules de l'immunité innée. La présence du motif ITIM de CLEC12A suggère un potentiel dans le contrôle de l'inflammation et de l'activation des cellules d'origines myéloïdes[143, 150]. Ce potentiel est renforcé par l'observation dans des lignées cellulaires du recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 au motif ITIM de CLEC12A[143]. Une autre étude souligne cette capacité de contrôle de l'activation des cellules myéloïdes durant l'inflammation car des expériences sur des cultures cellulaires et un modèle animal montrent que durant l'activation de la réponse inflammatoire l'expression de CLEC12A à la surface des cellules myéloïdes diminue[150]. L'intérêt de CLEC12A par rapport à d'autres récepteurs vient du fait que des études sur des modèles animaux et des associations génétiques démontrent son rôle dans divers contextes pathologiques inflammatoires. Le rôle du récepteur inhibiteur CLEC12A dans

la pathogenèse de la goutte et de la polyarthrite rhumatoïde a déjà été rapporté [151-153]. Des souris « *Knock-Out* » (K.O) pour le récepteur CLEC12A souffrent d'une réponse inflammatoire exagérée dans un modèle d'arthrite rhumatoïde induit par injection d'anticorps monoclonaux contre le collagène [154]. D'autres expériences sur des souris K.O pour le récepteur CLEC12A montrent une réponse inflammatoire aggravée à la suite de l'injection de cellules mortes ou de cristaux d'urate monosodique (UMS)[155]. Il y a également des associations génétiques et biologiques qui ont été mises en évidence entre CLEC12A et d'autres maladies inflammatoires chroniques à savoir le syndrome de Behçet, l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn [156-158].

Ceci suggère que CLEC12A est un récepteur important dans la réponse inflammatoire et donc que comprendre son rôle dans les maladies inflammatoires chroniques apporterait des connaissances et des nouvelles pistes thérapeutiques. Pour ce faire, il faut caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans le fonctionnement du récepteur et à l'induction de son signal intracellulaire permettant de moduler les fonctions cellulaires chez le neutrophile notamment. La caractérisation des récepteurs immunomodulateurs comme CLEC12A est une étape clé pour comprendre leur rôle dans les pathologies ou ils sont associés. C'est pour cela que nous allons nous intéresser au fonctionnement des récepteurs, et comprendre comment ils s'activent et comment leur signal est transmis dans la cellule pour en modifier la réponse cellulaire.

### **Mécanisme de signalisation des récepteurs immunomodulateurs**

Les récepteurs immunomodulateurs jouent un rôle important dans l'homéostasie immunitaire par leur capacité à détecter des PAMPs, des DAMPs ou des antigènes du soi et d'induire un signal intracellulaire permettant de moduler les fonctions des cellules immunitaires[159-161]. Ceci permet une réponse adaptée selon les ligands présents dans l'environnement (présence de pathogènes, molécules pro-inflammatoires) qui sont captés par les récepteurs. Toutefois, les récepteurs ne peuvent directement modifier la réponse cellulaire (expression de gènes pro-inflammatoires par exemple) depuis la membrane et doivent relayer un signal intracellulaire par le biais de messagers secondaires. Les messagers secondaires vont relayer entre eux le signal d'activation produit par la reconnaissance du ligand via le récepteur. Les messagers intracellulaires recrutés et activés vont constituer une cascade de signalisation regroupée sous

différentes voies de signalisations telles que la voie MAPK ou des PI3K-akt menant à l'activation de fonctions cellulaires, comme la phagocytose, ou de facteurs de transcription tels que le NF- $\kappa$ B qui induit la transcription de gènes pro-inflammatoires qui produiront des cytokines. Nous allons voir ici les mécanismes moléculaires principaux intervenant dans l'activation des récepteurs immunomodulateurs et des voies de signalisations intracellulaires.

### **Liaison du ligand et oligomérisation des récepteurs**

La reconnaissance du ligand est la première étape impliquée dans la voie de signalisation des récepteurs. La reconnaissance des PAMPs et des DAMPs par les PRR situés à la membrane des cellules va induire l'activation de ces récepteurs suivi de l'induction de leurs signalisations. Brièvement, la liaison d'un récepteur avec son ligand s'effectue selon leur affinité (la force de leur liaison), et induit l'activation du récepteur à la suite du changement conformationnel que cette liaison provoque. Toutefois lorsqu'un ligand se lie à plusieurs domaines sur un même récepteur, sur plusieurs récepteurs, ou plusieurs ligands sur un même récepteur on obtient un effet d'avidité. Par exemple, suite au contact d'une bactérie vivante avec une cellule, la quantité de ligands disponibles et de récepteurs qui se lieront avec leur ligand augmente la force du signal intracellulaire induit par avidité [162]. Ce phénomène permet d'adapter l'intensité du signal émis par l'activation de plusieurs récepteurs et de la réponse cellulaire[163]. L'oligomérisation va jouer un rôle important dans ce phénomène puisqu'elle va permettre la formation d'oligomères de récepteur. Cette interaction de récepteurs entre eux peut s'effectuer par un rapprochement induit par la reconnaissance d'un même ligand ou par la formation de ponts disulfures (SH-SH) par les résidus cystéines entre les récepteurs, ou par association de domaines spécifiques [164, 165]. Par exemple, les TLRs subissent un changement conformationnel par la liaison de leur ligand ce qui leur permet de former des homo ou hétérodimères afin de rendre leur domaine intracellulaire (le motif TIR) disponible au recrutement de protéines de signalisation[166]. L'oligomérisation est un mécanisme essentiel dans la signalisation des récepteurs, puisqu'elle permet de regrouper plusieurs récepteurs entre eux permettant de favoriser l'induction de leur signal. Les récepteurs dépourvus de motif de signalisation intracellulaire dépendent de la formation d'oligomères avec d'autres récepteurs adaptateurs contenant un motif de signalisation tel que nous le verrons avec certaines lectines de type C.

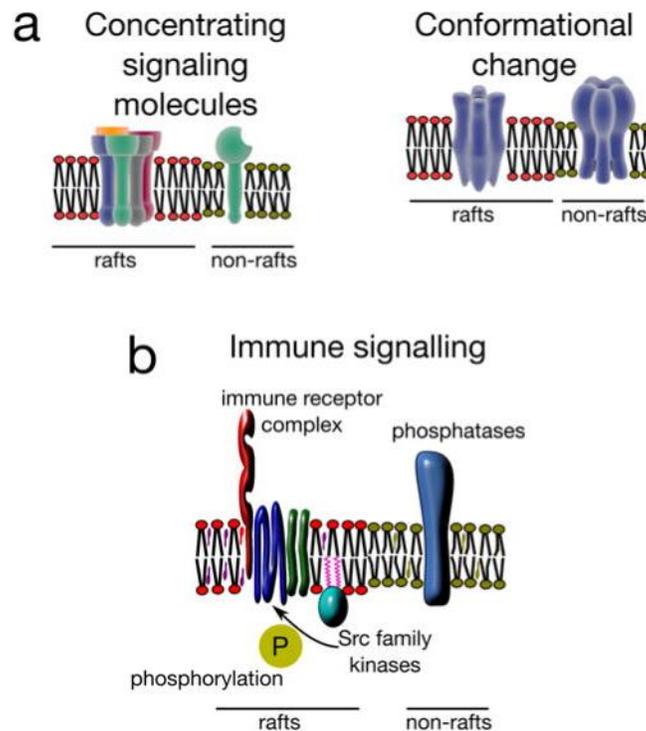
La capacité à former des oligomères apparaît comme un mécanisme important dans la signalisation des récepteurs. Un autre mécanisme clé dans la signalisation des récepteurs vient des domaines membranaires spécifiques faisant office de plateforme de signalisation.

### **Rôle des plateformes de signalisation, les radeaux lipidiques**

La membrane plasmique sépare le milieu extracellulaire du milieu intracellulaire, et bien que son rôle de barrière soit évident, son rôle d'organisation spatiale des récepteurs et des lipides est tout aussi important. En effet, la membrane plasmique cellulaire détermine ce qui entre et sort de la cellule mais sert aussi d'outil de signalisation orchestrant les signaux provenant du milieu extracellulaire et de l'intérieur de la cellule pour former la réponse cellulaire. La composition en lipides des membranes plasmiques fût considérée dans un premier temps comme désordonnée avec une répartition et un déplacement libre des protéines au travers de cette membrane. Maintenant, la membrane plasmique est vue comme une couche de lipides organisés, avec des domaines spécifiques plus petits, structurés, et enrichis en protéines et lipides (cholestérol, sphingolipides, protéines à ancre GPI). Les microdomaines membranaires sont communément appelés radeaux lipidiques de par leur composition enrichie en lipides (cholestérol, sphingolipides) et leur habilité à se déplacer librement dans la membrane plasmique[167]. Les radeaux lipidiques sont devenus une caractéristique importante dans les réactions biologiques ayant lieu à la membrane grâce à leur capacité à former des microdomaines spécialisés avec des compositions et des propriétés distinctes. Plusieurs protéines impliqués dans la transduction de signal (voie de signalisation) furent détectées dans les radeaux lipidiques, et apportent des évidences dans le rôle des radeaux lipidiques à faciliter les interactions entre protéines en servant de plateforme de signalisation pour recruter les différentes molécules nécessaires à l'induction du signal[168]. L'étude biochimique des radeaux lipidiques réalisée par leur isolation dans des fractions résistantes aux détergents comme le triton X-100; se traduit par l'étude de domaines membranaires appelés DRM (pour « Detergent Resistant Membranes »)[169, 170].

Cette compartimentalisation spatiale des radeaux lipidiques intervient dans la signalisation de récepteurs, notamment les récepteurs de l'immunité innée. En effet, l'activation d'un récepteur, son oligomérisation ou encore son changement conformationnel prend place à l'intérieur de ces domaines qui favorise ces interactions (Voir Figure 4). Dans le cas des CLR par exemple, possédant le motif de signalisation ITAM ou ITIM, la translocation du récepteur dans les

radeaux lipidiques permet la phosphorylation de son motif grâce à l'exclusion de phosphatases et à la concentration des kinases[171, 172]. Les radeaux lipidiques interviennent dans la signalisation de récepteurs de l'immunité aussi bien innée qu'acquise faisant d'eux un mécanisme de signalisation important pour plusieurs récepteurs[173]. D'autres fonctions sont associées aux radeaux lipidiques et cela généralement en fonction de la composition de ces microdomaines, comme les microdomaines enrichis en flotilline-1 et flotilline-2 qui jouent un rôle dans la signalisation de récepteurs, l'endocytose et dans l'interaction avec le cytosquelette d'actine de la cellule[174].



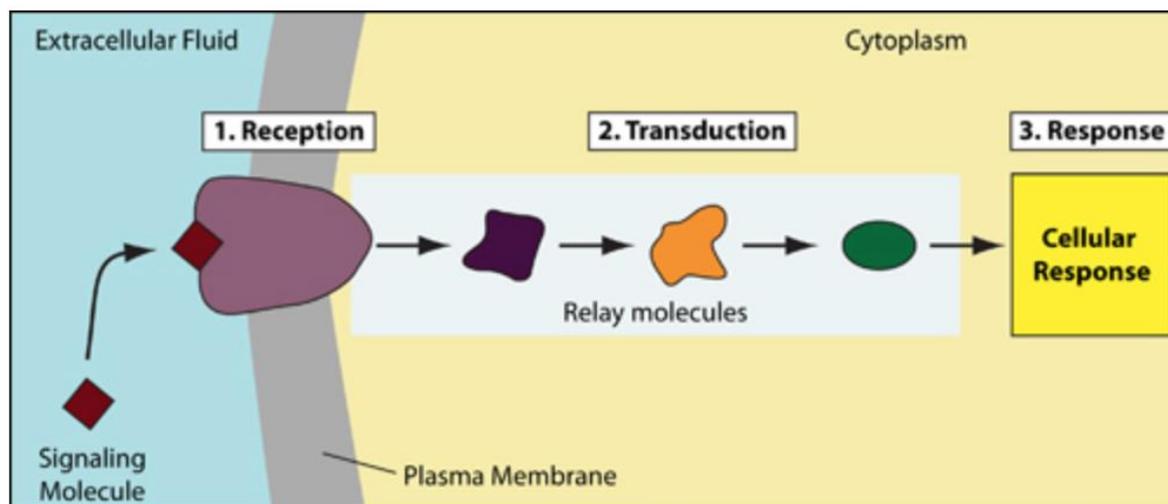
**Figure 8** Fonctions des radeaux lipidiques dans la signalisation.

L'illustration en (a) montre les mécanismes par lesquels les domaines membranaires peuvent potentiellement réguler l'activité de leurs composants. Les domaines peuvent concentrer certaines molécules, ce qui entraîne la mise en place de plateformes catalytiques fonctionnelles. Par exemple, l'enzyme et les substrats peuvent être rassemblés pour augmenter leur probabilité de rencontre et ainsi déclencher des réactions (par exemple, la transduction du signal). Une autre possibilité est que les environnements physico-chimiques distincts fournis par les radeaux lipidiques aient un impact direct sur la conformation des protéines, régulant ainsi leur activité. En (b) un exemple de rôle des domaines membranaires dans la signalisation de récepteur de l'immunité. Les kinases de la famille Src sont enrichies dans les radeaux lipidiques en raison de leur palmitoylation, alors que les phosphatases transmembranaires en sont généralement exclues. Cette ségrégation s'est avérée importante pour la signalisation immunitaire, où les kinases

associées aux radeaux sont impliquées dans la régulation de l'état de phosphorylation, et donc de l'activité de transduction du signal, de divers récepteurs immunitaires (y compris le récepteur des cellules T et le récepteur des IgE). Adaptée de [175].

### Activation des messagers et transduction du signal

La transduction d'un signal par un récepteur, suite à l'activation de ce dernier par la reconnaissance de son ligand, recrute des messagers secondaires ayant pour rôle de transmettre le signal en cascade pour activer des molécules et des facteurs de transcription qui dans le noyau induiront la transcription de gènes et la réponse cellulaire. Une illustration simplifiée de ce phénomène dans la figure 5 montre comment une voie de signalisation transmet son signal par le biais de molécules messagères intracellulaires.



**Figure 9** Illustration d'une voie de signalisation induite par un récepteur membranaire.

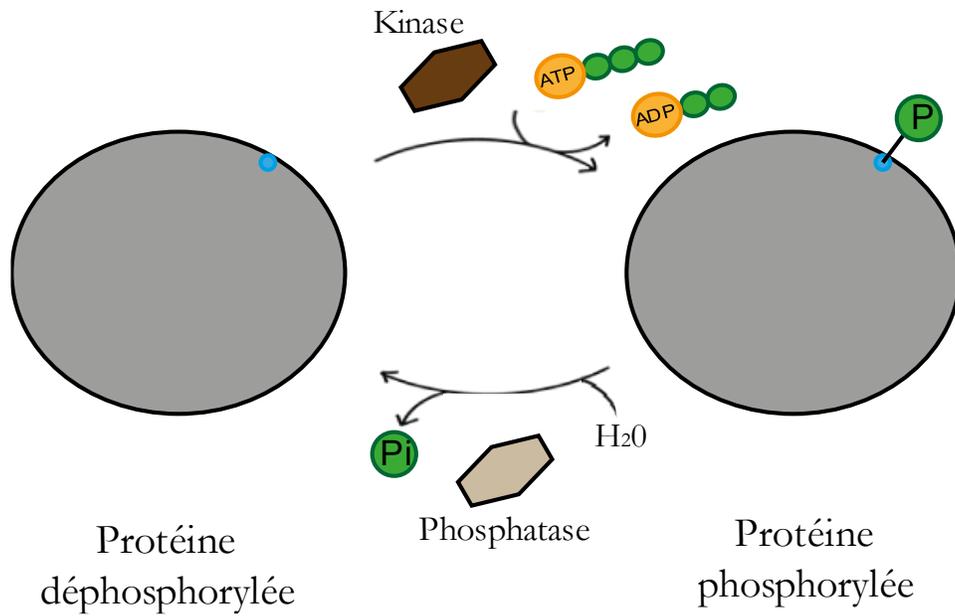
Le récepteur membranaire reconnaît son ligand (1. « Réception ») et va s'activer afin d'induire un signal intracellulaire. Ce signal est relayé en cascade par des messagers secondaires (2. « Transduction ») jusqu'à modifier la réponse cellulaire par l'activation de la transcription de gènes (3. « Réponse »). Adaptée de [176].

### La phosphorylation des protéines

Les différentes molécules impliquées dans la transduction du signal (que ce soit le récepteur ou les messagers secondaires) seront activées ou inactivées selon différents mécanismes. Le plus commun se nomme la phosphorylation et consiste en l'ajout d'un groupement phosphate à un ou plusieurs sites de la protéine. Le groupement phosphate ne peut se lier qu'avec trois acides aminés, ceux possédant un groupement hydroxyle (-OH) à savoir la tyrosine, la thréonine et la

sérine. Le groupement phosphate provient d'une molécule d'ATP (Adénosine TriPhosphate), ce dernier est transféré vers l'acide aminé d'une molécule cible par le biais d'une enzyme appelée communément une kinase qui catalyse ce transfert en produisant de l'ADP (Adénosine DiPhosphate)[177] (Voir figure 10). Nous retrouvons au sein d'une cellule différentes kinases pouvant phosphoryler différentes molécules (exemple la famille des Src Kinase composée de 9 membres : Src, Yes, Fyn, Fgr, Lck, Hck, Blk, Lyn, et Frk)[178]. Cette diversité de kinases et de cibles phosphorylées vient du fait que les kinases ne peuvent phosphoryler tous les résidus sérine, thréonine et tyrosine présents sur les protéines, mais seulement ceux présents dans des sites spécifiques possédant une séquence propre à différentes kinases. La phosphorylation est une modification réversible des protéines, et c'est une autre classe de kinase, les phosphatases, qui sont spécialisées dans la déphosphorylation des molécules de signalisation et qui relargueront un phosphate inorganique suite au retrait du groupement phosphate de la molécule ciblée. Ce phénomène de phosphorylation et déphosphorylation constitue un équilibre au sein de la cellule permettant aux protéines d'osciller entre des états activés ou inactivés afin de relayer et transmettre les signaux intracellulaires permettant de recruter les facteurs de transcription et de moduler les fonctions cellulaires. Ainsi l'activation de récepteurs par la phosphorylation de leur motif ITAM par exemple, permet de recruter des kinases qui pourront s'activer à leur tour pour phosphoryler d'autres kinases. Ce sont ces événements de phosphorylation en cascade relayés par les kinases entre elles telles que la voie des MAPK, PI3K-Akt et NF- $\kappa$ B, ou chaque protéine activée, va en activer une suivante et ainsi de suite, jusqu'à activer des facteurs de transcription qui iront modifier la transcription de gènes et induire la réponse cellulaire voulue (voir figure 9).

Bien que nous puissions considérer la phosphorylation comme un mécanisme d'activation, l'effet varie selon les molécules pouvant rendre une enzyme plus active, ou encore la désactiver comme la kinase Csk phosphorylant la tyrosine 527 des kinases de la famille Src pour les désactiver[179]. Un autre moyen d'inhiber les voies d'activations vient des récepteurs inhibiteurs possédant un motif ITIM. Comme décrit précédemment dans les CLR à motif ITIM, la phosphorylation de leur motif permet le recrutement de phosphatase et à leur activation. Les phosphatases iront déphosphoryler les protéines des voies activatrices pour inhiber les signaux activateurs (voir figure 6).



**Figure 10** Phosphorylation et déphosphorylation d'une protéine par une kinase et une phosphatase.

Schématisation du mécanisme de phosphorylation et déphosphorylation d'une protéine. Une protéine kinase catalyse le transfert d'un phosphate de l'ATP vers la chaîne latérale -OH présente sur une sérine, une thréonine ou une tyrosine. Cette réaction réduit l'ATP en ADP et la protéine ayant reçu le phosphate est dite phosphorylée. La déphosphorylation d'une protéine est assurée par une phosphatase dans une réaction faisant intervenir de l' $H_2O$  et relarguant un phosphate inorganique.

Bien que dans la majeure partie des cas, les signaux sont relayés en cascade par des protéines suite à leur phosphorylation ou déphosphorylation, d'autres mécanismes de signalisation jouent un rôle important et se trouvent parfois en amont des kinases, qui une fois activées iront phosphoryler en cascade les différentes protéines regroupées sous des voies (MAPK, PI3K-Akt, NF- $\kappa\beta$ ). Nous allons nous intéresser aux autres mécanismes qui ont pour rôle d'activer les kinases en amont de ces cascades de phosphorylation. Parmi les messagers en amont de ces voies, il n'y a pas que des protéines, nous retrouvons des ions, de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) (un dérivé de l'ATP) et des lipides connus sous le nom d'inositol phosphate (dérivés des phospholipides).

## Les ions Calcium

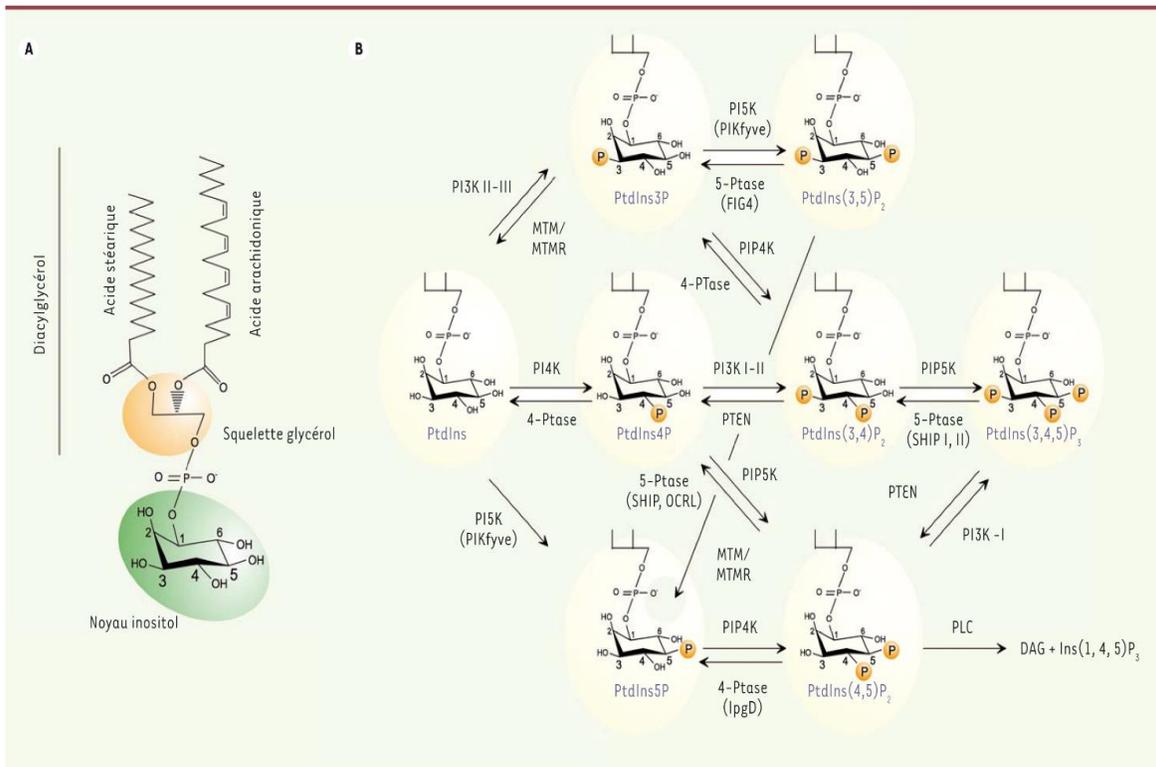
Parmi les molécules de signalisation les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) possèdent une place importante. Dans la plupart des types cellulaires la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol est faible puisque se trouve à la membrane plasmique des canaux fonctionnant comme des pompes à  $\text{Ca}^{2+}$  relarguant continuellement des ions hors du cytosol. Afin d'utiliser le  $\text{Ca}^{2+}$  comme messager de signalisation la cellule utilise des compartiments tels que le réticulum endoplasmique pour stocker du  $\text{Ca}^{2+}$ . La liaison d'un ligand avec son récepteur ouvre des canaux de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les canaux vont ainsi permettre aux  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaires présents en forte concentration de passer au travers de la membrane plasmique vers le cytosol, ou de passer des compartiments de stockage vers le cytosol, augmentant la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires. Les  $\text{Ca}^{2+}$  présents en grande quantité vont pouvoir se lier avec des protéines possédant des sites de liaison d'ions, et induire un changement conformationnel. À la suite de ce changement les protéines verront leur activité modifiée et transmettront un signal intracellulaire. Par exemple, la famille des protéines kinases C (PKC) possèdent un groupe nommé les PKC conventionnels qui arborent un site de liaison pour les  $\text{Ca}^{2+}$  qui est requis (ainsi que la liaison d'un phospholipide et du diacylglycérol (DAG)) pour l'activation de l'enzyme[180]. La signalisation relayée par les  $\text{Ca}^{2+}$  aura différents effets selon le type cellulaire et les protéines qu'ils lieront, par exemple les cellules musculaires utilisent les  $\text{Ca}^{2+}$  afin de se contracter[181].

## cAMP

Un messager secondaire impliqué dans plusieurs types cellulaires est une petite molécule dérivée de l'ATP, l'AMP. La liaison d'un ligand avec son récepteur produit un signal qui active l'enzyme membranaire adénylate cyclase qui convertit alors de l'ATP en cAMP par le retrait de deux groupements phosphate. La cAMP produite va se lier et activer une certaine famille d'enzymes, les protéines kinase A (PKA). Les PKA se composent de deux unités régulatrices qui sont fixées avec deux sous unités catalytiques les rendant inactives. La liaison du cAMP aux sous unités régulatrices des PKA libèrent les sous unités catalytiques qui deviennent actives[182].

## Les lipides (les inositols phosphates)

Les lipides sont généralement considérés pour leur rôle structural dans les membranes plasmiques, pourtant les lipides jouent un rôle dans la signalisation. Parmi les phospholipides, les inositols phosphates sont des petites molécules messagères de signalisation importante dans la transduction de signal. Les inositols phosphates sont répartis en deux groupes majeurs à savoir les phosphatidyl-inositols (PtdIns) ancrés aux membranes lipidiques (membrane plasmique, membrane de l'appareil de golgi etc..) ou les solubles (Ins)[183]. Les dérivés phosphorylés du PtdIns sont communément appelés les phosphoinositides (PI) et jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire car ceux-ci peuvent interagir avec différents domaines protéiques et donc protéines de signalisation[184]. Les 7 PI sont dérivés d'un PtdIns du fait de son résidu inositol qui possèdent 5 groupements hydroxyle libres (-OH) pouvant être phosphorylés, toutefois seulement les positions 3, 4 et 5 ont été retrouvées phosphorylées suggérant un encombrement stérique bloquant l'accès aux deux autres positions[185, 186]. De ce fait, les différentes combinaisons de phosphorylation d'un PtdIns peuvent donner 7 PI différents (Voir figure 11). Les phosphorylations sont médiées par des PI kinases et des phosphatases rendant les PI versatiles. L'un des PI les plus étudiés et important dans la signalisation est le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ou PI(4,5)P<sub>2</sub> car ce dernier, lors d'une activation cellulaire, peut interagir avec la phospholipase C (PLC) ce qui génère deux messagers à savoir l'Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> ou IP<sub>3</sub> et du diacylglycérol (DAG) qui comme nous l'avons vu précédemment intervient dans l'activation des PKC[184].



**Figure 11** Un PtdIns peut former 7 PI différents selon les phosphorylations et déphosphorylation de son noyau inositol.

Un PtdIns ancré à la membrane plasmique est composé généralement d'un acide stéarique et d'un acide arachidonique fixés sur un squelette glycérol qui est lié lui-même à un noyau inositol. Différentes PI-kinases et phosphatases modifient la phosphorylation des positions 3,4 et 5 du noyau inositol permettant de générer trois dérivés PtdIns monophosphates ou biphosphates et un dérivé triphosphate. Les phosphorylations sont catalysées par la famille des PI kinase (PIK), et des 3 classes de kinase PI3K (I, II et III). La déphosphorylation est médiée par les PTase spécifiques, les phosphatases de la famille des myotubularines (MTM et MTMR) et de IpgD comme représentée dans la figure. La figure illustre également l'effet de la phospholipase C sur le PI(4,5) sur la production de l'Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> et du DAG. Adaptée de [187].

### Les lipides (les inositols phosphates) et la voie de signalisation PI3K-Akt

Une autre réaction du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> montre la versatilité des PI dans la signalisation, puisque la PI3K utilise le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> comme substrat pour produire le second messager PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (voir figure 11) qui stimule l'activité de la kinase 1 dépendante des phosphoinositides (PDK1) et phosphorylera la voie Akt[188-190]. L'axe de signalisation PI3K-Akt est une des voies de

transduction majeure dans les cellules, elle permet notamment de réguler le cycle cellulaire, la croissance cellulaire et la différenciation[191]. L'axe PI3K-Akt joue également un rôle dans l'inflammation. En effet, chez les neutrophiles elle permet de réguler la production de cytokines pro-inflammatoires, la migration, la phagocytose et l'explosion oxydative[192].

Les récepteurs immunomodulateurs sont un outil précieux pour activer et réguler les cellules durant la réponse inflammatoire. Cette réponse permet un recrutement et une activation contrôlée des cellules de l'immunité innée et de leurs fonctions effectrices (exemple : phagocytose, production de cytokines pro-inflammatoires) dans la réponse inflammatoire. En effet, chez les neutrophiles par exemple nous avons vu que plusieurs des fonctions d'élimination des pathogènes peuvent causer des dommages directement au tissu sain et à l'organisme. Ceci nous indique l'importance de la modulation de l'activation des neutrophiles afin d'avoir une réponse contrôlée permettant de lutter efficacement sans risquer de nuire. L'équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs est primordial, puisqu'un déséquilibre de cette balance augmente les risques de développer des maladies chroniques inflammatoires ou auto-immunes. C'est le cas des arthrites notamment, comme la goutte qui est caractérisée par un recrutement et une activation excessive des neutrophiles.

## **La pathologie de la goutte**

La pathologie de la goutte est une inflammation importante d'une ou plusieurs articulations causées par la cristallisation de sels d'acide urique (appelés aussi des urates) en cristaux d'UMS qui constitue l'agent étiologique de cette pathologie[193-195] (voir figure 12). Une autre caractéristique de cette maladie vient du recrutement important et de l'activation exacerbée des neutrophiles au site inflammatoire lors d'une crise de goutte[196]. Cette pathologie va causer avec le temps des dommages menant à la déformation des articulations et va induire des douleurs chroniques entraînant des incapacités chez les patients[196-198].



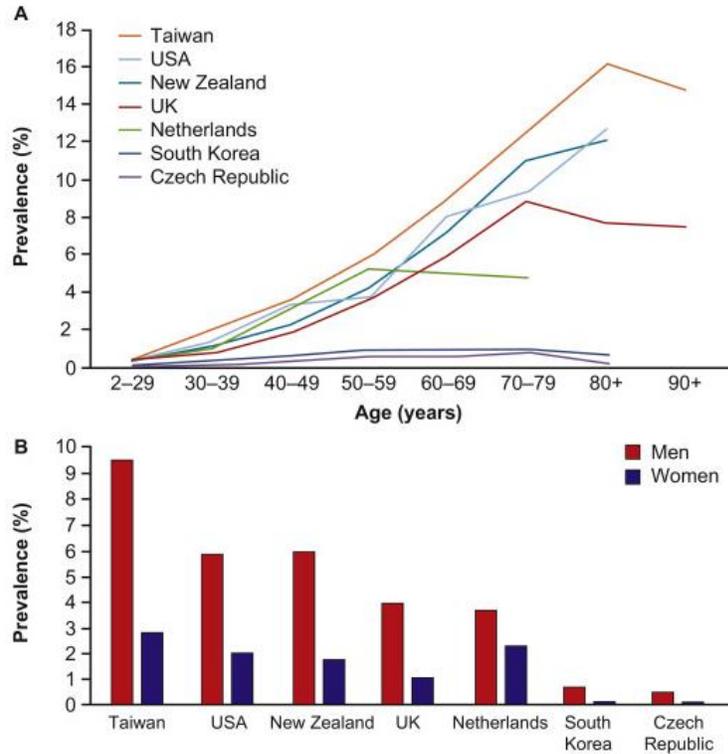
**Figure 12** Représentation de l'inflammation provoquée par les cristaux d'UMS dans l'articulation d'un gros orteil (Podagra).

La crise de goutte apparaît suite à la formation de cristaux d'UMS et se caractérise par une inflammation souvent mono-articulaire au niveau du gros orteil du pied plus communément appelé le podagra. Adapté de [199].

### **Prévalence**

La goutte est une des formes d'arthrites les plus communes et douloureuses touchant plus de 8 millions d'individus aux États-Unis[200]. Au Canada environ 2,4 % de Canadiens âgés de 20 ans et plus avaient reçu un diagnostic de goutte en 2016–2017(source gouvernement Canada). Mondialement, la prévalence de cette maladie varie en fonction des populations, si bien que cette dernière est estimée entre moins de 1% jusqu'à 6,8%, et elle touche majoritairement les hommes âgés et certains groupes ethniques[201, 202] (Voir figure 13). Il fût estimé en 2017 qu'environ 41,2 millions de personnes souffraient de la goutte avec une augmentation des cas d'environ 7,4 millions d'individus par année[203, 204].

Cette augmentation des personnes atteintes de la goutte peut s'expliquer d'une part par l'augmentation de notre espérance de vie, du vieillissement de la population, et du développement du style de vie occidental (principalement la diète). L'augmentation de cette prévalence est inquiétante car elle s'accompagne également d'un impact socio-économique important dû à la prise en charge des traitements de la goutte, mais aussi de l'incapacité qu'elle génère chez les patients [204-206].



**Figure 13** Prévalence de la goutte dans 7 pays représentatifs.

Exemple de la prévalence de la goutte dans 7 pays représentatifs (Taiwan ; États-Unis/ « USA »; Nouvelle-Zélande/« New Zealand »; le Royaume-Uni/ « UK : United Kingdom »; Les Pays-Bas/ « Netherlands »; La Corée du Sud/ « South Korea » ; La république Tchèque/« Czech Republic »). Dans le panel A, nous pouvons voir que la prévalence de la goutte augmente avec l'âge dans différents pays. Dans le panel B, la goutte apparaît comme une maladie touchant majoritairement les hommes comparés aux femmes. Adapté de [207].

## Facteurs de risque

L'augmentation de la prévalence s'explique par différents facteurs de risque clés dans le développement de la maladie. Les facteurs de risques vont augmenter la concentration d'acide urique dans le sang ou les tissus favorisant la cristallisation de l'UMS et provoquant la crise de goutte.

## **Hyperuricémie chronique**

L'hyperuricémie chronique est le facteur de risque majeur de la pathologie de la goutte. Par définition, l'hyperuricémie correspond à une concentration d'acide urique dans le sang étant supérieure à 0,41 mmol par litre ou 6,8 mg par décilitre. Les personnes atteintes d'hyperuricémie chronique ont un risque accru de déclencher une crise de goutte, mais ne développeront pas nécessairement cette pathologie. L'hyperuricémie apparaît souvent en réponse à une surproduction d'urates par la voie métabolique du cycle des purines dans le foie ou à une sous-excrétion rénale ou intestinale des urates[208, 209].

### **Facteurs influençant la sous-excrétion des urates**

Chez les patients souffrants de la goutte, la sous-excrétion des urates est la cause principale de leur hyperuricémie[208]. Les reins permettent d'excréter les deux tiers des urates de notre sang, tandis que le reste est excrété par le système gastro-intestinal. Une baisse de fonction du transporteur ABCG2 dans le tractus gastro-intestinal réduit la quantité d'urates excrétés et surcharge l'excrétion rénale[209, 210].

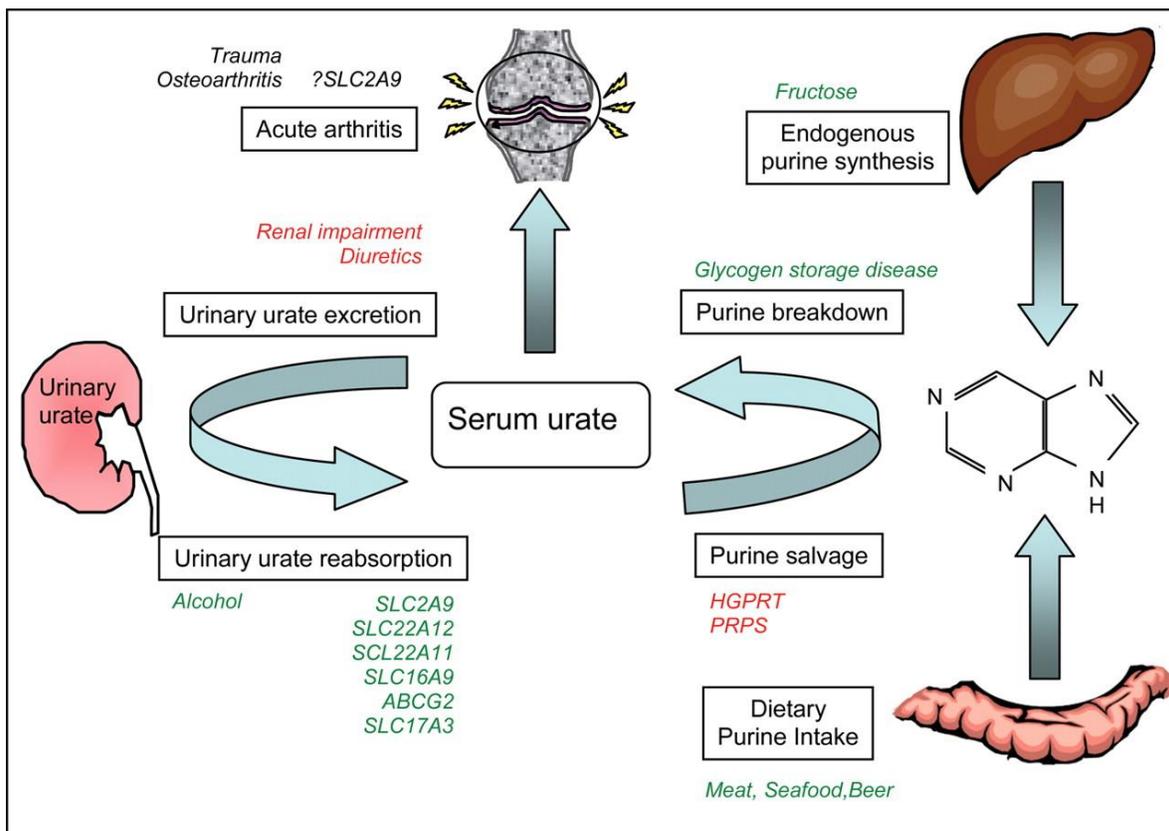
La sécrétion et la réabsorption des urates coexistent dans la filtration du sang par les reins. Ce processus est régulé par différentes molécules sécrétoires ou de réabsorption des urates dont certaines sont des cibles de médicaments réduisant les niveaux d'urate chez les patients[210]. Des études de séquençage du génome ont permis d'identifier différents variants génétiques qui augmentent le risque de faire de l'hyperuricémie. Les principaux gènes à risque sont ceux affectant l'excrétion au niveau rénal et gastro-intestinal (exemple : GLUT9/SLC2A9, URAT1/SLC22A12 et ABCG2) ou la production métabolique des urates[211, 212].

### **Facteurs influençant le métabolisme des urates**

Plusieurs facteurs non AGCG2génétiques peuvent affecter les taux d'urates chez un individu, augmentant ainsi les risques de développer la goutte. Les différents facteurs vont influencer la production d'urates par le métabolisme des purines. Une production endogène accrue d'acide urique peut se produire dans divers contextes impliquant un renouvellement cellulaire accéléré, comme dans les tumeurs malignes, les maladies hématologiques et inflammatoires. De même, une production accrue de purines peut résulter de la chimiothérapie et de lésions tissulaires[210].

## Diète, âge, sexe et comorbidité

La production d'urates vient du métabolisme des purines de sources alimentaires exogènes et de sous-produits endogènes du métabolisme cellulaire (voir figure 14). La consommation excessive de nourritures riches en purines telles que les viandes, les fruits de mer, ou l'alcool augmente la production de purines[213, 214]. Les purines que nous consommons ou qui sont générées par le métabolisme cellulaire (dégradation des nucléotides en purines) sont dégradées par le foie en inosine, hypoxanthine et xanthine pour finalement être métabolisées en acide urique et être excrétées[210]. Le facteur de l'âge, le sexe masculin et des maladies inflammatoires modifie également la production d'urates et donc augmentent le risque de développer de l'hyperuricémie et une crise de goutte[215] [216] [217].



**Figure 14** Le métabolisme des purines et d'excrétion de l'urate dans la pathologie de la goutte.

Les purines apportées par la diète ou par le métabolisme cellulaire sont transformées en acide urique par le foie (panel de droite). Les reins vont excréter 70% de l'acide urique et les 30% restant sont excrétés par le système gastro-intestinal (panel de gauche). Les différents facteurs augmentant l'apport de purines ou diminuant l'excrétion des urates vont élever le taux d'acide urique dans le sang et augmenter les risques d'hyperuricémie et de crise de goutte. Adapté de [218].

## **Caractérisation clinique**

Le diagnostic et la caractérisation de la pathologie de la goutte sont classés en 4 étapes :

### **Hyperuricémie asymptomatique**

L'hyperuricémie chronique est, comme vu précédemment, un facteur de risque important. La concentration d'acide urique est corrélée avec le risque de développer une crise de goutte, mais ne suffit pas à elle seule pour diagnostiquer la goutte. Les personnes souffrant d'hyperuricémie chronique peuvent ne pas avoir de symptôme et même ne jamais développer la goutte. Environ 36 % des patients atteints d'hyperuricémie développent la goutte[219] et environ 76 % de patients asymptomatiques souffrant d'hyperuricémie ne possèdent pas de dépôts de UMS[220]. Du fait de leur risque augmenté de déclencher une crise de goutte, elles sont toutefois diagnostiqués comme patients avec une hyperuricémie asymptomatique[221].

### **Crise de goutte aiguë**

Les personnes souffrant de la goutte sont souvent diagnostiquées cliniquement par la formation rapide d'une inflammation mono-articulaire, qui se trouve être généralement au niveau du gros orteil du pied (l'articulation métatarso-phalangienne), nommée podagra[195, 222]. Il se peut toutefois que cette inflammation se situe dans les articulations des doigts, du poignet, du coude, du genou ou de la cheville. L'identification des cristaux dans les liquides synoviaux d'une articulation enflammée (gonflements et douleurs importants) permet de diagnostiquer la goutte[196], bien que la combinaison d'un examen physique, d'un bilan sanguin (détection taux acide urique sanguin) et d'examens d'imageries (radiographies ou échographies) peuvent suffire à poser un diagnostic exact[223].

### **Phase intercritique**

L'inflammation de la crise de goutte aiguë se résorbe après plusieurs heures ou jours avec l'administration d'un traitement, souvent de la colchicine ou des AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens). Dans cette période de rémission les patients sont caractérisés par une absence de symptôme. Les patients doivent être traités pour leur hyperuricémie car ils peuvent développer une nouvelle crise, et cette phase intercritique peut se prolonger sans nouvelle crise. L'absence

de traitement approprié chez ses patients les rend vulnérables aux futures crises qui deviendront plus fréquentes et plus graves[224].

La thérapie de réduction de l'urate est le traitement adéquat pour prévenir à long terme des nouvelles poussées de crise de goutte. L'allopurinol, un inhibiteur de la xanthine oxydase responsable du métabolisme des purines, est le médicament principal utilisé et recommandé par la directive de 2012 du collège américain de rhumatologie[225] comme thérapie de réduction de l'urate. Une autre catégorie de traitement de cette thérapie est l'utilisation d'agents uricosuriques qui augmentent l'élimination de l'acide urique dans les urines[226].

### **La goutte tophacée chronique**

Lorsque les crises de goutte perdurent avec le temps, souvent dû à l'absence de traitement, celles-ci vont endommager les articulations en formant un tophus ou des tophi. Le tophus est une masse de cristaux d'UMS accumulés, et apparaît dans la goutte dite chronique. Le tophus peut se former autour des articulations, du cartilage des oreilles, des tissus sous-cutanés et de la peau. L'apparition de la goutte tophacée chronique se traduit par une érosion et une déformation osseuse des articulations. Sous la peau, le tophus a une apparence blanchâtre et la différentiation du tophus d'autres nodules d'arthrites inflammatoires est réalisée par une biopsie du nodule permettant d'identifier les cristaux d'UMS[227].

## **La réaction inflammatoire d'une crise de goutte aigüe**

### **Cristallisation de l'UMS**

Les cristaux d'UMS se forment chez certains individus atteints d'hyperuricémie. L'hyperuricémie définit le seuil limite du taux de concentration ( $408 \mu\text{mol/L}$ ) à laquelle les cristaux d'UMS se forment *in vitro* à un pH et une température physiologique[228]. Le processus de formation des cristaux n'est pas entièrement élucidé, mais différents facteurs jouent un rôle dans ce mécanisme comme la température, le pH, la concentration en sel et les composants de la matrice cartilagineuse[229]. Ceci explique en partie pourquoi l'articulation majoritairement touchée est le gros orteil, car ce dernier localisé en périphérie du corps possède un pH et une température de tissu faibles. Dans cette configuration, une concentration d'urate inférieure à  $408 \mu\text{mol/L}$  suffirait à l'apparition de cristaux d'UMS, car nous sommes par exemple capables à  $35^\circ\text{C}$  *in vitro*

de cristalliser l'acide urique à une concentration de 360  $\mu\text{mol/L}$ [228]. La concentration de l'acide urique mais aussi des facteurs présents dans le sérum ou le liquide synovial vont influencer la vitesse de formation, la forme et la taille des cristaux d'UMS.

### **Initiation de la réponse inflammatoire**

La réponse inflammatoire s'active lorsque les cristaux d'UMS formés dans l'articulation interagissent avec les macrophages et cellules résidentes (synoviocytes ou cellules endothéliales) (voir figure 15). Du fait que les cristaux soient recouverts de différentes molécules, ils participent à l'activation des cellules. Les cristaux d'UMS vont ainsi interagir avec les cellules dû notamment aux molécules du complément (C1q, C5 et C6), des Ig (G, M, fragments Fc des Ig), et de l'apolipoprotéine B ou E présentes sur les cristaux[230-235]. Le mécanisme principal qui initie la réponse inflammatoire serait l'interaction et la phagocytose des cristaux d'UMS par les macrophages résidents ce qui permet d'activer le NLRP3 inflammasome qui va recruter la caspase-1 pour cliver la pro-IL1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  mature[236-238]. Des études *in vitro* sur des cellules de souris (macrophages murins), humaines (des neutrophiles) ou de lignée cellulaire (la lignée des monocytes/macrophages THP-1) a montré également la production de multiples cytokines pro-inflammatoires (exemple : IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-18, MCP-1) induite par les cristaux d'UMS[236, 239, 240].

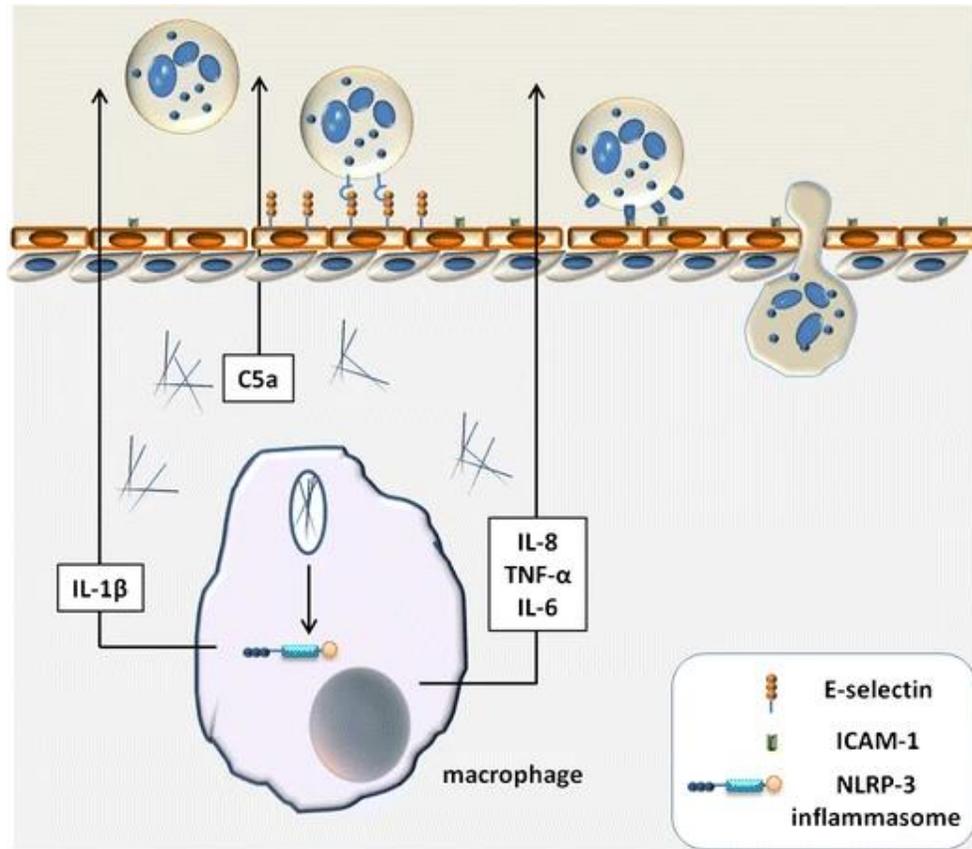
### **Production de cytokines pro-inflammatoires**

Parmi les multiples médiateurs pro-inflammatoires sécrétés durant la crise de goutte, les principaux sont l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-8. Dès le début de la phase initiale de la crise de goutte, les liquides synoviaux du patients vont contenir une concentration élevée d'IL-1 $\beta$ [241]. Des expérimentations sur des modèles animaux démontrent que la voie de signalisation de l'IL-1 $\beta$  est indispensable pour initier une réponse inflammatoire provoquée par les cristaux d'UMS[236, 239, 242], et pour recruter les neutrophiles[242, 243]. Le rôle clé de l'IL-1 $\beta$  est également supporté par l'utilisation clinique d'inhibiteur d'IL-1 $\beta$  dans le traitement de la goutte[244-247]. L'initiation de l'inflammation par les macrophages produit majoritairement de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$  qui activeront les cellules endothéliales environnantes et induiront le recrutement puis l'activation des neutrophiles[242, 248].

Le TNF- $\alpha$  joue un rôle capital dans l'initiation de l'inflammation de la goutte. Les neutrophiles nécessitent une pré-activation par le TNF- $\alpha$  pour s'activer une fois en contact avec les cristaux d'UMS et produire de l'IL-1 $\beta$ [249]. Il y a deux modèles de souris n'exprimant pas le TNF- $\alpha$  ou son récepteur TNFR 1 et 2 qui une fois injecté avec des cristaux d'UMS ne recrutent que très peu de neutrophiles[250]. Ceci signifie que les cristaux d'UMS seuls ne peuvent activer les neutrophiles ainsi que leur inflammasome NLRP3 nécessaire à la production d'IL-1 $\beta$  par ces derniers.

L'IL-8 est un des chimioattractant principal des neutrophiles, et des études sur un modèle de goutte chez les lapins ont montré une augmentation de la concentration d'IL-8 dans les liquides synoviaux environ 12 heures post-injection de cristaux d'UMS[251]. Dans ce même modèle, l'utilisation d'un anticorps contre l'IL-8 permet d'atténuer l'inflammation à partir de 12 heures post-injection seulement. Un modèle murin de poche d'air a aussi mis en évidence le rôle du récepteur murin homologue de l'IL-8 dans l'inflammation induite par les cristaux d'UMS[252]. Ainsi, les cristaux d'UMS causent une accumulation de la concentration d'IL-8 qui influenceraient la réponse inflammatoire[253-255].

L'initiation de l'inflammation, le recrutement et l'activation des neutrophiles impliquent l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , tandis que l'IL-8 participerait à l'évolution de l'inflammation[253, 254].



**Figure 15** Les macrophages interagissent avec les cristaux d'UMS et initient l'inflammation et le recrutement des neutrophiles.

Les macrophages reconnaissent les cristaux d'UMS et les phagocytent. Ceci entraîne l'activation de l'inflammasome NLRP3, et de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ ; IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6) qui vont activer la barrière endothéliale, et entraîner le recrutement des neutrophiles. Adaptée de [256].

### Recrutement des neutrophiles

Le rôle des neutrophiles dans la pathologie de la goutte est principal, comme le supporte l'absence de réaction inflammatoire dans les articulations d'un modèle canin dépleté en neutrophiles et injecté avec des cristaux d'UMS[194, 257]. Dans l'inflammation d'une crise de goutte aiguë, les neutrophiles comptent pour plus de 80% des cellules ayant migré dans la membrane et le liquide synovial[241]. Durant toute la durée de la crise inflammatoire, le nombre de neutrophiles reste constant[241]. Ce taux constant vient du fait que les neutrophiles recrutés vont interagir avec les cristaux d'UMS et s'activer. Une fois activés, ils vont participer à la production de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-8, maintenant ainsi l'attraction des neutrophiles en circulation, leur

recrutement au site inflammatoire et leur activation. En plus du maintien de cette inflammation, les neutrophiles vont produire et relarguer des ROS, ainsi que des enzymes par dégranulation causant une destruction de l'articulation.

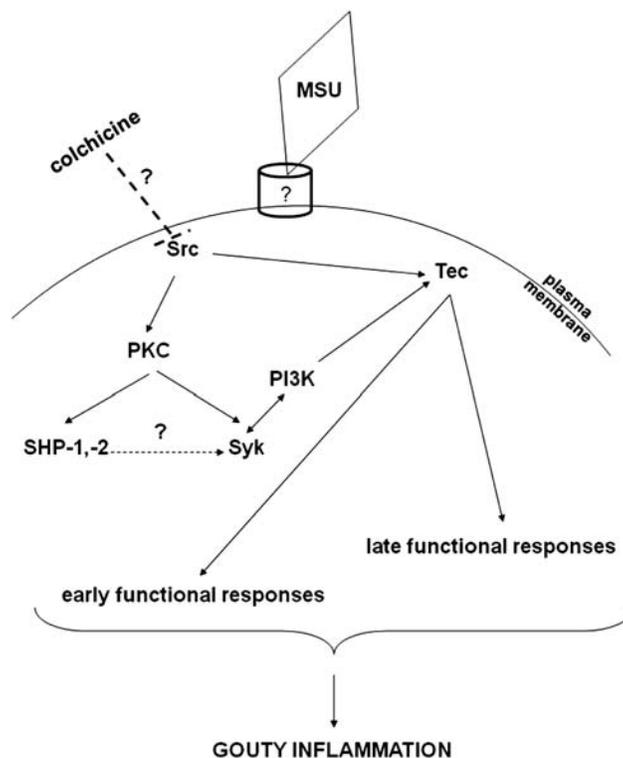
### **Activation des neutrophiles.**

L'activation des neutrophiles avec les cristaux d'UMS n'est pas entièrement élucidée mais pourrait intervenir de deux manières différentes. Soit par phagocytose ou endocytose des cristaux, soit par interaction avec la membrane cellulaire des neutrophiles. Assez tôt, il fût observé la phagocytose de petits fragments de cristaux d'UMS suivi de leurs inclusions dans des phagosomes chez le neutrophile[258]. Cependant la phagocytose des cristaux d'UMS par les neutrophiles mène à une déstabilisation de la paroi lysosomale libérant les enzymes lysosomales et provoquant la mort cellulaire, ce qui a comme conséquence d'influencer la production de cytokines inflammatoires, de ROS et d'activer l'inflammasome NLRP3[236, 259, 260]. La phagocytose des cristaux d'UMS, favoriserait l'activation du neutrophile et la production d'IL-1 $\beta$  par ce dernier, par le biais de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase-1[236, 261] ou de manière indépendante de l'inflammasome[260].

Une autre interaction des cristaux d'UMS qui activerait les neutrophiles vient du contact des cristaux avec la membrane cellulaire et les récepteurs exprimés à sa surface[164]. Le fait que les cristaux d'UMS puissent être recouverts de différentes molécules (molécules du complément, IgG, etc..) pourrait intervenir dans l'activation de différents récepteurs à la surface des neutrophiles[232, 259]. L'opsonisation des cristaux avec les IgG, permet à ces derniers d'interagir avec les récepteurs de la famille des immunoglobulines (Fc récepteurs), tel qu'observé avec le Fc $\gamma$ RIIIB qui participerait à l'activation des neutrophiles par les cristaux d'UMS[262]. D'autres récepteurs interviendraient, tel que le CD11b (le récepteur des intégrines  $\beta$ 2)[262], mais pour la plupart comme le CD14, TLR2 et 4, leurs interactions furent élucidées soit chez les macrophages mais encore chez les neutrophiles, soit en condition *in vitro* ou dans des modèles animaux. Il est évident que l'interaction des cristaux d'UMS, dépendamment de l'inflammation et des molécules les recouvrant, vont interagir avec un panel de récepteurs qui chez le neutrophile demande encore à être démontrés.

L'activation des neutrophiles mis en contact avec les cristaux d'UMS se traduit par l'activation de plusieurs voies de signalisation. Le complexe de l'inflammasome NLRP3 contribue à

l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et AP-1 à l'origine de la production de multiples médiateurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , pro-IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, protéines S100A8 et S100A9)[230, 260, 263]. L'activation des neutrophiles par interaction avec les cristaux d'UMS et divers récepteurs membranaires se traduit par une augmentation globale de la phosphorylation des tyrosines[264], et en amont de ces phosphorylations se trouverait la famille des Src kinases (exemple : Lyn)[265, 266]. Ainsi, les multiples voies de signalisation subséquentes aux Src kinases activées par les cristaux d'UMS sont les voies des MAPK[254], PI3K-Akt[267], PKC[268], Tec[265] et Syk[267, 269] (Voir figure 16). L'activation des multiples voies de signalisation influence le rôle du neutrophile dans l'amplification et la maintenance de l'inflammation activée par les cristaux d'UMS, causant également des dommages aux tissus enflammés. Les différentes fonctions modulées par les UMS affectent le relargage de ROS[270], de peptides anti-microbien et des multiples cytokines et médiateurs pro-inflammatoires[230, 271, 272].



**Figure 16** Voies de signalisation activées par les cristaux d'UMS chez le neutrophile

L'interaction des cristaux d'UMS avec les neutrophiles induit l'activation de plusieurs voies de signalisation faisant intervenir les Src kinases, les PKC, Syk, PI3K et Tec. Adaptée de [230].

## Résolution de la crise de goutte

Bien que les neutrophiles jouent un rôle majeur dans l'inflammation d'une crise de goutte, ceux-ci influencent également sa résolution, qui survient généralement plus d'une dizaine de jours après le début de la crise de goutte aiguë et ce même en l'absence de traitement[273]. La mort cellulaire des neutrophiles, induite par différents mécanismes au cours de l'inflammation dont les ROS, génère des corps apoptotiques qui seront captés par les macrophages pour être éliminés [274]. Cet événement est le mécanisme principal de résolution d'une crise de goutte aiguë, car l'ingestion des neutrophiles apoptotiques par les macrophages induit la production de TGF- $\beta$ , une cytokine anti-inflammatoire[275-277].

Un autre mécanisme qui participerait dans l'inhibition de l'inflammation serait la nature des protéines recouvrant les cristaux qui changerait au cours de la réponse inflammatoire. Le remplacement des IgG à la surface des cristaux par de l'ApoE ou de l'albumine empêcherait l'activation des cellules par ces derniers[231, 232].

La formation des NETs jouerait un rôle potentiel dans l'inhibition de la crise de goutte. L'induction des NETs par les ROS notamment, permettrait de séquestrer et de dégrader un nombre non négligeable de facteurs pro-inflammatoires. Un modèle expérimental bloquant le mécanisme de formation des NETs provoque une inflammation sévère et persistante de la crise de goutte comparé à une résolution après trois jours lorsque le mécanisme des NETs est fonctionnel[278].

Bien qu'il existe déjà des traitements pour stopper l'inflammation lors d'une crise de goutte aiguë, ceux-ci ne sont pas bien supportés par tous les patients et possèdent des effets secondaires ainsi que des risques de comorbidité[279].

## Traitement d'une crise de goutte aiguë

Pour traiter l'inflammation d'une crise de goutte, les médicaments principaux sont la colchicine, les drogues anti-inflammatoires non-stéroïdienne et stéroïdienne (les glucocorticoïdes)[225, 280, 281].

La colchicine module de multiples voies pro- et anti-inflammatoires associées à l'arthrite goutteuse. La colchicine empêche l'assemblage des microtubules et perturbe ainsi l'activation de

l'inflammasome, la chimiotaxie des cellules inflammatoires basée sur les microtubules, la génération de leucotriènes et de cytokines. Ainsi, la colchicine permet d'inhiber l'activation, la dégranulation, et la migration des neutrophiles. Bien que efficace, la colchicine reste une molécule toxique qui présente des effets secondaires (exemple : nausées et troubles gastro-intestinales) et des risques de comorbidités associés (par exemple les maladies cardio-vasculaires et rénales)[282].

Les drogues anti-inflammatoires non-stéroïdiennes et stéroïdiennes utilisées pour traiter la pathologie de la goutte, ou les autres maladies chroniques inflammatoires, visent principalement les médiateurs pro-inflammatoires[283, 284].

Le choix stratégique du traitement à utiliser prend en compte les risques de comorbidité du patient puisque la goutte et certains traitements sont associés à de l'hypertension, ou à la maladie rénale chronique[285].

L'inflammation est une balance délicate modulée par des mécanismes activateurs et inhibiteurs via différents médiateurs et récepteurs comme nous l'avons vu précédemment. Les récepteurs inhibiteurs, tels que les CLR possédant un motif ITIM, possèdent un potentiel thérapeutique prometteur[286, 287]. Il y a un intérêt pertinent dans le développement de nos connaissances au sujet des récepteurs inhibiteurs et de leur rôle dans les pathologies inflammatoires chroniques et auto-immunes. Par exemple, dans le cadre de la goutte, une compréhension plus approfondie des mécanismes impliqués dans le contrôle de l'intensité de la réponse inflammatoire et de sa résolution apporterait des nouvelles opportunités dans le traitement de cette pathologie.

### **Rôle de CLEC12A dans la goutte**

Notre équipe a démontré chez le neutrophile que le récepteur CLEC12A diminue la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 en réponse aux cristaux d'UMS[153]. Ceci démontre la capacité du récepteur à moduler les fonctions du neutrophile dans la pathologie de la goutte. Pour observer le rôle de CLEC12A en réponse aux cristaux d'UMS, notre équipe exploite la stratégie du pontage ou d'engagement du récepteur avec un anticorps. Le pontage consiste à utiliser des anticorps pour mimer une interaction avec un ligand et étudier le comportement du récepteur, ou d'induire son internalisation afin de diminuer son expression et d'observer les conséquences de son absence sur l'activation des cellules. Nous avons pu observer ainsi

l'augmentation de la production d'IL-8 chez les neutrophiles dont l'expression de CLEC12A a été au préalable diminuée par le pontage. Cette observation a été confirmée dans une lignée PLB-985 où une stratégie de SiRNA contre CLEC12A a été utilisée pour diminuer son expression, et où une augmentation de la production d'IL-8 a été observée en réponse aux cristaux d'UMS. Une autre évidence de la capacité de CLEC12A à diminuer l'activation des neutrophiles est lorsque ce dernier est ponté afin de diminuer son expression, les neutrophiles arborent un patron de tyrosine phosphorylation augmenté en réponse aux cristaux d'UMS[153]. CLEC12A démontre sa capacité à moduler l'activation des neutrophiles en réponse aux cristaux d'UMS, et d'autant plus que nous avons observé que les cristaux d'UMS induisent eux-mêmes la diminution de l'expression membranaire de CLEC12A ce qui doit résulter d'une suractivation des neutrophiles caractéristique de la pathologie. À l'appui de cette idée vient le fait que la colchicine, un des traitements utilisés dans les crises de goutte, prévient cette diminution de l'expression de CLEC12A à la surface des neutrophiles et donc préserve l'effet modulateur du récepteur[153].

## Contexte et hypothèse

Le ou les ligands de CLEC12A et ses mécanismes de signalisation ne sont pas encore connus. En tant que membre de la famille des CLR nous pouvons nous attendre à ce que CLEC12A puisse reconnaître des ligands endogènes du soi, des DAMPs et des PAMPs. Des premières évidences suggèrent que CLEC12A pourrait reconnaître des cellules mortes ou des cristaux d'UMS[155]. Bien que le fonctionnement du récepteur reste à élucider, son motif ITIM lui confère un potentiel thérapeutique, renforcé par l'observation dans des lignées cellulaires du recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 au motif ITIM de CLEC12A[143]. Ces observations soulignent l'intérêt d'étudier et de comprendre comment fonctionne le récepteur.

CLEC12A est un immunorécepteur impliqué dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques. CLEC12A est exprimé dans les cellules d'origine myéloïde [143, 288] et des associations génétiques pointent son rôle dans l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn[156-158]. Des modèles de souris *CLEC12A*<sup>-/-</sup> avec une arthrite induite par collagène, ou injectés avec des cristaux d'UMS ou des cellules mortes, arborent une réaction inflammatoire exacerbée[154, 155]. Le récepteur CLEC12A apparaît comme un facteur commun dans le syndrome de Behçet's et la goutte qui sont caractérisés par des épisodes inflammatoires aigus impliquant le neutrophile[157]. Les études montrent que la diminution de l'expression du récepteur CLEC12A est associée avec une inflammation exacerbée.

Les cristaux d'UMS, qui sont l'agent étiologique de la goutte, diminuent l'expression de CLEC12A à la surface des neutrophiles ce qui aboutit alors à une réponse inflammatoire accrue [153, 155]. De plus, nous savons que l'une des drogues (la colchicine) utilisée pour traiter les patients souffrant de la goutte prévient la diminution de l'expression de CLEC12A à la surface des neutrophiles par les cristaux d'UMS[153]. Or, chez le neutrophile, notre laboratoire a démontré qu'en réponse aux cristaux d'UMS CLEC12A régule négativement l'influx de calcium intracellulaire, la phosphorylation des protéines intracellulaires ainsi que la production d'IL-8[153].

Toutefois, malgré les évidences énoncées ci-dessus de l'importance de CLEC12A dans le contrôle de l'activation des neutrophiles dans la pathologie de la goutte, nous ne connaissons pas les voies de signalisation modulées par CLEC12A, ni les mécanismes moléculaires impliqués dans son activation.

**Hypothèse:** CLEC12A modulerait la réponse des neutrophiles en ciblant les différentes voies de signalisation intracellulaires activées par les cristaux d'UMS.

Nos objectifs nous amènent à devoir comprendre quelles sont les voies de signalisation activées par les cristaux d'UMS que le récepteur CLEC12A module, mais aussi de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans son fonctionnement.

Le premier objectif est de déterminer comment, et par quelles voies de signalisation, CLEC12A inhibe l'activation des neutrophiles humains en réponse aux cristaux d'UMS.

Quant au deuxième objectif, il sera de déterminer les motifs protéiques associés aux mécanismes moléculaires de signalisation de CLEC12A.

L'identification de ces voies apporterait des stratégies thérapeutiques potentielles pour la pathologie de la goutte. La caractérisation des mécanismes moléculaires intervenant dans la signalisation de CLEC12A serait un atout pour mieux comprendre son rôle dans la goutte et déterminer comment il module les fonctions du neutrophile.

# Chapitre 1: Le récepteur inhibiteur CLEC12A régule la signalisation de PI3K-Akt pour moduler l'activation des neutrophiles et le relargage de cytokine.

**Titre de l'article : “The inhibitory receptor CLEC12A regulates PI3K-Akt signaling to inhibit neutrophil activation and cytokine release.”**

Guillaume Paré<sup>1,\*</sup>, Julien Vitry<sup>1-2,\*</sup>, Michael L. Merchant<sup>3</sup>, Myriam Vaillancourt<sup>1</sup>, Andréa Murru<sup>1-2</sup>, Yunyun Shen<sup>1-2</sup>, Sabine Elowe<sup>4-5</sup>, Mireille H. Lahoud<sup>6</sup>, Paul H. Naccache<sup>1-2</sup>, Kenneth R. McLeish<sup>3</sup>, Maria J. Fernandes<sup>1-2</sup>

<sup>1</sup> Infectious and Immune Diseases Division, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

<sup>2</sup> Department of Microbiology-Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Medicine, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

<sup>3</sup> Department of Medicine, University of Louisville School of Medicine, Louisville, KY, USA

<sup>4</sup> Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

<sup>5</sup> Reproduction, Mother and Youth Health Division, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

<sup>6</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash Biomedicine Discovery Institute, Monash University, Clayton, VIC 3800, Australia

**Co-premier auteurs:** Guillaume Paré et Julien Vitry ont contribué également à ce manuscrit.

**Journal:** “Frontier in Immunology, Molecular Innate Immunity”

**Publication:** Le 21 Juin 2021

## **Contribution des auteurs:**

-Conception et planification des expériences : Maria J Fernandes, Kenneth R McLeish et Paul H Naccache.

-Réalisation des expériences et analyse des données : Guillaume Paré, Julien Vitry, Kenneth R McLeish, Michael L Merchant, Myriam Vaillancourt, Andréa Murru, Yunyun Shen, et Maria J Fernandes.

-Supervision : Maria J Fernandes et Paul H Naccache.

-Conception des figures et rédaction du manuscrit : Contribution majeure par Kenneth R McLeish et Maria J Fernandes. Contribution par Guillaume Paré, Julien Vitry, Myriam Vaillancourt, Sabine Elowe, Michael L Merchant, Paul H Naccache.

-Acquisition des fonds et ressources : Maria J Fernandes.

## 1.1 Résumé

Le récepteur de lectine de type C inhibiteur myéloïde CLEC12A limite l'activation des neutrophiles, les voies pro-inflammatoires et la maladie dans les modèles murins d'arthrite inflammatoire par un mécanisme moléculaire qui reste mal compris. Nous avons examiné comment la signalisation inhibitrice médiée par CLEC12A contrecarre la signalisation activatrice en réticulant CLEC12A dans les neutrophiles humains. La réticulation de CLEC12A a induit sa translocation vers des domaines membranaires riches en flotilline où son ITIM a été phosphorylé de manière dépendante de Src. Une analyse phosphoprotéomique a identifié des molécules de signalisation candidates régulées par CLEC12A, notamment des MAPK, des phosphoinositol kinases et des membres de la voie JAK-STAT (« *Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription* »). La stimulation des neutrophiles avec des cristaux d'acide urique, l'agent étiologique de la goutte, a entraîné l'hyperphosphorylation de p38 et d'Akt. En fin de compte, l'une des voies par lesquelles CLEC12A régule la libération d'IL-8 par les neutrophiles stimulées par les cristaux d'acide urique est la voie de signalisation p38/PI3K-Akt. En résumé, ces travaux définissent les premiers événements moléculaires qui sous-tendent la signalisation de CLEC12A dans les neutrophiles humains pour moduler la synthèse des cytokines. Le ciblage de cette voie pourrait être utile sur le plan thérapeutique pour atténuer l'inflammation.

## 1.2 Abstract

The myeloid inhibitory C-type lectin receptor CLEC12A limits neutrophil activation, pro-inflammatory pathways and disease in mouse models of inflammatory arthritis by a molecular mechanism that remains poorly understood. We addressed how CLEC12A-mediated inhibitory signaling counteracts activating signaling by cross-linking CLEC12A in human neutrophils. CLEC12A cross-linking induced its translocation to flotillin-rich membrane domains where its ITIM was phosphorylated in a Src-dependent manner. Phosphoproteomic analysis identified candidate signaling molecules regulated by CLEC12A that include MAPKs, phosphoinositol

kinases and members of the JAK-STAT pathway. Stimulating neutrophils with uric acid crystals, the etiological agent of gout, drove the hyperphosphorylation of p38 and Akt. Ultimately, one of the pathways through which CLEC12A regulates uric acid crystal-stimulated release of IL-8 by neutrophils is through a p38/PI3K-Akt signaling pathway. In summary this work defines early molecular events that underpin CLEC12A signaling in human neutrophils to modulate cytokine synthesis. Targeting this pathway could be useful therapeutically to dampen inflammation.

### **1.3 Introduction.**

Neutrophils are critical effector cells of the innate immune response(1, 2). Collateral damage from a rapid and robust neutrophil response is mitigated by a number of counter-regulatory mechanisms, including those mediated by inhibitory receptors(3). One of the few leukocyte inhibitory receptors associated with disease is CLEC12A, a myeloid inhibitory C-type lectin receptor (CLR)(4-8). Enhanced neutrophil responses due to reduced CLEC12A plasma membrane expression following exposure to monosodium urate (MSU) crystals provided the first evidence that CLEC12A participates in the pathogenesis of an inflammatory disease(9). Similarly, the loss of CLEC12A expression in CLEC12A knock-out (KO) mice significantly increased the MSU-induced inflammatory response by enhancing leukocyte recruitment(10). CLEC12A KO mice with collagen antibody-induced arthritis also exhibited increased joint inflammation, neutrophil activation, and impaired resolution of joint injury(11). Moreover, antibody-induced CLEC12A internalisation in wild-type mice enhanced collagen antibody-induced arthritis. At the molecular level, antibody-induced internalisation of CLEC12A on human neutrophils enhanced the MSU-induced increase in cytoplasmic calcium and increased tyrosine phosphorylation of a number of intracellular proteins(9). Thus, similar to other inhibitory receptors, CLEC12A regulation of neutrophil responses depends on the level of plasma membrane expression(3). The data support an important regulatory role for neutrophil CLEC12A in determining disease severity in chronic inflammatory arthritis.

Significant gaps in our knowledge of the mechanisms controlling CLEC12A cell-surface expression and inhibition of neutrophil activation prevents using CLEC12A in the treatment of chronic inflammatory diseases. Inhibitory receptors typically limit cell responses by recruiting phosphatases to their immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) (12, 13). These

phosphatases dephosphorylate activating signaling pathways stimulated by receptors with immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) (14-17). Consistent with this paradigm, antibody-induced cross-linking of CLEC12A in pervanadate-treated RAW cells induces recruitment of SHP-1(8). The current study was designed to define signaling events associated with CLEC12A clustering and internalisation in human neutrophils, and to identify the signal transduction pathways regulated by CLEC12A in neutrophils activated with stimuli relevant to inflammatory diseases. We show that MSU and antibody-mediated CLEC12A cross-linking in human neutrophils induces receptor translocation to flotillin-rich plasma membrane domains where the CLEC12A ITIM motif is phosphorylated prior to the downregulation of its expression. Decreased CLEC12A plasma membrane expression enhances MSU-induced activation of the p38-PI3K-Akt signal transduction pathway, resulting in increased neutrophil cytokine synthesis.

## **1.4 Materials and Methods.**

### **1.4.1 Antibodies.**

Two different antibodies against the HA-tag were used, namely, the anti-HA.11 (mouse monoclonal 16B12; no. 90150) from BioLegend (Pacific Heights Blvd, San Diego, CA) and the rabbit polyclonal anti-HA (NB600-363B) from Novus biologicals (Oakville, ON, Canada). The former was used to cross-link CLEC12A-HA on HEK-293T cells and the latter, for immunoblotting. A mouse IgG1 isotype antibody (no. IM0571) was obtained from Beckman Coulter (Mississauga, ON, Canada) and used as a negative control.

The monoclonal antibody clone 50C1 against an extracellular epitope of CLEC12A was generated and previously reported in Lahoud et al (18). APC-labeled anti-CLEC12A antibody (clone 50C1; no. 353606) and the mouse IgG2a isotype control (no. 401502) antibody were obtained from BioLegend (Pacific Heights Blvd, San Diego, CA). The affiniPure F(ab')<sub>2</sub> fragment goat anti-mouse IgG F(ab')<sub>2</sub> fragment specific (no. 115-006-072), horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit IgG (no. 711-035-152), horseradish peroxidase-labeled donkey anti-mouse IgG (no. 715-035-150) and Fluorescein (FITC)-AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> fragment goat anti-mouse IgG, Fcγ fragment specific (no. 115-096-071) antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Anti-phospho-Akt (Thr308;

no.9275), anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182; no.9216) and anti-phospho-(Ser) PKC substrate motif (no. 6967) antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Anti-phosphotyrosine (clone 4G10, no. 05-321) and polyclonal anti-PI3K p85 antibodies (no. 06-195) were purchased from EMD Millipore (Etobicoke, ON, Canada) and the monoclonal anti-flotillin-1 antibody (no. 610820) from BD Transduction Laboratories (Mississauga, ON, Canada). Goat anti-mouse IgG (H+L) conjugated AlexaFluor 488nm (A-11011) and the goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugated AlexaFluor 594nm (A-10012) antibodies were purchased from Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

The anti-phospho CLEC12A ITIM antibody was generated by injecting rabbits with a peptide composed of the amino acids within and around the ITIM motif or with a phosphorylated version of the same peptide, by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Sera positive for CLEC12A reactivity were subject to a negative adsorption purification process to obtain the affinity purified anti-CLEC12A antibody that we named R-94P.

#### **1.4.2 Reagents.**

Sodium orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), trypsin inhibitor, PMSF, OptiPrep™ density gradient medium, Nonidet P-40, Dextran T-500, aprotinin and leupeptin, methyl- $\beta$ -cyclodextrin (C4555) and colchicine (C9754) were obtained from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Percoll and protein A sepharose beads were purchased from GE Healthcare Life Science (Mississauga, ON, Canada) and Western Lightning Chemiluminescence Plus from PerkinElmer (Guelph, ON, Canada). Lymphocyte separation medium, geneticin, HEPES, fetal bovine serum (FBS) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) were obtained from Wisent Bioproducts (St-Bruno, Qc, Canada) and diisopropyl fluorophosphate (DFP) from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). Gelatin, Tween20 and hydrogen peroxide (30%) were purchased from Fischer Scientific (Ottawa, ON, Canada) and polyethylenimine (PEI) from VWR (Mississauga, ON, Canada). Lipofectamine™ 2000 reagent, SlowFade™ Gold antifade reagent and Opti-MEM medium were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) and bovine serum albumin (BSA), PP2, PP3, Wortmannin and LY294002 from EMD Millipore (Etobicoke, ON, Canada). CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl) dimethylammonio) propanesulfonic acid) was obtained from Roche Applied Science (Laval, QC, Canada) and extracellular CXCL8/IL-8 (human IL-8 cytoset, no. CHC1303) from Invitrogen (ON, Canada).

Triclinic MSU crystals were synthesized and characterized as previously described by Naccache et al. (19). Latrunculin A (#10010630) was purchased from Cayman Chemical (Michigan, USA).

#### **1.4.3 Cells.**

Neutrophils were purified from blood donations of healthy adult volunteers collected in blood collection tubes containing sodium citrate as described in Gagné et al. (9). Isolated neutrophils were resuspended in Mg<sup>2+</sup>-free Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>. The entire procedure was carried out under sterile conditions. For the phosphoproteomics experiments, neutrophils were isolated using plasma-Percoll gradients followed by hypotonic lysis to remove red blood cells and resuspended in KRPB with CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>.

HEK-293T and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate and 10% heat-inactivated fetal bovine serum. No antibiotics were used to culture these cell

#### **1.4.4 Neutrophil stimulation.**

Neutrophils (4x10<sup>7</sup> cells/ml) were pre-incubated with 1mM of DFP for 10 min at room temperature prior to stimulation. For CLEC12A cross-linking, cells were incubated with 0.5µg of the 50C1 antibody or mouse isotype IgG2a/106 cells for 5 min at 37°C. The cells were then washed to remove unbound antibody prior to cross-linking with 3 µg/106 cells of goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> anti-F(ab')<sub>2</sub> antibody for the indicated times. For MSU stimulation, neutrophils were stimulated with 3 mg/ml of MSU crystals for the indicated time at 37°C. In certain experiments, CLEC12A was cross-linked as above to induce the internalization of CLEC12A before stimulation with 3mg/ml of MSU crystals. After MSU stimulation, an aliquot of the stimulated cells was transferred at the indicated times directly into the same volume of 2X modified Laemmli's sample buffer (composition of 1X: 62.5mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% (w/v) SDS, 8.5% (v/v) glycerol, 2.5 mM orthovanadate, 0.025% bromophenol blue, 10µg/ml leupeptin, 10µg/ml aprotinin, 5% (v/v) β-mercaptoethanol) and heated at 95°C for 7 min. For kinetic experiments with the p38 inhibitor, cells were incubated with 10µM of SB203580 or diluent (DMSO) for 25 min at 37°C prior to stimulation with 3mg/ml MSU.

#### **1.4.5 Plasma membrane preparations.**

Neutrophils ( $4 \times 10^7$  cells/ml) were pre-incubated with 1 mM DFP for 10 min followed by MSU stimulation or 50C1 cross-linking as described above. When indicated, cells were preincubated with 10 $\mu$ M of Src inhibitor PP2 or its inactive analog PP3 for 10 min at 37°C prior to the addition of MSU and terminating the stimulation in an ice bath. The cells were then subject to a quick spin (15,000  $\times$  g) and resuspended in cold modified relaxation buffer (100 mM KCl, 3 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7.4, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10 $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 250  $\mu$ g/ml trypsin inhibitor, 1 mM PMSF, 3 mM DFP) prior to sonication on ice for 22 sec at power level 1 in a Branson Sonifier 450 sonicator. Lysates were centrifuged at 400  $\times$  g for 2 min at 4°C and the supernatants (900  $\mu$ l) added to the top of a two-step Percoll gradient composed of an equal volume (1.4 ml) of a 1.12 g/ml Percoll solution layered beneath a 1.05 g/ml Percoll solution, as described in Kjeldsen et al(20). The Percoll gradients were centrifuged for 30 min at 37,000  $\times$  g at 4 °C in a fixed angle rotor (Beckman TLA100.4). The plasma membranes that partitioned to the upper portion of the gradient underneath the cytosol fractions were collected and diluted in modified relaxation buffer prior to a centrifugation at 100,000  $\times$  g for 45 min at 4 °C to remove the Percoll and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . An aliquot was boiled for 5 min in the same volume of 2X non-reducing (without  $\beta$ -mercaptoethanol) modified Laemmli's sample buffer (see above) prior to analysis.

#### **1.4.6 Plasma membrane preparations.**

Neutrophils ( $4 \times 10^7$  cells/ml) were pre-incubated with 1 mM DFP for 10 min followed by MSU stimulation or 50C1 cross-linking as described above. When indicated, cells were preincubated with 10 $\mu$ M of Src inhibitor PP2 or its inactive analog PP3 for 10 min at 37°C prior to the addition of MSU and terminating the stimulation in an ice bath. The cells were then subject to a quick spin (15,000  $\times$  g) and resuspended in cold modified relaxation buffer (100 mM KCl, 3 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7.4, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10 $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 250  $\mu$ g/ml trypsin inhibitor, 1 mM PMSF, 3 mM DFP) prior to sonication on ice for 22 sec at power level 1 in a Branson Sonifier 450 sonicator. Lysates were centrifuged at 400  $\times$  g for 2 min at 4°C and the supernatants (900  $\mu$ l) added to the top of a two-step Percoll gradient composed of an equal volume (1.4 ml) of a 1.12 g/ml Percoll solution layered beneath a 1.05 g/ml Percoll solution, as described in Kjeldsen et al (20). The Percoll gradients were centrifuged for 30 min at 37,000  $\times$  g at 4°C in a fixed angle rotor (Beckman TLA100.4). The plasma membranes that partitioned to the upper portion of the gradient underneath the cytosol

fractions were collected and diluted in modified relaxation buffer prior to a centrifugation at  $100,000 \times g$  for 45 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to remove the Percoll and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . An aliquot was boiled for 5 min in the same volume of 2X non-reducing (without  $\beta$ -mercaptoethanol) modified Laemmli's sample buffer (see above) prior to analysis.

#### **1.4.7 Isolation of detergent-resistant membrane domains.**

Plasma membranes freshly prepared from neutrophils ( $4 \times 10^7$  cells/ml) incubated with isotype or CLEC12A antibody and cross-linked with an anti-F(ab')<sub>2</sub> antibody were solubilized in 1% Nonidet P-40 buffer (137 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.4, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  trypsin inhibitor, 1 mM PMSF, 3 mM DPF) for 20 min on ice. Solubilized membranes were then placed on the top of a 48% OptiPrep™ cushion prepared from a stock solution (59.4% OptiPrep™, 10 mM Hepes, pH 7.4) and centrifuged at  $100,000 \times g$  for 1 h at  $4^{\circ}\text{C}$  in a TLA 100.4 rotor to remove soluble protein as described in Fernandes et al (21). The pellets were washed in the same buffer as above by centrifugation at  $100,000 \times g$  for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Two OptiPrep™ pellets from the same donor and with the same stimulation conditions were pooled and adjusted to 40% (v/v) OptiPrep™ with a stock solution of 59.4% OptiPrep™ in 10 mM Hepes (pH 7.4). This insoluble plasma membrane preparation (700  $\mu\text{l}$ ) was transferred to a 4-ml centrifuge tube and overlaid with 700  $\mu\text{l}$  of ice-cold solutions of 35, 30, 25, 20, and 0% (300 $\mu\text{l}$ ) OptiPrep™ successively. The gradients were centrifuged at  $38,000 \times g$  for 3 h at  $4^{\circ}\text{C}$  in a TLA 100.4 rotor. Twelve fractions of 300  $\mu\text{l}$  were collected from the top of the gradient and proteins were chloroform/methanol-precipitated as described previously (22). The precipitated proteins were resuspended in 35  $\mu\text{l}$  of 2X non-reducing (without  $\beta$ -mercaptoethanol) modified Laemmli's sample buffer (see above) and heated for 5 min at  $95^{\circ}\text{C}$ .

#### **1.4.8 Preparation of detergent-resistant cell lysate pellets.**

Neutrophils were pre-incubated with 1mM of DFP for 5 min at room temperature and incubated with 2.5mM methyl- $\beta$ -cyclodextrin for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  prior to stimulation with 1mg/ml MSU for 1.5min. After a quickspin cells were resuspended in a 1% NP40 buffer, lysed for 10 min at  $40^{\circ}\text{C}$  and centrifuged at  $13,000 \times g$  for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Cell pellets were then washed in 1X HBSS, centrifuged at  $400 \times g$  for 2 min and the pellet resuspended in 1X sample buffer and boiled at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min.

#### **1.4.9 Antibody-induced internalization of CLEC12A in neutrophils.**

Before CLEC12A antibody-induced internalization, neutrophils ( $10 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with the following drugs that perturb the cytoskeleton or with the diluent. Neutrophils were incubated with  $10 \mu\text{M}$  colchicine (a microtubule inhibitor),  $0.5 \mu\text{M}$  latrunculin A (an actin filament inhibitor) or DMSO for 30 min or 5 min at  $37^\circ\text{C}$ , respectively. Cells were also incubated with  $2.5 \text{ mM}$  methyl- $\beta$ -cyclodextrin (a cholesterol-depleting agent) for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ . It is of note that at these drug concentrations, neutrophil viability is not affected, and the cells do not degranulate (data not shown). Particular attention was paid to the effect of the drugs on degranulation since CLEC12A cell-surface expression was the outcome measure of these assays. Higher concentrations of methyl- $\beta$ -cyclodextrin induce neutrophil degranulation. After incubation with the drugs or diluents, CLEC12A was cross-linked by incubating neutrophils with  $0.1 \mu\text{g}/10^6$  cells of 50C1 for 5 min at  $37^\circ\text{C}$  followed by cross-linking with  $0.3 \mu\text{g}/10^6$  of a goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> anti F(ab')<sub>2</sub> antibody or incubation in HBSS (negative internalization control). The extent of CLEC12A internalization was determined by flow cytometry with an anti-mouse Fc- FITC conjugated ( $13 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) antibody.

#### **1.4.10 Plasmid construct.**

The wild type, CLEC12A coding sequence used for our constructs corresponds to the CLEC12A isoform 2 sequence (Q5QGZ9-2 Uniprot). CLEC12A was fused to a HA tag at its C-terminus by PCR. The sequence of the forward primer used is: 5'-ATGTCTGAAGAAGTTACTTTTGCAGATC-3', and of the reverse primer that harbors a HA-tag is: 5'-TCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATGCCTCCC TAAAATA TG-3'. The PCR product was ligated to the pCRII plasmid with the TA cloning kit (Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) and then subcloned into the EcoRI site of pcDNA3 using standard molecular biology techniques. The final construct was sequenced and named CLEC12A-wt. To generate the CLEC12A-HA-Y7F construct with a mutated tyrosine in the ITIM motif (Y7F), the open reading frame of CLEC12A was amplified with the forward primer 5'-ATGTCTGAAGAAGTTACTTTTGCAGATC-3' and the reverse primer that harbors a HA-tag 5'-TCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATGCCTCCC TAAAATA TG-3'. The PCR product was ligated to the pCRII plasmid and then subcloned into pcDNA3 using the same strategy as for CLEC12A-HA-wt.

#### **1.4.11 Transfection of HEK-293T and HeLa cells.**

Cells were seeded at a density of  $0.3 \times 10^6$  cells/well (HEK 293T) or  $0.45 \times 10^6$  cells/well (HeLa) in 6-well plates the day prior to transient transfection with the CLEC12A-HA-wt or CLEC12A-HA-Y7F with Lipofectamine™ or PEI as per the manufacturer's instructions. The cells were harvested 48 h post-transfection with PBS/10 mM EDTA prior to analysis. Lipofectamine™ or PEI was also used to stably transfect HEK-293T cells seeded at a density of  $0.2 \times 10^6$  cell/well in 6-well plates the day before transfection. Forty eight hours post-transfection, the media was changed and supplemented with 1mg/ml geneticin for 1 week and cells were sorted with an APC-labeled CLEC12A antibody (clone 50C1) by FACS (BD FACSAria II cell sorter, BD Transduction Laboratories, Mississauga, ON, Canada) and seeded in a 96-well plate at a density of 1 cell/well (Supplementary Figure 1.1). Stable cell lines were selected with 1mg/ml geneticin and thereafter the selection was maintained with 300 µg/ml geneticin.

#### **1.4.12 CLEC12A immunoprecipitation.**

HEK-293T cells ( $1.4 \times 10^7$  cells/ml) transiently transfected with the CLEC12A constructs were stimulated with freshly prepared pervanadate [ $\text{H}_2\text{O}$ , orthovanadate (1mM), hydrogen peroxide (0.03%)] at a concentration of 11,1% for 10 min at 37°C in the dark. Half the cells were lysed in the same volume of 2X modified Laemmli's sample buffer for input sample analysis. CLEC12A was immunoprecipitated from the other half of the cells as previously described in Fernandes et al (21). Briefly, cells underwent a quick spin ( $15,000 \times g$ ) and the cell pellet was resuspended in cold CHAPS buffer (10mM Tris-HCL pH 7.3, 137.2 mM NaCl, 1mM EDTA, 10µg/ml aprotinin, 10µg/ml leupeptin, 2mM sodium orthovanadate, 50µg/ml trypsin inhibitor, 1mM PMSF, 0.6% CHAPS) and lysed for 10 min on ice. Cells were then sonicated with a 3 sec pulse on ice with a Branson ultrasonic SONIFIER 450 (Branson ultrasonics corporation, Connecticut, USA) before centrifugation at  $15\,000 \times g$  for 10 min at 4°C. The supernatants were incubated at 4°C with gentle rotation for 3 h with protein A sepharose beads previously coated with anti-CLEC12A antibody (50C1) for 1 h (2µg for immunoprecipitation of  $1.4 \times 10^7$  cells lysate). The beads were then centrifuged at  $400 \times g$  for 2 min at 4°C followed by three washing steps with cold CHAPS lysis buffer. Before the last wash, beads were divided in half, washed and resuspended in non-reducing or reducing modified Laemmli's sample buffer 1X (see above) and incubated at 95 °C for 7 min.

#### **1.4.13 CLEC12A cross-linking on HEK-293T cells.**

HEK-293T stably expressing CLEC12A-HA-wt or CLEC12A-HA-Y7F were harvested (106 cells/100µl PBS) and incubated with the anti-HA, mouse monoclonal or the isotype antibody (3 µg/106 cells) for 5 min at 37°C and centrifuged prior to cross-linking with the goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> anti F(ab')<sub>2</sub> antibody (3 µg/106 cells) for 10 min at 37°C. Cross-linking was stopped on ice and the cells centrifuged at 1000 x g for 1 min. Cell pellets were resuspended in cold NP-40 lysis buffer (10mM Tris-HCL pH 7.3, 137.2mM NaCl, 1mM EDTA, 10µg/ml aprotinin, 10µg/ml leupeptin, 2mM sodium orthovanadate, 50µg/ml trypsin inhibitor, 1mM PMSF, 1% NP-40) and incubated for 10 min on ice prior to centrifuging at 15 000 x g for 10 min at 4°C. An aliquot of the supernatant (SN) was incubated at 95 °C for 7 min in the same volume of non-reducing, modified 2X Laemmli's sample buffer. The pellets were washed with cold NP-40 lysis buffer and centrifuged at 15 000 x g for 5 min at 4°C. Cells were sonicated with an ultrasonic pulse for 3 sec prior to the addition of non-reducing, modified 2X Laemmli's sample buffer to the pellet and incubating at 95 °C for 7 min.

#### **1.4.14 Electrophoresis and immunoblotting.**

Proteins were separated by SDS-PAGE on 10% acrylamide gels and transferred to PVDF membranes. Blocking agents and antibodies were diluted in a TBS-Tween solution (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% (v/v) Tween 20). Non-fat milk solution (5% w/v) was used to block nonspecific sites prior to immunoblotting with the anti-flotillin-1, anti-phospho-Akt, anti-CLEC12A (50C1), anti-phosphoCLEC12A (R-94P), anti-phospho-(Ser) PKC substrate and anti-HA antibodies. Gelatin solution (2%, w/v) was used to block nonspecific sites before anti-phosphotyrosine (pY), anti-phospho-p38 and anti-PI3K/p85 immunoblotting. Anti-flotillin-1 [0.125µg/ml], rabbit anti-HA [1µg/ml] and anti-CLEC12A antibody [4µg/ml] were diluted in TBS-Tween (0.15%). Anti-phosphoCLEC12A (R94-P) was diluted at 0.4-0.8µg/ml in TBS-T/BSA (5% w/v). Anti-phospho-(Ser) PKC substrate and anti-phospho-Akt were diluted 1:500 with TBS-T/BSA (5% w/v) as recommended by the manufacturer. Anti-phosphotyrosine antibody (0.25µg/ml), the anti-PI3K p85 and anti-phospho p38 (1/5000 and 1/500) were diluted in gelatin 2% as recommended by the manufacturer. Horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit IgG and horseradish peroxidase-labeled donkey anti-mouse IgG were diluted at 50ng/ml in TBS-Tween solution. Chemiluminescence reagents were used to detect antibodies

within a maximal exposure time of 5 min. Equal protein loading was verified by immunoblotting against flotillin-1 or the PI3K p85 subunit.

#### **1.4.15 Confocal microscopy.**

Forty-eight hours after transfecting HeLa cells with CLEC12A-HA-wt, the receptor was engaged with a rabbit anti-HA antibody (3 µg/106 cells) for 7 min at 37°C followed by cross-linking with a donkey F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit F(ab')<sub>2</sub> antibody (4 µg/106 cells) for 2 or 5 min at 37°C. For comparison, cells were also incubated with the anti-HA antibody alone. Cells were stained as previously described in Gagné et al. (23) with a few modifications. Briefly, cells were fixed in cold methanol for 20 min and washed once for 5 min at 4°C with cold PBS, and once for 5 min at room temperature. Cells were permeabilized with 0.05% Triton X-100 in PBS for 10 min at room temperature followed by an incubation for 20 min at room temperature in blocking solution (0.05% Triton X-100 in PBS supplemented with 4% FBS). Cells were then stained with the mouse anti-flotillin-1 antibody [10 µg/mL] in blocking solution overnight at 4°C prior to a wash for 30 min at 37°C and an incubation in 5µg/mL of secondary antibodies (anti-rabbit AlexaFluor 594 nm and anti-mouse AlexaFluor 488nm) for 30 min at 37°C in blocking solution. After a wash in PBS 0.05% Triton X-100 for 30 min at 37°C and several subsequent washes in water for 2 min, 90% ethanol for 1 min, and 99% ethanol for 1 min, cells were mounted with SlowFade™ Gold antifade reagent. No non-specific binding of the secondary antibodies was observed (data not shown). Images were acquired at 63X with a Z-stack spacing of 0.05 µm with a CSU-X1 confocal scanner system and analyzed with the Volocity quantitation module as previously described in Gagné (23). The confocal images were deconvoluted and the point spread function that was calculated for the GFP channel and Texas Red channel was applied using velocity module for iterative restoration. The co-localization module was used to determine the degree of co-localization between CLEC12A and flotillin-1 by calculating the Pearson's linear correlation coefficient.

#### **1.4.16 Phosphoproteomics and analysis.**

Neutrophils were suspended in KRFB containing calcium and magnesium and incubated with or without TNF-α (2 ng/ml) and with or without 50C1 for 5 or 10 min at 37°C prior to cross-linking with a goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse F(ab')<sub>2</sub>. Following stimulation, cells were pelleted immediately at 4000 rpm for 1 min at 4°C and lysed by resuspending the pellet in ice-cold

extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM HEPES, 25 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM EGTA), and 1% (w/w) protease inhibitor cocktail, followed by sonication using 3 to 5 cycles at room temperature. Cell debris and nuclei were removed by centrifugation at 700 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was transferred to ultracentrifugation tubes and centrifuged at 100,000 x g for 30 min at 4°C. After centrifugation, the supernatant was stored at -80°C until used. The phosphoproteomics was performed as previously described in McLeish et al. (24).

Samples were reduced, alkylated, and trypsinized and phosphopeptides enriched using sequential TiO<sub>2</sub> and immobilized metal affinity chromatography chromatographic steps to purify polyphosphorylated peptides and monophosphorylated peptides, as described previously (24). The effects of co-isolation of non-phosphorylated peptides enriched in aspartic acid and/or glutamic acid residues were minimized with the use of 1 M glycolic acid as a competitive ligand for the TiO<sub>2</sub> step. Targeted analysis of phosphopeptide fractions was achieved using a nanoflow ultra HPLC/nanospray- Linear Ion Trap-Orbitrap Elite mass spectrometer with collision-induced dissociation and electron transfer dissociation fragmentation in a bottom-up approach.

Acquired data were analyzed against human Reference Sequence (Human-Ref131014.fasta) and decoy databases using Sequest HT by PD1.4, considering tryptic cleavage, maximum of 2 missed cleavages per peptide, and a mass error of 50 ppm in precursor ions of a specific mass-to-charge ratio and 1.2 Da in fragmented precursor ions data. The searches considered a maximum of 4 modifications to any peptide and the modifications of cysteine (carbamidomethyl/+57.021 Da), methionine (oxidation/+15.995 Da), and serine/threonine/tyrosine (phospho/+79.966 Da). PD1.4 data were filtered first to retrieve all peptides containing serine-, threonine-, or tyrosine containing peptides (putative kinase-targetable peptides). Peptide grouping was enabled by mass and sequence. Protein grouping was enabled to consider only PSMs with confidence at least low/medium/high-confidence peptides and to consider proteins only with PSMs having a delta correlation better than 1.0. These data were filtered to eliminate entries where a low-confidence assignment was the only assignment present in any condition. If medium- or high-confidence peptides were present in 1 condition, then the peptide areas were exported for all conditions. For this purpose, medium-confidence peptides had minimal xcorr values for charge +2. 0.9, charge +3. 1.2, and charges +4–7. 1.5, and for high-confidence peptides, the corresponding xcorr values were for charge +2. 2, charge +3. 2.5, and charges +4–7.3. These peptides were

exported to an Excel spreadsheet for peptide grouping by mass and sequence and manual comparison of abundance between treatment and control conditions.

#### **1.4.17 Enzyme-linked immunosorbent assays.**

Extracellular CXCL8/IL-8 was quantified by ELISA. Briefly, neutrophils ( $2 \times 10^7$  cells/ml) in RPMI without phenol red were incubated with the indicated concentrations of compounds or diluent (DMSO) for 10 min at  $37^\circ\text{C}$  prior to the addition of buffer or 1 mg/ml MSU. Neutrophil-MSU contact was synchronized by centrifuging at  $400 \times g$  for 10 seconds. After a 3 h incubation at  $37^\circ\text{C}$ , cells were centrifuged at  $400 \times g$  for 2 min and the supernatants harvested and clarified with a centrifugation at  $16,000 \times g$  for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ . Each condition was measured in duplicate (Spectramax 190 plate reader) prior to quantifying IL-8 as per the manufacturer's instructions.

#### **1.4.18 Statistical analysis.**

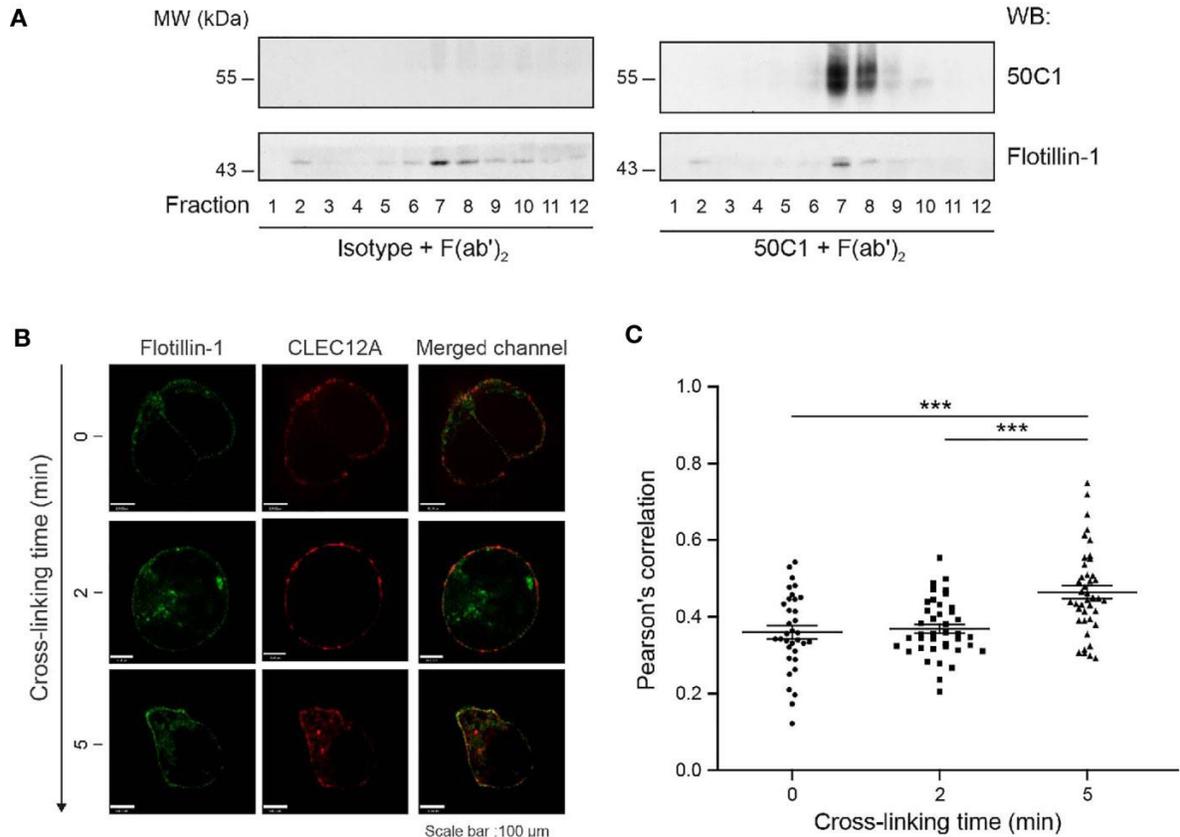
Numerical values are means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were either performed using one-way ANOVA followed by Fisher or Dunn's multiple comparisons tests, or two-way ANOVA followed by the Turkey's multiple comparisons test. Calculations were made with GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Significance was considered at a value of  $P < 0.05$ .

### **1.5 Results.**

#### **1.5.1 CLEC12A cross-linking induces its translocation to detergent-resistant membrane domains.**

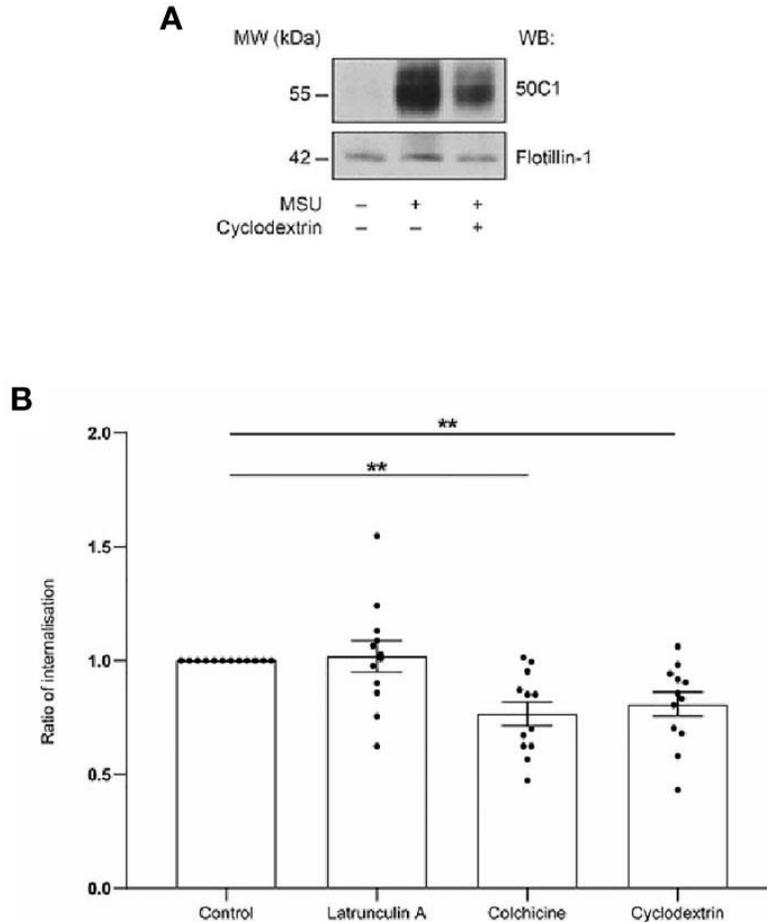
To understand the molecular events initiating CLEC12A internalization and regulation of neutrophil activation, we determined receptor distribution in plasma membrane domains known to facilitate cellular responses (25). These membrane domains are detergent-resistant and enriched for signaling and structural proteins as well as flotillin. Detergent-resistant domains were isolated from a preparation of neutrophil plasma membranes devoid of soluble protein, by differential centrifugation. Localization of CLEC12A in flotillin-rich membrane domains was determined by Western blotting of detergent-resistant, plasma membrane fractions obtained from neutrophils with or without receptor cross-linking with the CLEC12A-specific antibody, 50C1, followed with a secondary antibody (9). Flotillin-1 was primarily located in fractions 7 and

8 (Figure 1.1A). Cross-linking resulted in marked enrichment of CLEC12A in neutrophil plasma membrane fractions containing flotillin-1 compared to membrane fractions of neutrophils after cross-linking with isotype antibody that are devoid of the receptor.



**Figure 1.1** CLEC12A translocates to detergent-resistant membrane domains after antibody-induced cross-linking.

(A) Detergent-resistant membrane domains were isolated from plasma membrane preparations from human neutrophils incubated with an isotype antibody or 50C1 prior to cross-linking. Fractions were migrated on a non-reducing acrylamide gel and immunoblotted with 50C1 or flotillin-1. Data are representative of 3 independent experiments. (B) Co-localization of CLEC12A and flotillin-1 was determined in HeLa cells transiently expressing CLEC12A-HA-wt after cross-linking with an anti-HA antibody or incubation with the anti-HA antibody alone. Data are representative of 3 independent experiments. (C) The extent of co-localization was determined by Pearson R values (mean  $\pm$  SEM) for the different cross-linking times. Statistical analysis: one way ANOVA and Dunn's test were performed to compare cross-linked condition to control cells. \*\*\*P < 0.001.



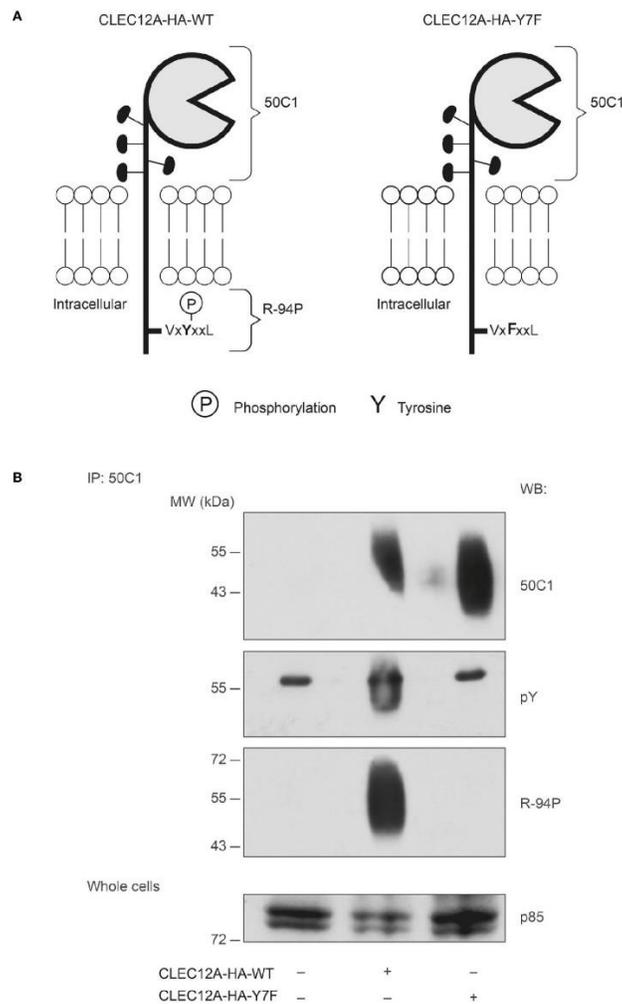
**Figure 1.2** Antibody-induced cross-linking and internalization of CLEC12A is dependent on cholesterol-rich, membrane domains and microtubules.

(A) Methyl- $\beta$ -cyclodextrin-treated neutrophils were lysed in cold, 1% Nonidet P-40 after MSU stimulation and the insoluble pellet of the lysate immunoblotted with 50C1. These data are representative of 3 independent experiments. (B) Cell-surface CLEC12A expression of neutrophils treated with all compounds or diluent (control) was determined by flow cytometry after CLEC12A cross-linking. These data are representative of 12 independent experiments (Mean  $\pm$  SEM). Statistical analysis: One way ANOVA and Fischer's LSD. \*\* P < 0.01.

### 1.5.2 CLEC12A is phosphorylated following translocation.

To follow CLEC12A ITIM phosphorylation, an antibody that recognizes the phosphorylated ITIM of CLEC12A was developed (Figure 1.3A). The affinity purified antibody (R-94P) bound a phosphorylated version of a peptide composed of the ITIM of CLEC12A, but not the non-

phosphorylated form of the peptide, as determined by dot blot (data not shown). To confirm the specificity of R-94P for the phosphorylated form of the CLEC12A ITIM, HEK-293T cells were transfected with CLEC12A-HA-wt or CLEC12A in which the tyrosine of its ITIM is substituted with a phenylalanine (CLEC12A-HA-Y7F). The phosphorylation of CLEC12A-HA-wt immunoprecipitated from pervanadate-treated HEK-293T cells was detected with an antibody against phosphorylated tyrosine residues (pY) and with R-94P (Figure 1.3B). In contrast, neither antibody recognized CLEC12A-HA-Y7F. R-94P thus recognizes the phosphorylated ITIM of CLEC12A.

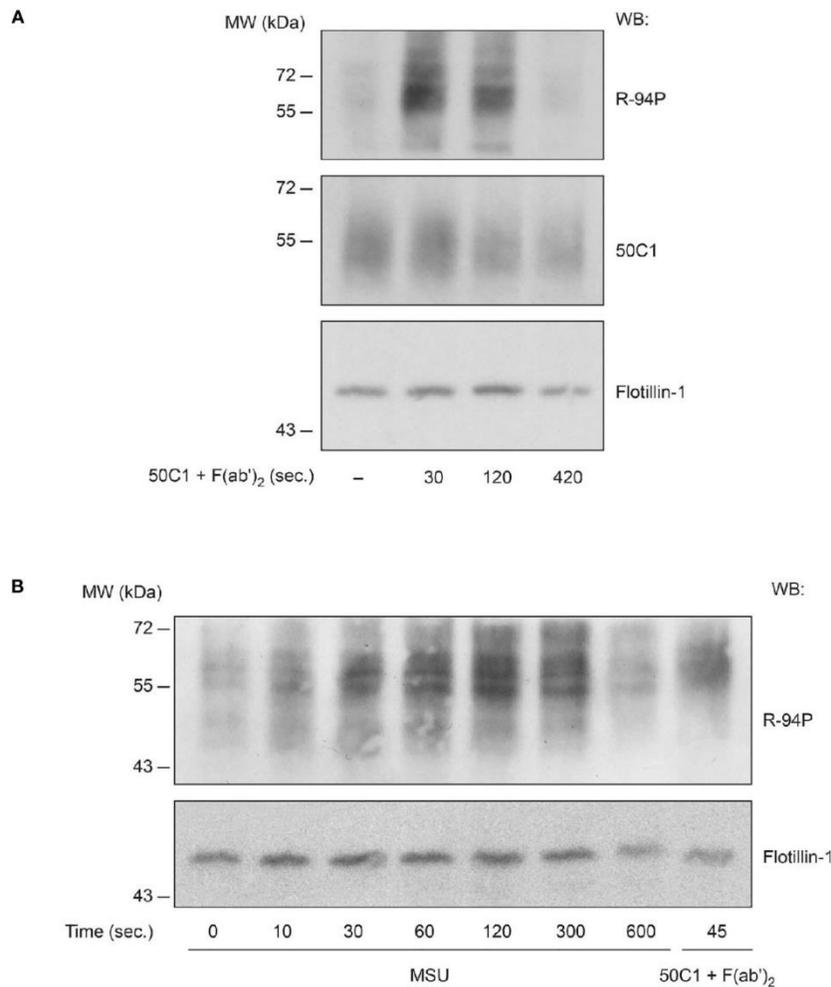


**Figure 1.3** Antibody-induced cross-linking of CLEC12A induces the phosphorylation of its ITIM in HEK-293T cells.

(A) A schematic diagram of the wild-type (CLEC12A-HA-wt) and mutant (CLEC12A-HA-Y7F) constructs. Regions of the receptor recognized by 50C1 and the anti-CLEC12A ITIM phospho-antibody, R-94P, are indicated

by brackets. (B) HEK-293T cells transiently transfected with CLEC12A-HA-wt or CLEC12A- HA-Y7F were treated with pervanadate prior to immunoprecipitating with 50C1 and immunoblotting with 50C1, R-94P, an anti-phospho-tyrosine (pY) antibody or an anti-p85 subunit of PI3K (p85) antibody (loading control). Data are representative of 3 independent experiments.

As inhibitory receptors signal through the ITIM cytoplasmic motif (12), the phosphorylation of the CLEC12A ITIM was examined in human neutrophils. CLEC12A was cross-linked with 50C1 prior to Western blot analysis with R-94P of plasma membrane preparations. Minimal CLEC12A phosphorylation was detected in the plasma membrane of resting human neutrophils (Figure 1.4A and Supplementary Figure 1.2). In contrast, CLEC12A phosphorylation was markedly enhanced at 30 seconds and 120 seconds after cross-linking, and returned to basal levels by 7 min. Since MSU-stimulated neutrophils internalize CLEC12A, the ability of MSU to stimulate the phosphorylation of the CLEC12A ITIM was examined in human neutrophils. Figure 1.4B shows a time course of MSU-induced CLEC12A phosphorylation in neutrophil plasma membrane preparations. R-94P immunoblotting detected phosphorylation above basal levels within 10 seconds of MSU stimulation that peaked between 1 and 2 min, and returned to basal levels by 10 min. A time-dependent phosphorylation of CLEC12A's ITIM is thus induced by MSU and 50C1 cross-linking.

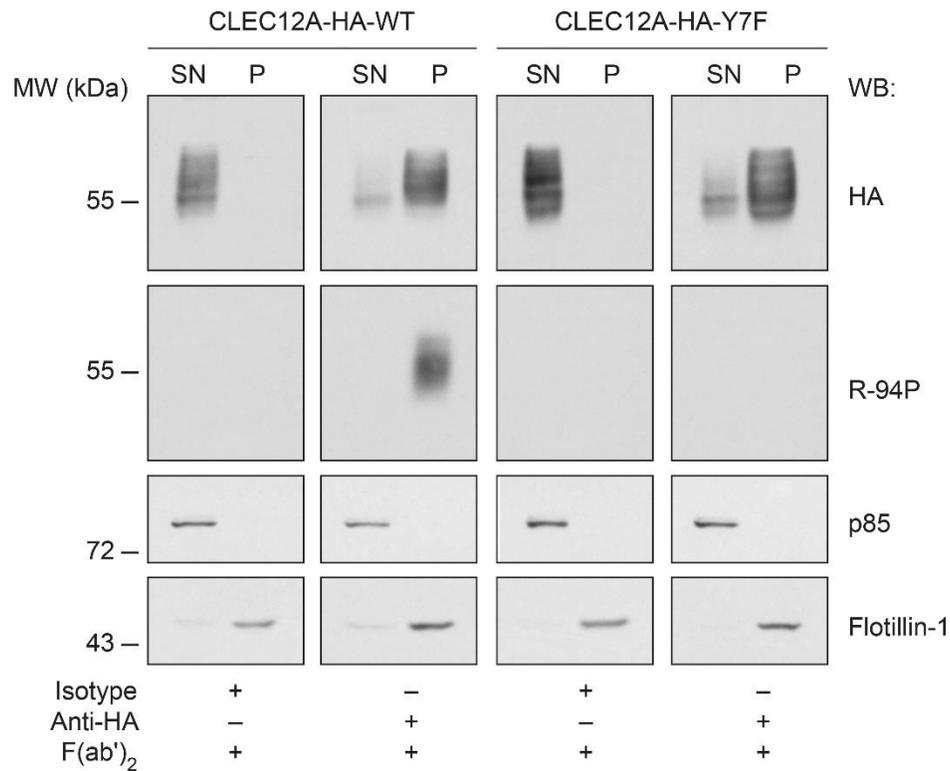


**Figure 1.4** CLEC12A phosphorylation upon antibody-induced cross-linking and MSU stimulation in human neutrophils.

(A) Cell-surface CLEC12A was cross-linked with 50C1 on human neutrophils prior to immunoblotting plasma membrane preparations with R-94P, 50C1 or flotillin-1 (loading control) antibodies. Data are representative of 3 independent experiments. (B) Plasma membranes isolated from MSU-stimulated neutrophils were immunoblotted with R94P or flotillin-1. For comparison, CLEC12A was also cross-linked as in (A) for 45 seconds. Data are representative of 3 independent experiments.

The relationship of ITIM phosphorylation to translocation of CLEC12A into flotillin-1-containing membrane domains was then examined by cross-linking CLEC12A-HA-wt or CLEC12A-HA-Y7F with anti-HA and secondary antibodies in transiently transfected HEK-293T cells as neutrophils are not amenable to transfection. In cells incubated with isotype antibody, CLEC12A-HA-wt was only detected in the soluble fractions of cell lysates. CLEC12A-

HA-wt cross-linking resulted in translocation to the flotillin-1 enriched, detergent-resistant cell pellet (Figure 1.5, two left panels). Western blot with R-94P showed ITIM phosphorylation of CLEC12A-HA-wt only within flotillin-1 enriched, cell pellets following receptor cross-linking. Cross-linking CLEC12A-HA-Y7F also resulted in translocation from the soluble to the flotillin-1 enriched cell pellet. Phosphorylation of the CLEC12A ITIM thus occurs after receptor cross-linking and translocation to flotillin-rich membrane fractions. Moreover, CLEC12A phosphorylation is not required for CLEC12A translocation to flotillin-rich, membrane fractions.

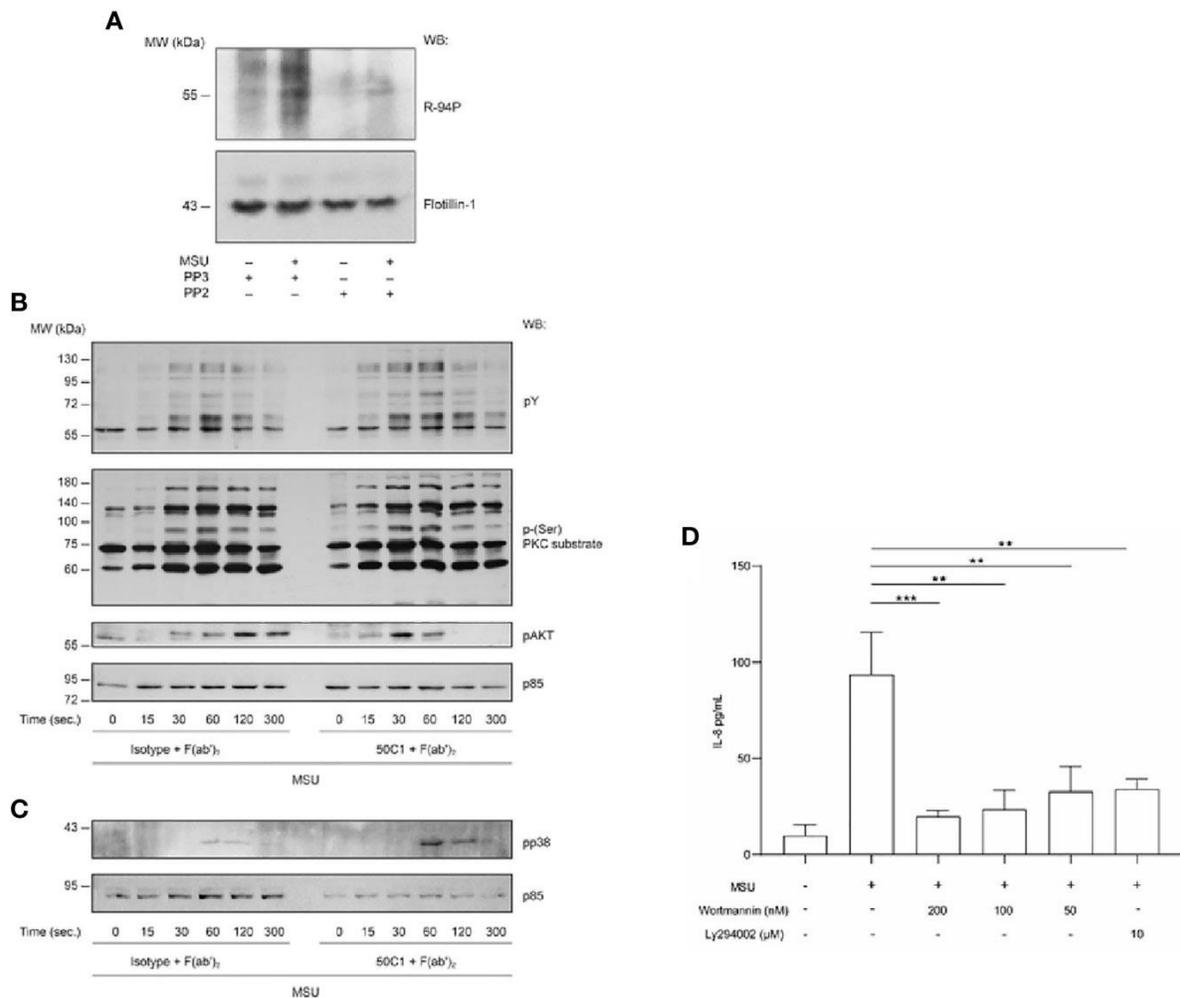


**Figure 1.5** CLEC12A is phosphorylated upon its antibody-induced translocation to the flotillin-rich, detergent-insoluble cell pellet.

Proteins in the flotillin-enriched pellet (P) and supernatant (SN) of cell lysates of HEK-293T cells stably transfected with CLEC12A-HA-wt or CLEC12A-HA-Y7F after cross-linking with an anti-HA antibody were immunoblotted with an anti-HA, R-94P, anti-PI3K p85 subunit (p85) or flotillin-1 antibodies. The p85 protein was a loading control for proteins in the (SN) and flotillin-1 for proteins in (P). Data are representative of 3 independent experiments.

As Src kinases are known to phosphorylate ITIM motifs (14), the ability of the Src kinase inhibitor PP2 to prevent CLEC12A phosphorylation in human neutrophils was examined.

Western blot analysis with R-94P of plasma membranes prepared from neutrophils stimulated with MSU shows that PP2, but not the inactive analog PP3, prevented phosphorylation of CLEC12A (Figure 1.6A). Taken together, our data indicate that following clustering, CLEC12A translocates to flotillin-rich plasma membrane domains of neutrophils where the ITIM region is phosphorylated in a Src-dependent manner.



**Figure 1.6** Antibody-induced cross-linking of CLEC12A enhances the phosphorylation of tyrosine residues, PKC substrates, Akt and p38 to regulate MSU-induced IL-8 production in human neutrophils.

(A) Plasma membranes were isolated from neutrophils incubated with PP2 or its inactive analog PP3 prior to MSU stimulation and immunoblotting with R-94P or an anti-flotillin-1 antibody (loading control). Data are representative of 3 independent experiments. (B, C) CLEC12A was cross-linked on neutrophils with 50C1 prior to MSU stimulation and cell lysates immunoblotted with the indicated antibodies and the loading control antibody (anti-

PI3K p85 subunit). pY = anti-phosphotyrosine antibody. Data are representative of 3 independent experiments. (D) CXCL8/IL-8 released by MSU-stimulated neutrophils in the presence or absence of Wortmannin, Ly294002 or dilutant (DMSO) was determined by ELISA. Data are representative of 3 independent experiments. Statistical analysis: Two-way ANOVA and the Turkey's multiple comparisons test was performed to compare the treated cells to the control cells. \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

### **1.5.3 Reduced expression of cell-surface CLEC12A enhances MSU-stimulated kinase activity in human neutrophils.**

We previously reported several signaling events induced by MSU in neutrophils, one of which is regulated by CLEC12A, the tyrosine phosphorylation of intracellular substrates (9, 27). To identify additional signaling events regulated by CLEC12A in activated neutrophils, the effect of reduced CLEC12A expression on MSU-induced protein phosphorylation was examined. Western blotting of lysates prepared from neutrophils stimulated with MSU after antibody-induced cross-linking of CLEC12A showed enhanced MSU-induced tyrosine phosphorylation of proteins larger than 72kD compared to neutrophils incubated with control isotype antibody confirming our previous observation (Figure 1.6B, pY blot). A similar observation was made for serine phosphorylation of PKC substrates as early as 15 sec (Figure 1.6B, p-(Ser)-PKC substrate blot). We interpret these results to indicate that cell-surface CLEC12A expression required for counter-regulatory function in MSU-activated human neutrophils is associated with inhibition of both tyrosine kinase and PKC activity.

### **1.5.4 Proteomic analysis of protein phosphorylation after CLEC12A cross-linking on human neutrophils.**

Based on the regulation of protein phosphorylation by CLEC12A, an unbiased phosphoproteomic analysis was performed to identify candidate phosphorylation events induced by CLEC12A cross-linking in neutrophils. A total of 9367 phosphopeptides were identified from two separate experiments representing 3089 unique proteins. Proteins phosphorylated in response to CLEC12A cross-linking were identified by subtraction analysis of phosphopeptides detected from cells incubated with isotype antibody from those identified after 50C1 cross-linking. A total of 2033 phosphopeptides, representing 1259 unique proteins, were identified from neutrophils after CLEC12A cross-linking, but were absent in cells incubated with isotype antibody incubation. An additional 183 phosphopeptides from 120

unique proteins were present at a 2-fold higher abundance after cross-linking, compared to isotype control. Gene Ontology enrichment analysis for molecular function was performed on those 1379 proteins with enhanced phosphorylation following CLEC12A crosslinking. Supplementary Table 1 lists the 9 molecular functions of those phosphoproteins with statistically significant enrichment, including proteins with MAP kinase and GTPase activity and proteins involved in phospholipid binding, adhesion, and actin binding. STRING analysis of proteins with differential phosphorylation predicted 62 proteins that possessed kinase or phosphatase activity (Supplementary Table 2). Analysis of interactions among those 62 proteins by STRING defined three clusters of signaling proteins that might define relevant signal transduction pathways activated by CLEC12A cross-linking (Supplementary Figure 1.3). The cluster with the largest number of proteins contained components of the MAPK2 (ERK1) and MAPK8 (JNK1) signaling cascades and protein kinase C beta and delta. Another cluster contained ephrin receptors and ligands, and the tyrosine kinase BLK. The third cluster contained the catalytic subunit of PI3K and two subunits of AMPK.

As CLEC12A regulates phosphorylation of kinase substrates (Figure 1.6), we also screened for signal transduction pathways in stimulated human neutrophils after the antibody-induced down-regulation of CLEC12A. Based on the importance of TNF- $\alpha$  in rheumatoid arthritis (28) and gout (29), subtraction analysis of phosphoproteins generated by stimulation with TNF- $\alpha$  after cross-linking CLEC12A from those generated by TNF- $\alpha$  alone was performed. A total of 1884 phosphopeptides representing 1400 unique proteins were absent or showed a 2-fold or greater reduction in TNF- $\alpha$  stimulated cells in which CLEC12A internalization was induced by cross-linking. Gene Ontology enrichment analysis for molecular function of those 1400 proteins is shown in Supplementary Table 3. The categories of proteins showing reduced phosphorylation with CLEC12A internalization included cytoskeletal structural and regulatory proteins and protein kinases with both tyrosine kinase and serine/threonine kinase activity. STRING analysis of all 1400 proteins identified 94 proteins with kinase or phosphatase activity (Supplementary Table 4). STRING cluster analysis identified two major clusters (Supplementary Figure 1.4). The first, centered on MAPK8 (JNK1) contained the tyrosine kinases LYN, JAK3, and ABL1 and the serine/threonine kinases PAK1, PKC zeta, and ATM. The second cluster centered on the tyrosine kinase FYN contained tyrosine kinases JAK2, CSK and Ephrin receptors, PAK1, the catalytic subunit of PI3K, and the Akt activating kinase PKD1.

### **1.5.5 CLEC12A targets the PI3K-Akt pathway.**

As our phosphoproteomic analysis showed that CLEC12A regulated phosphorylation of members of the Akt pathway [PI3K, PKD1, and p38 MAPK; (30, 31)], we examined CLEC12A regulation of the Akt pathway in MSU-stimulated human neutrophils. Figure 1.6B shows that the peak of MSU-induced phosphorylation of Akt occurred earlier (30 sec vs 120 sec) in cells in which CLEC12A was internalized by cross-linking with 50C1 and an anti-F(ab')<sub>2</sub> antibody. As previously reported (31), Supplementary Figure 1.5 shows that the p38 MAPK inhibitor, SB203580, blocked MSU-induced phosphorylation of Akt. Thus, the effect of CLEC12A internalization on MSU-stimulated p38 MAPK activation was determined. Figure 1.6C shows that MSU stimulated a low level of p38 MAPK phosphorylation at 60 sec and 120 sec. Reduced CLEC12A expression significantly enhanced MSU-stimulated p38 MAPK phosphorylation at those same time points. A similar enhancement of MSU-induced p38 MAPK and Akt phosphorylation was observed after knocking-down CLEC12A expression in the monocytic cell line THP-1 (Supplementary Figure 1.6). CLEC12A thus negatively regulates PI3K/Akt pathway activation in MSU-stimulated neutrophils and potentially monocytes.

We previously reported that silencing CLEC12A in the neutrophil-like cell line (PLB-985) and the internalization of CLEC12A in human neutrophils enhances MSU-induced release of IL-8 (9). To determine if CLEC12A inhibition of the PI3K/p38 MAPK/Akt pathway alters MSU-induced neutrophil responses, we measured MSU-stimulated IL-8 production and release. Wortmannin and Ly294002 significantly inhibited the MSU-induced release of IL-8 by human neutrophils (Figure 1.6D) as does the p38 inhibitor SB203580 (Supplementary Figure 1.7 and Tatsiy et al). CLEC12A thus inhibits IL-8 release in MSU-stimulated human neutrophils, in part, through regulation of the PI3K/Akt pathway.

## **1.6 Discussion.**

The current study identifies key signal transduction events involved in CLEC12A regulation of neutrophil activity. Following clustering on the surface of human neutrophils, CLEC12A translocates to flotillin-rich membrane domains, where the ITIM domain undergoes phosphorylation by a Src-family kinase. CLEC12A clustering results in altered phosphorylation of a number of kinases and their substrates, primarily in MAPK signal transduction pathways.

CLEC12A also regulates the ability of TNF- $\alpha$  and MSU to activate a number of kinase pathways, including those containing JNK, p38 MAPK, Src family non-receptor tyrosine kinases, and phosphoinositol kinases. We identified a novel role for CLEC12A in the regulation of the p38 MAPK-PI3K-Akt axis in human neutrophils, one of the pathways that regulates cytokine production stimulated by MSU.

One of the earliest events of inhibitory receptor signaling is the phosphorylation of the ITIM (9). This is the first report providing direct evidence that phosphorylation of the CLEC12A ITIM domain depends on receptor clustering in flotillin-rich membrane domains. We showed translocation of CLEC12A to those membrane domains using membrane fractionation, confocal microscopy, and biochemical disruption with methyl- $\beta$ -cyclodextrin. The key role of those membrane domains as signaling hubs suggests a mechanism by which CLEC12A regulates the signaling of other neutrophil activating receptors that also translocate to those domains. Further studies to identify CLEC12A binding partners within flotillin-rich, membrane domains should clarify the range of CLEC12A regulation of neutrophil activation.

Internalization of CLEC12A is a major mechanism preventing the counter-regulatory activity of this inhibitory receptor in neutrophil (9). CLEC12A clustering in membrane domains is necessary for internalization and thus required for both the activation and inactivation of CLEC12A. We envision a sequence of events where ligand-induced receptor cross-linking leads to translocation to flotillin-rich membrane domains, where the CLEC12A ITIM domain is phosphorylated by Src tyrosine kinases within seconds. That phosphorylation recruits phosphatases localized within those membrane domains, limiting phosphorylation-dependent activation of signal transduction components localized within membrane domains that are required for neutrophil functional responses. This inhibitory process is terminated by internalization of the membrane domain complex 10-20 minutes later (9). Our data show that CLEC12A internalization is partly dependent on microtubules, consistent with previous reports on flotillin recycling (32). This may explain the efficacy of the microtubule inhibitor, colchicine, in the treatment of gout. Inhibition of CLEC12A internalization by colchicine would maintain CLEC12A plasma membrane expression and inhibition of cell activation.

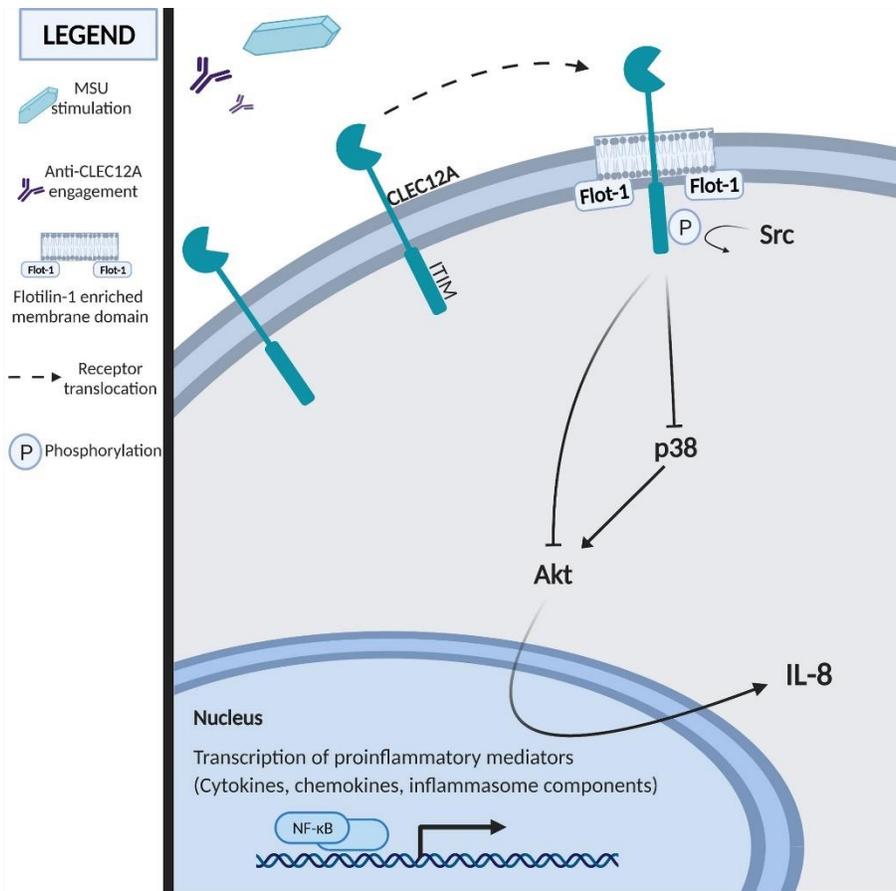
Our unbiased phosphoproteomic analysis identified a change in the phosphorylation status of a number of protein kinases and phosphatases induced by CLEC12A cross-linking with molecular

functions that included GTPase regulation, phospholipid binding, cell adhesion, and actin binding. Prominent among the kinases were upstream components of the ERK, JNK, and p38 MAPK pathways. The regulation of components of the MAPK pathway may be a recurring theme in CLEC12A biology as CLEC12A cross-linking induces the phosphorylation of p38 MAPK in bone marrow-derived dendritic cells (5). CLEC12A also negatively regulates the expression of MAPKAPK5 in bone marrow-derived macrophages of CLEC12A KO mice (33). Potentially important to the regulatory role of CLEC12A, receptor cross-linking resulted in phosphorylation of 4 phosphatases. CLEC12A cross-linking also induced a change in the phosphorylation of components of a number of signal transduction pathways activated by TNF- $\alpha$  in human neutrophils. TNF- $\alpha$  is a cytokine that regulates a number of pro-inflammatory neutrophil functions, including granule mobilization, respiratory burst activity, and cytokine synthesis, and also plays a key role in chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and gout (34). The molecular functions of these pathways included cytoskeletal regulation, GTPase activity, and phospholipid binding. Kinase phosphorylation inhibited by CLEC12A included two JNKs (MAPK8, MAPK10), PAK1/2, and several cyclin-dependent kinases, which regulate neutrophil transcription, apoptosis, migration, and NET formation (35–37). Additional TNF- $\alpha$  signaling components inhibited by CLEC12A included kinases (PIK3CG, PDPK1, PAK1), and phosphatases (PTEN) that regulate the PI3K/Akt pathway. MSU-stimulated human neutrophils demonstrated similarities in signal transduction pathway component phosphorylation to that following antibody cross-linking of CLEC12A. We provide evidence that CLEC12A negatively regulates the MSU-induced serine phosphorylation of PKC substrates and the PI3K pathway. We also show that CLEC12A inhibits MSU-induced phosphorylation of Akt and p38 MAPK. As MSU-stimulated Akt phosphorylation is dependent on p38 MAPK activity, our results suggest that CLEC12A regulation of p38/PI3K/pAkt in MSU-activated human neutrophils is important for regulation of neutrophil functional responses. To link CLEC12A regulation of MSU-induced signaling to neutrophil functional responses, MSU-induced release of IL-8 by human neutrophils was examined. We showed previously that silencing of CLEC12A in a neutrophil-like cell line increased MSU-induced release of IL-8 (9). Moreover, our data show that MSU-induced synthesis and release of IL-8 is dependent on PI3K and p38. We thus identified one of the MSU-activated pathways, the p38 MAPK/PI3K/Akt pathway, that CLEC12A attenuates to inhibit MSU-induced IL-8 release. In contrast, CLEC12A does not modulate degranulation by human neutrophils in response to MSU (our preliminary

data), additional evidence for the selective regulation of a subset of MSU-induced signaling events and functions in neutrophils.

Inhibitory receptors regulate cell function by recruiting phosphatases that dephosphorylate activating signal transduction pathways (12–17). CLEC12A recruits the phosphatases SHP-1 and SHP-2 in transfected, pervanadate-treated RAW cells (8), and SHP-2 is recruited by CLEC12A in transfected HEK-293T cells treated with pervanadate (data not shown). These phosphatases, however, were not identified in our phosphoproteomic screen, indicating they are either not involved in CLEC12A signaling in neutrophils or their interaction with CLEC12A could not be detected under our experimental conditions. The phosphoproteomic data did identify an alternative downstream candidate known to dampen cell activation by inhibiting Src-family kinases, CSK. Further studies are required to confirm phosphatase recruitment by CLEC12A in human neutrophils and to identify the phosphatase(s) involved in CLEC12A function.

Our observations suggest that CLEC12A plays a counter-regulatory role in the MSU stimulation of neutrophils through inhibition of signal transduction pathways containing p38 MAPK, PI3K, and Akt. Although our data show that both p38 MAPK and PI3K are upstream of Akt activation by MSU in human neutrophils, each of those signaling components contribute to multiple signal transduction pathways. While we show that CLEC12A regulation of the PI3K/Akt pathway controls IL-8 synthesis and release, the ability of these pathways to mediate CLEC12A regulation of other neutrophil functions remains to be established. PI3K, for instance, also regulates neutrophil recruitment, survival and activation (38, 39). Figure 1.7 presents a preliminary model of CLEC12A regulation of neutrophil activation based on our data. Whilst we interpret our data on the regulation of MSU-induced signaling by CLEC12A as a linear series of events, it is likely that the regulatory pathways interact with a variety of other signaling proteins in a non-linear fashion. Confirmation of the regulation of phosphorylation events identified by our phosphoproteomic screen will require a comprehensive analysis of the molecular pathways and functional responses stimulated by MSU. The ability of CLEC12A to regulate signal transduction pathways activated by TNF- $\alpha$  suggests our findings are applicable to other inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis. Understanding the molecular mechanisms by which CLEC12A inhibits neutrophil functional responses may provide new therapeutic strategies to address chronic inflammatory diseases.



**Figure 1.7** Schematic representation of the MSU-induced signaling pathways negatively regulated by CLEC12A upon its translocation to flotillin-rich membrane domains and its internalization.

## 1.6 Data availability statement.

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## 1.7 Ethics statement.

The studies involving human participants were reviewed and approved by CHU de Québec-Université Laval research ethics committee (2012-337). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## 1.8 Authors contributions.

Conceptualization: MF, KM, and PN. Methodology, investigation, and formal analysis: major contribution by GP, KM, and MM, and contribution by JV, MV, YS, AM and MF (formal analysis). Review and editing, and visualization: major contribution by KM and MF, and contribution by GP, MV, JV, SE, MHL, and PN. Funding acquisition, project administration, and writing original draft: MF. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## **1.9 Funding.**

This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant (number 142408) and funds from the CHU de Québec Foundation awarded to MF. MF also received an Arthritis Society Investigator Award. JV received a scholarship from the CHU de Québec Foundation and the ‘Fonds Pierre-Borgeat sur l’Arthrite et les Maladies Rhumatismales’.

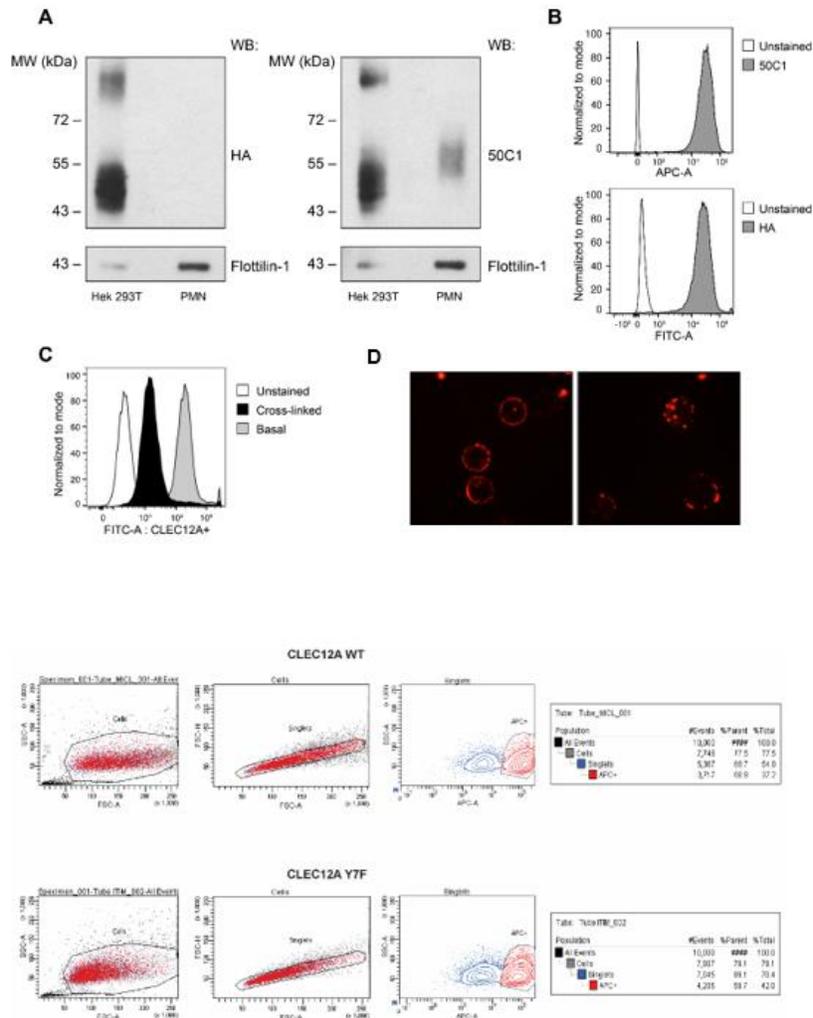
## **1.10 Conflict of interest.**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## **1.11 Acknowledgments.**

We thank Dr. Alexandre Brunet for expert technical assistance in flow cytometry. We also thank the manager of the Infectious Disease Research Centre Bioimaging platform at the CRCHU de Quebec, Julie-Christine Levesque, for sharing her expertise in imaging analysis.

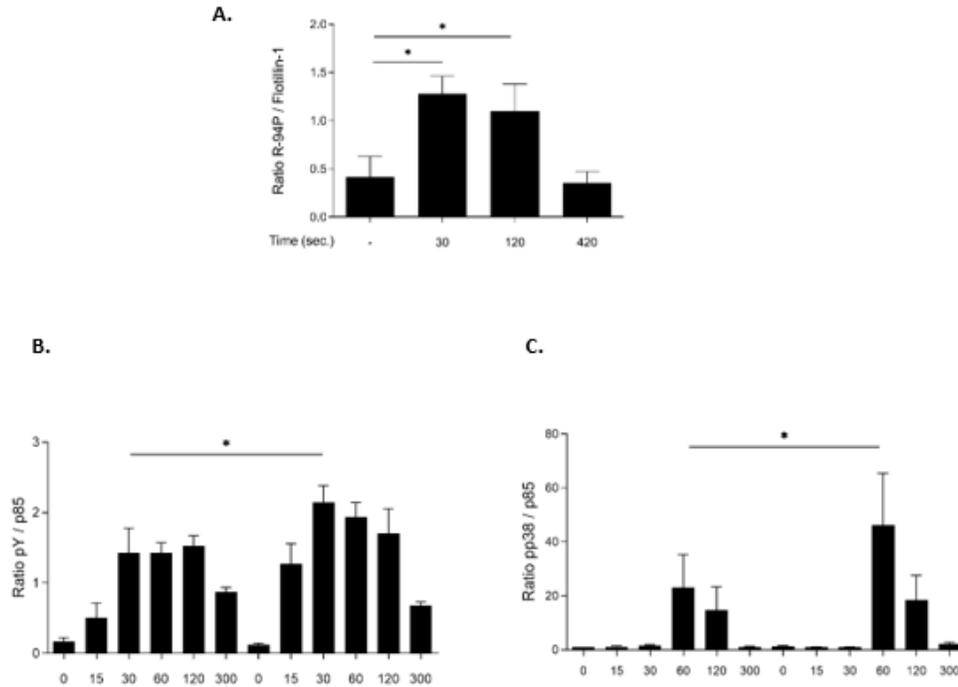
## **1.12 Supplementary material.**



**Supplementary figure 1.1** HEK-293T cells express CLEC12A-HA-wt on their surface that can be internalised by antibody-induced cross-linking as in human neutrophils.

(A) Total cell lysates were prepared from HEK-293T cells transiently transfected with CLEC12A-HA-wt or from human neutrophils isolated from healthy donors as described in Materials and Methods prior to immunoblotting with an anti-HA antibody or 50C1 antibodies, left and right gels, respectively. The anti-flotillin-1 antibody was used as a loading control. (B) Cell-surface expression of CLEC12Awt-HA was confirmed by flow cytometry with the same antibodies conjugated to the indicated fluorochromes. (C) The internalisation of CLEC12Awt-HA expressed on transiently transfected HEK-293T was determined by flow cytometry after cross-linking with an anti-HA and an anti-F(ab')<sub>2</sub> secondary antibody as described in Materials and Methods. These data are representative of 3 experiments. Similar observations were made in HeLa cells (data not shown). (D) The internalisation of CLEC12A in human neutrophils induced by fluorescently-labelled 50C1 after incubation at 37°C (right image) for 10 minutes. Cell-surface CLEC12A staining without internalisation is shown in the left image. Images were acquired at 63X

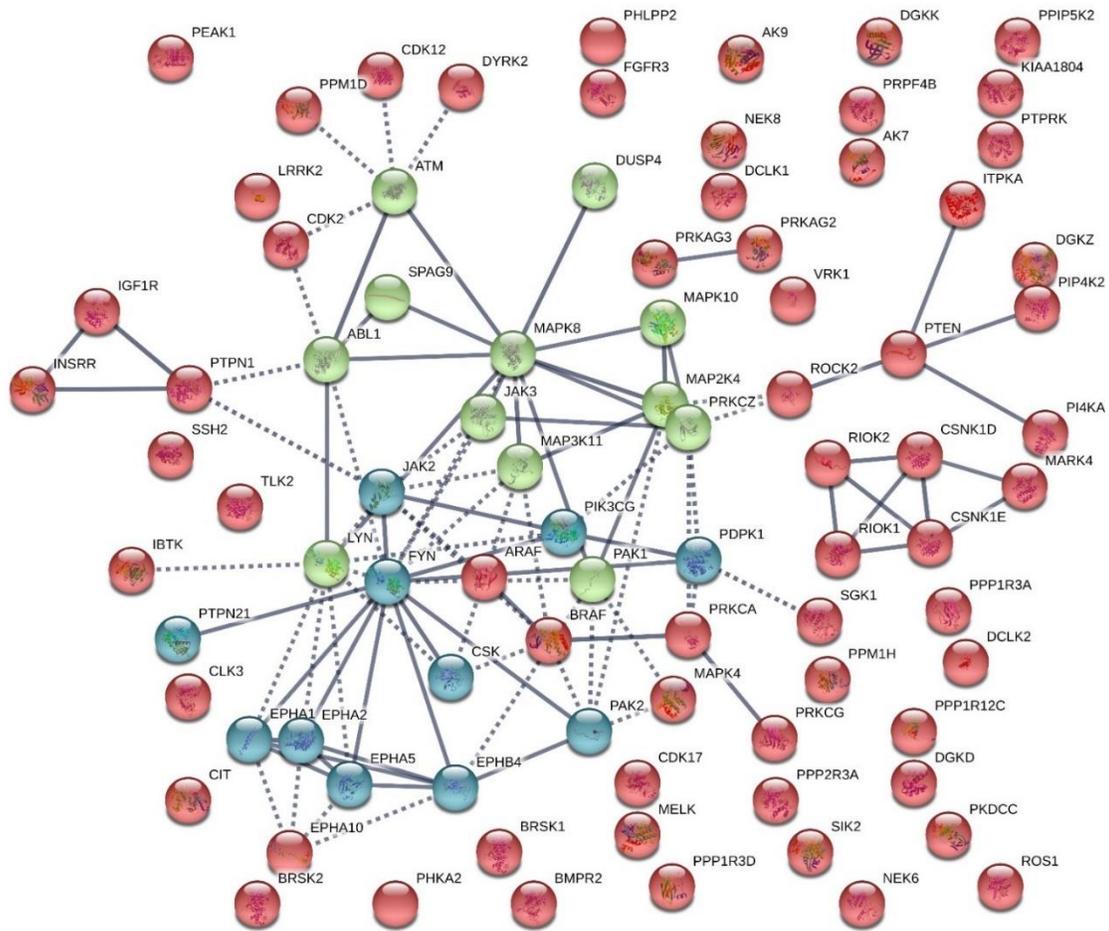
with the Quorum WAVFX spinning disc system (Quorum Technologies, Guelph, Ontario, Canada) and images analyzed with the Velocity quantitation module as previously described in Gagné[289]. (E) Gating strategy for the sorting of cells stably transfected with CLEC12A by flow cytometry using an APC-labeled CLEC12A antibody.



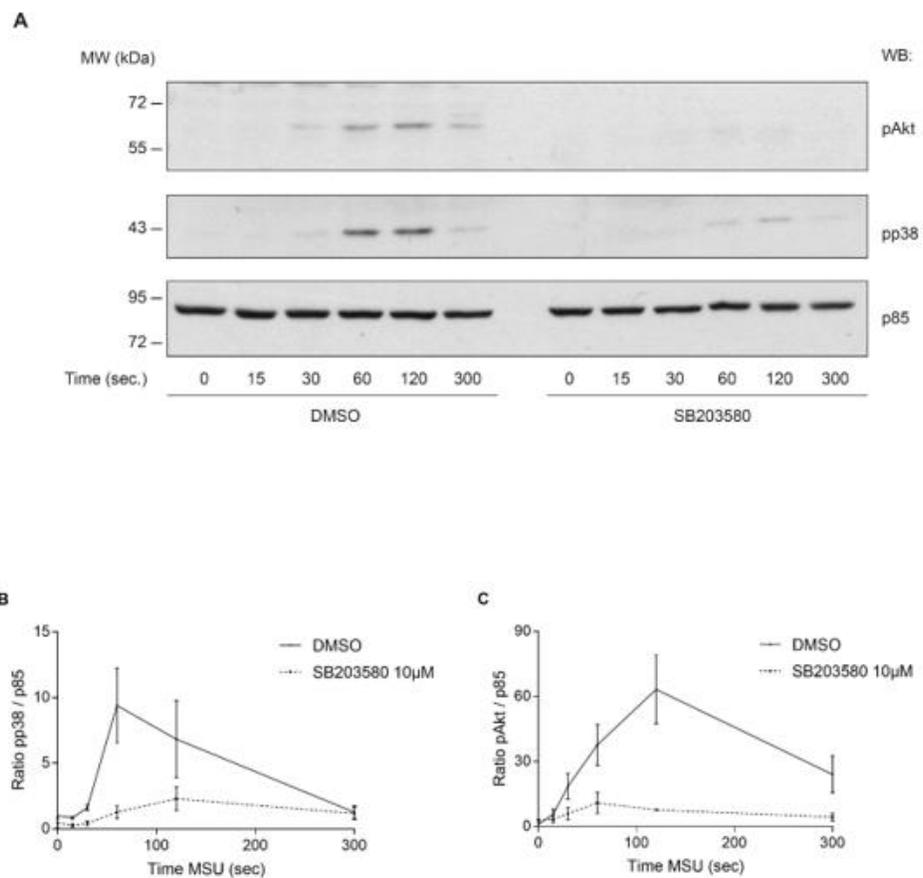
### Supplementary figure 1.2 Quantification of Western blots by densitometry.

Densitometry analysis was performed with Image Lab software (Bio-Rad) on blots in Figure 4a (A) and Figure 6b ((B), anti-tyrosine phosphorylation bands >72 kd; (C), p38 blot) of the main manuscript. Statistical analysis: Two way ANOVA and the Dunnett's multiple comparisons test was performed to compare the treated cells to the control cells in (A) and the paired t-test was performed in (B) and (C). \* P < 0.05.



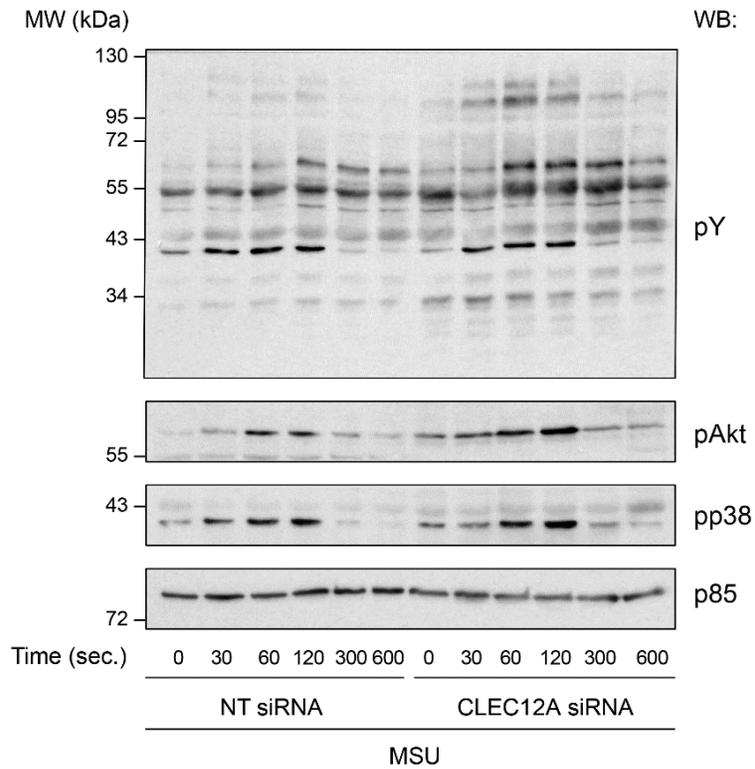


**Supplementary figure 1.4** STRING analysis of kinases with increased phosphorylation in human neutrophils stimulated with TNF- $\alpha$  compared to neutrophils stimulated with TNF- $\alpha$  and cross-linked for CLEC12A cross-linking.



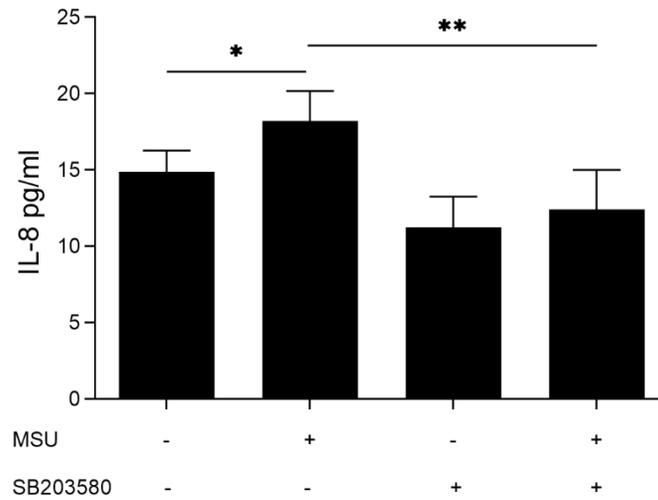
**Supplementary figure 1.5** MSU induce the phosphorylation of Akt via p38 in human neutrophils.

(A) Neutrophils were stimulated with MSU in the presence or absence of SB203580 as described in *Materials and Methods*. Cell lysates were then immunoblotted with an anti-phospho Akt (*pAkt*) or anti-phospho-p38 (*pp38*) antibody as well as an anti-PI3K p85 subunit antibody as a loading control. (B & C) Densitometry analysis of the immunoblots in (A). These data are representative of 3 independent experiments.



**Supplementary figure 1.6** CLEC12A knock-down in THP-1 cells enhances MSU-induced global tyrosine phosphorylation and the phosphorylation of Akt and p38.

The monocytic cell line, THP-1, was cultured in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf or bovine serum. THP-1 cells were transfected with CLEC12A siRNA prior to stimulation with MSU as described in *Materials and Methods* followed by immunoblotting with an anti-phosphotyrosine (pY), anti-phospho Akt and a PI3K p85 subunit (loading control) antibody. These data are representative of 3 experiments.



**Supplementary figure 1.7** MSU-induced IL-8 production in human neutrophils is p38-dependent.

Human neutrophils were stimulated with 0.3 mg/ml MSU in the presence or absence of SB203580 or diluant (-); DMSO) and released CXCL8/IL-8 determined by ELISA. Data are representative of 3 independent experiments. Statistical analysis: Two way ANOVA and the Turkey's multiple comparisons test was performed to compare the treated cells to the control cells. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

<b>Table S1. GO molecular functions of CLEC12A-Induced Phosphoproteins</b>							
<b>Enrichment of phosphoproteins CLEC12A&gt;isotype GO molecular function</b>							
Homo sapiens (REF)		CLEC12A-induced					
GO molecular function	#	#	Expected	Fold Enrichment	+/-	Raw P value	FDR
MAP kinase kinase activity	28	9	1.74	5.18	+	2.18E-04	2.90E-02
protein kinase activity	614	64	38.13	1.68	+	1.65E-04	2.40E-02
guanyl-nucleotide exchange factor activity	218	30	13.54	2.22	+	1.72E-04	2.43E-02
GTPase binding	545	62	33.85	1.83	+	2.10E-05	3.75E-03
GTPase regulator activity	303	37	18.82	1.97	+	2.63E-04	3.30E-02
phospholipid binding	426	49	26.46	1.85	+	1.45E-04	2.26E-02
cell adhesion molecule binding	483	55	30	1.83	+	5.46E-05	9.42E-03
actin binding	435	49	27.02	1.81	+	1.76E-04	2.41E-02
calcium ion binding	715	73	44.41	1.64	+	1.01E-04	1.62E-02

**Supplementary Table 1.1** GO molecular functions of CLEC12A-Induced Phosphoproteins. Enrichment of phosphoproteins CLEC12A>isotype GO molecular function

**Table S2. Protein Kinases and Phosphatases Phosphorylated upon CLEC12A Cross-linking**

Protein	Gene	Protein	Gene
Beta-adrenergic receptor kinase 1	ADRBK1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 2	MAP4K2
Alpha-protein kinase 3	ALPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	MAPK3
Serine/threonine-protein kinase A-Raf	ARAF	Mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8
Tyrosine-protein kinase Blk	BLK	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	MARK4
Serine/threonine-protein kinase BRSK2	BRSK2	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2	MAST2
Cyclin-T2	CCNT2	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4	MAST4
Cyclin-dependent kinase 12	CDK12	Hepatocyte growth factor receptor	MET
Cyclin-dependent kinase 16	CDK16	MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1	MKNK1
Dual-specificity protein kinase CLK2	CLK2	Serine/threonine-protein kinase Nek5	NEK5
Casein kinase II subunit alpha	CSNK2A1	Serine/threonine-protein kinase NIM1	NIM1K
Serine/threonine-protein kinase DCLK3	DCLK3	AMPK-related protein kinase 5	NUAK1
Epithelial discoidin domain-containing receptor 1	DDR1	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha	PHKA2
Dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 4	DYRK4	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	PIK3C3
Ephrin-B1	EFNB1	Protein phosphatase 1A	PPM1A
Ephrin-B2	EFNB2	Protein phosphatase 1D	PPM1D
Ephrin type-A receptor 2	EPHA2	Protein phosphatase 1H	PPM1H
Ephrin type-B receptor 2	EPHB2	Protein phosphatase 1J	PPM1J
Ephrin type-B receptor 4	EPHB4	5'-AMP-activated protein kinase subunit alpha-2	PRKAA2

Ephrin type-B receptor 6	EPHB6	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2	PRKAG2
Fibroblast growth factor receptor 4	FGFR4	Protein kinase C beta	PRKCB
Insulin receptor-related protein	INSRR	Protein kinase C delta	PRKCD
LIM domain kinase 2	LIMK2	Ribosomal protein S6 kinase alpha-1	RPS6KA1
Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2	LRRK2	Ribosomal protein S6 kinase alpha-5	RPS6KA5
Mitogen-activated protein kinase kinase 2	MAP2K2	Ribosomal protein S6 kinase delta-1	RPS6KC1
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAP3K1	SRSF protein kinase 2	SRPK2
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	MAP3K11	Serine/threonine-protein kinase 10	STK10
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19	MAP3K19	Non-receptor tyrosine kinase TNK1	TNK1
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	MAP3K2	Testis-specific serine/threonine-protein kinase 2	TSSK2
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	MAP3K3	Tau-tubulin kinase 1	TTBK1
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	MAP3K4	Inactive serine/threonine-protein kinase VRK3	VRK3
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9	MAP3K9	Wee1-like protein kinase 2	WEE2

**Supplementary Table 1.2** Protein Kinases and Phosphatases Phosphorylated upon CLEC12A Cross-linking

**Table S3. Molecular Functions of TNF- $\alpha$  Phosphoproteins Reduced by CLEC12A Cross-linking**

	Homo sapiens	Current List				
GO molecular function	#	#	Expected	Fold Enrichment	P value	FDR
microtubule motor activity	86	18	5.27	3.41	2.64E-05	2.02E-03
tau-protein kinase activity	22	8	1.35	5.93	2.26E-04	1.42E-02
protein kinase activity	614	71	37.64	1.89	1.68E-06	1.73E-04
dynein complex binding	23	8	1.41	5.67	2.89E-04	1.66E-02
dynein intermediate chain binding	29	9	1.78	5.06	2.47E-04	1.53E-02
ionotropic glutamate receptor binding	34	10	2.08	4.8	1.63E-04	1.07E-02
glutamate receptor binding	50	13	3.06	4.24	5.24E-05	3.69E-03
alpha-actinin binding	32	9	1.96	4.59	4.54E-04	2.55E-02
histone-lysine N-methyltransferase activity	44	10	2.7	3.71	9.30E-04	4.65E-02
structural constituent of cytoskeleton	99	21	6.07	3.46	4.85E-06	4.51E-04
Rac GTPase binding	69	14	4.23	3.31	2.67E-04	1.60E-02
Rho GTPase binding	180	29	11.03	2.63	1.45E-05	1.19E-03
Ras GTPase binding	431	56	26.42	2.12	9.72E-07	1.05E-04
methylated histone binding	66	13	4.05	3.21	5.60E-04	3.03E-02
Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity	82	16	5.03	3.18	1.49E-04	9.91E-03
Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity	140	23	8.58	2.68	6.52E-05	4.53E-03
microtubule binding	241	47	14.77	3.18	1.03E-10	2.00E-08

actin filament binding	194	34	11.89	2.86	3.60E-07	4.41E-05
thiol-dependent ubiquitin-specific protease activity	107	17	6.56	2.59	7.82E-04	4.05E-02
calmodulin binding	198	31	12.14	2.55	1.02E-05	8.76E-04
ion channel binding	128	20	7.85	2.55	4.87E-04	2.70E-02
protein tyrosine kinase activity	136	20	8.34	2.4	7.70E-04	4.03E-02
cadherin binding	315	44	19.31	2.28	3.02E-06	2.99E-04
protein kinase binding	658	78	40.33	1.93	2.01E-07	2.59E-05
protein serine/threonine kinase activity	446	52	27.34	1.9	3.69E-05	2.73E-03
GTPase regulator activity	303	35	18.57	1.88	8.68E-04	4.44E-02
phospholipid binding	426	48	26.11	1.84	1.96E-04	1.25E-02
RNA binding	1661	152	101.81	1.49	2.67E-06	2.70E-04

**Supplementary Table 1.3** Molecular Functions of TNF- $\alpha$  Phosphoproteins Reduced by CLEC12A Cross-linking

<b>Table S4. Protein Kinases and Phosphatases with Reduced Phosphorylation following CLEC12A Cross-linking</b>			
Protein	Gene	Protein	Gene
Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	ABL1	maternal embryonic leucine zipper kinase	MELK
Adenylate kinase 7	AK7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLK4	MLK4
Adenylate kinase 9	AK9	Serine/threonine-protein kinase Nek6	NEK6
Serine/threonine-protein kinase A-Raf	ARAF	Serine/threonine-protein kinase Nek8	NEK8
Serine-protein kinase ATM	ATM	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	PAK1
Bone morphogenetic protein receptor type-2	BMPR2	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	PAK2

Serine/threonine-protein kinase B-raf	BRAF	Putative 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	PPDK1
Serine/threonine-protein kinase BRSK1	BRSK1	Pseudopodium-enriched atypical kinase 1	PEAK1
Serine/threonine-protein kinase BRSK2	BRSK2	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha	PHKA2
Cyclin-dependent kinase 12	CDK12	PH domain leucine-rich repeat-containing protein phosphatase 2	PHLPP2
Cyclin-dependent kinase 17	CDK17	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	PI4KA
Cyclin-dependent kinase 2	CDK2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma	PIK3CG
citron rho-interacting serine/threonine kinase	CIT	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha	PIP4K2A
CDC-like kinase 3	CLK3	Protein kinase domain-containing protein, cytoplasmic	PKDCC
Tyrosine-protein kinase CSK	CSK	Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 2	PPIP5K2
Casein kinase I isoform delta	CSNK1D	Protein phosphatase 1D	PPM1D
Casein kinase I isoform epsilon	CSNK1E	Protein phosphatase 1H	PPM1H
Doublecortin and CaM kinase-like 1	DCLK1	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C	PPP1R12C
Doublecortin and CaM kinase-like 2	DCLK2	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3A	PPP1R3A
Diacylglycerol kinase delta	DGKD	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3D	PPP1R3D
Diacylglycerol kinase kappa	DGKK	Phosphatase 2A regulatory subunit B subunit alpha	PPP2R3A
Diacylglycerol kinase zeta	DGKZ	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2	PRKAG2
Dual specificity protein phosphatase 4	DUSP4	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2	PRKAG2
Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2	DYRK2	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-3	PRKAG3
Ephrin type-A receptor 1	EPHA1	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-3	PRKAG3
Ephrin type-A receptor 1	EPHA1	Protein kinase C alpha type	PRKCA
Ephrin type-A receptor 10	EPHA10	Protein kinase C gamma type	PRKCG

Ephrin type-A receptor 2	EPHA2	Protein kinase C gamma type	PRKCG
Ephrin type-A receptor 5	EPHA5	Protein kinase C zeta type	PRKCZ
Ephrin type-B receptor 4	EPHB4	Putative serine/threonine-protein kinase PRKY	PRKY
Fibroblast growth factor receptor	FGFR3	Serine/threonine-protein kinase PRP4	PRPF4B
Tyrosine-protein kinase Fyn	FYN	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN	PTEN
Inhibitor of Bruton tyrosine kinase	IBTK	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type	PTPN1
Tyrosine-protein kinase receptor	IGF1R	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 21	PTPN21
Insulin receptor-related protein	INSRR	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa	PTPRK
Inositol-trisphosphate 3-kinase A	ITPKA	Serine/threonine-protein kinase RIO1	RIOK1
Tyrosine-protein kinase	JAK2	Serine/threonine-protein kinase RIO2	RIOK2
Tyrosine-protein kinase JAK3	JAK3	Rho-associated protein kinase 2	ROCK2
Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2	LRRK2	Tyrosine-protein kinase receptor	ROS1
LYN tyrosine kinase	LYN	Serine/threonine-protein kinase Sgk1	SGK1
Dual-specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4	MAP2K4	Serine/threonine-protein kinase SIK2	SIK2
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	MAP3K11	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	SPAG9
mitogen-activated protein kinase 10	MAPK10	Protein phosphatase Slingshot homolog 2	SSH2
Mitogen-activated protein kinase 4	MAPK4	Serine/threonine-protein kinase tousled-like 2	TLK2
Mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	Serine/threonine-protein kinase VRK1	VRK1
MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	MARK4		

**Supplementary Table 1.4** Protein Kinases and Phosphatases with Reduced Phosphorylation following CLEC12A Cross-linking

### 1.13 Abbreviations.

ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; PI3K, phosphatidylinositol 3' kinase; PP2, 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo(3,4-d) pyrimidine; PP3, 4-amino-1-phenylpyrazol(3,4-d) pyrimidine; MSU, monosodium urate crystals.

## 1.14 References.

1. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(8):519-31.
2. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology*.10(10):593-601.
3. Favier B. Regulation of neutrophil functions through inhibitory receptors: an emerging paradigm in health and disease. *Immunol Rev*. 2016;273(1):140-55.
4. Marshall AS, Willment JA, Pyz E, Dennehy KM, Reid DM, Dri P, et al. Human MICL (CLEC12A) is differentially glycosylated and is down-regulated following cellular activation. *European journal of immunology*. 2006;36(8):2159-69.
5. Chen CH, Floyd H, Olson NE, Magaletti D, Li C, Draves K, et al. Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood*. 2006;107(4):1459-67.
6. Bakker AB, van den Oudenrijn S, Bakker AQ, Feller N, van Meijer M, Bia JA, et al. C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer research*. 2004;64(22):8443-50.
7. Han Y, Zhang M, Li N, Chen T, Zhang Y, Wan T, et al. KLRL1, a novel killer cell lectinlike receptor, inhibits natural killer cell cytotoxicity. *Blood*. 2004;104(9):2858-66.
8. Marshall AS, Willment JA, Lin HH, Williams DL, Gordon S, Brown GD. Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(15):14792-802.
9. Gagne V, Marois L, Levesque JM, Galarneau H, Lahoud MH, Caminschi I, et al. Modulation of monosodium urate crystal-induced responses in neutrophils by the myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor: potential therapeutic implications. *Arthritis Res Ther*.15(4):R73.
10. Neumann K, Castineiras-Vilarino M, Hockendorf U, Hanneschlager N, Lemeer S, Kupka D, et al. Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death. *Immunity*.40(3):389-99.
11. Redelingshuys P, Whitehead L, Augello A, Drummond RA, Levesque JM, Vautier S, et al. MICL controls inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015.
12. Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science (New York, NY)*. 2000;290(5489):84-9.
13. Meyaard L, Steevens TAM. Immune inhibitory receptors: Essential regulators of phagocyte function. *European journal of immunology*. 2011;41(3):575-87.

14. Daeron M, Jaeger S, Du Pasquier L, Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev.* 2008;224:11-43.
15. Azcutia V, Parkos CA, Brazil JC. Role of negative regulation of immune signaling pathways in neutrophil function. *Journal of leukocyte biology.* 2017.
16. Bolland S, Ravetch JV. Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors. *Advances in immunology.* 1999;72:149-77.
17. Fernandes MJ, Naccache PH. The Role of Inhibitory Receptors in Monosodium Urate Crystal-Induced Inflammation. *Frontiers in immunology.* 2018;9:1883.
18. Lahoud MH, Proietto AI, Ahmet F, Kitsoulis S, Eidsmo L, Wu L, et al. The C-type lectin Clec12A present on mouse and human dendritic cells can serve as a target for antigen delivery and enhancement of antibody responses. *J Immunol.* 2009;182(12):7587-94.
19. Naccache PH, Grimard M, Roberge CJ, Gilbert C, Lussier A, Demedicis R, et al. Crystal-Induced Neutrophil Activation .1. Initiation and Modulation of Calcium Mobilization and Superoxide Production by Microcrystals. *Arthritis and Rheumatism.* 1991;34(3):333-42.
20. Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N. Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients. *Journal of immunological methods.* 1999;232(1-2):131-43.
21. Fernandes MJG, Rollet-Labelle E, Pare G, Marois S, Tremblay ML, Teillaud JL, et al. CD16b associates with high-density, detergent-resistant membranes in human neutrophils. *Biochemical Journal.* 2006;393:351-9.
22. Wessel D, Flugge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry.* 1984;138(1):141-3.
23. Gagne V, Moreau J, Plourde M, Lapointe M, Lord M, Gagnon E, et al. Human angiominin-like 1 associates with an angiominin protein complex through its coiled-coil domain and induces the remodeling of the actin cytoskeleton. *Cell motility and the cytoskeleton.* 2009;66(9):754-68.
24. McLeish KR, Merchant ML, Creed TM, Tandon S, Barati MT, Uriarte SM, et al. Frontline Science: Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulation and priming of human neutrophil granule exocytosis. *Journal of leukocyte biology.* 2017;102(1):19-29.
25. Staubach S, Hanisch FG. Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert review of proteomics.* 2011;8(2):263-77.
26. Otto GP, Nichols BJ. The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond. *Journal of cell science.* 2011;124(Pt 23):3933-40.
27. Popa-Nita O, Naccache PH. Crystal-induced neutrophil activation. *Immunology and cell biology.* 2010;88(1):32-40.
28. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity.* 2017;46(2):183-96.
29. di Giovine FS, Malawista SE, Thornton E, Duff GW. Urate crystals stimulate production of tumor necrosis factor  $\alpha$  from human blood monocytes and synovial cells. Cytokine mRNA and protein kinetics, and cellular distribution. *The Journal of clinical investigation.* 1991;87(4):1375-81.
30. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell.* 2017;170(4):605-35.

31. Rane MJ, Coxon PY, Powell DW, Webster R, Klein JB, Pierce W, et al. p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(5):3517-23.
32. Langhorst MF, Reuter A, Jaeger FA, Wippich FM, Luxenhofer G, Plattner H, et al. Trafficking of the microdomain scaffolding protein reggie-1/flotillin-2. *European journal of cell biology*. 2008;87(4):211-26.
33. Begun J, Lassen KG, Jijon HB, Baxt LA, Goel G, Heath RJ, et al. Integrated Genomics of Crohn's Disease Risk Variant Identifies a Role for CLEC12A in Antibacterial Autophagy. *Cell reports*. 2015;11(12):1905-18.
34. Edwards SW, Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 2010;49(9):1618-31.
35. Hsu AY, Wang D, Liu S, Lu J, Syahirah R, Bennin DA, et al. Phenotypal microRNA screen reveals a noncanonical role of CDK2 in regulating neutrophil migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(37):18561-70.
36. Wang K, Hampson P, Hazeldine J, Krystof V, Strnad M, Pechan P, et al. Cyclin-dependent kinase 9 activity regulates neutrophil spontaneous apoptosis. *PLoS One*. 2012;7(1):e30128.
37. Amulic B, Knackstedt SL, Abu Abed U, Deigendesch N, Harbort CJ, Caffrey BE, et al. Cell-Cycle Proteins Control Production of Neutrophil Extracellular Traps. *Developmental cell*. 2017;43(4):449-62 e5.
38. Tavares LD, Galvao I, Costa VV, Batista NV, Rossi LCR, Brito CB, et al. Phosphoinositide-3 kinase gamma regulates caspase-1 activation and leukocyte recruitment in acute murine gout. *Journal of leukocyte biology*. 2019;106(3):619-29.
39. Galvao I, Queiroz-Junior CM, de Oliveira VLS, Pinho V, Hirsch E, Teixeira MM. The Inhibition of Phosphoinositide-3 Kinases Induce Resolution of Inflammation in a Gout Model. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:1505.

## **Chapitre 2 : Régulation de l'expression, l'oligomérisation et la signalisation du récepteur CLEC12A par les résidus de cystéines localisés dans sa tige extracellulaire.**

**Titre de l'article: "Regulation of the Expression, Oligomerisation and Signaling of the Inhibitory Receptor CLEC12A by Cysteine Residues in the Stalk Region."**

Julien Vitry<sup>1-2,\*</sup>, Guillaume Paré<sup>1,2</sup>, Andréa Murru<sup>1-2</sup>, Charest-Morin Xavier<sup>1-2</sup>, Halim Maaroufi<sup>3</sup>, Kenneth R. McLeish<sup>4</sup>, Paul H. Naccache<sup>1-2</sup>, Maria J. Fernandes<sup>1-2</sup>

1 Infectious and Immune Diseases Division, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

2 Department of Microbiology-Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Medicine, Laval University, CHU de Québec research center, Québec, Canada, G1V 4G2

3 Institute of integrative biology and systems, Laval University, Canada, G1V 0A6

4 Department of Medicine, University of Louisville School of Medicine, Louisville, KY, USA

**Premier auteur :** Vitry Julien

**Journal:** "International Journal of Molecular Science" (MDPI)

**Publication:** Le 22 septembre 2021

Cet article appartient au numéro spécial Réseaux de signalisation des récepteurs immunorégulateurs 2.0

### **Contribution des auteurs:**

**-Conception et planification des expériences :** Julien Vitry, Maria J Fernandes et Paul H Naccache.

**-Réalisation des expériences et analyse des données :** Contribution majeure par Julien Vitry et Maria J Fernandes. Contribution par Guillaume Paré, André Murru, Xavier Charest-Morin, Halim Maaroufi, Paul H Naccache et Kenneth R McLeish.

**-Supervision :** Maria J Fernandes et Paul H Naccache.

**-Modélisation en 3 dimensions :** Halim Maaroufi.

**-Conception des figures et rédaction du manuscrit :** Contribution majeure par Julien Vitry et Maria J Fernandes. Contribution par Guillaume Paré, Halim Maaroufi, Kenneth R McLeish et Paul H Naccache.

**-Acquisition des fonds et ressources :** Maria J Fernandes.

## **2.1 Résumé**

CLEC12A est un récepteur inhibiteur myéloïde qui régule négativement l'inflammation dans les modèles murins d'arthrite auto-immune et auto-inflammatoire. La réduction de l'expression de CLEC12A augmente l'activation des cellules myéloïdes et l'inflammation chez les souris knock-out CLEC12A atteintes d'arthrite induite par des anticorps au collagène ou de type goutte. Comme d'autres récepteurs de lectine de type C, CLEC12A possède un domaine de tige entre son domaine de liaison au ligand et son domaine transmembranaire. Bien que l'on suppose que les cystéines du domaine de la tige ont des propriétés d'oligomérisation, leur rôle dans l'expression et/ou la signalisation de CLEC12A reste inconnue. Nous avons donc utilisé la mutagenèse dirigée pour déterminer si les cystéines du domaine de la tige jouent un rôle dans l'expression, l'internalisation, l'oligomérisation et/ou la signalisation de CLEC12A. La mutation de C118 bloque le transport de CLEC12A par la voie sécrétoire et diminue son expression à la surface des cellules. En revanche, la mutation de C130 n'affecte pas l'expression de CLEC12A à la surface des cellules mais augmente son oligomérisation en induisant une phosphorylation du récepteur indépendante du ligand. De plus, nous apportons la preuve que la dimérisation de CLEC12A est régulée de manière redox-dépendante. Nous montrons également que la réticulation de CLEC12A induite par les anticorps induit l'oligomérisation de la flotilline dans les domaines membranaires insolubles dans lesquels CLEC12A signale. Ensemble, ces données indiquent que les cystéines de la tige de CLEC12A modulent de manière différentielle l'expression, l'oligomérisation et la signalisation de ce récepteur inhibiteur, ce qui suggère la régulation de CLEC12A de manière redox-dépendante pendant l'inflammation.

## **2.2 Abstract**

CLEC12A is a myeloid inhibitory receptor that negatively regulates inflammation in mouse models of autoimmune and autoinflammatory arthritis. Reduced CLEC12A expression enhances myeloid cell activation and inflammation in CLEC12A knock-out mice with collagen antibody-induced or gout-like arthritis. Similar to other C-type lectin receptors, CLEC12A harbours a stalk domain between its ligand binding and transmembrane domains. While it is presumed that the cysteines in the stalk domain have multimerisation properties, their role in CLEC12A expression and/or signaling remain unknown. We thus used site-directed

mutagenesis to determine whether the stalk domain cysteines play a role in CLEC12A expression, internalisation, oligomerisation, and/or signaling. Mutation of C118 blocks CLEC12A transport through the secretory pathway diminishing its cell-surface expression. In contrast, mutating C130 does not affect CLEC12A cell-surface expression but increases its oligomerization inducing ligand-independent phosphorylation of the receptor. Moreover, we provide evidence that CLEC12A dimerisation is regulated in a redox-dependent manner. We also show that antibody-induced CLEC12A cross-linking induces flotillin oligomerization in insoluble membrane domains in which CLEC12A signals. Taken together, these data indicate that the stalk cysteines in CLEC12A differentially modulate this inhibitory receptors' expression, oligomerisation and signaling suggestive of the regulation of CLEC12A in a redox-dependent manner during inflammation.

## **2.2 Introduction**

The myeloid C-type lectin-like inhibitory receptor 12A (CLEC12A) regulates immune responses in various pathological contexts including gout, rheumatoid arthritis, and viral infection(1-5). In knock-out mouse models of gout and rheumatoid arthritis, a diminution in CLEC12A expression enhances inflammation and disease severity(6, 7). Similarly, low levels of CLEC12A expression by circulating neutrophils and monocytes from early rheumatoid arthritis patients correlates with higher disease activity(8). On the other hand, interferon production is significantly downregulated in lymphocytic choriomeningitis virus infected CLEC12A KO mice, resulting in an increased viral load and liver damage(9). Thus, CLEC12A differentially regulates myeloid cell responses in a stimulus-dependent manner.

CLEC12A has an extracellular C-type lectin-like domain (CTLD), the defining feature of C-type lectin receptors (CLRs)(10-13). While CTLDs typically bind a diverse array of carbohydrate ligands and some have evolved to bind proteins, endogenous ligands that specifically bind the CLEC12A CTLD remain unidentified(10-14). CLEC12A CTLD is linked to the transmembrane domain by a stalk region that mediates receptor oligomerisation in other CLRs(14). The short cytoplasmic tail of CLEC12A comprises an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) through which it regulates intracellular signaling pathways.

The paradigm of inhibitory receptor signaling involves ligand-induced receptor clustering leading to ITIM phosphorylation and the recruitment of phosphatases that inhibit activation signal transduction pathways(15, 16). In the absence of a known natural ligand, antibody-induced CLEC12A clustering has identified key events in CLEC12A signaling. Antibody-mediated crosslinking induces CLEC12A translocation to flotillin-rich membrane domains, where ITIM is phosphorylated in a Src-dependent manner(17). Phosphatases recruited by CLEC12A include SHP-1 and SHP-2 (5). Signaling proteins with reduced phosphorylation after CLEC12A clustering and internalisation include components of the MAP kinase and PI3K-Akt pathways(17). CLEC12A regulates the monosodium urate-crystal (MSU)-induced release of IL-8 by neutrophils through the p38/PI3K-Akt signaling pathway(17) (18). In addition to regulating cytokine release, reactive oxygen species production is enhanced in CLEC12A KO mice(9).

While the role of CLEC12A in several inflammatory diseases is well established and the signaling pathways it modulates are partially defined, little is known about the molecular determinants of CLEC12A function. A potentially essential domain for CLEC12A function is its stalk region as it harbours two cysteine residues. While it is presumed that these cysteine residues have receptor multimerization properties, this has not been demonstrated experimentally. Herein, we tested the hypothesis that the two cysteine residues in the stalk domain of CLEC12A regulate its expression, internalisation, signaling and/or function through their ability to induce receptor oligomerisation.

## **2.3 Materials and methods.**

### **2.3.1 Antibodies.**

Two different antibodies against the HA-tag were used, namely, the anti-HA.11 (mouse monoclonal 16B12; no. 90150) from BioLegend (Pacific Heights Blvd, San Diego, CA) and the rabbit polyclonal anti-HA (NB600-363B) from Novus biologicals (Oakville, ON, Canada). The former was used to cross-link CLEC12A-HA on HEK-293T cells and the latter, for immunoblotting. A mouse IgG1 isotype antibody (no. IM0571) was obtained from Beckman Coulter (Mississauga, ON, Canada) and used as a negative control.

The mouse IgG2a isotype control (no. 401502) antibody was obtained from BioLegend (Pacific Heights Blvd, San Diego, CA). The affiniPure F(ab')<sub>2</sub> fragment goat anti-mouse IgG F(ab')<sub>2</sub>

fragment specific (no. 115-006-072), the horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit IgG (no. 711-035-152), the horseradish peroxidase-labeled donkey anti-mouse IgG (no. 715-035-150) and fluorescein (FITC)-AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> fragment goat anti-mouse IgG, Fcγ fragment specific (no. 115-096-071) antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). The monoclonal anti-Flotillin-1 (no. 610820) and anti-Flotillin-2 (no. 610383) antibodies were purchased from BD Transduction Laboratories (Mississauga, ON, Canada) and phalloidin (no. A12381) from ThermoFischer (Pacific Heights Blvd, San Diego, CA). The mouse monoclonal anti-GAPDH (NBP1-47339) was obtained from Novus biologicals (Oakville, ON, Canada). Goat anti-mouse IgG (H+L) conjugated AlexaFluor 488nm (A-11011) and the goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugated AlexaFluor 594nm (A-10012) antibodies were purchased from Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). The polyclonal anti-SHP-2 (sc-280) antibody was obtained from Santa Cruz (Dallas, Texas, USA) and the mouse anti-human tubulin 4 (anti-TUBB4) (TUBB2C #WH0010383M2) antibody from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). The anti-phospho CLEC12A ITIM antibody (R-94P) was generated in-house and characterized in Paré et al(20).

### **2.3.2 Reagents.**

Sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), trypsin inhibitor, PMSF, Nonidet P-40, Triton X-100, formalin 10%, aprotinin and leupeptin were obtained from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada) and the Western Lightning Chemiluminescence Plus from PerkinElmer (Guelph, ON, Canada). Fetal bovine serum (FBS) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) were purchased from Wisent Bioproducts (St-Bruno, Qc, Canada). and Tween20 as well as hydrogen peroxide (30%) from Fischer Scientific (Ottawa, ON, Canada). Polyethylenimine (PEI) was obtained from VWR (Mississauga, ON, Canada) and slowFade™ Gold antifade reagent from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

### **2.3.3 Plasmid construct and SiRNA stealth™ RNAi.**

The wild type, CLEC12A coding sequence used for our constructs corresponds to the CLEC12A isoform 2 sequence (Q5QGZ9-2 Uniprot). The generation of the HA-tagged CLEC12A wild-type (WT) and CLEC12A-HA-Y7F construct with a mutated tyrosine in the ITIM motif (Y7F) were previously described in Paré(20). To generate the CLEC12A-HA-C118A mutant construct with a mutated C118A, the open reading frame of CLEC12A-HA-wt was

amplified with the forward; 5' CAATAGCCACCAAATTAGCTCGTGAGCTATATAGC 3' and reverse primer 5' GCTATATAGCTCACGAGCTAATTGGTGGCTATTG 3'. The PCR product was ligated to the pCRII plasmid using the same strategy as for CLEC12A-HA-wt. To generate the CLEC12A-HA-C130A construct with a mutated C130A, we used an overlap extension polymerase chain reaction (OE-PCR). The open reading frame of CLEC12A was amplified in two different PCR reactions with different pairs of primers. For the first PCR reaction for CLEC12A-HA-C130A we used the forward primer: 5' AAGAGCACAAAGCTAAGCCTTGTC 3' and reverse primer: 5' TCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCTTA 3'. For the second PCR reaction for CLEC12A-HA-C130A, we used the forward primer: 5' CGCCAGTGTGCTGGAATTCTTTACATATT 3' and reverse primer: 5' GACAAGGCTTAGCTTTGTGCTCTT 3'. The two PCR products, one extending "upstream" and the other "downstream" of the desired mutation were mixed and hybridized while performing a third PCR using the oligonucleotides that targeted the 5' and 3' ends the hybrid PCR product, namely, the forward primer: 5' CGCCAGTGTGCTGGAATTCTTTACATATT 3' and the reverse primer: 5' TCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCTTA 3'. The PCR product was ligated to the pCRII plasmid using the same strategy as for CLEC12A-HA-wt. To generate the CLEC12A-HA-C118A/C130A double mutant, the open reading frame of CLEC12A-HA-C130A was amplified with the same primer and cloning strategy used to generate CLEC12A-HA-C118A. The SiRNA control (SiCTRL) (452001) and the SiRNA Flotillin-1 (FLOT1HSS115567) were obtained from Invitrogen.

#### **2.3.4 Cell culture and transfection.**

HEK-293T and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate and 10% heat-inactivated fetal bovine serum. No antibiotics were used to culture these cell lines. Cells were seeded at a density of  $0.3 \times 10^6$  cells/well (HEK 293T or HeLa) in 6-well plates the day prior to transient transfection of the CLEC12A-HA-WT or mutant plasmids (2  $\mu$ g of DNA per well) with PEI as per the manufacturer's instructions. The cells were harvested 48 h post-transfection with 10 mM EDTA in PBS prior to analysis.

### **2.3.5 Co-Transfection of cell lines with CLEC12A-HA-WT and the SiRNA stealth™ RNAi.**

Cells were seeded at a density of  $0.2 \times 10^6$  cells/well (HEK 293T) in 6-well plates the day prior to transient transfection of the CLEC12A-HA-WT plasmid (2  $\mu$ g of DNA per well) and 20mM SiRNA (SiCtrl or SiFlot-1) with PEI as per the manufacturer's instructions. The cells were harvested 72 h post-transfection with 10 mM EDTA in PBS prior to analysis. To confirm flotillin-1 expression was downregulated, we performed a western blot for each experiment (western blot and flow cytometer) where flotillin-1 expression in SiFlot-1 was compared to SiCtrl to assess the SiRNA flotillin-1 downregulation.

### **2.3.6 Lysis of transiently transfected Hek 293T cells prior to immunoblotting.**

HEK-293T transfected with CLEC12A mutant construct were harvested (106 cells/100 $\mu$ l PBS) and resuspended in the same volume of 2X modified Laemmli's sample buffer reducing (composition of 1X: 62.5mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% (w/v) SDS, 8.5% (v/v) glycerol, 2.5 mM orthovanadate, 0.025% bromophenol blue, 10 $\mu$ g/ml leupeptin, 10 $\mu$ g/ml aprotinin, 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol) or non-reducing (5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol replaced by water) and heated 95oC for 7 min. When indicated cells were treated with pervanadate. Pervanadate was freshly prepared before use by mixing 1mM orthovanadate, 0.03% hydrogen peroxide in H<sub>2</sub>O and then incubating the solution at room temperature for 15 min in the dark prior to the addition to cells (1 in 9, vol:vol dilution). Cells were incubated for 10 minutes at 37°C in the dark prior to lysis in the same volume of 2X modified Laemmli's sample buffer (see above) and immunoblotting.

When indicated, the CLEC12A-HA receptors were cross-linked with an anti-HA, mouse monoclonal or the isotype antibody (3  $\mu$ g/106 cells) for 5 min at 37°C and centrifuged prior to incubation with the goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> anti F(ab')<sub>2</sub> antibody (3  $\mu$ g/106 cells) for 5 min at 37°C. Cross-linking was stopped on ice and the cells centrifuged at 1000 x g for 1 min. The cells were resuspended (106 cells/100 $\mu$ l PBS) and lysed with the same volume of 2X modified, reducing or non-reducing Laemmli's sample buffer (see above). To prepare cell-free supernatants and pellets, cells were lysed in cold 1% NP40 and the cell pellet resuspended in cold 1% NP-40 lysis buffer (10mM Tris-HCL pH 7.3, 137.2mM NaCl, 1mM EDTA, 10 $\mu$ g/ml aprotinin, 10 $\mu$ g/ml leupeptin, 2mM sodium orthovanadate, 50 $\mu$ g/ml trypsin inhibitor, 1mM PMSF, 1% NP-40) and incubated for 10 min on ice prior to centrifuging at 15 000 x g for 10 min at 4°C.

An aliquot of the supernatant (SN) was incubated at 95 °C for 7 min in the same volume of non-reducing or reducing, modified 2X Laemmli's sample buffer. The pellets were washed with cold, 1% NP-40 lysis buffer and centrifuged at 15 000 x g for 5 min at 4°C. Pellets were sonicated with an ultrasonic pulse for 3 sec prior to the addition of non-reducing or reducing, modified 2X Laemmli's sample buffer and incubating at 95 °C for 7 min.

### **2.3.7 Electrophoresis and Immunoblotting.**

Proteins (20-25µg/sample) were separated by SDS-PAGE on 10% acrylamide gels and transferred to PVDF membranes. Blocking agents and antibodies were diluted in a TBS-Tween solution (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% (v/v) Tween 20). Non-fat milk solution (5% w/v) was used to block nonspecific sites prior to immunoblotting with the anti-flotillin-1, anti-flotillin-2, anti-HA, anti-phosphoCLEC12A (R-94P), anti-GAPDH and anti-SHP-2 antibodies. Anti-flotillin-1 [0.125µg/ml], anti-flotillin-2 [0.125µg/ml µg/ml], anti-SHP-2 [0,2µg/ml], anti-GAPDH [1µg/ml], anti-TUBB4 (Tubullin 4) [0,5µg/ml], rabbit anti-HA [1µg/ml] and were diluted in TBS-Tween (0.15%). The anti-phospho CLEC12A ITIM antibody (R-94-P) was diluted at 0.4-0.8µg/ml in TBS-Tween + BSA (5% w/v). Horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit IgG and horseradish peroxidase-labeled donkey anti-mouse IgG antibody were diluted at 50ng/ml in TBS-Tween solution. Chemiluminescence reagents were used to detect antibodies within a maximal exposure time of 5 min. Equal protein loading was verified by immunoblotting against flotillin-1 or GAPDH.

### **2.3.8 Confocal microscopy.**

Cells were transfected with the CLEC12A constructs 24 hours after being seeded on coverslips (0.22 µm). Forty-eight hours post-transfection, cells were fixed with 9% formalin for 10 min at RT and washed with PBS prior to permeabilisation with 0.05% Triton X-100 in PBS for 10 min at room temperature. This was followed by an incubation for 20 min at room temperature in blocking solution (0.05% Triton X-100 in PBS supplemented with 4% FBS) and staining with the mouse anti-HA antibody [3µg/mL for intracellular staining] and phalloidin AlexaFluor 594nm in blocking buffer 30 min at 37°C in dark. For extracellular staining, cells were incubated with an rabbit anti-HA antibody 7,5µg/mL before fixation with formalin. Cells were then washed for 30 min at 37°C and incubated with 5µg/mL of secondary antibody against HA (anti-mouse AlexaFluor 488nm) for 30 min at 37°C in dark with blocking solution. After a wash in

0.05% PBS Triton X-100 for 30 min at 37 °C and water for 2 min followed by 1 min in 90% ethanol and 1min in 99% ethanol, prior to mounting cells with SlowFade™ Gold antifade reagent. No non-specific binding of the secondary antibodies was observed (data not shown).

Images were acquired at 63X with a Z-stack spacing of 0.05 µm with the Quorum WAVFX spinning disc system (Quorum Technologies, Guelph, Ontario, Canada) and analyzed with the Volocity quantitation module. Briefly, confocal images were deconvoluted and the point spread function calculated for the GFP and Texas Red channel was applied using the velocity module for iterative restoration.

### **2.3.9 Quantitation of antibody-induced CLEC12A internalisation by flow cytometry.**

HEK-293T cells transfected with the CLEC12A constructs were harvested (106 cells/100µl PBS) and incubated with anti-HA, mouse monoclonal or the isotype antibody (3 µg/106 cells) for 5 min at 37°C and centrifuged prior to cross-linking with the goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> anti F(ab')<sub>2</sub> antibody (3 µg/106 cells) for 5 min at 37°C or incubated in buffer (no cross-linking). Cross-linking was stopped on ice and the cells centrifuged at 1000 x g for 1 min. The cells were resuspended (106 cells/100µl PBS) prior to a 30 min incubation at 4 °C in the dark with an anti-mouse Fc- FITC conjugated (13 µg/mL) antibody. The cells were washed and resuspended in PBS and CLEC12A surface expression determined by flow cytometer.

### **2.3.10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.**

HEK-293T transfected with CLEC12A WT were harvested with EDTA (106 cells/100µl PBS) and incubated in 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 3 minutes or the same v:v with diluent (H<sub>2</sub>O) . The reaction were stop by adding the same volume of 2X modified Laemmli's sample buffer (see above) without beta-mercaptoethanol and boiled for 7 minutes at 100°C.

### **2.3.11 Three dimensional modeling of CLEC12A.**

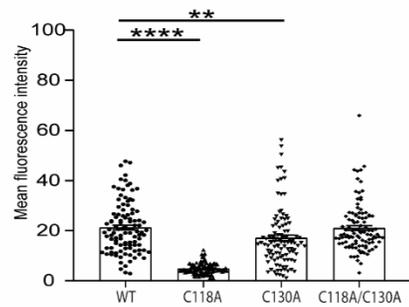
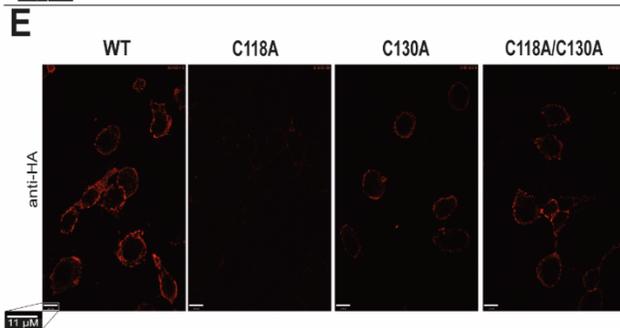
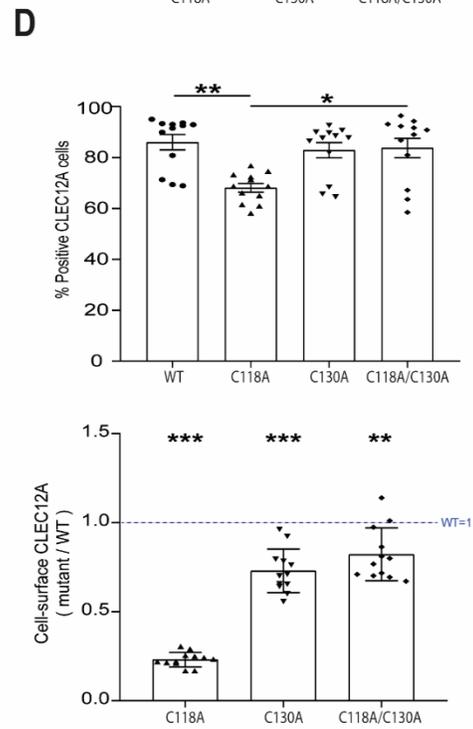
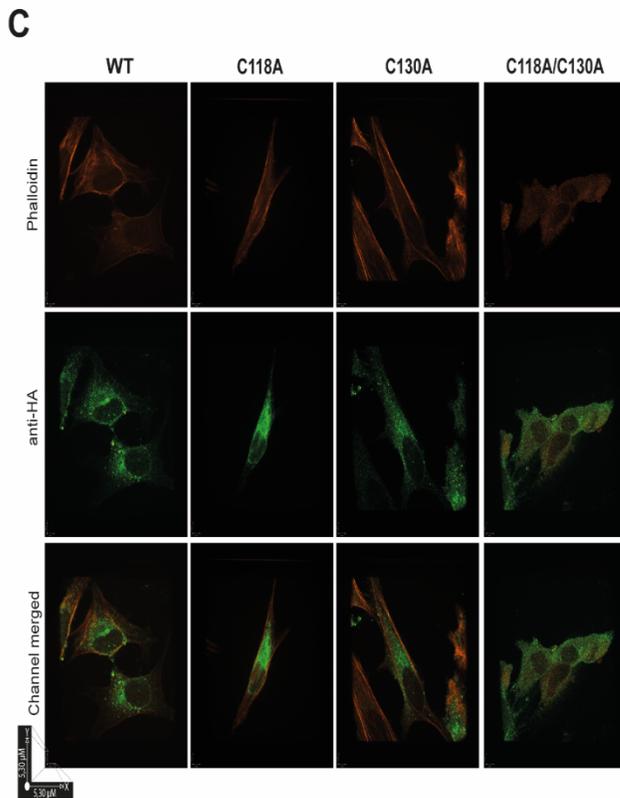
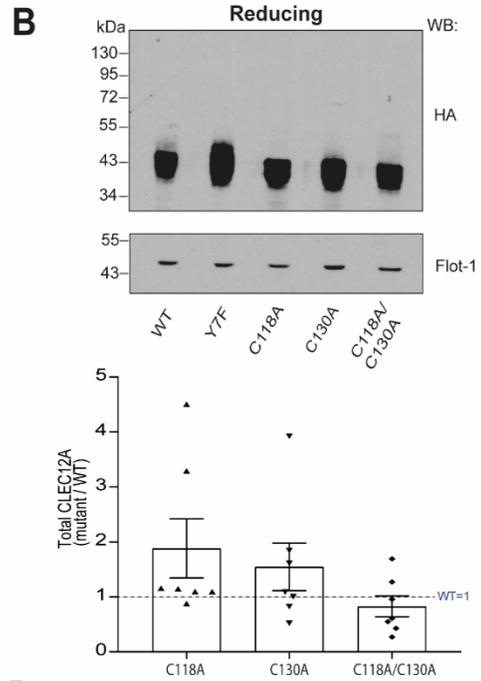
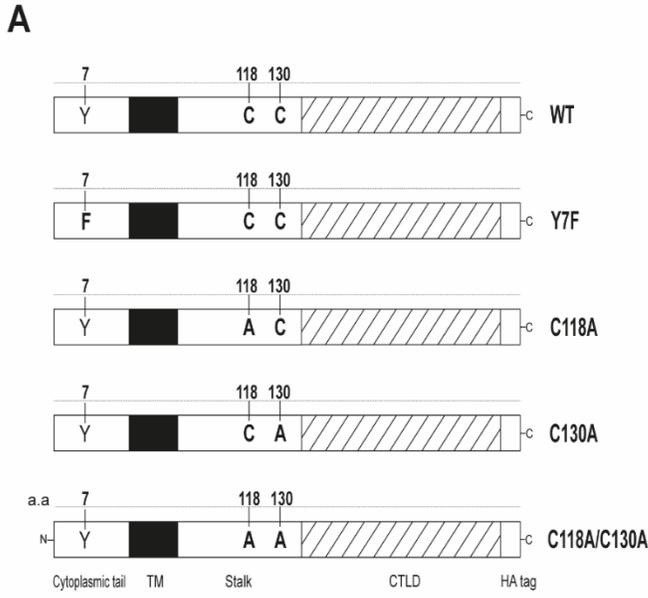
The 3D homology model (105-253 amino acid) of CLEC12A (Uniprot ID: Q5QGZ9) was constructed by the mod-eling software Modeller (Webb and Sali, 2014), using as templates from PDB database, 3g8l\_A (105-125 amino acid) and 1yxk\_B (126-253 amino acid). The homodimer was obtained by Galaxy homomer software (10.1093/nar/gkx246)

(<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=HOMOMER>). Coiled-coil of CLEC12A (68-88 amino acid) was de-termined by PCOILS (Gruber et al., 2006) and was added to dimer. Model quality was assessed by Ramachandran plot analysis through PROCHECK (Laskowski et al., 1993). Structure images were generated using PyMOL (<http://www.pymol.org>).

## **2.4 Results.**

### **2.4.1 Constructions of mutant CLEC12A receptors.**

Cysteine residues are key for protein stability and function as they can form disulfide bonds within and between polypeptide chains(19). CLEC12A contains two cysteine residues in its stalk region, C118 and C130, that are postulated to form disulfide bonds and lead to CLEC12A oligomerisation<sup>5</sup>. Sequence alignment revealed that these cysteine residues are conserved with CLEC-1 and CLEC12B(5) suggestive of an important role for these residues in CLR function. We thus used a site-directed mutagenesis approach to probe the functional properties of the CLEC12A stalk domain cysteines. The mutant CLEC12A constructs generated are shown in Fig. 2.1A. We substituted the cysteines with alanines and added a HA tag at the C-terminus to track their expression and to induce CLEC12A clustering. We previously reported that the addition of this tag does not interfere with CLEC12A expression and that CLEC12A-HA can be cross-linked with an anti-HA antibody to induced signaling in HEK-293T cells(17). We also used a CLEC12A construct with a mutation in the ITIM tyrosine residue as a control.



**Figure 2. 1** Stalk domain C118 and C130 residues regulate CLEC12A cell-surface expression and oligomerisation.

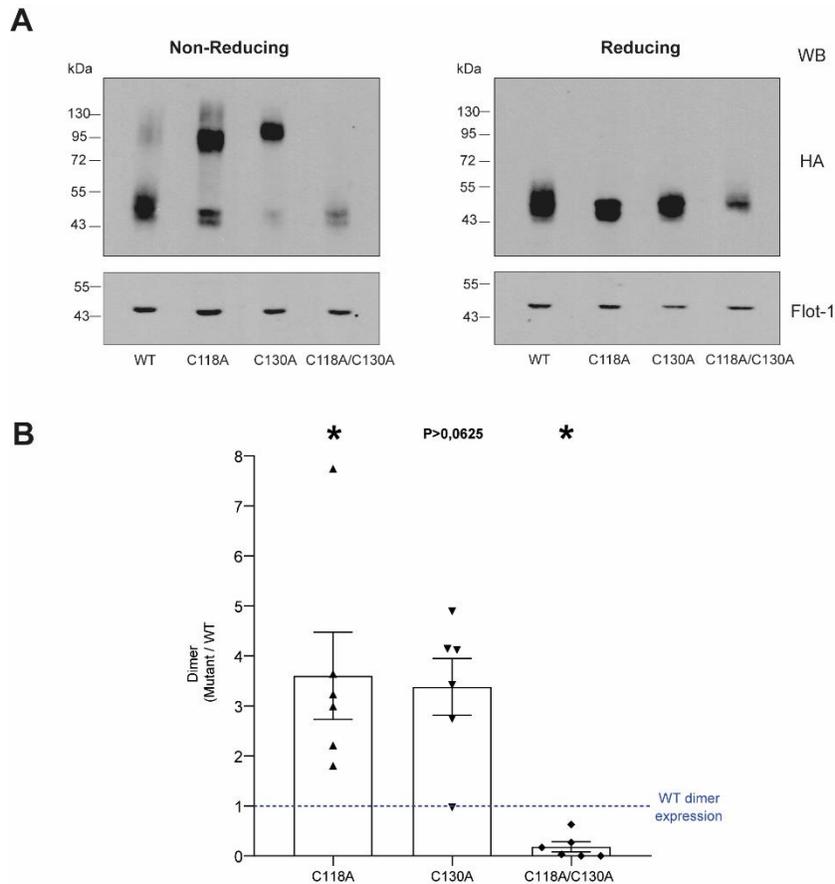
(A) A schematic diagram of the constructs used in these experiments. Wild-type CLEC12A (WT), CLEC12A ITIM mutant (Y7F), and the C118A, C130A and C118A/C130A double mutants. All constructs are HA-tagged at the C-terminus. (B) Western blot of HEK-293T cells transiently transfected with the constructs was performed with an anti-HA and anti-flotillin-1 antibody (loading control). Densitometry analysis of the Western blot is shown in the graph to the right of the gel. (C) Confocal microscopy of HeLa cells transiently expressing the indicated constructs. Permeabilised cells were stained with an anti-HA antibody (green) and phalloidin (red). X and Y axis scale bar= 5,30µM. (D) Cell-surface, CLEC12A expression in HEK-293T cells transiently transfected with the constructs as determined by flow cytometry. The proportion of cells expressing the transfected CLEC12A plasmids is shown in the left graph and the cell-surface expression is represented as a ratio over the level of expression of WT CLEC12A in the right graph. (E) Confocal microscopy of non-permeabilised, HEK-293T cells transiently expressing the indicated constructs and stained with an anti-HA antibody (red). Quantitation of CLEC12A cell-surface expression is shown in the right graph and expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). Scale bar = 11 µM. The data in the Western blot in (B) is representative of 7 independent experiments (n=7) and flow cytometry in (D), of 12 independent experiments (n=12). Confocal microscopy experiments in (C) and (E) are representative of 3 independent experiments (n=3). The data in the graph in (E) was generated by analysing the MFI of 35 cells per experiment. Statistical analysis: (upper D panel and E) Kruskal-Wallis test and multiple comparison Dunn's test \* P<0.05; \*\* P<0.01 ; \*\*\* P<0.001; \*\*\*\*P<0,0001. (D bottom panel) One sample Wilcoxon test \*\* P<0.01 ; \*\*\* P<0.001.

**2.4.2 Stalk Domain C118 and C130 Regulate CLEC12A Cell-Surface Expression and oligomerization.**

Since CLRs can oligomerise by forming disulfide bonds (14), we determined the role of the stalk cysteine residues in CLEC12A expression and oligomerisation. The transient transfection of the CLEC12A constructs in HEK-293T cells revealed that CLEC12A WT, C118A, C130A and the double mutant C118A/C1130A are expressed at comparable levels by Western blot analysis (Fig. 2.1B). Similarly, the transfection efficiency was comparable for all constructs (Fig. 2.1B, graph). CLEC12A typically migrates in SDS-PAGE gels as a thick band of a molecular weight between 43-55 kDa, as it is highly glycosylated(18). The mutant CLEC12A constructs migrated faster suggesting that glycosylation is altered (Fig. 2.1B). Confocal microscopy showed that the C118 mutant was predominantly expressed intracellularly with reduced plasma membrane expression (Fig. 2.1C). This observation was confirmed by flow cytometry and confocal microscopy of non-permeabilised cells (Fig. 2.1D & E, respectively). In contrast to the intracellular vesicular and

cell-surface staining pattern of CLEC12A WT, C130A and the double mutant, the C118A mutant exhibited diffused cytoplasmic staining. We interpret those findings to indicate that C118 is essential for CLEC12A intracellular distribution and transport to the plasma membrane. With regards to receptor internalisation, the cysteine mutants did not alter the antibody-induced internalisation of CLEC12A (Supplementary Figure 2.1).

To determine the role of C118 and C130 in CLEC12A oligomerisation, we began by comparing the migration of CLEC12A WT to the double cysteine mutant under reducing and non-reducing conditions. Fig. 2.2A shows that under non-reducing conditions CLEC12A WT migrates as two bands. The higher molecular weight band is approximately 90-100 kDa, approximately twice the molecular weight of the lower band that corresponds to differentially glycosylated CLEC12A monomers. Under reducing conditions, CLEC12A WT migrates as a single band within the 43-55 kDa range indicating that the upper 90 kDa band in the non-reducing gel represents a CLEC12A oligomer formed by disulfide bonding. A similar analysis of the double cysteine mutant revealed that disulfide bonding-dependent, CLEC12A oligomerization occurs through C118 and/or C130. A comparison of the migration of C118A or C130A corroborated this observation. CLEC12A was able to oligomerize as long as at least one of the two cysteine residues was present. Moreover, CLEC12A oligomerization was significantly enhanced for both single cysteine mutants. Together, these data identify distinct roles for cysteine stalk residues in the regulation of CLEC12A cell-surface expression and oligomerisation.



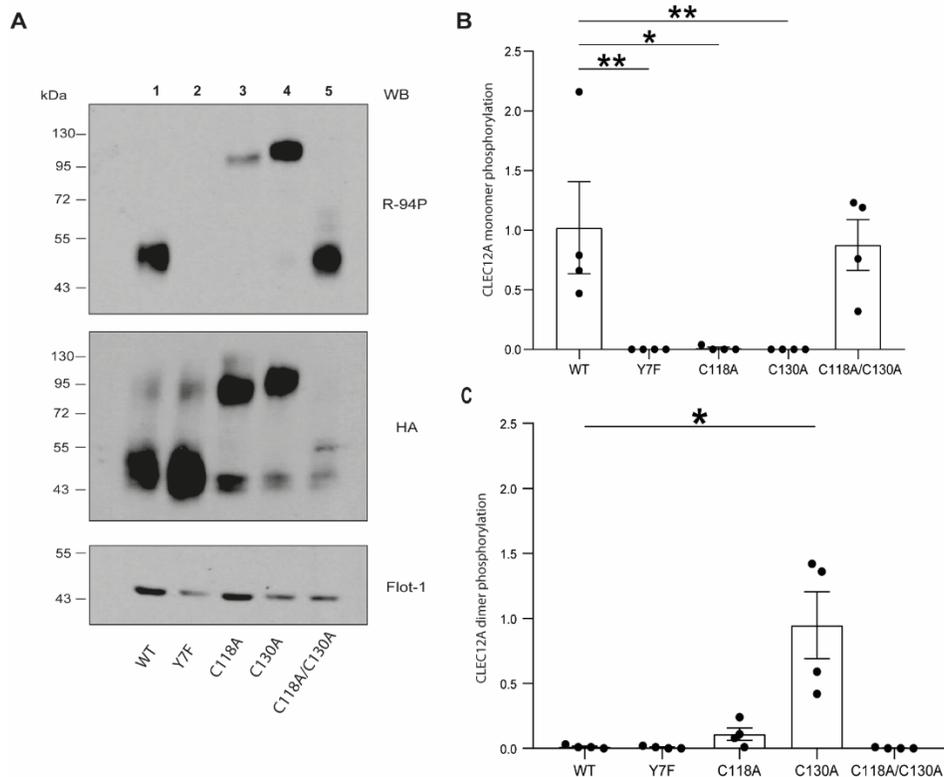
**Figure 2. 2** CLEC12A oligomerisation is dependent on C118 and C130.

(A) Oligomerisation of WT CLEC12A and CLEC12A cysteine mutants was analyzed by Western blot of transiently transfected HEK-293T cells with the anti-HA and flotillin-1 antibody (loading control) under non-reducing (left blot) and reducing (right blot) conditions. (B) Densitometry analysis of CLEC12A oligomer expression in the non-reducing gel is shown as a ratio of the signal of CLEC12A cysteine mutant oligomers/WT CLEC12A oligomers. Data in (A) are representative of 6 and 3 independent experiments for the non-reducing and reducing immunoblots, respectively. Statistical analysis: One sample Wilcoxon test \*  $P < 0.05$ .

### 2.4.3 CLEC12A phosphorylation and phosphatase recruitment is regulated by C130

Inhibitory receptor signaling is initiated by receptor clustering resulting in ITIM phosphorylation(20). The role of cysteine residues in the stalk region of CLEC12A on ITIM phosphorylation was examined in pervanadate-treated cells. Immunoblot analysis with anti-phospho CLEC12A showed that inhibition of protein tyrosine phosphatases with pervanadate resulted in CLEC12A WT phosphorylation in HEK-293T transfected cells (Fig 2.3A, lane 1).

CLEC12A ITIM phosphorylation was detected with an in-house generated, anti-phospho CLEC12A ITIM antibody (R-94P) described in Paré et al(20). Phosphorylation was ITIM-specific as mutating this motif's tyrosine to a phenylalanine (Y7F) abolished CLEC12A phosphorylation (Fig 2.3A, lane 2). The double cysteine CLEC12A mutant was also phosphorylated (Fig 2.3A, lane 5) indicative that C118 and C130 are not required for CLEC12A monomer phosphorylation in pervanadate-treated cells. In line with this observation, mutation of C118 or C130 did not abolish CLEC12A ITIM phosphorylation as R-94P bound both these CLEC12A mutants (Fig 2.3A, lane 3 and 4). Phosphorylation was, however, predominantly observed in C118A and C130A dimers. Moreover, there was a strong tendency for the level of phosphorylation to be superior for the C130A dimers than the C118A dimers but this difference did not reach significance.



**Figure 2. 3** C118 and C130 mutants are phosphorylated and do not alter antibody-induced CLEC12A internalization.

(A) CLEC12A phosphorylation was analyzed by Western blot with the R-94P antibody, the anti-HA antibody and the anti-Flotillin-1 (loading control) in HEK-293T cells transiently expressing the indicated CLEC12A constructs and treated with pervanadate. (B) and (C) Densitometry analysis of the phosphorylated monomer and dimer forms

of WT and mutant CLEC12A. These data are representative of 4 independent experiments. Statistical analysis: Kruskal-Wallis, uncorrected Dunn's test \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

To determine if the CLEC12A mutants are phosphorylated upon the antibody-induced clustering, the HA-tagged CLEC12A WT and mutants were cross-linked with an anti-HA and secondary antibody prior to Western blotting. As we previously reported(17), cross-linking induces the translocation of the CLEC12A WT monomer to the NP40 insoluble fraction (pellet) of the cell lysate (Fig. 2.4, compare lane 1 and 5 of the right, HA gel). This translocation is not observed in cells incubated with an isotype control antibody (Fig. 2.4, compare lane 1 and 5 of the left, HA gel). Blotting with R-94P confirmed our previous observation that the CLEC12A WT monomer is phosphorylated in the insoluble fraction of the lysate after cross-linking (Fig. 2.4, compare compare lane 1 and 5 of the right, R-94P gel). In contrast, in the absence of both stalk cysteines, CLEC12A translocation is abolished and phosphorylation significantly reduced (Fig. 2.4, lane 4 and 8 of the right, HA and R-94P gels). Both C118A and C130A are sufficient, however, to preserve CLEC12A translocation in its dimer form (Fig. 2.4, compare lanes 2 and 6, and lanes 3 and 7 of the right, HA gel). Translocation of the C118A dimer is significantly inferior to that of C130A dimer, highly likely due to its low level of cell-surface expression. Strikingly, the C118A and C130A dimers in the supernatant fraction of cells incubated with the isotype antibody were constitutively phosphorylated. Increased receptor oligomerisation thus induces CLEC12A phosphorylation (Fig. 2.4, compare lane 2 and 3 to the WT in lane 1 in the left, R-94P gel). While cross-linking induced the translocation of C130A dimers to the pellet fraction, an increase in their phosphorylation was not apparent as their basal level of phosphorylation was already very high (Fig. 2.4, compare lanes 3 and 7 of the right, R-94P gel). Similar observations were made for C118A. Phosphorylation of the C118A mutant in the pellet was, however, significantly lower than C130A highly likely due to a significantly inferior amount of the C118A dimer in the pellet fraction compared to C130A.

We and others previously reported the recruitment of SHP-2 by CLEC12A after phosphorylation induced by antibody-mediated clustering or treatment with pervanadate<sup>5</sup> (17). In contrast, SHP-2 was not detected in the pellet fraction in cells expressing the double cysteine mutant (Fig. 2.4, lane 8 of the right, SHP-2 blot). A similar observation was made for C118A, highly likely due to the low levels of cell-surface expression of this mutant receptor. As for C130A, it recruits SHP-2 to the pellet fraction after antibody-induced cross-linking similar to

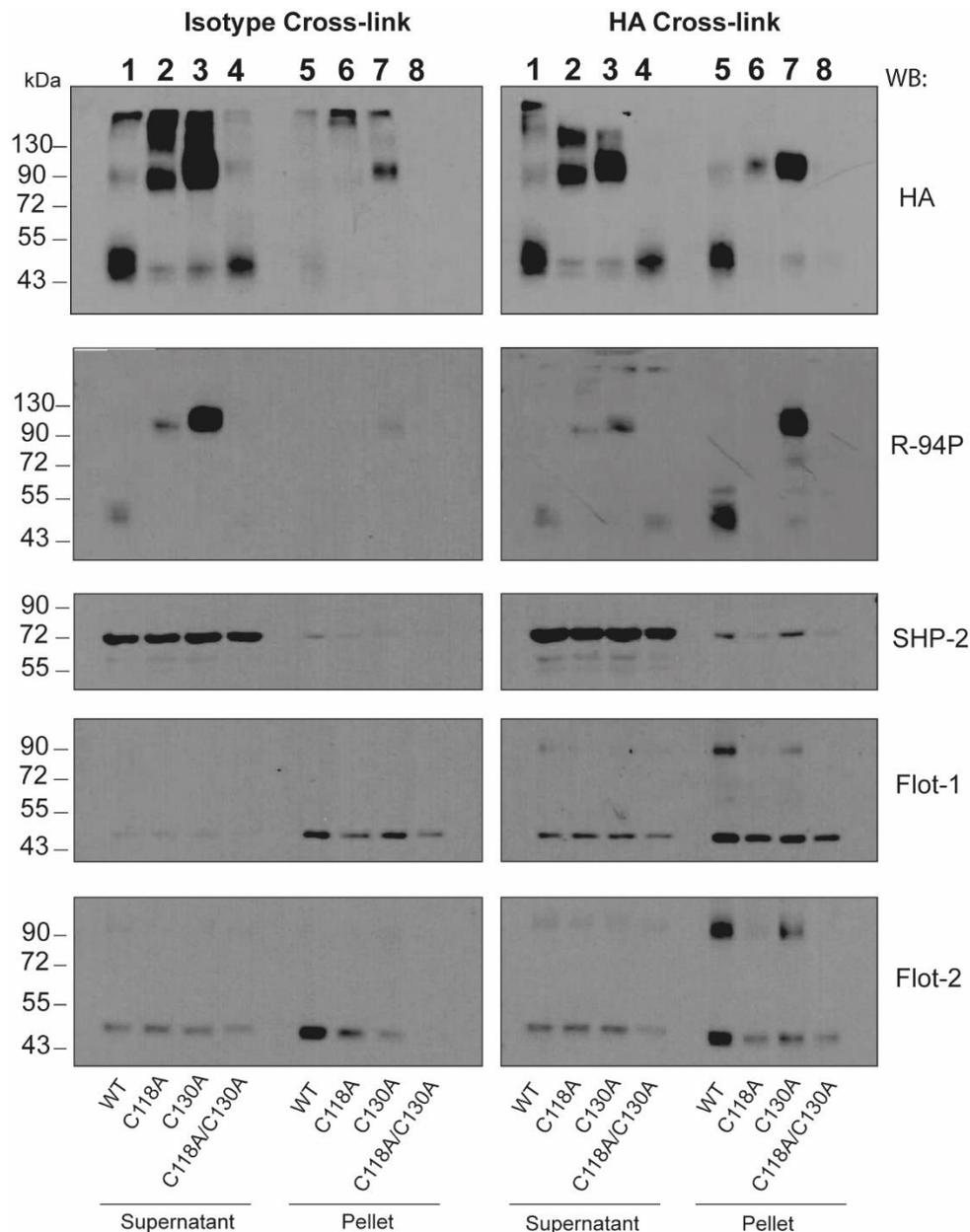
CLEC12A WT (Fig. 2.4, compare lanes 5 and 7 of the right, SHP-2 blot). Together, these results indicate that the presence of the C118 residue is essential for SHP-2 recruitment by CLEC12A.

Signaling reactions are dynamic over time. As C130A was able to translocate to the insoluble fraction of the cell lysate to the same extent as CLEC12A WT, we examined the possibility that mutating C130 influences the kinetics of CLEC12A translocation, phosphorylation, and/or SHP-2 recruitment. A time course experiment was performed to follow these molecular events by Western blot analysis at the indicated time points. We not only confirmed that C130A dimers translocated to the pellet after CLEC12A cross-linking, but also that this phenomenon occurred with faster kinetics than for CLEC12A WT monomers (Fig. 2.5, compare lanes 1-5 to 6-10 in C130A, HA gel). The proportion of C130A dimers in the pellet at 15 sec post-cross-linking was two-fold higher than CLEC12A WT monomers and already at its peak of recruitment to the pellet compared to 120 sec for CLEC12A WT. Moreover, SHP-2 recruitment to the insoluble NP40 pellet is also accelerated in cells expressing C130A dimers as it is at its highest level 15 seconds after cross-linking compared to 300 sec for CLEC12A WT monomers (Fig. 2.5, compare lanes 6-10 in left and right anti-SHP-2 blots). Together, these data indicate that C130A is a gain of function mutation.

#### **2.4.4 Modeling of CLEC12A mutants**

To gain insight into the effect of C118A and C130A on the quaternary structure of CLEC12A, we generated a 3D model of CLEC12A with structural data of related CLRs Ly49 and ORL1. Figure 6A shows the predicted closed conformation of CLEC12A when both C118 and C130 form disulfide bonds and CLEC12A dimerizes. Our modelling predicts that the C118A mutant exhibits an open conformation as it does not form a disulfide bond (Fig. 2.6B). In this open conformation, the cytoplasmic tails of CLEC12A are farther apart than in the closed conformation. Since receptor oligomerisation is a dynamic process, these CLEC12A conformations may co-exist. Non-reducing and reducing PAGE of C118, C130 and C118+C130 mutations and 3D models suggest that there are three types of homodimers in equilibrium with monomers: C118-C118 disulfide bridge homodimer, C130-C130 homodimer, and C118-C118/C130-C130 homodimer. In addition, mutation of C118 promotes the formation of C130-C130 disulfide bridge homodimer and vice versa. Together, our experimental data indicate that disulfide bonding between C118 residues of adjacent CLEC12A polypeptides pushes the

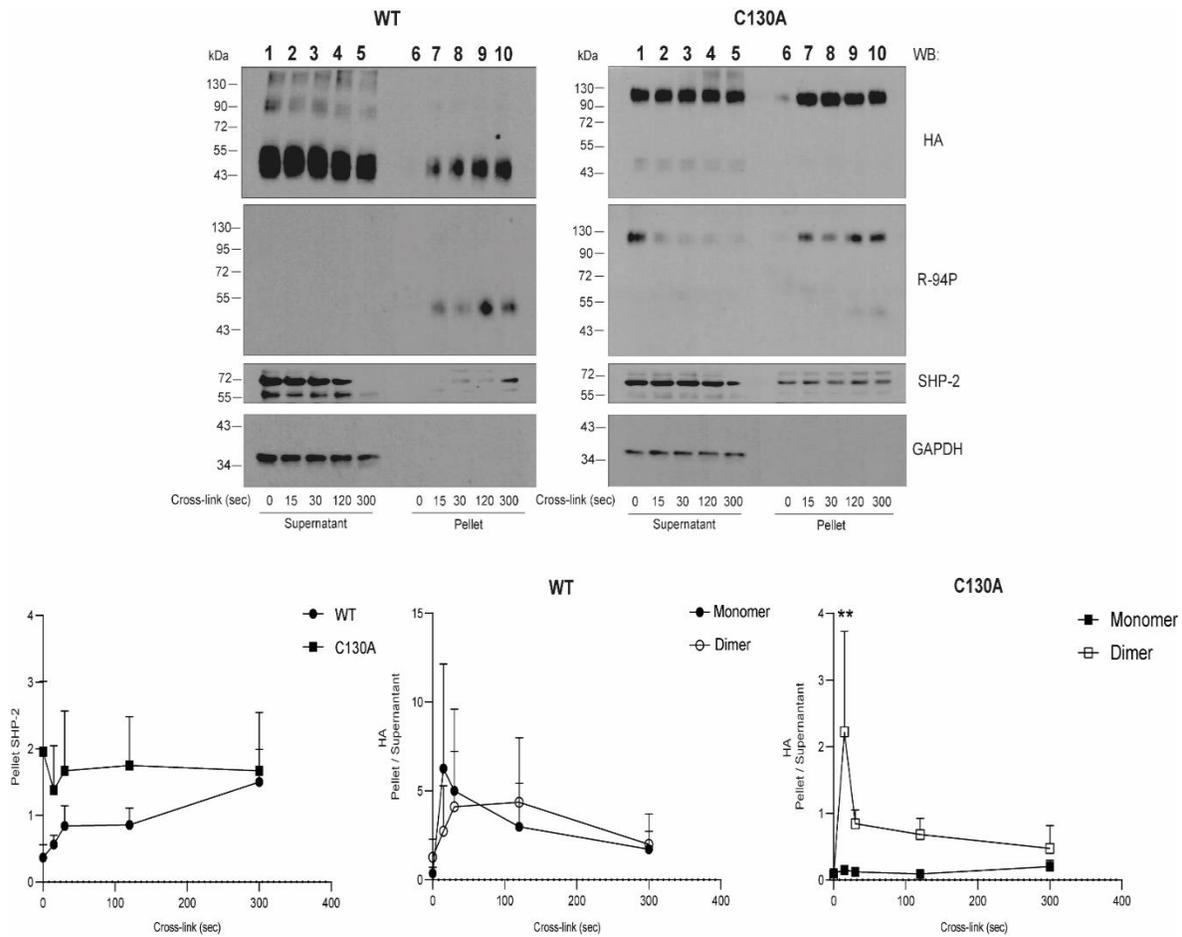
oligomerisation equilibrium towards the closed conformation bringing the two CLEC12A polypeptides closer to each other to favor signaling via the cytoplasmic ITIM motif.



**Figure 2. 4** Involvement of neck domain C118 and C130 in early signaling initiated by antibody-induced clustering of CLEC12A.

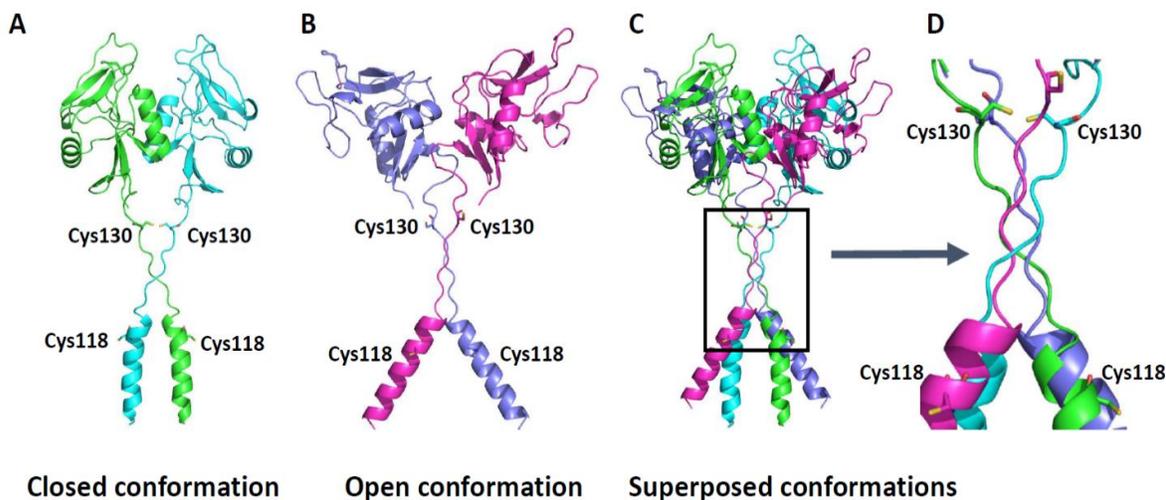
Wild-type (WT) and mutant CLEC12A expressed transiently in HEK-293T cells were cross-linked with an anti-HA or a mouse isotype (IgG) control antibody and a secondary (F(ab)<sup>2</sup>) antibody prior to cell lysis with NP-40 buffer as described in Materials and Methods. CLEC12A translocation was analysed by Western blot of the supernatant

(SN) or pellet (P) with the R-94P, anti-HA, anti-SHP-2 or anti-flotillin-1 and 2 antibodies. The flotillin-1 protein was used a loading control. These data are representative of 3 independent experiments.



**Figure 2. 5** The C130 mutant enhances the recruitment of SHP-2 to the insoluble membrane fraction.

Wild-type (WT) CLEC12A and C130 expressed transiently in HEK-293T cells were cross-linked with an anti-HA or a mouse isotype control antibody before cell lysis at the indicated time points as described in Materials and Methods. CLEC12A translocation from the NP40 soluble (supernatant (SN)) to insoluble pellet (P) was analysed by Western blot under non-reducing conditions with the anti-HA, R-94P, anti-SHP-2 and anti-GAPDH (loading control) antibodies. These data are representative of 3 independent experiments. Densitometry analysis was performed for both constructs as follows, at the indicated time points. The proportion of SHP-2 in the pellet relative to the amount of pellet CLEC12A-HA was calculated as the ratio of pellet (SHP-2/GADPH)/(anti-HA/GADPH) in the left graph. The proportion of oligomers and monomers that translocated to the pellet was calculated as the ratio of pellet anti-HA/supernatant anti-HA signal, shown in the middle graph for WT CLEC12A and C130A in the right graph. Statistical analysis: Uncorrected Fisher's LSD test \*\* P<0.01.

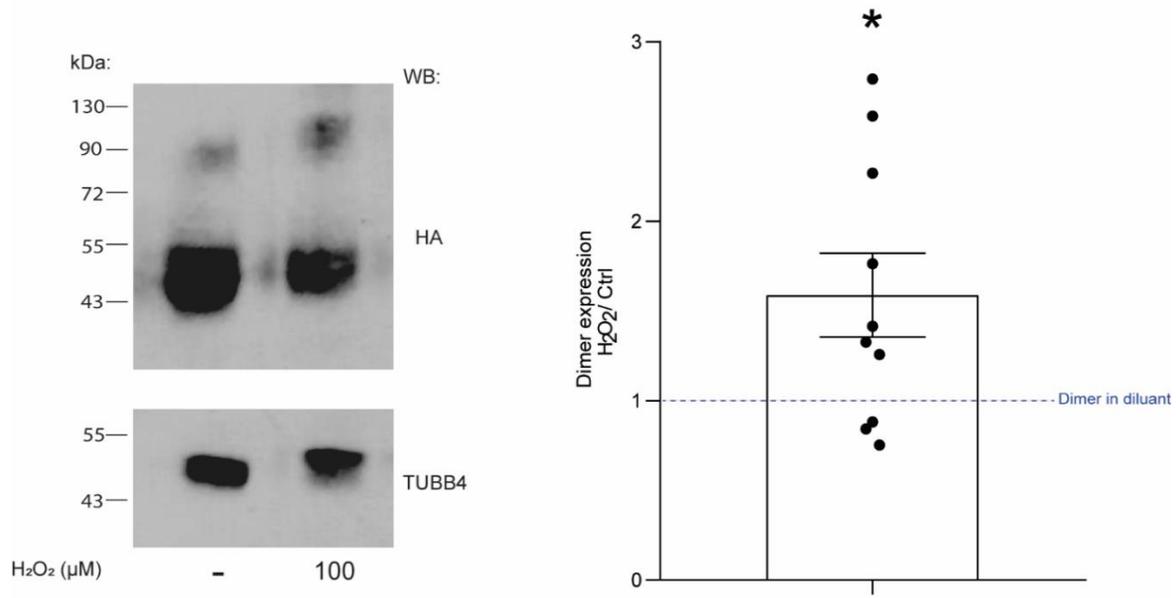


**Figure 2. 6** 3D models of CLEC12A in different conformations.

(A) CLEC12A in closed conformation with Cys118 and Cys130 that could form disulfide bridge between two monomer. (B) CLEC12A in open conformation with Cys118 and Cys130 that are predicted to not form disulfide bridge. (C) Superposition of closed and open conformation. (D) Close-up in the region containing Cys118 and Cys130. 3D models images were generated using PyMOL (<http://www.pymol.org>).

#### 2.4.5 Regulation of CLEC12A oligomerisation by oxidation

Disulfide bonds form through an oxidation reaction involving cysteine residues(19, 21). We tested the hypothesis that oxidation would enhance the formation of CLEC12A oligomers by incubating cells transiently transfected with CLEC12A WT with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a physiological level of 100 μM(22). The ratio of CLEC12A WT oligomers to monomers formed in peroxide-treated HEK-293T cells transiently transfected with CLEC12A WT was significantly higher compared to cells incubated in buffer (Fig. 7). These data suggest that CLEC12A stalk cysteines regulate CLEC12A oligomerisation, in part, by sensing the oxidative state of the environment.

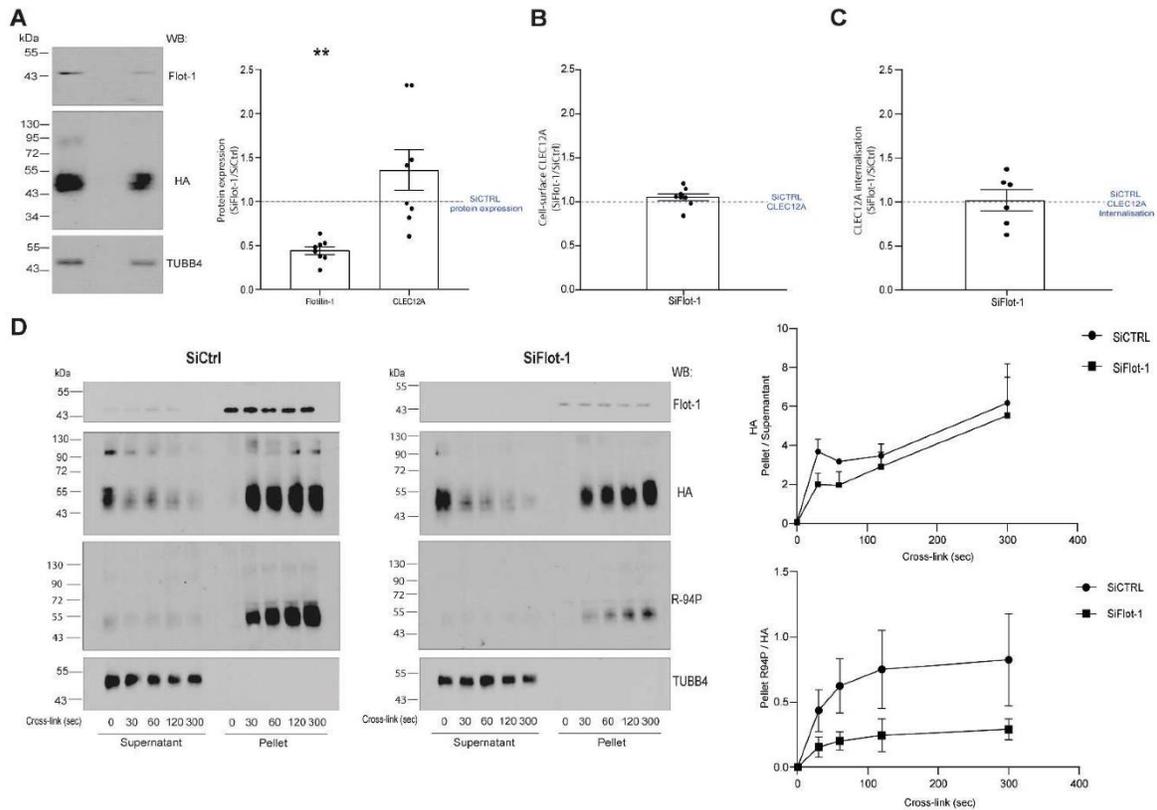


**Figure 2. 7** Oxidation induces CLEC12A WT oligomerisation.

HEK-293T cells transiently expressing CLEC12A WT were either incubated with 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or diluent (H<sub>2</sub>O) prior to Western blot analysis with an anti-HA and TUBB4 antibody (loading control). Densitometric analysis of the Western blot data was performed by calculating the ratio of CLEC12A dimer signal after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubation/ CLEC12A dimer signal formed during incubation with the diluent. These data are representative of 10 independent experiments. Statistical analysis: One sample Wilcoxon test \* P<0.05.

#### 2.4.6 Flotillin regulates CLEC12A phosphorylation

Flotillins are best known for their scaffolding properties that are crucial for the formation of signaling membrane platforms(23). The close proximity of receptors and signaling molecules in these protein complexes facilitates the initiation of cellular signaling to either promote or downregulate cellular activation. We previously reported that the antibody-induced clustering of CLEC12A WT led to its co-localization with flotillin-1(17). We confirmed this observation in Fig. 4 that shows the presence of CLEC12A WT in the flotillin-enriched, insoluble fraction (pellet). Similarly, cross-linking of the C130A mutant also induces the oligomerisation of a portion of the flotillin pool in the pellet that migrates at the same molecular weight as the CLEC12AWT and C130 oligomers Fig. 4 (lanes 5 and 7 in the right, Flot-1 and Flot-2 blots).



**Figure 2. 8** Flotillin depletion downregulates antibody-induced CLEC12A phosphorylation.

(A) Flotillin-1 expression was knocked-down with a pool of flotillin-1-specific siRNAs (siFlot-1) in HEK-293T cells transiently transfected with CLEC12A WT. The diminution of flotillin-1 expression was confirmed by Western blot as was CLEC12A expression. (B) Cell-surface CLEC12A expression in flotillin knocked-down cells was compared to cells transfected with control (siCTRL) siRNAs by flow cytometry with an anti-HA antibody. The ratio of the MFI of the anti-HA signal in siFlot-1/siCTRL RNA-treated cells is shown in the graph. Data in (A) and (B) are representative of 8 independent experiments. (C) The effect of SiFlot-1 on CLEC12A internalisation was determine by flow cytometry as described in 'Materials and Methods'. Data are shown as the ratio of the median fluorescent index (MFI) of cell-surface CLEC12A in siFlot-1 cells/siCTRL cells after the antibody-induced internalization of CLEC12A. These data are representative of 8 independent experiments. (D) CLEC12A was cross-linked with the anti-HA antibody on HEK-293T cells transiently expressing WT CLEC12A and transfected with siFlot-1 or siCTRL siRNAs. CLEC12A translocation to the NP40-insoluble pellet and phosphorylation was analysed by Western blot of the supernatant (SN) and pellet (P) of cell lysates with the anti-HA and R-94P antibody. The anti-TUBB4 (tubulin 4) antibody was used as a loading control. These data are representative of 4 and 3 (for R-94P) independent experiments. Densitometric analysis was performed on the anti-HA data to calculate the ratio of CLEC12A in the pellet/supernatant in siFlot-1 and siCTRL siRNA-transfected cells (top graph). The proportion of phosphorylated CLEC12A in the pellet is shown as the ratio of phosphorylated CLEC12A (R-94P)/non-

phosphorylated CLEC12A (anti-HA) in siFlot-1 and siCTRL siRNA-transfected cells (bottom graph). (C) Statistical analysis: One sample Wilcoxon test \*\* P<0.01.

As our observations suggest that CLEC12A may oligomerize with flotillin after antibody-induced clustering, we explored the potential link between CLEC12A signaling and flotillin using a knock-down approach. The silencing of flotillin-1 expression in HEK-293T cells by 50% did not significantly alter CLEC12A cell-surface expression or its antibody-induced internalisation (Fig. 8A-C). The downregulation of flotillin-1 did not significantly decrease the antibody-induced translocation of CLEC12A WT to the NP40 insoluble pellet (Fig. 8D, anti-HA blot and top graph). In contrast, silencing flotillin-1 expression significantly diminished the proportion of CLEC12A WT phosphorylated in the NP40 insoluble pellet (Fig. 8D, anti-R-94P blot and bottom graph). Together, these observations suggest that, while not playing a role in CLEC12A membrane expression or internalisation, flotillin-1 plays a key role in the ITIM phosphorylation required for receptor signaling following antibody-induced clustering of CLEC12A.

## 2.5 Discussion

Cysteine residues ensure protein quality control through proper protein folding in the tightly controlled redox environment of the ER(19). Naturally occurring mutations in membrane and secretory proteins causing ER retention and loss of protein function are common in genetic diseases including Pelizaeus-Merzbacher disease and von Willebrand's disease(19). While we provide evidence that loss of C118 disrupts CLEC12A's transit through the secretory pathway significantly diminishing its cell-surface expression, naturally occurring polymorphisms at this residue have not been reported. It is highly likely that there is considerable selection pressure to avoid changes at this amino acid due to its crucial role in CLEC12A expression. To our knowledge a role for stalk cysteine residues in CLR expression has not been previously reported.

In addition to naturally occurring polymorphisms, the redox status of the surrounding environment could modify CLEC12A function by affecting C118 and C130 formation of disulfide bonds due to changes in their thiol reactivity. Cysteines are highly reactive residues and they also play a role as redox molecular switches in addition to their oxidative protein folding properties in several proteins such as HMGB1(19). The function of this DNA-binding nuclear protein changes depending on the redox state of its cysteines. When fully reduced, HGMB1 promotes inflammation by activating cell migration and stimulating cytokine secretion. In

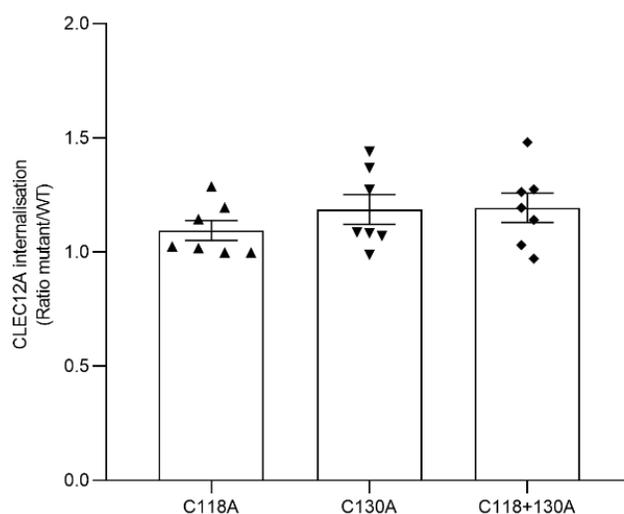
contrast, sulphonylation inactivates HMGB1. Moreover, cysteines within the same protein may play differential roles in protein trafficking, dimerization and function as reported for the HDL receptor, SR-B1(28). Our findings have implications for the role of CLEC12A in inflammation as we also show that hydrogen peroxide induces CLEC12A oligomerisation. Whether C118 and C130 are equally reactive towards oxygen radicals remains unknown. The preferential oxidation of C118 would result in forming a disulfide bond as shown in Fig. 6 (closed conformation) and a gain-of-function phenotype. In contrast, oxidation of C130 would favor disulfide bonding at this residue as shown in Fig. 6 and result in a diminution in receptor function. These two cysteines thus have distinct and counter-regulatory roles to ensure the appropriate post-translational processing and function of CLEC12A. While the presence of C118 ensures that CLEC12A's transport from the ER to the plasma membrane is not hindered, the presence of C130 is necessary to regulate CLEC12A oligomerisation. Our data strongly suggest that CLEC12A stalk cysteines function as redox, regulatory switches of CLEC12A cell-surface expression, oligomerisation and signaling.

We previously reported that CLEC12A co-localizes with flotillin in detergent-resistant membranes after antibody-induced cross-linking(17). The current study shows that antibody-induced cross-linking of CLEC12A also induces flotillin-1 and flotillin-2 oligomerisation in the detergent-resistant membrane fraction. This is in line with previous reports that demonstrated the requirement of flotillin oligomerisation for its recruitment to these plasma membrane domains(29). Consistent with the signaling promoting properties of flotillin-enriched membrane domains, a knock-down of flotillin-1 expression significantly diminished the phosphorylation of the CLEC12A ITIM. These observations underscore the crucial role of flotillin membrane domains in CLEC12A signaling. Flotillin interacts with a variety of receptors and signaling proteins explaining its involvement in a myriad of cellular processes including cell adhesion, endocytosis, phagocytosis and cell signalling(23, 29). Whether CLEC12A can also, in turn, regulate any of the diverse roles of flotillin through hetero-oligomerisation and/or altering flotillin phosphorylation remains to be determined.

While we provide evidence for a regulatory role for Cys118 and Cys130 in CLEC12A expression, oligomerization and phosphorylation, the role of these residues in downstream CLEC12A signaling and function remains to be determined. Further experimentation will also reveal how flotillin and CLEC12A interact to regulate myeloid cell function.

In summary, our observations significantly further our understanding of CLEC12A function by identifying a crucial role for non-CTLD cysteines in regulating CLEC12A expression and signaling. Additionally, our data suggest that these cysteines act as redox-regulatory switches of CLEC12A signaling. Insight into how different inflammatory environments modulate CLEC12A expression and function will further our understanding of CLEC12A participation in autoimmune and inflammatory diseases.

## 2.6 Supplementary Materials.



**Supplementary figure 2. 1** The effect of C118A and C130A on CLEC12A antibody-induced internalization.

HEK-293T cells transfected with CLEC12A constructs were cross-linked with a primary anti-HA. Cell-surface CLEC12A was then determined by staining cells with a secondary, anti-mouse Fc antibody prior to flow cytometry analysis as described in 'Materials and Methods'. Using the Median fluorescent index (MFI), the percent of each mutant internalization was calculated, and used to generate the mutant internalization ratio with CLEC12A WT basal internalization. These data are representative of 7 independent experiments.

## 2.7 Author contributions.

Conceptualisation and methodology: M.J.F., P.H.N. and J.V.

Investigation, formal analysis and validation: major contribution by J.V. and M.J.F., contribution by G.P., A.M., X.C-M., H.M., P.H.N., K.R.M. Software: H.M.;

Writing original draft, review and editing and visualisation: major contribution by M.J.F. and J.V., contribution by G.P., H.M., K.R.M., P.H.N.

Supervision by M.J.F. and P.H.N.

Funding acquisition, resources and project administration: M.J.F.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## **2.8 Funding.**

Funding: This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant (number 142408) and funds from the CHU de Québec Foundation awarded to MJF. MJF also received an Arthritis Society Investigator Award. JV received a scholarship from the CHU de Québec Foundation and the 'Fonds Pierre-Borgeat sur l'Arthrites et les Maladies Rhumatismales'.

## **2.9 Acknowledgments.**

We would like to thank Alexandre Brunet of the flow cytometry core facility of the CHU de Quebec Research Center for his assistance with the flow cytometry experiments. We also thank Romain Devillers, for sharing his expertise in imaging analysis.

## **2.10 Conflicts of interest:**

The authors declare no conflict of interest. The research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## **2.11 References:**

1. Marshall AS, Willment JA, Pyz E, et al. Human MICL (CLEC12A) is differentially glycosylated and is down-regulated following cellular activation. *European journal of immunology*. 2006;36(8):2159-69.
2. Chen CH, Floyd H, Olson NE, et al. Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood*. 2006;107(4):1459-67.
3. Bakker AB, van den Oudenrijn S, Bakker AQ, et al. C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer research*. 2004;64(22):8443-50.
4. Han Y, Zhang M, Li N, et al. KLRL1, a novel killer cell lectinlike receptor, inhibits natural killer cell cytotoxicity. *Blood*. 2004;104(9):2858-66.
5. Marshall AS, Willment JA, Lin HH, Williams DL, Gordon S, Brown GD. Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(15):14792-802.

6. Redelinghuys P, Whitehead L, Augello A, et al. MICL controls inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206644
7. Neumann K, Castineiras-Vilarino M, Hockendorf U, et al. Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death. *Immunity*.40(3):389-99.
8. Vaillancourt M, Desaulniers P, Pare G, et al. Expression of the myeloid inhibitory receptor CLEC12A correlates with disease activity and cytokines in early rheumatoid arthritis. *Scientific reports*. 2021;11(1):11248. doi:10.1038/s41598-021-90631-7
9. Li K, Neumann K, Duhan V, et al. The uric acid crystal receptor Clec12A potentiates type I interferon responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(37):18544-9. doi:10.1073/pnas.1821351116
10. Drickamer K, Fadden AJ. Genomic analysis of C-type lectins. *Biochemical Society symposium*. 2002(69):59-72.
11. Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev*. 1998;163:19-34.
12. McGreal EP, Martinez-Pomares L, Gordon S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Molecular immunology*. 2004;41(11):1109-21.
13. Pyz E, Marshall AS, Gordon S, Brown GD. C-type lectin-like receptors on myeloid cells. *Annals of medicine*. 2006;38(4):242-51.
14. Drickamer K. C-type lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology*. 1999;9(5):585-90.
15. Daeron M, Jaeger S, Du Pasquier L, Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev*. 2008;224:11-43.
16. Shakola F, Suri P, Ruggiu M. Splicing Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines and Chemokines: At the Interface of the Neuroendocrine and Immune Systems. *Biomolecules*. 2015;5(3):2073-100. doi:10.3390/biom5032073
17. Pare G, Vitry J, Merchant ML, et al. The Inhibitory Receptor CLEC12A Regulates PI3K-Akt Signaling to Inhibit Neutrophil Activation and Cytokine Release. *Frontiers in immunology*. 2021;12:650808. doi:10.3389/fimmu.2021.650808
18. Gagne V, Marois L, Levesque JM, et al. Modulation of monosodium urate crystal-induced responses in neutrophils by the myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor: potential therapeutic implications. *Arthritis Res Ther*.15(4):R73.
19. Fra A, Yoboue ED, Sitia R. Cysteines as Redox Molecular Switches and Targets of Disease. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2017;10:167. doi:10.3389/fnmol.2017.00167
20. Munitz A. Inhibitory receptors on myeloid cells: new targets for therapy? *Pharmacology & therapeutics*. 2010;125(1):128-37. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.10.007
21. Wiedemann C, Kumar A, Lang A, Ohlenschlager O. Cysteines and Disulfide Bonds as Structure-Forming Units: Insights From Different Domains of Life and the Potential for Characterization by NMR. *Frontiers in chemistry*. 2020;8:280. doi:10.3389/fchem.2020.00280
22. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999;93(5):1464-76.
23. Otto GP, Nichols BJ. The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond. *Journal of cell science*. 2011;124(Pt 23):3933-40. doi:10.1242/jcs.092015
24. Drickamer K. C-type lectin-like domains. *Current opinion in structural biology*. 1999;9(5):585-90.
25. Drickamer K, Dodd RB. C-Type lectin-like domains in *Caenorhabditis elegans*: predictions from the complete genome sequence. *Glycobiology*. 1999;9(12):1357-69. doi:10.1093/glycob/9.12.1357
26. Sattler S, Reiche D, Sturtzel C, et al. The human C-type lectin-like receptor CLEC-1 is upregulated by TGF-beta and primarily localized in the endoplasmic membrane compartment. *Scand J Immunol*. 2012;75(3):282-92. doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02665.x
27. Xie Q, Matsunaga S, Niimi S, et al. Human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 functions as a dimer in living cells. *DNA and cell biology*. 2004;23(2):111-7. doi:10.1089/104454904322759920

28. Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Nomoto A, Azhar S. Differential roles of cysteine residues in the cellular trafficking, dimerization, and function of the high-density lipoprotein receptor, SR-BI. *Biochemistry*. 2011;50(50):10860-75. doi:10.1021/bi201264y
29. Neumann-Giesen C, Falkenbach B, Beicht P, et al. Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *The Biochemical journal*. 2004;378(Pt 2):509-18. doi:10.1042/BJ20031100

# Discussion et perspective

## Contexte

Le récepteur CLEC12A est un récepteur inhibiteur impliqué dans plusieurs pathologies inflammatoires qui possède la capacité de moduler l'activation des cellules d'origine myéloïde grâce au motif de signalisation inhibiteur qu'il possède, le motif ITIM. Toutefois, nos connaissances sont limitées à propos du fonctionnement de CLEC12A, que ce soit les ligands qu'il reconnaît, ses mécanismes moléculaires d'activation et les voies de signalisation subséquentes qu'il module. Pour bien comprendre le rôle régulateur de CLEC12A dans les maladies, il faut d'abord comprendre son fonctionnement.

Mes travaux ont contribué à identifier des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation du récepteur CLEC12A, à savoir sa translocation dans les DRM enrichies en flotillines. Nous avons ainsi pu améliorer la compréhension du fonctionnement du récepteur dans la pathologie de la goutte et découvrir la modulation de l'axe p38-MAPK-PI3K-Akt par CLEC12A chez le neutrophile en réponse aux cristaux d'UMS.

## **Le rôle des cystéines 118 et 130 de la tige extracellulaire dans la signalisation de CLEC12A**

Notre étude a identifié des événements moléculaires et des motifs protéiques de CLEC12A menant à la transduction de son signal. Notre étude rapporte principalement le rôle des cystéines responsables de l'oligomérisation de CLEC12A et de sa translocation dans les DRM enrichies en flotillines pour induire la phosphorylation de son motif ITIM et le recrutement des phosphatases présumées Shp1- et Shp-2[143].

L'oligomérisation est un mécanisme moléculaire important dans le fonctionnement de plusieurs récepteurs. Un mécanisme que partagent plusieurs CLR impliqués dans la reconnaissance de différents ligands est l'oligomérisation qui leur permet de modifier leur avidité[145]. L'hétéro ou l'homo-oligomérisation des CLR leurs permet aussi d'adapter les signaux intracellulaires qu'ils induisent dans la cellule en fonction du type de ligand rencontré. Ce principe permet aux récepteurs immunomodulateurs de potentialiser ou d'inhiber d'autres voies de signalisation induites par d'autres récepteurs[145]. L'oligomérisation des récepteurs immunomodulateurs joue

un rôle important dans leur signalisation, afin de moduler les voies de signalisation lors de l'activation des cellules immunitaires. Étant donné la nature de récepteur immunomodulateur de CLEC12A, ce mécanisme apparaît important dans l'induction de son signal intracellulaire.

La formation de ponts disulfures est la méthode d'oligomérisation la plus répandue permettant au récepteur de former des liaisons covalentes [290]. Dans la famille des CLR, la tige extracellulaire (ou la région du cou) est connue pour jouer un rôle dans cette capacité d'oligomérisation[291, 292]. Les travaux de Marshall[143], ont permis lors de l'identification de CLEC12A la mise en évidence de motifs dans sa séquence qui joueraient un rôle important dans son fonctionnement. Parmi ces motifs, les résidus cystéines présents dans le CTLD jouent un rôle structural dans ce motif et sont oligomérisés[109], tandis que dans la région du cou deux autres cystéines apparaissent disponibles à la formation de ponts disulfures et sont prédites impliquées dans l'oligomérisation de CLEC12A[143].

La fonction d'oligomérisation de CLEC12A pourrait être nécessaire à l'induction de son signal ou du signal d'autres récepteurs dépourvus de motif ITAM ou ITIM comme la CLR NKG2[293]. Pour les récepteurs possédant un motif ITIM, leur oligomérisation avec des récepteurs aux motifs ITAM permet de réduire ou d'abroger l'induction de leur signal[294]. La possibilité que CLEC12A puisse interagir avec des récepteurs activateurs pour moduler leur signalisation est soutenue par notre collaboration avec l'IBIS. La séquence transmembranaire de CLEC12A possède une forte homologie avec la séquence de DAP12, qui est un récepteur ayant une fonction de protéine adaptatrice qui s'associe avec plusieurs récepteurs afin d'initier, de potentialiser ou d'atténuer leur voie de signalisation[295]. DAP12 s'associe par l'intermédiaire de domaines transmembranaires, chargés, complémentaires qui forment un pont salin dans la bicouche lipidique hydrophobe[296]. L'homologie du domaine transmembranaire de CLEC12A avec celui de DAP12 signifie qu'ils sont de possible récepteurs s'associant entre eux pour moduler leur voie de signalisation. CLEC12A pourrait inhiber le rôle activateur de DAP12 dans la signalisation des cellules d'origine myéloïde où ils sont tous deux exprimés, ou alors CLEC12A, en plus des cystéines formant des ponts disulfures, pourrait s'associer à d'autres récepteurs via les domaines transmembranaires comme le fait DAP12 pour en moduler leur activation. Une étude approfondie sur l'association de CLEC12A avec DAP12 révélerait un des mécanismes d'inhibition de l'activation des cellules myéloïdes par CLEC12A. De plus, vérifier la capacité du domaine transmembranaire de CLEC12A à former des ponts salins comme le fait

DAP12 nous donnerait des indices sur sa capacité à s'associer à d'autres récepteurs, dont ceux connus pour s'associer avec DAP12 comme le récepteur d'activation exprimé chez les cellules myéloïdes nommé TREM. La découverte de récepteurs s'associant à CLEC12A pourrait améliorer notre compréhension des récepteurs activateurs qu'il module durant la pathogénèse de la goutte notamment, ce qui renforce notre besoin de comprendre son mécanisme d'oligomérisation dans sa signalisation.

En plus de l'oligomérisation avec des récepteurs activateurs, l'homo-dimérisation de CLEC12A pourrait être un mécanisme important pour sa signalisation et ferait intervenir les cystéines. La plupart des récepteurs inhibiteurs possèdent deux motifs ITIM, ceci leur permet de recruter les phosphatases, à l'image de Shp-1, grâce aux deux tyrosines phosphorylées (une par motif ITIM) qui interagissent avec les deux domaines d'homologie à Src 2 (SH-2) adaptateurs de la phosphatase pour la recruter et l'activer[297-299]. Les travaux de Marshall ont montré le recrutement des phosphatases Shp-1 et Shp-2 par CLEC12A dans des lignées cellulaires[143]. Si on suppose que dans les cellules myéloïdes ce sont les mêmes phosphatases qui sont recrutées alors le fait que CLEC12A ne possède qu'un seul motif ITIM suggère qu'il formerait probablement des homodimères. La formation des homodimères permettrait l'interaction avec les deux protéines adaptatrices SH-2 des phosphatases Shp-1 et Shp-2. L'oligomérisation serait un mécanisme moléculaire important dans le fonctionnement du récepteur CLEC12A, pour modifier son avidité mais aussi pour l'induction de son signal via le recrutement des phosphatases.

Nos résultats démontrent le rôle des deux cystéines de la région du cou de CLEC12A prédites par Marshall, à savoir les cystéines 118 et 130, dans la formation des oligomères par la formation de ponts disulfures[143]. La formation d'oligomères n'a pas encore été observée dans des lignées myéloïdes primaires ce qui suggère que l'oligomérisation de CLEC12A serait un mécanisme dynamique et que nos conditions actuelles ne nous ont pas permis d'en détecter[143, 150]. Notre raisonnement tend vers le fait que l'oligomérisation de CLEC12A dans les cellules myéloïdes serait un phénomène dynamique qui modulerait probablement la signalisation du récepteur. En effet, les cystéines de la tige extracellulaire des CLR sont surtout connues pour leur rôle dans l'oligomérisation des récepteurs par la formation de liaisons disulfures[300], ce qui est en accord avec nos résultats sur les cystéines de CLEC12A. De plus, les cystéines de la tige de CLEC12A sont conservées avec celles de la séquence de CLEC-1, un CLR qui se dimérise par la formation

de liaisons disulfures dans la région de sa tige extracellulaire [301]. De même, le CLR LOX-1 qui partage un haut degré d'homologie avec le motif CTLD de CLEC12A forme également des homodimères par le biais d'un lien disulfure formé par la cystéine 140 dans sa tige extracellulaire[302].

Toutefois, le rôle des cystéines ne se limite pas seulement à la formation d'oligomères, ces dernières possèdent un groupement thiol qui est réactif avec plusieurs réactions redox ce qui permet aux cystéines de moduler la fonction de récepteur [303]. La collaboration avec l'IBIS (Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes) et le Dr Maaroufi nous a permis de générer des modèles en 3 dimensions du récepteur CLEC12A et de la conformation des dimères selon les liaisons de ponts disulfures avec les cystéines 118 et 130. L'utilisation de séquences homologues au récepteur CLEC12A suggère que l'homodimérisation de ce dernier entre les cystéines 118 ou les cystéines 130 respectivement apporterait une configuration ouverte ou fermée au récepteur CLEC12A ce qui modulerait l'induction de son signal intracellulaire. Cette modélisation d'une homodimérisation de CLEC12A lui permettant d'adopter une conformation qui rapproche les deux motif ITIM, est en accord avec notre idée que l'oligomérisation serait nécessaire à CLEC12A pour le recrutement des phosphatases comme nous l'avons énoncé précédemment. L'oligomérisation de CLEC12A par les cystéines 118 et 130 localisées dans sa tige extracellulaire, serait probablement un phénomène dynamique permettant de moduler l'activité du récepteur. Notre étude sur les mutants des cystéines de CLEC12A supporte également cette idée. Nos résultats constituent la première observation sur le rôle majeur des deux cystéines 118 et 130 de la tige extracellulaire de CLEC12A dans la régulation de la localisation sous-cellulaire, d'expression de surface et dans la signalisation.

La mutation de la cystéine 118 altère le transport de CLEC12A à travers les compartiments cytoplasmiques jusqu'à l'expression à la surface des cellules. Les résidus de cystéine assurent le contrôle de la qualité des protéines par un repliement correct des protéines dans l'environnement redox, étroitement contrôlé, du RE [304]. Les mutations naturelles des protéines membranaires et sécrétoires entraînant la rétention du RE et la perte de la fonction protéique sont courantes dans les maladies génétiques, notamment la maladie de Pelizaeus-Merzbacher et la maladie de von Willebrand [304]. Bien que la perte de la cystéine 118 perturbe le transit de CLEC12A par la voie sécrétoire, diminuant de manière significative son expression à la surface des cellules, les polymorphismes naturels de ce résidu n'ont pas été signalés. Il est fort probable qu'il existe une

pression de sélection considérable pour éviter les changements au niveau de cet acide aminé en raison de son rôle crucial dans l'expression de CLEC12A. À notre connaissance, nos résultats rapportent pour la première fois un rôle des résidus de cystéine de la tige extracellulaire dans l'expression de CLEC12A.

La mutation de la cystéine 130 augmente la dimérisation et la signalisation de CLEC12A en réponse au pontage par un anticorps spécifique. Nous avons observé également que le niveau basal de phosphorylation du récepteur mutant et le recrutement de SHP-2 dans les DRM enrichies en flotillines est supérieur au niveau basal du récepteur sauvage CLEC12A. Le récepteur CLEC12A contrôle l'activation des cellules myéloïdes, par son effet inhibiteur basal constant permettant de définir un seuil d'activation des cellules. Ainsi, lors de contexte inflammatoire, l'expression de surface de CLEC12A va être modulée afin de modifier son effet inhibiteur pour ajuster le seuil d'activation des cellules et ainsi permettre une intensité d'activation contrôlée [142, 143, 150, 305]. Nous interprétons cette activation basale augmentée du mutant comme un phénotype de gain de fonction. Une recherche dans la base de données gnomAD a révélé un polymorphisme naturel qui remplace la cystéine 130 par un résidu tyrosine (C130Y). Nos données suggèrent que les individus présentant ce polymorphisme auront un récepteur CLEC12A constitutivement plus actif et une régulation négative significative de l'activation des cellules myéloïdes. Étant donné que l'oligomérisation des CLR augmente l'affinité de liaison du ligand, la formation d'oligomères de CLEC12A due à la perte de la cystéine 130 peut potentialiser davantage la fonction de CLEC12A. Le polymorphisme C130Y est plus fréquent dans les populations asiatiques qu'européennes, ce qui suggère que des facteurs environnementaux et ou épigénétiques peuvent favoriser la rétention de ce polymorphisme dans une plus grande proportion de la population asiatique que de la population européenne.

### **Les modifications post-traductionnelles des cystéines 118 et 130 de CLEC12A modulent sa signalisation**

Les mutants de cystéines affectent la signalisation de CLEC12A, et la pertinence de ces résultats s'explique par le fait que CLEC12A puissent moduler l'activation des cellules myéloïdes par les résidus cystéines en fonction des propriétés de l'environnement inflammatoire et des modifications post-traductionnelles des cystéines[306]. Une des particularités de l'environnement inflammatoire est son oxydation, due notamment au relargage de ROS par les

neutrophiles. À l'appui de cette notion, nous montrons que les cystéines de CLEC12A ont une capacité de régulation redox, car l'exposition au peroxyde d'hydrogène augmente la formation d'oligomères de CLEC12A.

L'état redox du milieu environnant pourrait modifier la fonction de CLEC12A en affectant la formation de liaisons disulfures entre les cystéines 118 et 130 en raison de changements dans leurs groupes thiol. Les cystéines sont des résidus hautement réactifs et elles jouent également un rôle de senseur moléculaire redox[306] en plus de leurs propriétés de repliement oxydatif des protéines dans plusieurs protéines comme HMGB1[304]. La fonction de cette protéine nucléaire liant l'ADN change en fonction de l'état redox de ses cystéines. Lorsqu'elle est totalement réduite, HMGB1 favorise l'inflammation en activant la migration cellulaire et en stimulant la sécrétion de cytokines. En revanche, la sulfonylation inactive l'HMGB1.

Cependant, les cystéines au sein d'une même protéine peuvent jouer des rôles différents dans le trafic, la dimérisation et la fonction des protéines, comme cela a été signalé pour le récepteur HDL, SR-B1[307]. Nos résultats ont des implications pour le rôle de CLEC12A dans l'inflammation car nous montrons également que le peroxyde d'hydrogène induit l'oligomérisation de CLEC12A. On ignore encore si la cystéine 118 et la cystéine 130 possèdent la même réactivité envers les radicaux oxygénés. L'oxydation préférentielle de la cystéine 118 entraînerait la formation d'un lien disulfure comme le montre la figure 6 du chapitre 2 (conformation fermée) et un phénotype de gain de fonction. En revanche, l'oxydation de la cystéine 130 favoriserait la formation d'un lien disulfure au niveau de ce résidu et entraînerait une diminution de la fonction du récepteur.

Ces deux cystéines ont donc des rôles distincts, et assurent la modulation post-traductionnelle de la fonction appropriée de CLEC12A. Alors que la présence de la cystéine 118 garantit que le transport de CLEC12A du RE vers la membrane plasmique n'est pas entravé, la présence de la cystéine 130 est nécessaire pour réguler l'oligomérisation de CLEC12A. Nos données suggèrent fortement que les cystéines de la tige de CLEC12A fonctionnent comme des commutateurs de régulation redox de l'expression, de l'oligomérisation et de la signalisation de la surface cellulaire de CLEC12A. Les motifs cystéines modulent la fonction de récepteur[303, 306] par des modifications post-traductionnelles induites selon l'environnement où elles sont exposées. Ceci

favorise notre idée d'une modulation dynamique de CLEC12A afin d'ajuster son contrôle sur le seuil d'activation des cellules myéloïdes.

Bien que nos résultats à propos des mutations des cystéines 118 et 130 suggèrent des effets différents sur l'activation de CLEC12A, il faut confirmer les effets de ces cystéines sur le fonctionnement de CLEC12A et la modulation des voies de signalisation. Pour cela, une lignée Hek-293T avec un gène rapporteur luciférase activable par le TNF- $\alpha$  permettrait de comparer les effets des différents mutants et de CLEC12A sur la signalisation de ce gène rapporteur. Nos travaux révèlent la capacité de CLEC12A à moduler la voie PI3K-Akt, et d'autres travaux révèlent la phosphorylation d'Akt en réponse au TNF- $\alpha$  dans une lignée Hek-293T [308]. De plus nos résultats de phosphoprotéomique ont démontré que CLEC12A module la réponse au TNF des neutrophiles. Ceci indique que l'utilisation de cette lignée rapportrice à la luciférase induite par le TNF- $\alpha$  pourrait nous permettre d'étudier l'effet des mutations sur l'inhibition de CLEC12A de la voie Akt. Des résultats préliminaires indiquent que CLEC12A peut moduler la réponse luciférase des Hek-293T induite par le TNF- $\alpha$ .

Une autre question doit être éclaircie à propos de l'impact de la modification redox des cystéines de CLEC12A sur l'activité du récepteur dans une réponse inflammatoire. Est-ce qu'un milieu oxydatif lors d'une réponse inflammatoire favoriserait l'induction du signal de CLEC12A ou le diminuerait pour permettre l'activation de la cellule ? L'utilisation de la technique de pontage conjointement avec des drogues pour bloquer la formation de ponts disulfures permettrait de mettre en évidence si l'oligomérisation dynamique de CLEC12A est nécessaire pour permettre sa translocation et phosphorylation dans les DRM. L'exposition au peroxyde d'hydrogène du mutant de la cystéine 130 ayant un gain de fonction ou de la cystéine 118 pourrait donner des indices quant à l'effet de la modification post-traductionnelle de ces cystéines sur l'activité de CLEC12A. L'utilisation de modèles animaux exprimant les récepteurs mutés pour les cystéines permettrait d'observer les conséquences sur une réponse inflammatoire *in vivo* des résidus cystéines. Il existe déjà des modèles d'études sur CLEC12A nous laissant le choix de regarder dans des modèles de souris d'arthrites induites, ou après injection de cristaux d'UMS l'effet des mutations sur la réponse inflammatoire des neutrophiles [154, 155]. Étant donné que la mutation double des cystéines semble altérer la signalisation du récepteur *in vitro*, nous nous attendons à ce qu'une souris déplétée pour le gène d'intérêt et le mutant des deux cystéines aient le même phénotype d'inflammation exacerbé.

Nous avons abordé l'oligomérisation de CLEC12A comme un mécanisme important dans l'induction de son signal intracellulaire, permettant de regrouper plusieurs motifs ITIM afin de recruter les deux domaines SH-2 présent sur les phosphatases Shp-1 et Shp-2[297, 299, 309]. Le fait que les phosphatases Shp-1 et Shp-2 soient recrutées par la liaison de leur deux domaines SH-2 suggèrent qu'il faudrait deux motifs ITIM phosphorylés de CLEC12A disponibles pour les recruter[297]. Cela signifierait que CLEC12A doit s'oligomériser dans les DRM pour pouvoir recruter les phosphatases.

### **Le rôle des DRM enrichies en flotillines dans la signalisation de CLEC12A**

Nous avons rapporté qu'un des mécanismes moléculaires de signalisation de CLEC12A implique sa translocation par le biais des cystéines 118 et 130 dans des DRM enrichies en flotillines qui servent de radeaux de signalisation pour les récepteurs[168, 173, 175]. L'un des événements les plus précoces de la signalisation des récepteurs inhibiteurs est la phosphorylation de leur motif ITIM[289]. Nos travaux constituent la première étude montrant que la phosphorylation du domaine ITIM de CLEC12A dépend de la translocation et du regroupement du récepteur dans des domaines membranaires enrichis en flotilline-1. Nous avons confirmé la translocation de CLEC12A vers ces domaines membranaires chez le neutrophile en réponse au pontage après isolation des DRM par gradient. De plus, nos expériences de pontage ont révélé en microscopie confocale la colocalisation de CLEC12A avec la flotilline-1 mais aussi que la perturbation biochimique des radeaux lipidiques avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine affecte sa translocation chez les neutrophiles. Le rôle clé de ces domaines membranaires en tant que plateformes de signalisation pour plusieurs récepteurs [168, 173] suggère un mécanisme pertinent par lequel CLEC12A régule la signalisation d'autres récepteurs activateurs des neutrophiles. Comme énoncé précédemment, ce mécanisme des récepteurs immunomodulateurs leur permet de potentialiser ou d'inhiber d'autres voies de signalisation induites par d'autres récepteurs[145, 294, 310]. Il apparaît pertinent dans ce cas que CLEC12A signale lui aussi dans les DRM afin qu'il recrute les phosphatases à proximité des voies de signalisation qu'il inhibe. Il serait intéressant d'étudier les interactions de CLEC12A avec des partenaires de liaison dans les domaines membranaires riches en flotillines. Certains récepteurs possédant un motif ITIM s'associent souvent avec des récepteurs à motif ITAM pour altérer l'induction de leur signal intracellulaire. L'un des exemples le mieux étudié reste le récepteur Fc $\gamma$ RIIB qui s'oligomériser avec les autres récepteurs Fc ou le BCR pour inhiber leurs voies de signalisation[311]. L'identification des

récepteurs activateurs modulés par CLEC12A dans leur regroupement aux DRM, améliorerait notre compréhension des voies de signalisation qu'ils modulent chez le neutrophile.

L'étude actuelle montre que le pontage de CLEC12A induit par les anticorps entraîne également l'oligomérisation de la flotilline-1 et de la flotilline-2 dans la fraction contenant des DRM. Ceci est conforme aux rapports précédents qui ont démontré la nécessité de l'oligomérisation de la flotilline pour son recrutement dans ces domaines de la membrane plasmique[312]. En accord avec ces mécanismes notre expérience avec les Si-ARN, diminuant l'expression de la flotilline-1, a diminué la phosphorylation de l'ITIM CLEC12A en réponse au pontage. Ces observations soulignent le rôle crucial des domaines membranaires de la flotilline dans la signalisation de CLEC12A. En adéquation avec les capacités des cystéines de CLEC12A à subir des modifications redox post-traductionnelles, les DRM peuvent selon leur composition protéique et lipidique constituer des plateformes modulant l'induction de signaux par des réactions redox[313, 314]. Les flotillines sont impliquées dans la signalisation de CLEC12A et interagissent avec une variété de récepteurs et de protéines de signalisation, ce qui explique leur implication dans une myriade de processus cellulaires, notamment l'adhésion cellulaire, l'endocytose, la phagocytose et la signalisation cellulaire [174, 312]. Il reste à déterminer si CLEC12A peut également, à son tour, réguler l'un des divers processus cellulaires modulés dans les DRM par hétéro-oligomérisation ou même de modifier la phosphorylation de la flotilline et ses fonctions. Bien que les flotillines puissent moduler l'internalisation de CLEC12A, nos résultats ne semblent pas indiquer que cette internalisation soit dépendante de la flotilline-1. Pour essayer de déterminer des interactions potentielles de CLEC12A dans les DRM enrichies en flotilline-1, une isolation de ces dernières après pontage ou stimulation avec les cristaux d'UMS révélerait avec une analyse de protéomique les différents partenaires potentiels de CLEC12A.

Parmi les différents partenaires déjà identifiés, le recrutement des phosphatases Shp-1 et Shp-2 a été observé dans des lignées cellulaires (RAW 264,7) dans les travaux de Marshall, et cette étude n'a pas observé le recrutement de SHIP[143]. L'utilisation de la lignée des Hek-293T nous a permis de mettre en évidence le recrutement de Shp-2 (données non présentées) à l'ITIM phosphorylé de CLEC12A, en accord avec ce qui a déjà été observé. Un autre récepteur qui possède 31% d'homologie avec CLEC12A nommé CLEC12B, recrute aussi les phosphatases Shp-1 et Shp-2 après un traitement au pervanadate dans les Hek-293T[315]. Bien que nous n'ayons pas d'évidence dans les neutrophiles, nous supposons que CLEC12A recrute

préférentiellement les phosphatases Shp-1 et Shp-2, dont leur rôle dans la littérature est différent, ce qui permettrait à CLEC12A de moduler plusieurs fonctions selon la phosphatase recrutée. Les travaux de Marshall ont montré dans la lignée des monocytes que la glycosylation et l'expression de CLEC12A étaient modifiées selon les étapes de différenciation et d'activation des monocytes/macrophages[150]. Ceci pourrait être le reflet de changement d'expression entre les isoformes de CLEC12A pouvant recruter préférentiellement la phosphatase shp1 ou shp2 et avoir un rôle différent sur la cellule. Un rôle important connu de la phosphatase Shp-2 est celui de moduler la prolifération et la différenciation cellulaire[316], tandis que la phosphatase Shp-1 est connue pour réguler négativement les voies de signalisation activatrices induites par les PRR, les cytokines et les facteurs de croissance[317, 318]. Il est tout à fait pertinent que CLEC12A, jouant un rôle majeur dans la réponse inflammatoire, puisse recruter ces phosphatases ce qui lui permettrait de moduler plusieurs fonctions des cellules myéloïdes. Il reste cependant à confirmer que CLEC12A recrute bien ces phosphatases chez les cellules myéloïdes, notamment chez les neutrophiles.

### **CLEC12A module la production d'IL-8 chez le neutrophile en réponse aux cristaux d'UMS en régulant la voie p38-MAPK-PI3K-Akt**

Nos précédents résultats révélaient la modulation par CLEC12A de la phosphorylation des résidus tyrosine, de l'influx de calcium intracellulaire et de la production d'IL-8 chez le neutrophile en réponse aux cristaux d'UMS[153]. Pour identifier les voies de signalisation potentielles modulées par CLEC12A nous avons réalisé une analyse phosphoprotéomique. En tenant compte du manque de connaissance sur CLEC12A, quant à son ligand et sa signalisation, nous avons utilisé la stratégie de pontage. Cette stratégie permet de diminuer l'expression du récepteur à la surface cellulaire afin d'observer les molécules de signalisation dont la phosphorylation est augmentée en comparaison avec des cellules dont l'expression du récepteur CLEC12A n'est pas diminuée. Nous avons également comparé les niveaux de phosphorylation des molécules chez des neutrophiles pré-activés par du TNF- $\alpha$  dont l'expression de CLEC12A fût diminuée ou non par la technique de pontage.

Notre analyse phosphoprotéomique a identifié un changement de l'état de phosphorylation de 9367 peptides dont des protéines kinases et phosphatases induit par l'engagement avec un anticorps de CLEC12A. Ceci signifie, que la diminution de CLEC12A et de son effet inhibiteur

se visualise par l'augmentation de la phosphorylation des molécules qu'il module. Parmi les différentes molécules, celles-ci possèdent comme fonctions moléculaires la régulation des GTPases, la liaison des phospholipides, l'adhésion cellulaire et la liaison de l'actine, suggérant la capacité de CLEC12A de moduler la réorganisation du cytosquelette, l'interaction des cellules avec les lipides de signalisation, la migration, la phagocytose, la production de cytokine et la dégranulation.

Les kinases les plus importantes étaient celles en amont des voies de signalisation de ERK, JNK et p38 MAPK. La régulation des composants de la voie MAPK peut être un thème récurrent dans la biologie de CLEC12A, car la diminution de CLEC12A par pontage voit l'augmentation de la phosphorylation de p38 MAPK dans les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse [142]. CLEC12A régule négativement l'expression de MAPKAPK5 dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris *CLEC12A<sup>-/-</sup>* [156]. Potentiellement important pour le rôle régulateur de CLEC12A, le pontage du récepteur a entraîné une augmentation de la phosphorylation de 4 phosphatases et une diminution de la phosphorylation de 13 autres phosphatases. Le pontage de CLEC12A a également induit une modification de la phosphorylation des composants d'un certain nombre de voies de transduction du signal activées par le TNF- $\alpha$  dans les neutrophiles humains. Le TNF- $\alpha$  est une cytokine qui régule un certain nombre de fonctions pro-inflammatoires des neutrophiles, notamment la mobilisation des granules, l'explosion oxydative et la synthèse des cytokines, et joue également un rôle clé dans les maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde et la goutte [319]. Les fonctions moléculaires de ces voies comprennent la régulation du cytosquelette, l'activité GTPase et la liaison aux phospholipides. La phosphorylation des kinases inhibées par CLEC12A comprenait deux JNK (MAPK8, MAPK10), PAK1/2, et plusieurs kinases dépendantes de la cycline, qui régulent la transcription, l'apoptose, la migration et la formation de NET des neutrophiles [320-322].

Parmi les autres composants de signalisation du TNF- $\alpha$  inhibés par CLEC12A, on trouve des kinases (PIK3CG, PDPK1, PAK1) et des phosphatases (PTEN) qui régulent la voie PI3K/Akt. Les neutrophiles humains stimulés par les cristaux d'UMS ont montré des similitudes dans la phosphorylation des molécules de signalisation par rapport à celle avec le pontage par anticorps de CLEC12A. Nous apportons la preuve que CLEC12A régule négativement la phosphorylation en sérine des substrats de la PKC induite par les cristaux d'UMS et la voie PI3K. Nous montrons

également que CLEC12A inhibe la phosphorylation d'Akt et de p38 MAPK induite par les cristaux d'UMS. Comme la phosphorylation d'Akt stimulée par les cristaux d'UMS dépend de l'activité de p38 MAPK, nos résultats suggèrent que la régulation par le CLEC12A de p38/PI3K/Akt dans les neutrophiles humains activés par les cristaux d'UMS est importante pour la régulation des réponses fonctionnelles des neutrophiles. Pour établir un lien entre la régulation par CLEC12A de la signalisation induite par les cristaux d'UMS et les réponses fonctionnelles des neutrophiles, la libération d'IL-8 induite par les cristaux d'UMS par des neutrophiles humains a été examinée. Nous avons montré précédemment que la diminution d'expression de CLEC12A avec des siARN dans une lignée cellulaire de type neutrophile (des PLB-985) augmentait la libération d'IL-8 induite par les cristaux d'UMS[289]. Nos données montrent que la synthèse et la libération d'IL-8 induites par les cristaux d'UMS sont dépendantes de la PI3K. Ceci suggère que l'inhibition par CLEC12A de la production de l'IL-8 chez le neutrophile stimulé par les cristaux d'UMS, s'effectue par la modulation de la voie p38 MAPK/PI3K/Akt. Nos résultats sont pertinents par rapport aux travaux d'un laboratoire montrant eux aussi le rôle des MAPK et Akt dans la production de cytokines par le neutrophile en réponse aux cristaux d'UMS[323]. De plus, le fait que les MAPK, PI3K et Akt modulent aussi la production de cytokines chez le neutrophile exposé à d'autres stimuli renforce le rôle clé de ces voies de signalisation dans l'activation des neutrophiles[324-327]. La régulation de CLEC12A sur la production de cytokines pro-inflammatoires chez les neutrophiles par la voie des MAPK, PI3K et Akt pourrait être un mécanisme clé dans plusieurs maladies inflammatoires.

Les récepteurs inhibiteurs régulent la fonction cellulaire en recrutant des phosphatases qui déphosphorylent les voies de transduction du signal d'activation [143]. Comme énoncé précédemment, les phosphatases supposées recrutées par CLEC12A (Shp-1 et Shp-2) chez le neutrophile n'ont pas encore été confirmées. De plus, notre analyse phosphoprotéomique n'a pas identifié ces deux phosphatases, ce qui indiquerait que leur interaction n'a pas pu être détectée dans nos conditions expérimentales. En revanche, les données phosphoprotéomiques ont permis d'identifier un autre candidat connu pour atténuer l'activation cellulaire en inhibant les kinases de la famille Src, CSK[179, 328]. Le recrutement de la kinase CSK et son inhibition des Src kinases pourraient expliquer nos résultats précédents et ceux répétés dans le premier manuscrit montrant que CLEC12A diminue le patron de tyrosine phosphorylation du neutrophile en réponse aux cristaux d'UMS[153]. Ceci renforcerait d'autant plus le potentiel de

CLEC12A, car l'inhibition des Src kinases permettrait de moduler en aval plusieurs voies de signalisation qu'elles activent en réponse aux cristaux d'UMS[264-266], dont la voie des MAPK [254] et des PI3K-akt[267]. D'autres études sont nécessaires pour confirmer le recrutement des phosphatases ou des kinases à l'image de CSK par CLEC12A dans les neutrophiles humains et pour identifier leur implication dans la fonction de CLEC12A.

Nos observations suggèrent que CLEC12A joue un rôle régulateur dans la stimulation des neutrophiles par les cristaux d'UMS en inhibant les molécules de signalisation p38 MAPK, PI3K et Akt. Bien que nos données montrent que p38 MAPK et PI3K sont tous deux en amont de l'activation d'Akt par les cristaux d'UMS chez les neutrophiles humains, chacun de ces composants de signalisation contribue à de multiples voies de transduction du signal. Bien que nous montrions que la régulation de la voie PI3K/Akt par CLEC12A contrôle la synthèse et la libération de l'IL-8, la capacité de ces voies à médier d'autres fonctions des neutrophiles reste à établir. La p38 MAPK et la PI3K, sont des voies de signalisation majeures qui régulent également le recrutement, la survie et l'activation des neutrophiles [329-333]. Ceci renforce l'intérêt de cibler cet axe de signalisation comme cible thérapeutique, d'autant plus que la voie p38 MAPK est aussi une cible potentielle dans l'arthrite rhumatoïde[334]. Parmi les différentes fonctions modulées par les voies p38 MAPK et PI3K, il serait pertinent d'identifier si CLEC12A peut moduler le recrutement, l'apoptose et la NETosis des neutrophiles dans la goutte. Plusieurs travaux ont déjà rapporté le rôle de la p38 MAPK et des PI3K dans la migration des neutrophiles[333, 335], il reste à savoir si CLEC12A module la migration des neutrophiles dans des contextes pathologiques tels que la goutte ou d'autres arthrites. Quant à la formation de NETs dans la pathologie de la goutte, leur fonction n'est pas entièrement élucidée, bien que leur rôle participe à l'inhibition de l'inflammation[278], son implication bénéfique ou non dans la formation de tophi reste à déterminer[336]. Le rôle de PI3K et MAPK a été rapporté dans l'induction des NETs en réponse aux cristaux d'UMS[323]. Il reste à déterminer si CLEC12A peut moduler par les voies MAPK et PI3K la formation des NETs dans la goutte, et à identifier s'il favorise ou inhibe cette fonction cellulaire.

Bien que nous interprétions nos données sur la régulation de la signalisation induite par les cristaux d'UMS par CLEC12A comme une série linéaire d'événements, il est probable que les voies de régulation interagissent avec une variété d'autres protéines de signalisation de façon simultanée. La confirmation de la régulation des événements de phosphorylation identifiée par

phosphoprotéomique nécessitera une analyse complète des voies moléculaires et des réponses fonctionnelles stimulées par les cristaux d'UMS. La capacité de CLEC12A à réguler les voies de transduction du signal activées par le TNF- $\alpha$  suggère que nos résultats sont applicables à d'autres maladies inflammatoires, comme la polyarthrite rhumatoïde ou le TNF- $\alpha$  joue un rôle dans la pathogénèse[337].

### **Rôle de CLEC12A dans l'arthrite rhumatoïde ?**

De par le rôle du TNF- $\alpha$ , et des neutrophiles dans la pathogénèse de l'arthrite rhumatoïde[337, 338], CLEC12A apparaît comme un récepteur important dans cette pathogénèse. Bien que cette maladie auto-immune implique le système immunitaire adaptatif, le rôle des neutrophiles dans la pathogénèse de l'arthrite rhumatoïde est bien présent. Le rôle des neutrophiles se caractérise par leur migration et infiltration dans les liquides synoviaux de patients ou leurs fonctions de dégranulation, d'explosion oxydative, de production de cytokines, de formation de NETs participe à la pathogénèse et à la dégradation des articulations[338]. Notre approche phosphoprotéomique montre la capacité de CLEC12A à moduler des voies de signalisation chez le neutrophile stimulé par le TNF- $\alpha$  dans l'arthrite rhumatoïde et des modèles animaux ont démontré le rôle de CLEC12A dans l'arthrite rhumatoïde [154, 158].

Explorer le fonctionnement de CLEC12A dans cette pathologie et les voies de signalisation qu'il module apporterait des indices pertinents sur de nouvelles cibles thérapeutiques pour diminuer l'intensité d'activation du neutrophile dans la pathologie. Cet intérêt est pertinent notamment car la déplétion des neutrophiles permet de diminuer la sévérité de l'arthrite rhumatoïde dans un modèle de souris[339]. De plus, plusieurs agents thérapeutiques utilisés cliniquement possèdent un effet sur les neutrophiles favorisant leur efficacité (comme un inhibiteur du TNF- $\alpha$ , un agent bloquant de l'IL-6, ou un inhibiteur des kinases Janus)[340]. Toutefois, les thérapies actuelles possèdent des effets secondaires; donc le développement de nouvelles stratégies pourrait améliorer les conditions de traitements des patients. Étant donné la capacité de CLEC12A à moduler l'activation des neutrophiles en réponse au TNF- $\alpha$ , il apparaît important d'étudier son rôle dans cette pathologie. L'intérêt de comprendre les voies de signalisation modulées par CLEC12A, permettrait de les exploiter thérapeutiquement.

Nos résultats montrent que CLEC12A régule l'axe p38-MAPK-PI3K-Akt chez le neutrophile, et il serait pertinent de voir si CLEC12A peut réguler ces voies de signalisation et moduler

l'activation du neutrophile dans l'arthrite rhumatoïde. Améliorer notre compréhension de la modulation des neutrophiles par CLEC12A dans l'arthrite rhumatoïde apporterait des connaissances sur son rôle dans cette pathologie. Surtout qu'un modèle d'arthrite rhumatoïde induite chez des souris CLEC12A<sup>-/-</sup> possède une pathogénèse aggravée, supportant l'idée que l'absence de l'effet modulateur de CLEC12A dans la pathologie la rendrait plus sévère et intense. En accord avec cette idée, un autre projet de notre laboratoire a observé la corrélation entre l'expression de CLEC12A, la production de cytokines et la sévérité de la maladie chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde[341]. La corrélation négative entre CLEC12A et une cytokine pro-inflammatoire (RANTES) et la corrélation positive avec une cytokine anti-inflammatoire (IL-1RA) produites chez les patients dans la phase précoce d'arthrite rhumatoïde renforce son rôle de modulation de la réponse immune dans la phase précoce de développement de cette maladie auto-immune. Le fait que les souris et l'étude sur les patients rapportent les mêmes évidences sur l'effet de l'absence du récepteur CLEC12A sur la sévérité de la pathologie, renforce l'importance du récepteur pour moduler l'inflammation de l'arthrite rhumatoïde. Caractériser les mécanismes causant chez les patients la diminution de l'expression de CLEC12A, permettrait de développer des stratégies pour préserver l'expression du récepteur pour diminuer la sévérité de la maladie. Si cela n'est pas possible, les voies de signalisation modulées par CLEC12A qui seront identifiées, seront des choix thérapeutiques pertinents pour compenser la perte de l'effet modulateur de CLEC12A.

CLEC12A est un récepteur inhibiteur capable de moduler l'activation des cellules d'origine myéloïde dans plusieurs contextes inflammatoires. L'un de ces contextes implique les cristaux d'UMS, capable d'activer la signalisation du récepteur CLEC12A. Bien que les cristaux d'UMS soient l'agent étiologique de la goutte, une pathologie déclenchée par la formation de cristaux n'est pas anecdotique.

### **CLEC12A jouerait un rôle dans les crystallopathies ?**

Nos travaux montrent la capacité de CLEC12A à réagir aux contacts des cristaux d'UMS, et les travaux de Neumann montrent également le rôle de CLEC12A en réponse aux cristaux d'UMS ou de cellules mortes[155]. Une autre équipe de recherche travaillant sur la malaria, a étudié l'interaction de CLEC12A avec les cristaux d'hémozoinés [342]. Au vu de nos résultats et de la littérature montrant que CLEC12A joue un rôle important dans la réponse inflammatoire du

système immunitaire inné, il est compréhensible qu'il puisse moduler la réponse activée par la formation de cristaux de différentes origines. La transition de substances solubles issues du métabolisme dans des concentrations en excès cause leur cristallisation, une forme capable d'activer le système immunitaire[343]. Puisque CLEC12A module l'activation des cellules myéloïdes dans la réponse inflammatoire, il ne semble pas aberrant que ce dernier soit impliqué dans les pathologies déclenchées par la formation de cristaux à l'image de la goutte. Ceci suggérerait que nos résultats sur CLEC12A et les cristaux d'UMS pourraient être appliqués pour étudier, en réponse à différents cristaux, le fonctionnement de CLEC12A, comme celui impliqué dans l'athérosclérose (cristaux de cholestérol).

L'un des effets des cristaux d'UMS provoque la dégradation du récepteur CLEC12A suite à son internalisation, menant à la perte de son effet modulateur sur l'activation des neutrophiles dans la pathologie de la goutte[153]. L'utilisation de la colchicine permet de prévenir cette dégradation et de traiter l'inflammation d'une crise de goutte. Il serait pertinent d'étudier si les cristaux d'hémozoïnes ou de cholestérol induisent eux aussi l'internalisation et la dégradation de CLEC12A. Ceci afin d'identifier les mécanismes d'internalisation impliqués et voir si l'inhibition des microtubules du cytosquelette (comme le fait la colchicine avec les cristaux d'UMS) serait un moyen de préserver l'effet de CLEC12A sur la réponse inflammatoire induite par les cristaux.

### **Mécanisme d'internalisation de CLEC12A ?**

Étudier les mécanismes d'internalisation de CLEC12A serait une direction à approfondir afin de comprendre comment l'expression du récepteur est dérégulée par les cristaux d'UMS. Avant de comprendre ce qui peut déréguler l'expression du récepteur il faut déterminer ses mécanismes d'internalisation, de recyclage ou de dégradation. Nos résultats préliminaires ont observé pour l'instant que les cystéines 118 et 130 des mutants ne modifient pas l'internalisation du récepteur. D'autres de nos résultats avec de la colchicine et un agent de séquestration du cholestérol, révèlent que l'internalisation de CLEC12A implique le cytosquelette des microtubules et les DRM. Toutefois, bien que le cytosquelette d'actine ou les flotillines ne semblent pas être des mécanismes impliqués dans l'internalisation de CLEC12A, il apparaît plus probable que le récepteur ne soit pas dépendant d'un mécanisme précis pour son endocytose. Ce qui nous laisse croire que l'internalisation de CLEC12A peut être médiée par différents mécanismes et l'observation d'une inhibition d'un pourcentage de récepteur internalisé. L'utilisation d'un

inhibiteur à la fois n'a pas stoppé intégralement l'internalisation du récepteur, ce qui suggère qu'un autre mécanisme a pu intervenir dans l'internalisation. Une étude sur l'interaction entre les CLR DCIR, DC-SIGN a montré que leurs interactions simultanées pouvaient modifier le trajet d'internalisation et d'endocytose vers les compartiments endosomaux du DC-SIGN[344]. Nous supposons que l'interaction de CLEC12A comme récepteur inhibiteur avec d'autres récepteurs activateurs doit modifier ses mécanismes d'internalisation selon le type cellulaire et le partenaire d'interaction.

CLEC12A est capable de recruter les phosphatases Shp-1 et Shp-2 dans des lignées cellulaires *in vitro*[143], et bien que semblables, ces deux phosphatases modulent différemment les voies de signalisation intracellulaires. Le rôle inhibiteur de Shp-1 sur les voies de signalisation a été étudié et démontré[317], mais pour Shp-2 son rôle est plus subtil. Bien que Shp-2 soit une phosphatase son recrutement jouerait plutôt un rôle favorable dans l'induction de voie de signalisation intracellulaire, notamment dans les fonctions de croissance cellulaire[318, 345]. L'effet activateur de Shp-2 peut s'effectuer sans l'activité de son domaine catalytique de déphosphorylation, en fonctionnant comme une protéine adaptatrice pour d'autres molécules de signalisation. Le recrutement de Shp-1 ou de Shp-2 aux motif ITIM de CLEC12A pourrait modifier son effet sur l'activation cellulaire, et confère un potentiel plus complexe à CLEC12A sur la modulation des cellules myéloïdes. La capacité du récepteur CLEC12A à recruter la phosphatase Shp-2, connu pour avoir un effet activateur sur la croissance cellulaire suggère que CLEC12A possède un potentiel activateur.

### **CLEC12A pourrait jouer un rôle activateur ?**

Le recrutement de Shp-2 ou Shp-1 révèle la capacité de CLEC12A à moduler plusieurs fonctions de manière activatrice ou inhibitrice, et l'existence d'un isoforme de CLEC12A ayant une séquence arborant un motif de signalisation supplémentaire, renforce ce potentiel du récepteur à jouer un rôle activateur. L'isoforme long de CLEC12A que l'on surnomme CLEC12A long, possède un motif de signalisation supplémentaire qui lui conférerait un rôle différent de celui de la forme consensus. En effet, comparé à la forme consensus de CLEC12A qui possède un seul motif ITIM lui conférant un rôle de récepteur inhibiteur, la forme longue de CLEC12A possède un motif de signalisation supplémentaire localisé en amont de la séquence du motif ITIM en N-terminal (Uniprot: Q5QGZ9-1). Le motif de signalisation YxxM (x=un acide aminé

quelconque) présent uniquement chez l'isoforme long de CLEC12A pourrait lui conférer un rôle activateur. Ce motif a été caractérisé sur le récepteur PDGF- $\beta$ , et possède deux rôles connus, à savoir celui de recruter la P85 par son domaine SH-2 et celui de signal de tri des compartiments endosomaux[346].

Cet isoforme long possède deux tyrosines présentes sur deux motifs distincts capables de reconnaître les domaines SH-2 et permettant peut-être à cet isoforme de jouer un rôle activateur plutôt qu'inhibiteur, car il pourrait recruter d'autres molécules de signalisation. En accord avec cette idée, la séquence consensus YxxM, en plus de pouvoir recruter la p85[346] fait partie des séquences connues pour avoir une forte affinité avec le SH-2 N-terminal de Shp-2[309]. Le rôle activateur de l'isoforme long viendrait du recrutement de la kinase P85, une des sous-unités des PI3K qui induirait des voies de signalisation activatrices modulant majoritairement le développement cellulaire (croissance, prolifération et survie)[347]. Quant au recrutement de Shp-2, il favoriserait l'activation de multiples fonctions cellulaires, notamment celle du développement cellulaire [316, 348]. Bien qu'il n'y ait pas encore d'évidence sur les phosphatases recrutées par l'isoforme long, des résultats préliminaires nous ont permis d'observer la co-immunoprécipitation de Shp-2 avec l'isoforme long phosphorylé dans une lignée cellulaire Hek-293T. Il est important d'étudier l'expression de cet isoforme et de déterminer les molécules qu'il peut recruter suite à sa phosphorylation.

Étudier l'expression de cet isoforme long par rapport à l'isoforme consensus dans les différents stades de différenciation des populations de cellules myéloïdes pourrait révéler si CLEC12A jouerait un rôle dans le développement des cellules myéloïdes par le recrutement de la P85 et de Shp-2. Les travaux de Marshall sur la forme consensus de CLEC12A observent que la glycosylation du récepteur varie selon les différents stades de différenciation des monocytes[150], ce qui pourrait suggérer une variation entre les isoformes long et consensus de CLEC12A ayant un poids moléculaire différent. Étant donné que les anticorps commerciaux ne peuvent distinguer les deux isoformes, il est difficile de s'avancer sur la question à l'heure actuelle. Toutefois, notre laboratoire a développé en parallèle de l'anticorps R-94P qui reconnaît l'ITIM phosphorylé de CLEC12A, un anticorps qui reconnaît la forme longue et le motif YxxM intracellulaire de l'isoforme long nommé R-92L. L'évaluation de l'expression de l'isoforme long à l'aide de cet anticorps, pourrait révéler si l'expression de ce dernier varie entre les stades de différenciations des cellules myéloïdes.

Étant donné la capacité présumée de l'isoforme long à pouvoir induire des signaux de signalisation activateur via le recrutement de la P85 et de Shp-2 pour stimuler la croissance et la différenciation des cellules myéloïdes[297, 348], la forme longue de CLEC12A devrait être majoritairement exprimée dans les cellules immatures de la lignée myéloïde, à savoir les cellules myéloïdes progénitrices et les myéloblastes. En accord avec cette idée, des travaux sur la phosphatase Shp-2 démontrent son rôle dans l'induction de cytokines impliqués dans la croissance des cellules souches des lignées hématopoïétique et myéloïde telles que l'IL-3, le facteur de croissance des cellules souches hématopoïétiques et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages. Une étude sur la leucémie myéloblastique aigüe a d'ailleurs étudié l'isoforme long de CLEC12A comme marqueur aberrant des cellules souches cancéreuses de la moëlle osseuse, révélant que l'expression de CLEC12A apparaît à partir du stade des cellules myéloïdes progénitrices de manière constitutive. Cela laisse supposer que la forme longue de CLEC12A serait exprimée durant la différenciation des cellules souches myéloïdes. L'isoforme consensus quant à lui joue un rôle inhibiteur afin de moduler l'activation des cellules myéloïdes, de ce fait nous nous attendons alors à ce que ce dernier soit majoritairement exprimé dans les cellules matures qui sont prêtes à participer à la réponse inflammatoire, telles que les monocytes, macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles. L'utilisation de notre anticorps pour détecter la forme longue de CLEC12A nous permettra de confirmer l'expression de l'isoforme long majoritairement chez les cellules myéloïdes progénitrices et les myéloblastes, et de la forme consensus majoritairement chez les monocytes, macrophages, cellules dendritiques et les neutrophiles. Cette expression des deux isoformes serait en accord avec l'idée du rôle de l'isoforme long dans la croissance et la différenciation des cellules souches myéloïdes et le rôle de l'isoforme consensus comme récepteur inhibiteur modulateur des cellules myéloïdes matures.

Après avoir validé l'expression de l'isoforme long dans les cellules myéloïdes il sera nécessaire de valider son rôle activateur. Pour cela, il faudrait valider le recrutement de P85 ou de Shp-2. Ensuite avec l'utilisation de nos expériences réalisées avec la forme consensus et la génération de mutants pour les tyrosines du motif ITIM et du motif YxxM, nous pourrions valider le rôle respectif des tyrosines des deux motifs dans le recrutement de la P85 ou de Shp-2 préférentiellement à Shp-1. Ceci confirmerait le rôle activateur de l'isoforme long dans le

développement des cellules myéloïdes comparé à l'isoforme consensus inhibiteur qui module leur activation.

L'étude de cet isoforme long apporterait une meilleure compréhension du rôle de CLEC12A et de ses effets sur les cellules myéloïdes. Ces connaissances trouveraient des applications dans plusieurs contextes inflammatoires où la distinction du rôle des deux isoformes pourrait améliorer notre compréhension du rôle de CLEC12A dans ces pathologies.

## Conclusion

En conclusion, les travaux de recherche réalisés au cours de cette thèse démontrent chez le neutrophile que le récepteur CLEC12A est capable de s'activer en réponse aux cristaux d'UMS et que son effet inhibiteur sur la production d'IL-8 s'effectue par la modulation de l'axe de signalisation p38-MAPK-PI3K-Akt. Nous validons l'hypothèse émise de la modulation de voie de signalisation activée par les cristaux d'UMS chez le neutrophile par le récepteur CLEC12A.

Les résultats générés permettent d'éclairer le rôle de CLEC12A dans la pathologie de la goutte. Nous démontrons la rapide phosphorylation du récepteur CLEC12A par une kinase Src dans les DRM enrichies en flotilline-1 en réponse aux cristaux d'UMS, ce qui révèle qu'avant d'être dégradé par les cristaux, le récepteur module l'activation des neutrophiles par l'axe de signalisation p38-MAPK-PI3K-Akt. L'inhibition de cette voie p38-MAPK-PI3K-Akt, ou la conservation de l'effet modulateur de CLEC12A sur cette voie pourrait être des pistes thérapeutiques. En effet la dégradation de CLEC12A induite par les cristaux d'UMS, cause la perte de son effet modulateur sur cette voie de signalisation et sur l'activation des neutrophiles dans la goutte. L'identification du mécanisme dérégulant le fonctionnement de CLEC12A durant la pathogénèse de la goutte, permettrait d'envisager une stratégie permettant de conserver son expression et son effet modulateur sur l'activation des neutrophiles en réponse aux cristaux. Afin d'identifier les causes de la dérégulation de CLEC12A dans la pathologie de la goutte, nos travaux ont étudié la signalisation de CLEC12A afin de pallier le manque de connaissance sur le fonctionnement du récepteur.

Les travaux de mon doctorat révèlent le rôle des cystéines extracellulaires 118 et 130 dans les mécanismes moléculaires d'oligomérisation et de translocation du récepteur CLEC12A impliqués dans sa signalisation selon des modifications post-traductionnelles redox intervenant durant la réponse inflammatoire. Le récepteur CLEC12A après pontage avec un anticorps se déplace dans les DRM enrichies en flotilline ou son motif ITIM sera phosphorylé. Le déplacement du récepteur en reconnaissance d'un potentiel ligand mimé par le pontage est dépendant des deux cystéines 118 et 130 situées dans sa tige extracellulaire. En plus d'être impliquées dans la signalisation du récepteur, les deux cystéines 118 et 130 affectent l'expression et l'oligomérisation du récepteur CLEC12A. Les deux résidus cystéines sont également sensible au réaction rédox, ce qui modulent la formation d'oligomère du récepteur, et serait un mécanisme

de modification post-traductionnelles régulant l'activité du récepteur durant la réponse inflammatoire.

Le rôle de modulation de CLEC12A sur les cellules myéloïdes suggère qu'il pourrait également moduler l'activation des macrophages et des cellules dendritiques. Une perspective serait d'étudier le rôle de CLEC12A dans ces cellules pour améliorer notre compréhension de son rôle de modulation de la réponse inflammatoire innée. En effet, comprendre le fonctionnement du récepteur dans son ensemble renforcerait nos connaissances, car bien que nos résultats montrent sa capacité à moduler les neutrophiles il reste à déterminer si son champ d'action est différent dans les monocytes ou les cellules dendritiques par exemple.

Nos résultats apportent des connaissances supplémentaires sur le fonctionnement du récepteur CLEC12A et de son effet sur les voies de signalisations des neutrophiles activés par le TNF- $\alpha$ . Ainsi, notre étude pourrait s'étendre à l'arthrite rhumatoïde, où le rôle du récepteur, celui des neutrophiles et du TNF- $\alpha$  sont démontrés, et participer à l'amélioration des connaissances dans la pathogénèse de cette maladie.

## Bibliographie

1. Khader, S.A., et al., *Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination*. J Clin Invest, 2019. **129**(9): p. 3482-3491.
2. Ciechanover, A.J. and J.I. Sznajder, *Innate and adaptive immunity: the 2011 Nobel Prize in Physiology or Medicine*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(11): p. i-ii.
3. Roh, J.S. and D.H. Sohn, *Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases*. Immune Netw, 2018. **18**(4): p. e27.
4. Till, J.E. and E.A. McCulloch, *Hemopoietic stem cell differentiation*. Biochim Biophys Acta, 1980. **605**(4): p. 431-59.
5. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow*. Cell, 1997. **91**(5): p. 661-72.
6. Pronk, C.J., et al., *Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloid progenitor cell hierarchy*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(4): p. 428-42.
7. *VUE GÉNÉRALE DES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE*. 2016; Available from: <https://www.monssystemeimmunitaire.fr/vue-generale-des-cellules-du-systeme-immunitaire/>.
8. Dancey, J.T., et al., *Neutrophil kinetics in man*. J Clin Invest, 1976. **58**(3): p. 705-15.
9. Dayang, E.Z., et al., *Identification of LPS-Activated Endothelial Subpopulations With Distinct Inflammatory Phenotypes and Regulatory Signaling Mechanisms*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1169.
10. Cattaneo, F., et al., *Formyl Peptide Receptor 1 Modulates Endothelial Cell Functions by NADPH Oxidase-Dependent VEGFR2 Transactivation*. Oxid Med Cell Longev, 2018. **2018**: p. 2609847.
11. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 803-15.
12. Stein, B.N., et al., *Activation of endothelial extracellular signal-regulated kinase is essential for neutrophil transmigration: potential involvement of a soluble neutrophil factor in endothelial activation*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6097-104.
13. Xu, T., et al., *P-selectin cross-links PSGL-1 and enhances neutrophil adhesion to fibrinogen and ICAM-1 in a Src kinase-dependent, but GPCR-independent mechanism*. Cell Adh Migr, 2007. **1**(3): p. 115-23.
14. Zollner, O., et al., *L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin*. J Cell Biol, 1997. **136**(3): p. 707-16.
15. Condliffe, A.M., et al., *Priming of human neutrophil superoxide generation by tumour necrosis factor-alpha is signalled by enhanced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate but not inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation*. FEBS Lett, 1998. **439**(1-2): p. 147-51.
16. Linevsky, J.K., et al., *IL-8 release and neutrophil activation by Clostridium difficile toxin-exposed human monocytes*. Am J Physiol, 1997. **273**(6): p. G1333-40.
17. Yago, T., et al., *E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin alphaLbeta2-mediated slow leukocyte rolling*. Blood, 2010. **116**(3): p. 485-94.
18. Mueller, H., et al., *Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) gamma2 and PI3Kgamma pathways*. Blood, 2010. **115**(15): p. 3118-27.
19. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.

20. Laudanna, C., et al., *Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule.* J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 4021-6.
21. Simon, S.I., et al., *Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway.* J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4348-58.
22. Campbell, J.J., et al., *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions.* Science, 1998. **279**(5349): p. 381-4.
23. Basit, A., et al., *ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(2): p. L200-7.
24. Barreda, D.R., P.C. Hanington, and M. Belosevic, *Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors.* Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 509-54.
25. Girard, D., R. Paquin, and A.D. Beaulieu, *Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis.* Biochem J, 1997. **325 ( Pt 1)**: p. 147-53.
26. Boey, H., et al., *Interleukin-4 is a neutrophil activator.* J Allergy Clin Immunol, 1989. **83**(5): p. 978-84.
27. Borish, L., et al., *Activation of neutrophils by recombinant interleukin 6.* Cell Immunol, 1989. **121**(2): p. 280-9.
28. Hurst, S.M., et al., *IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation.* Immunity, 2001. **14**(6): p. 705-14.
29. Kaplanski, G., et al., *IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation.* Trends Immunol, 2003. **24**(1): p. 25-9.
30. McDonald, P.P., et al., *Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils.* Blood, 1998. **92**(12): p. 4828-35.
31. Musso, T., et al., *Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells.* Infect Immun, 1998. **66**(6): p. 2640-7.
32. Li, Z., et al., *Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction.* Science, 2000. **287**(5455): p. 1046-9.
33. Mocsai, A., *Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond.* J Exp Med, 2013. **210**(7): p. 1283-99.
34. Flannagan, R.S., V. Jaumouille, and S. Grinstein, *The cell biology of phagocytosis.* Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 61-98.
35. Nordenfelt, P. and H. Tapper, *Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils.* J Leukoc Biol, 2011. **90**(2): p. 271-84.
36. Roos, D., R. van Bruggen, and C. Meischl, *Oxidative killing of microbes by neutrophils.* Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1307-15.
37. Bainton, D.F. and M.G. Farquhar, *Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. I. Histochemical staining of bone marrow smears.* J Cell Biol, 1968. **39**(2): p. 286-98.
38. Borregaard, N., O.E. Sorensen, and K. Theilgaard-Monch, *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins.* Trends Immunol, 2007. **28**(8): p. 340-5.
39. Klebanoff, S.J., et al., *Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms.* J Leukoc Biol, 2013. **93**(2): p. 185-98.
40. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.* Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
41. Vieira, O.V., R.J. Botelho, and S. Grinstein, *Phagosome maturation: aging gracefully.* Biochem J, 2002. **366**(Pt 3): p. 689-704.

42. Chertov, O., et al., *Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 68-78.
43. Uriarte, S.M., et al., *Comparison of proteins expressed on secretory vesicle membranes and plasma membranes of human neutrophils*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5575-81.
44. Dupre-Crochet, S., M. Erard, and O. Nubetae, *ROS production in phagocytes: why, when, and where?* J Leukoc Biol, 2013. **94**(4): p. 657-70.
45. Van Acker, H. and T. Coenye, *The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria*. Trends Microbiol, 2017. **25**(6): p. 456-466.
46. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
47. Chapman, E.A., et al., *Caught in a Trap? Proteomic Analysis of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 423.
48. Qi, H., S. Yang, and L. Zhang, *Neutrophil Extracellular Traps and Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis and Thrombosis*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 928.
49. Neeli, I., et al., *Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils*. J Innate Immun, 2009. **1**(3): p. 194-201.
50. Li, P., et al., *PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps*. J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1853-62.
51. Lewis, H.D., et al., *Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation*. Nat Chem Biol, 2015. **11**(3): p. 189-91.
52. D'Cruz, A.A., et al., *The pseudokinase MLKL activates PAD4-dependent NET formation in necroptotic neutrophils*. Sci Signal, 2018. **11**(546).
53. Kenny, E.F., et al., *Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways*. Elife, 2017. **6**.
54. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
55. Takei, H., et al., *Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(2): p. 229-40.
56. Byrd, A.S., et al., *An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to Candida albicans*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 4136-48.
57. Narasaraju, T., et al., *Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis*. Am J Pathol, 2011. **179**(1): p. 199-210.
58. Pilsczek, F.H., et al., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7413-25.
59. Dwivedi, N., et al., *Felty's syndrome autoantibodies bind to deiminated histones and neutrophil extracellular chromatin traps*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(4): p. 982-92.
60. Kelley, J.M., et al., *IgA and IgG antineutrophil cytoplasmic antibody engagement of Fc receptor genetic variants influences granulomatosis with polyangiitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(51): p. 20736-41.
61. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 463-9.
62. Yipp, B.G., et al., *Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1386-93.
63. Yousefi, S., et al., *Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps*. Cell Death Differ, 2009. **16**(11): p. 1438-44.
64. McIlroy, D.J., et al., *Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery*. J Crit Care, 2014. **29**(6): p. 1133 e1-5.

65. Cristinziano, L., et al., *Anaplastic Thyroid Cancer Cells Induce the Release of Mitochondrial Extracellular DNA Traps by Viable Neutrophils*. J Immunol, 2020. **204**(5): p. 1362-1372.
66. Mutua, V. and L.J. Gershwin, *A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics*. Clin Rev Allergy Immunol, 2020.
67. Nauseef, W.M. and N. Borregaard, *Neutrophils at work*. Nat Immunol, 2014. **15**(7): p. 602-11.
68. Scapini, P. and M.A. Cassatella, *Social networking of human neutrophils within the immune system*. Blood, 2014. **124**(5): p. 710-9.
69. Wright, H.J., et al., *Fusobacterium nucleatum regulation of neutrophil transcription*. J Periodontal Res, 2011. **46**(1): p. 1-12.
70. Tamassia, N., et al., *Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the "dark side of the moon"*. Eur J Clin Invest, 2018. **48 Suppl 2**: p. e12952.
71. Tecchio, C., A. Micheletti, and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 508.
72. Scapini, P., et al., *The neutrophil as a cellular source of chemokines*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 195-203.
73. Pelletier, M., et al., *Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells*. Blood, 2010. **115**(2): p. 335-43.
74. Vincent, W.J.B., et al., *Neutrophil derived LTB4 induces macrophage aggregation in response to encapsulated Streptococcus iniae infection*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0179574.
75. Hammond, M.E., et al., *IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1428-33.
76. Sadik, C.D., N.D. Kim, and A.D. Luster, *Neutrophils cascading their way to inflammation*. Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 452-60.
77. Rahimi, R.A. and A.D. Luster, *Chemokines: Critical Regulators of Memory T Cell Development, Maintenance, and Function*. Adv Immunol, 2018. **138**: p. 71-98.
78. Scapini, P., F. Bazzoni, and M.A. Cassatella, *Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils*. Immunol Lett, 2008. **116**(1): p. 1-6.
79. Sica, A., et al., *IL-1 transcriptionally activates the neutrophil chemotactic factor/IL-8 gene in endothelial cells*. Immunology, 1990. **69**(4): p. 548-53.
80. Kasama, T., et al., *Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(3): p. 273-9.
81. Serhan, C.N., N. Chiang, and T.E. Van Dyke, *Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 349-61.
82. Schwab, J.M., et al., *Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes*. Nature, 2007. **447**(7146): p. 869-74.
83. Spite, M., et al., *Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis*. Nature, 2009. **461**(7268): p. 1287-91.
84. Serhan, C.N., et al., *Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 15-23.
85. Bazzoni, F., et al., *Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils*. Eur J Immunol, 2010. **40**(9): p. 2360-8.
86. Fox, S., et al., *Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease*. J Innate Immun, 2010. **2**(3): p. 216-27.
87. Jeannin, P., S. Jaillon, and Y. Delneste, *Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(5): p. 530-7.

88. Filardy, A.A., et al., *Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages*. J Immunol, 2010. **185**(4): p. 2044-50.
89. Martin, K.R., D. Ohayon, and V. Witko-Sarsat, *Promoting apoptosis of neutrophils and phagocytosis by macrophages: novel strategies in the resolution of inflammation*. Swiss Med Wkly, 2015. **145**: p. w14056.
90. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
91. Bystrom, J., et al., *Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP*. Blood, 2008. **112**(10): p. 4117-27.
92. van Gisbergen, K.P., et al., *Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN*. J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1281-92.
93. Megiovanni, A.M., et al., *Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(5): p. 977-88.
94. van Gisbergen, K.P., et al., *Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils*. FEBS Lett, 2005. **579**(27): p. 6159-68.
95. Costantini, C., et al., *Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc+ DC and NK cells to amplify NK-derived IFN $\gamma$ : role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3*. Blood, 2011. **117**(5): p. 1677-86.
96. Davey, M.S., et al., *Human neutrophil clearance of bacterial pathogens triggers anti-microbial  $\gamma$  T cell responses in early infection*. PLoS Pathog, 2011. **7**(5): p. e1002040.
97. Beauvillain, C., et al., *Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo*. Blood, 2007. **110**(8): p. 2965-73.
98. Abadie, V., et al., *Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1843-50.
99. Duffy, D., et al., *Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 917-29.
100. Yang, C.W., et al., *Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants*. J Immunol, 2010. **185**(5): p. 2927-34.
101. Ericson, J.A., et al., *Gene expression during the generation and activation of mouse neutrophils: implication of novel functional and regulatory pathways*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e108553.
102. Tecchio, C. and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity*. Semin Immunol, 2016. **28**(2): p. 119-28.
103. Netea, M.G., et al., *Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease*. Science, 2016. **352**(6284): p. aaf1098.
104. Kesteman, N., et al., *Injection of lipopolysaccharide induces the migration of splenic neutrophils to the T cell area of the white pulp: role of CD14 and CXC chemokines*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(3): p. 640-7.
105. Greenlee-Wacker, M.C., *Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation*. Immunol Rev, 2016. **273**(1): p. 357-70.
106. Calvente, C.J., et al., *Neutrophils contribute to spontaneous resolution of liver inflammation and fibrosis via microRNA-223*. J Clin Invest, 2019. **129**(10): p. 4091-4109.
107. Sancho, D. and C. Reis e Sousa, *Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 491-529.
108. Drummond, R.A. and G.D. Brown, *Signalling C-type lectins in antimicrobial immunity*. PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003417.

109. Drickamer, K., *C-type lectin-like domains*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(5): p. 585-90.
110. Drickamer, K., *Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins*. J Biol Chem, 1988. **263**(20): p. 9557-60.
111. Drickamer, K., *Demonstration of carbohydrate-recognition activity in diverse proteins which share a common primary structure motif*. Biochem Soc Trans, 1989. **17**(1): p. 13-5.
112. Drickamer, K., M.S. Dordal, and L. Reynolds, *Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Complete primary structures and homology with pulmonary surfactant apoprotein*. J Biol Chem, 1986. **261**(15): p. 6878-87.
113. Drickamer, K., *Evolution of Ca(2+)-dependent animal lectins*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1993. **45**: p. 207-32.
114. Zelensky, A.N. and J.E. Gready, *The C-type lectin-like domain superfamily*. FEBS J, 2005. **272**(24): p. 6179-217.
115. Hoving, J.C., G.J. Wilson, and G.D. Brown, *Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity*. Cell Microbiol, 2014. **16**(2): p. 185-94.
116. Plougastel, B., C. Dubbelde, and W.M. Yokoyama, *Cloning of Clr, a new family of lectin-like genes localized between mouse Nkrp1a and Cd69*. Immunogenetics, 2001. **53**(3): p. 209-14.
117. Kikuno, R., et al., *Clustering of C-type lectin natural killer receptor-like loci in the bony fish Oreochromis niloticus*. Scand J Immunol, 2004. **59**(2): p. 133-42.
118. Hurtado, C., et al., *The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression*. Virology, 2004. **326**(1): p. 160-70.
119. Dambuza, I.M. and G.D. Brown, *C-type lectins in immunity: recent developments*. Curr Opin Immunol, 2015. **32**: p. 21-7.
120. Geijtenbeek, T.B. and Y. van Kooyk, *DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission*. Curr Top Microbiol Immunol, 2003. **276**: p. 31-54.
121. Hillaire, M.L., et al., *Binding of DC-SIGN to the hemagglutinin of influenza A viruses supports virus replication in DC-SIGN expressing cells*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56164.
122. Ritter, M., et al., *Schistosoma mansoni triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(47): p. 20459-64.
123. van Die, I., et al., *The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for Schistosoma mansoni egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x*. Glycobiology, 2003. **13**(6): p. 471-8.
124. Sancho, D. and C. Reis e Sousa, *Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 46-52.
125. Hara, H., et al., *The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 619-29.
126. Li, M. and Y. Yu, *Innate immune receptor clustering and its role in immune regulation*. J Cell Sci, 2021. **134**(4).
127. Xu, S., et al., *Activated dectin-1 localizes to lipid raft microdomains for signaling and activation of phagocytosis and cytokine production in dendritic cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 22005-22011.
128. Osorio, F. and C. Reis e Sousa, *Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 651-64.
129. Kerrigan, A.M. and G.D. Brown, *Syk-coupled C-type lectins in immunity*. Trends Immunol, 2011. **32**(4): p. 151-6.
130. Kerrigan, A.M. and G.D. Brown, *Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 335-52.
131. Rogers, N.C., et al., *Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins*. Immunity, 2005. **22**(4): p. 507-17.

132. Underhill, D.M., et al., *Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2543-50.
133. Goodridge, H.S., et al., *Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells*. J Immunol, 2009. **182**(2): p. 1146-54.
134. Gringhuis, S.I., et al., *Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- $\kappa$ B activation through Raf-1 and Syk*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 203-13.
135. Geijtenbeek, T.B., et al., *Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 7-17.
136. LeibundGut-Landmann, S., et al., *Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 630-8.
137. Robinson, M.J., et al., *Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection*. J Exp Med, 2009. **206**(9): p. 2037-51.
138. Shah, V.B., et al., *Vav1 and PI3K are required for phagocytosis of beta-glucan and subsequent superoxide generation by microglia*. Mol Immunol, 2009. **46**(8-9): p. 1845-53.
139. Slack, E.C., et al., *Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan*. Eur J Immunol, 2007. **37**(6): p. 1600-12.
140. Meyer-Wentrup, F., et al., *Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4245-53.
141. Meyer-Wentrup, F., et al., *DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(3): p. 518-25.
142. Chen, C.H., et al., *Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production*. Blood, 2006. **107**(4): p. 1459-67.
143. Marshall, A.S., et al., *Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14792-802.
144. Robinson, M.J., et al., *Myeloid C-type lectins in innate immunity*. Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1258-65.
145. Geijtenbeek, T.B. and S.I. Gringhuis, *Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 465-79.
146. Kerrigan, A.M. and G.D. Brown, *C-type lectins and phagocytosis*. Immunobiology, 2009. **214**(7): p. 562-75.
147. Taylor, P.R., et al., *Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR $\gamma$  and dectin-2*. Nat Immunol, 2014. **15**(2): p. 143-51.
148. Plato, A., J.A. Willment, and G.D. Brown, *C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways*. Int Rev Immunol, 2013. **32**(2): p. 134-56.
149. Zarrin, A.A. and R.C. Monteiro, *Editorial: The Role of Inhibitory Receptors in Inflammation and Cancer*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 633686.
150. Marshall, A.S., et al., *Human MICL (CLEC12A) is differentially glycosylated and is down-regulated following cellular activation*. Eur J Immunol, 2006. **36**(8): p. 2159-69.
151. Michou, L., et al., *A genetic association study of the CLEC12A gene in rheumatoid arthritis*. Joint Bone Spine. **79**(5): p. 451-6.
152. Redelinguys, P., et al., *MICL controls inflammation in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2015.
153. Gagne, V., et al., *Modulation of monosodium urate crystal-induced responses in neutrophils by the myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor: potential therapeutic implications*. Arthritis Res Ther, 2013. **15**(4): p. R73.

154. Redelinghuys, P., et al., *MICL controls inflammation in rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2016. **75**(7): p. 1386-91.
155. Neumann, K., et al., *Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death*. *Immunity*, 2014. **40**(3): p. 389-99.
156. Begun, J., et al., *Integrated Genomics of Crohn's Disease Risk Variant Identifies a Role for CLEC12A in Antibacterial Autophagy*. *Cell Rep*, 2015. **11**(12): p. 1905-18.
157. Oguz, A.K., et al., *C-type lectin domain family 12, member A: A common denominator in Behcet's syndrome and acute gouty arthritis*. *Med Hypotheses*, 2015. **85**(2): p. 186-91.
158. Michou, L., et al., *A genetic association study of the CLEC12A gene in rheumatoid arthritis*. *Joint Bone Spine*, 2012. **79**(5): p. 451-6.
159. Brown, G.D., J.A. Willment, and L. Whitehead, *C-type lectins in immunity and homeostasis*. *Nat Rev Immunol*, 2018. **18**(6): p. 374-389.
160. Del Fresno, C., et al., *Flexible Signaling of Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Inflammation*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 804.
161. Iborra, S. and D. Sancho, *Signalling versatility following self and non-self sensing by myeloid C-type lectin receptors*. *Immunobiology*, 2015. **220**(2): p. 175-84.
162. Erlendsson, S. and K. Teilmann, *Binding Revisited-Avidity in Cellular Function and Signaling*. *Front Mol Biosci*, 2020. **7**: p. 615565.
163. Xu, H. and D.E. Shaw, *A Simple Model of Multivalent Adhesion and Its Application to Influenza Infection*. *Biophys J*, 2016. **110**(1): p. 218-33.
164. Ng, G., et al., *Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells*. *Immunity*, 2008. **29**(5): p. 807-18.
165. Ng, S.Y., L.T. Lee, and B.K. Chow, *Receptor oligomerization: from early evidence to current understanding in class B GPCRs*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012. **3**: p. 175.
166. Chattopadhyay, S. and G.C. Sen, *Tyrosine phosphorylation in Toll-like receptor signaling*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014. **25**(5): p. 533-41.
167. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. *Nature*, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
168. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(1): p. 31-9.
169. Yu, J., D.A. Fischman, and T.L. Steck, *Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents*. *J Supramol Struct*, 1973. **1**(3): p. 233-48.
170. Aureli, M., et al., *Isolation and Analysis of Detergent-Resistant Membrane Fractions*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1376**: p. 107-31.
171. Filipp, D., et al., *Enrichment of lck in lipid rafts regulates colocalized fyn activation and the initiation of proximal signals through TCR alpha beta*. *J Immunol*, 2004. **172**(7): p. 4266-74.
172. Zhang, M., et al., *CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK activation, synaptic raft clustering, and IL-2 production*. *J Immunol*, 2005. **174**(3): p. 1479-90.
173. Varshney, P., V. Yadav, and N. Saini, *Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective*. *Immunology*, 2016. **149**(1): p. 13-24.
174. Otto, G.P. and B.J. Nichols, *The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 23): p. 3933-40.
175. Sezgin, E., et al., *The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017. **18**(6): p. 361-374.
176. *Signal Transduction*. 2019.
177. Garcia-Aranda, M. and M. Redondo, *Protein Kinase Targets in Breast Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(12).

178. Boggon, T.J. and M.J. Eck, *Structure and regulation of Src family kinases*. *Oncogene*, 2004. **23**(48): p. 7918-27.
179. Okada, M., *Regulation of the SRC family kinases by Csk*. *Int J Biol Sci*, 2012. **8**(10): p. 1385-97.
180. Newton, A.C., *Protein kinase C: structure, function, and regulation*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(48): p. 28495-8.
181. Kuo, I.Y. and B.E. Ehrlich, *Signaling in muscle contraction*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. **7**(2): p. a006023.
182. Sassone-Corsi, P., *The cyclic AMP pathway*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(12).
183. Puschmann, R., R.K. Harmel, and D. Fiedler, *Analysis of metabolically labeled inositol phosphate messengers by NMR*. *Methods Enzymol*, 2020. **641**: p. 35-52.
184. Mandal, K., *Review of PIP2 in Cellular Signaling, Functions and Diseases*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(21).
185. Picas, L., F. Gaits-Iacovoni, and B. Goud, *The emerging role of phosphoinositide clustering in intracellular trafficking and signal transduction*. *F1000Res*, 2016. **5**.
186. Viaud, J., et al., *Phosphoinositides: Important lipids in the coordination of cell dynamics*. *Biochimie*, 2016. **125**: p. 250-8.
187. Viaud, J. and B. Payraastre, *Les phosphoinositides-Ces lipides qui coordonnent la dynamique cellulaire*. *médecine/sciences*, 2015. **31**(11): p. 996-1005.
188. Thillai, K., et al., *Deciphering the link between PI3K and PAK: An opportunity to target key pathways in pancreatic cancer?* *Oncotarget*, 2017. **8**(8): p. 14173-14191.
189. Vasudevan, K.M., et al., *AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer*. *Cancer Cell*, 2009. **16**(1): p. 21-32.
190. Walter, L.M., et al., *Profilin2a-phosphorylation as a regulatory mechanism for actin dynamics*. *FASEB J*, 2020. **34**(2): p. 2147-2160.
191. Shi, X., et al., *Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer (Review)*. *Mol Med Rep*, 2019. **19**(6): p. 4529-4535.
192. Weichhart, T. and M.D. Saemann, *The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67 Suppl 3**: p. iii70-4.
193. McCarty, D.J. and J.L. Hollander, *Identification of urate crystals in gouty synovial fluid*. *Ann Intern Med*, 1961. **54**: p. 452-60.
194. Phelps, P. and D.J. McCarty, Jr., *Crystal-induced inflammation in canine joints. II. Importance of polymorphonuclear leukocytes*. *J Exp Med*, 1966. **124**(1): p. 115-26.
195. Wallace, S.L., et al., *Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout*. *Arthritis Rheum*, 1977. **20**(3): p. 895-900.
196. Gonzalez, E.B., *An update on the pathology and clinical management of gouty arthritis*. *Clin Rheumatol*, 2012. **31**(1): p. 13-21.
197. Schlesinger, N. and R.G. Thiele, *The pathogenesis of bone erosions in gouty arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(11): p. 1907-12.
198. Grassi, W. and R. De Angelis, *Clinical features of gout*. *Reumatismo*, 2012. **63**(4): p. 238-45.
199. Middleton, B. *Gout In The Big Toe, Podagra Symptoms, Podagra Treatment*. 2012; Available from: <https://www.thegoutkiller.com/blog/gout-symptoms/podagra-4/>.
200. Zhu, Y., B.J. Pandya, and H.K. Choi, *Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(10): p. 3136-41.
201. Reginato, A.M., et al., *The genetics of hyperuricaemia and gout*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(10): p. 610-21.

202. Dehlin, M., L. Jacobsson, and E. Roddy, *Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors*. Nat Rev Rheumatol, 2020. **16**(7): p. 380-390.
203. Safiri, S., et al., *Prevalence, Incidence, and Years Lived With Disability Due to Gout and Its Attributable Risk Factors for 195 Countries and Territories 1990-2017: A Systematic Analysis of the Global Burden of Disease Study 2017*. Arthritis Rheumatol, 2020. **72**(11): p. 1916-1927.
204. Jackson, R., et al., *Flare frequency, healthcare resource utilisation and costs among patients with gout in a managed care setting: a retrospective medical claims-based analysis*. BMJ Open, 2015. **5**(6): p. e007214.
205. Wu, E.Q., et al., *Disease-related and all-cause health care costs of elderly patients with gout*. J Manag Care Pharm, 2008. **14**(2): p. 164-75.
206. Saseen, J.J., et al., *Comparison of patient characteristics and gout-related health-care resource utilization and costs in patients with frequent versus infrequent gouty arthritis attacks*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(11): p. 2004-12.
207. Singh, J.A. and A. Gaffo, *Gout epidemiology and comorbidities*. Semin Arthritis Rheum, 2020. **50**(3S): p. S11-S16.
208. Perez-Ruiz, F., et al., *Renal underexcretion of uric acid is present in patients with apparent high urinary uric acid output*. Arthritis Rheum, 2002. **47**(6): p. 610-3.
209. Ichida, K., et al., *Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 764.
210. Mandal, A.K. and D.B. Mount, *The molecular physiology of uric acid homeostasis*. Annu Rev Physiol, 2015. **77**: p. 323-45.
211. Kottgen, A., et al., *Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations*. Nat Genet, 2013. **45**(2): p. 145-54.
212. Merriman, T.R., H.K. Choi, and N. Dalbeth, *The genetic basis of gout*. Rheum Dis Clin North Am, 2014. **40**(2): p. 279-90.
213. Neogi, T., et al., *Alcohol quantity and type on risk of recurrent gout attacks: an internet-based case-crossover study*. Am J Med, 2014. **127**(4): p. 311-8.
214. Singh, J.A., S.G. Reddy, and J. Kundukulam, *Risk factors for gout and prevention: a systematic review of the literature*. Curr Opin Rheumatol, 2011. **23**(2): p. 192-202.
215. Kuo, C.F., et al., *Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(11): p. 649-62.
216. Johnson, R.J., et al., *Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which?* Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(9): p. 2221-8.
217. Zhu, Y., B.J. Pandya, and H.K. Choi, *Comorbidities of gout and hyperuricemia in the US general population: NHANES 2007-2008*. Am J Med, 2012. **125**(7): p. 679-687 e1.
218. Riches, P.L., A.F. Wright, and S.H. Ralston, *Recent insights into the pathogenesis of hyperuricaemia and gout*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(R2): p. R177-84.
219. Lin, K.C., H.Y. Lin, and P. Chou, *The interaction between uric acid level and other risk factors on the development of gout among asymptomatic hyperuricemic men in a prospective study*. J Rheumatol, 2000. **27**(6): p. 1501-5.
220. Dalbeth, N., et al., *Urate crystal deposition in asymptomatic hyperuricaemia and symptomatic gout: a dual energy CT study*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(5): p. 908-11.
221. Champion, E.W., R.J. Glynn, and L.O. DeLabry, *Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study*. Am J Med, 1987. **82**(3): p. 421-6.
222. Roddy, E., *Revisiting the pathogenesis of podagra: why does gout target the foot?* J Foot Ankle Res, 2011. **4**(1): p. 13.
223. Neogi, T., *Gout*. Ann Intern Med, 2016. **165**(1): p. ITC1-ITC16.

224. Pascual, E., et al., *Synovial fluid analysis for diagnosis of intercritical gout*. Ann Intern Med, 1999. **131**(10): p. 756-9.
225. Khanna, D., et al., *2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 2: therapy and antiinflammatory prophylaxis of acute gouty arthritis*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2012. **64**(10): p. 1447-61.
226. Fravel, M.A. and M.E. Ernst, *Management of gout in the older adult*. Am J Geriatr Pharmacother, 2011. **9**(5): p. 271-85.
227. Walke, V., S. Ramraje, and V. Jadhao, *Cytodiagnosis of gouty tophus*. Cytojournal, 2013. **10**: p. 11.
228. Loeb, J.N., *The influence of temperature on the solubility of monosodium urate*. Arthritis Rheum, 1972. **15**(2): p. 189-92.
229. Chhana, A., G. Lee, and N. Dalbeth, *Factors influencing the crystallization of monosodium urate: a systematic literature review*. BMC Musculoskelet Disord, 2015. **16**: p. 296.
230. Popa-Nita, O. and P.H. Naccache, *Crystal-induced neutrophil activation*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(1): p. 32-40.
231. Ortiz-Bravo, E., M.S. Sieck, and H.R. Schumacher, Jr., *Changes in the proteins coating monosodium urate crystals during active and subsiding inflammation. Immunogold studies of synovial fluid from patients with gout and of fluid obtained using the rat subcutaneous air pouch model*. Arthritis Rheum, 1993. **36**(9): p. 1274-85.
232. Terkeltaub, R.A., et al., *Apolipoprotein (apo) E inhibits the capacity of monosodium urate crystals to stimulate neutrophils. Characterization of intraarticular apo E and demonstration of apo E binding to urate crystals in vivo*. J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 20-6.
233. Terkeltaub, R., et al., *Plasma protein binding by monosodium urate crystals. Analysis by two-dimensional gel electrophoresis*. Arthritis Rheum, 1983. **26**(6): p. 775-83.
234. Brandt, K.D., *The effect of synovial hyaluronate on the ingestion of monosodium urate crystals by leukocytes*. Clin Chim Acta, 1974. **55**(3): p. 307-15.
235. Terkeltaub, R., et al., *Lipoproteins containing apoprotein B are a major regulator of neutrophil responses to monosodium urate crystals*. J Clin Invest, 1984. **73**(6): p. 1719-30.
236. Martinon, F., et al., *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 237-41.
237. Martin, W.J., M. Walton, and J. Harper, *Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(1): p. 281-9.
238. Bousoik, E., M. Qadri, and K.A. Elsaid, *CD44 Receptor Mediates Urate Crystal Phagocytosis by Macrophages and Regulates Inflammation in A Murine Peritoneal Model of Acute Gout*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 5748.
239. Chen, C.J., et al., *MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2262-71.
240. Murakami, Y., et al., *Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in murine resident peritoneal macrophages by monosodium urate monohydrate crystals*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(2): p. 455-62.
241. Scanu, A., et al., *Cytokine levels in human synovial fluid during the different stages of acute gout: role of transforming growth factor beta1 in the resolution phase*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(4): p. 621-4.
242. Amaral, F.A., et al., *NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(2): p. 474-84.

243. Torres, R., et al., *Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(10): p. 1602-8.
244. Schlesinger, N., et al., *Canakinumab for acute gouty arthritis in patients with limited treatment options: results from two randomised, multicentre, active-controlled, double-blind trials and their initial extensions*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(11): p. 1839-48.
245. Schumacher Jr, H.R., et al., *Rilonacept (Interleukin-1 Trap) in the prevention of acute gout flares during initiation of urate-lowering therapy: Results of a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Arthritis & Rheumatism, 2012. **64**(3): p. 876-884.
246. McGonagle, D., et al., *Management of treatment resistant inflammation of acute on chronic tophaceous gout with anakinra*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(12): p. 1683-4.
247. Mitroulis, I., P. Skendros, and K. Ritis, *Targeting IL-1beta in disease; the expanding role of NLRP3 inflammasome*. Eur J Intern Med, 2010. **21**(3): p. 157-63.
248. di Giovine, F.S., et al., *Urate crystals stimulate production of tumor necrosis factor alpha from human blood monocytes and synovial cells. Cytokine mRNA and protein kinetics, and cellular distribution*. J Clin Invest, 1991. **87**(4): p. 1375-81.
249. Yokose, K., et al., *TNF-alpha potentiates uric acid-induced interleukin-1beta (IL-1beta) secretion in human neutrophils*. Mod Rheumatol, 2018. **28**(3): p. 513-517.
250. Amaral, F.A., et al., *Transmembrane TNF-alpha is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout*. Eur J Immunol, 2016. **46**(1): p. 204-11.
251. Nishimura, A., et al., *Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8*. J Leukoc Biol, 1997. **62**(4): p. 444-9.
252. Terkeltaub, R., et al., *The murine homolog of the interleukin-8 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of neutrophilic inflammation in the air pouch model of acute urate crystal-induced gouty synovitis*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(5): p. 900-9.
253. Liu, R., K. Aupperle, and R. Terkeltaub, *Src family protein tyrosine kinase signaling mediates monosodium urate crystal-induced IL-8 expression by monocytic THP-1 cells*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(6): p. 961-8.
254. Liu, R., et al., *Extracellular signal-regulated kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 2 mitogen-activated protein kinase signaling and activation of activator protein 1 and nuclear factor kappaB transcription factors play central roles in interleukin-8 expression stimulated by monosodium urate monohydrate and calcium pyrophosphate crystals in monocytic cells*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(5): p. 1145-55.
255. Kim, K.W., et al., *Reciprocal interaction between macrophage migration inhibitory factor and interleukin-8 in gout*. Clin Exp Rheumatol, 2019. **37**(2): p. 270-278.
256. Mitroulis, I., K. Kambas, and K. Ritis, *Neutrophils, IL-1beta, and gout: is there a link?* Semin Immunopathol, 2013. **35**(4): p. 501-12.
257. Chang, Y.H. and E.J. Garalla, *Suppression of urate crystal-induced canine joint inflammation by heterologous anti-polymorphonuclear leukocyte serum*. Arthritis Rheum, 1968. **11**(2): p. 145-50.
258. Schumacher, H.R. and P. Phelps, *Sequential changes in human polymorphonuclear leukocytes after urate crystal phagocytosis. An electron microscopic study*. Arthritis Rheum, 1971. **14**(4): p. 513-26.
259. Liu-Bryan, R., et al., *Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p. 2936-46.
260. Martinon, F., *Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation*. Immunol Rev, 2010. **233**(1): p. 218-32.
261. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.

262. Barabe, F., et al., *Crystal-induced neutrophil activation VI. Involvement of FcγRIIIB (CD16) and CD11b in response to inflammatory microcrystals*. FASEB J, 1998. **12**(2): p. 209-20.
263. Ea, H.K. and F. Liote, *Advances in understanding calcium-containing crystal disease*. Curr Opin Rheumatol, 2009. **21**(2): p. 150-7.
264. Gaudry, M., et al., *Crystal-induced neutrophil activation. III. Inflammatory microcrystals induce a distinct pattern of tyrosine phosphorylation in human neutrophils*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1649-55.
265. Popa-Nita, O., et al., *Crystal-induced neutrophil activation: X. Proinflammatory role of the tyrosine kinase Tec*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(6): p. 1866-76.
266. Gaudry, M., et al., *Activation of Lyn is a common element of the stimulation of human neutrophils by soluble and particulate agonists*. Blood, 1995. **86**(9): p. 3567-74.
267. Popa-Nita, O., et al., *Crystal-induced neutrophil activation. IX. Syk-dependent activation of class Ia phosphatidylinositol 3-kinase*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 763-73.
268. Popa-Nita, O., et al., *Crystal-induced neutrophil activation: XI. Implication and novel roles of classical protein kinase C*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 2104-14.
269. Desaulniers, P., et al., *Crystal-induced neutrophil activation. VII. Involvement of Syk in the responses to monosodium urate crystals*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(4): p. 659-68.
270. Abramson, S., S.T. Hoffstein, and G. Weissmann, *Superoxide anion generation by human neutrophils exposed to monosodium urate*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(2): p. 174-80.
271. Ryckman, C., et al., *Monosodium urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(2): p. 433-40.
272. Roberge, C.J., et al., *Crystal-neutrophil interactions lead to interleukin-1 synthesis*. Agents Actions, 1991. **34**(1-2): p. 38-41.
273. Schumacher, H.R., *Crystal-induced arthritis: an overview*. Am J Med, 1996. **100**(2A): p. 46S-52S.
274. Rose, D.M., et al., *Transglutaminase 2 limits murine peritoneal acute gout-like inflammation by regulating macrophage clearance of apoptotic neutrophils*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(10): p. 3363-71.
275. Fadok, V.A., et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-β, PGE2, and PAF*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 890-8.
276. Yagnik, D.R., et al., *Macrophage release of transforming growth factor beta1 during resolution of monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(7): p. 2273-80.
277. Liote, F., et al., *Inhibition and prevention of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation in vivo by transforming growth factor beta1*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(7): p. 1192-8.
278. Schauer, C., et al., *Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines*. Nat Med, 2014. **20**(5): p. 511-7.
279. Robinson, P.C. and S. Horsburgh, *Gout: joints and beyond, epidemiology, clinical features, treatment and co-morbidities*. Maturitas, 2014. **78**(4): p. 245-51.
280. Zhang, W., et al., *EULAR evidence based recommendations for gout. Part II: Management. Report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCSIT)*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(10): p. 1312-24.
281. Zhang, W., et al., *EULAR evidence based recommendations for gout. Part I: Diagnosis. Report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCSIT)*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(10): p. 1301-11.

282. Dalbeth, N., T.J. Lauterio, and H.R. Wolfe, *Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout*. Clin Ther, 2014. **36**(10): p. 1465-79.
283. Misawa, T., et al., *Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome*. Nat Immunol, 2013. **14**(5): p. 454-60.
284. So, A.K. and F. Martinon, *Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets*. Nat Rev Rheumatol, 2017. **13**(11): p. 639-647.
285. Stamp, L.K. and P.T. Chapman, *Gout and its comorbidities: implications for therapy*. Rheumatology (Oxford), 2013. **52**(1): p. 34-44.
286. Munitz, A., *Inhibitory receptors on myeloid cells: new targets for therapy?* Pharmacol Ther, 2010. **125**(1): p. 128-37.
287. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
288. Bill, M., et al., *Mapping the CLEC12A expression on myeloid progenitors in normal bone marrow; implications for understanding CLEC12A-related cancer stem cell biology*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(4): p. 2311-2318.
289. Gagne, V., et al., *Modulation of monosodium urate crystal-induced responses in neutrophils by the myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor: potential therapeutic implications*. Arthritis Res Ther. **15**(4): p. R73.
290. Wiedemann, C., et al., *Cysteines and Disulfide Bonds as Structure-Forming Units: Insights From Different Domains of Life and the Potential for Characterization by NMR*. Front Chem, 2020. **8**: p. 280.
291. Feinberg, H., et al., *Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR*. J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1327-35.
292. McQueen, K.L. and P. Parham, *Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(5): p. 615-21.
293. Lazetic, S., et al., *Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits*. J Immunol, 1996. **157**(11): p. 4741-5.
294. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors*. Science, 2000. **290**(5489): p. 84-9.
295. Turnbull, I.R. and M. Colonna, *Activating and inhibitory functions of DAP12*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 155-61.
296. Feng, J., M.E. Call, and K.W. Wucherpfennig, *The assembly of diverse immune receptors is focused on a polar membrane-embedded interaction site*. PLoS Biol, 2006. **4**(5): p. e142.
297. Chong, Z.Z. and K. Maiese, *The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury*. Histol Histopathol, 2007. **22**(11): p. 1251-67.
298. Wang, L.L., et al., *Specificity of the SH2 domains of SHP-1 in the interaction with the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing receptor gp49B*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1318-23.
299. Hua, C.T., et al., *Recruitment and activation of SHP-1 protein-tyrosine phosphatase by human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). Identification of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-like binding motifs and substrates*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28332-40.
300. Drickamer, K. and R.B. Dodd, *C-Type lectin-like domains in Caenorhabditis elegans: predictions from the complete genome sequence*. Glycobiology, 1999. **9**(12): p. 1357-69.
301. Sattler, S., et al., *The human C-type lectin-like receptor CLEC-1 is upregulated by TGF-beta and primarily localized in the endoplasmic membrane compartment*. Scand J Immunol, 2012. **75**(3): p. 282-92.

302. Xie, Q., et al., *Human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 functions as a dimer in living cells*. DNA Cell Biol, 2004. **23**(2): p. 111-7.
303. Lipton, S.A., et al., *Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation*. Trends Neurosci, 2002. **25**(9): p. 474-80.
304. Fra, A., E.D. Yoboue, and R. Sitia, *Cysteines as Redox Molecular Switches and Targets of Disease*. Front Mol Neurosci, 2017. **10**: p. 167.
305. Fernandes, M.J. and P.H. Naccache, *The Role of Inhibitory Receptors in Monosodium Urate Crystal-Induced Inflammation*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1883.
306. Giles, N.M., et al., *Metal and redox modulation of cysteine protein function*. Chem Biol, 2003. **10**(8): p. 677-93.
307. Hu, J., et al., *Differential roles of cysteine residues in the cellular trafficking, dimerization, and function of the high-density lipoprotein receptor, SR-BI*. Biochemistry, 2011. **50**(50): p. 10860-75.
308. Dan, H.C. and A.S. Baldwin, *Differential involvement of I $\kappa$ B kinases alpha and beta in cytokine- and insulin-induced mammalian target of rapamycin activation determined by Akt*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7582-9.
309. Anselmi, M., et al., *Structural Determinants of Phosphopeptide Binding to the N-Terminal Src Homology 2 Domain of the SHP2 Phosphatase*. J Chem Inf Model, 2020. **60**(6): p. 3157-3171.
310. Billadeau, D.D. and P.J. Leibson, *ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation*. J Clin Invest, 2002. **109**(2): p. 161-8.
311. Smith, K.G. and M.R. Clatworthy, *Fc $\gamma$ RIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 328-43.
312. Neumann-Giesen, C., et al., *Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression*. Biochem J, 2004. **378**(Pt 2): p. 509-18.
313. Li, P.L. and E. Gulbins, *Lipid rafts and redox signaling*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(9): p. 1411-5.
314. Jin, S., et al., *Lipid raft redox signaling: molecular mechanisms in health and disease*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(4): p. 1043-83.
315. Hoffmann, S.C., et al., *Identification of CLEC12B, an inhibitory receptor on myeloid cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22370-5.
316. Qu, C.K., *Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(3): p. 297-301.
317. Zhang, J., A.K. Somani, and K.A. Siminovitch, *Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling*. Semin Immunol, 2000. **12**(4): p. 361-78.
318. Neel, B.G. and N.K. Tonks, *Protein tyrosine phosphatases in signal transduction*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 193-204.
319. Edwards, S.W., et al., *Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases*. Rheumatology, 2010. **49**(9): p. 1618-1631.
320. Hsu, A.Y., et al., *Phenotypical microRNA screen reveals a noncanonical role of CDK2 in regulating neutrophil migration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(37): p. 18561-18570.
321. Wang, K., et al., *Cyclin-dependent kinase 9 activity regulates neutrophil spontaneous apoptosis*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30128.
322. Amulic, B., et al., *Cell-Cycle Proteins Control Production of Neutrophil Extracellular Traps*. Dev Cell, 2017. **43**(4): p. 449-462 e5.
323. Tatsiy, O., et al., *Cytokine Production and NET Formation by Monosodium Urate-Activated Human Neutrophils Involves Early and Late Events, and Requires Upstream TAK1 and Syk*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2996.

324. Ear, T., et al., *Constitutive association of TGF-beta-activated kinase 1 with the I $\kappa$ B kinase complex in the nucleus and cytoplasm of human neutrophils and its impact on downstream processes.* J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3897-906.
325. Cloutier, A., et al., *Differential involvement of NF- $\kappa$ B and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils.* J Leukoc Biol, 2007. **81**(2): p. 567-77.
326. Ear, T., et al., *Regulation of Discrete Functional Responses by Syk and Src Family Tyrosine Kinases in Human Neutrophils.* J Immunol Res, 2017. **2017**: p. 4347121.
327. Tatsiy, O. and P.P. McDonald, *Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 2036.
328. Kazi, J.U., et al., *The tyrosine kinase CSK associates with FLT3 and c-Kit receptors and regulates downstream signaling.* Cell Signal, 2013. **25**(9): p. 1852-60.
329. Tavares, L.D., et al., *Phosphoinositide-3 kinase gamma regulates caspase-1 activation and leukocyte recruitment in acute murine gout.* J Leukoc Biol, 2019. **106**(3): p. 619-629.
330. Galvao, I., et al., *The Inhibition of Phosphoinositide-3 Kinases Induce Resolution of Inflammation in a Gout Model.* Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 1505.
331. Aoshiba, K., et al., *Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils.* J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1692-700.
332. Geest, C.R., et al., *p38 MAP kinase inhibits neutrophil development through phosphorylation of C/EBP $\alpha$  on serine 21.* Stem Cells, 2009. **27**(9): p. 2271-82.
333. Kim, D. and C.L. Haynes, *The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression.* Analyst, 2013. **138**(22): p. 6826-33.
334. Schett, G., J. Zwerina, and G. Firestein, *The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis, 2008. **67**(7): p. 909-16.
335. Martin, K.J., et al., *The role of phosphoinositide 3-kinases in neutrophil migration in 3D collagen gels.* PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0116250.
336. Maueroeder, C., et al., *How neutrophil extracellular traps orchestrate the local immune response in gout.* J Mol Med (Berl), 2015. **93**(7): p. 727-34.
337. Vasanthi, P., G. Nalini, and G. Rajasekhar, *Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review.* APLAR Journal of Rheumatology, 2007. **10**(4): p. 270-274.
338. Zhang, L., et al., *Contribution of neutrophils in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.* J Biomed Res, 2019. **34**(2): p. 86-93.
339. Tanaka, D., et al., *Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis.* Immunology, 2006. **119**(2): p. 195-202.
340. Cecchi, I., et al., *Neutrophils: Novel key players in Rheumatoid Arthritis. Current and future therapeutic targets.* Autoimmun Rev, 2018. **17**(11): p. 1138-1149.
341. Vaillancourt, M., et al., *Expression of the myeloid inhibitory receptor CLEC12A correlates with disease activity and cytokines in early rheumatoid arthritis.* Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 11248.
342. Raulf, M.K., et al., *The C-type Lectin Receptor CLEC12A Recognizes Plasmodial Hemozoin and Contributes to Cerebral Malaria Development.* Cell Rep, 2019. **28**(1): p. 30-38 e5.
343. Franklin, B.S., M.S. Mangan, and E. Latz, *Crystal Formation in Inflammation.* Annu Rev Immunol, 2016. **34**: p. 173-202.
344. Garcia-Vallejo, J.J., et al., *The Consequences of Multiple Simultaneous C-Type Lectin-Ligand Interactions: DCIR Alters the Endo-Lysosomal Routing of DC-SIGN.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 87.
345. Frearson, J.A. and D.R. Alexander, *The role of phosphotyrosine phosphatases in haematopoietic cell signal transduction.* Bioessays, 1997. **19**(5): p. 417-27.

346. Wu, H., et al., *YXXM motifs in the PDGF-beta receptor serve dual roles as phosphoinositide 3-kinase binding motifs and tyrosine-based endocytic sorting signals*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40425-8.
347. Rathinaswamy, M.K. and J.E. Burke, *Class I phosphoinositide 3-kinase (PI3K) regulatory subunits and their roles in signaling and disease*. Adv Biol Regul, 2020. **75**: p. 100657.
348. Qu, C.K., *The SHP-2 tyrosine phosphatase: signaling mechanisms and biological functions*. Cell Res, 2000. **10**(4): p. 279-88.