

**La 5-phosphatase de phosphoinositides INPP5K
régule le développement précoce des lymphocytes B
par le biais du contrôle de la structure et de
la signalisation du récepteur à l'interleukine 7**

Bastien Moës

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Année académique 2021-2022

« La recherche est la passerelle entre l'inconnu et le connu,
le doctorat en est la fondation »

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	5
REMERCIEMENTS	9
ACRONYMES	15
RÉSUMÉ	21
ABSTRACT	25
INTRODUCTION.....	29
LES INOSITIDES ET LEUR MÉTABOLISME	31
1. Généralités	31
2. Les Inositols phosphates (IP).....	32
2.1. Synthèse	32
2.2. Rôles	33
3. Les Phosphoinositides	34
3.1. Le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate - PtdIns(4,5)P ₂	36
(a) Généralités	36
(b) Fonctions	38
3.2. Le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate - PtdIns(3,4,5)P ₃	40
(a) Généralités	40
(b) Régulation de la voie PI3K/AKT	41
LES ENZYMES DU MÉTABOLISME DES PHOSPHOINOSITIDES	44
1. Généralités	44
2. Les phosphoinositide kinases.....	44
3. Les phosphoinositide phosphatases	45
3.1. Les phosphoinositide 3-phosphatases	46
(a) Description	46
(b) PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) et les lymphocytes B.....	46
3.2. Les phosphoinositide 5-phosphatases	47
(a) Description	47
(b) Mécanisme catalytique	49
(c) Importance et fonctions biologiques.....	51
(d) SHIP-1 (Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase-1) et les lymphocytes B.....	53
(e) SHIP-2 (Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase-2) et les lymphocytes B.....	54
LA PHOSPHOINOSITIDE 5-PHOSPHATASE INPP5K.....	56
1. Identification	56
2. Structure génétique.....	57
3. Structure protéique.....	57
3.1. Le domaine catalytique 5-phosphatase.....	57
3.2. Le domaine SKICH.....	58
3.3. Le domaine N-terminal.....	58
4. Expression et Localisation.....	60
4.1. Fonctions	61
(a) Régulation de la voie de l'insuline	62
(b) Osmorégulation.....	63
(c) Régulation de la migration cellulaire.....	64
(d) Régulation de la différenciation cellulaire.....	64
(e) Contrôle de la structure du RE	64
(f) Implication dans des maladies humaines	65
(g) Prédications de fonctions	66
LA BIOLOGIE DES LYMPHOCYTES B	67

1. La Moëlle osseuse.....	67
1.1. Description globale.....	67
2. La différenciation des lymphocytes B	67
2.1. Engagement dans la lignée des lymphocytes B	67
2.2. La lymphopoïèse B	69
(a) Stade PrePro B – Fr. A.....	70
(b) Stades Early et Late Pro B – Fr. B et C.....	71
(c) Stades Large, Small Pre B et Immature B – Fr. C', D et E	73
3. La voie de signalisation du récepteur à l'interleukine-7 (IL7R)	74
3.1. La signalisation	75
(a) Adaptation membranaire	75
(b) Transduction du signal	75
3.2. Fonctions biologiques au cours de la lymphopoïèse B	77
(a) Prolifération des précurseurs des lymphocytes B	78
(b) Survie des précurseurs des lymphocytes B	78
(c) Régulation de la recombinaison de la chaîne lourde de l'IgS	79
3.3. Réseau transcriptionnel dépendant de la voie de l'IL7R	79
3.4. La voie de l'IL7R et la leucémie lymphoïde aigue de type B (B-ALL)	81
OBJECTIFS	83
SECTION EXPÉRIMENTALE	87
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	153
ANNEXES.....	165
RÉFÉRENCES	177

Remerciements

Tout le long de la réalisation de cette thèse, de l'aide, du soutien et du réconfort m'ont été apportés par diverses personnes de mon entourage. Sans elles, il me semble peu probable que cette thèse eut été promptement finalisée. C'est à ces personnes que cette section est dédiée.

La première personne envers qui je porte toute ma gratitude est mon promoteur de mémoire devenu par la suite mon promoteur de thèse : le Professeur Stéphane Schurmans. En premier lieu, pour l'opportunité, après l'échec de ma première défense FRIA, que tu m'as offerte pour rééditer cet essai. De cette expérience, tu m'as alloué un discours abrupt et, au bon sens du terme, moralisateur : « Tu sais Bastien, dans la vie tu vas te recevoir des claques mais l'important, c'est de réussir à se relever ». Sans cette opportunité, ces lignes, cette thèse et l'article qui en découlent n'auraient jamais pris forme. Grâce à cette seconde chance, j'ai pu réaliser un de mes objectifs de vie. Au-delà de cette opportunité, il y a la confiance, confiance que tu m'as directement accordée. Ce, en me laissant dès les premières expériences, sous ton œil toujours bienveillant, mener d'une manière autonome mon projet doctoral. Puisque oui, de la bienveillance, tu en as eu tout le long de cette thèse, de par l'absence de pression apposée ou encore via ton positivisme. « *Always look on the bright side of life* » la citation que tu aimes reprendre en est la preuve. L'apprentissage d'une compétence, dont l'acquisition, pour un bon chercheur, est fondamentale est l'autonomie. Ce trait, de par la très grande liberté que tu m'as octroyée, m'a été productivement enseigné. Merci de m'avoir promptement permis de me construire en tant que chercheur. Bien que je sache que la route est encore fort longue. Aussi longue qu'une vie je dirais.

Deuxièmement, j'aimerais remercier mes bruyantes voisines, aka la team neutrophile, pour m'avoir permis d'améliorer ma capacité de concentration dans un environnement fortement sonore. Plus sérieusement, les conditions m'ont amené, durant 2 ans de ma thèse, à être le seul chercheur du laboratoire. Cette solitude a été bien plus facilement vivable grâce à vous. Merci à mamy Coco pour tous ces conseils de vieilles dames, le temps que tu as pris pour la lecture de posters, ton expertise pour la rédaction d'un article, également pour certains choix professionnels que tu m'as conseillé ainsi que pour les karaokés improvisés. Merci au petit trolly qui m'a montré qu'il est possible d'avoir un flow de parole plus rapide qu'Eminem mais surtout merci pour ta bonne humeur et ton entrain. Je ne te l'avouerai jamais en présentiel mais cela me rend des fois moins grumpy. Merci à Pauwpauw pour les services que tu m'as rendus et qui m'ont permis de plus facilement gérer le laboratoire et merci à Céci pour sa gentillesse, pour les discussions partagées, pour ta constante bonne humeur (Tu m'apprendras ?) et pour avoir amené la Méditerranée au GIGA. Merci également au dernier venu de ce labo, Pierre, pour les dégustations de bières (vraiment très bonne ces tits ambrées !!) et plus sportivement pour les sorties courses mais surtout pour ton entrain. Et non, je n'ai pas et ne serais jamais phagocyté, je demeurerai, à jamais, un lymphocyte B indépendant !! Merci aussi à toi Barbara

pour ta positivité, ta très bonne humeur mais surtout pour ton écoute et ta bienveillance lorsque des moments de doute sont venu s'insérer dans cette thèse.

Je souhaiterais également remercier les différents post-doctorants qui se sont succédés depuis le début de ma thèse. Je pense entre autres à Sufyan pour sa sagesse et son relativisme, à Halim pour m'avoir démontré que la qualité prévaut sur la quantité et que la collaboration est fondamentale pour mener à bien une recherche et finalement à Patricia sans qui la complétude de certaines de mes compétences techniques ne seraient pas du tout les mêmes. Merci pour ta patience et le temps que tu m'as accordé pour les nombreuses questions que j'ai pu te poser et même pour la durée que tu m'as octroyée afin de me montrer différentes techniques et, notamment le marquage Facs.

Merci également à Charles-Andrew, de son prénom complet, pour son esprit de camaraderie, pour l'ambiance bonne enfant qui régnait au laboratoire, pour tes blagues... comme cette fois où tu avais insidieusement inséré un mot à la consonance phalloïde dans un des titres de ma présentation pour le congrès à Banff.... (D'ailleurs merci Stéphane pour la relecture de ce power point). Ne jamais surestimer l'allure innocente d'une personne...

Je tiens également à remercier Rafaat, Céline, Alex et Sandra de la plateforme cytométrie imagerie pour leur disponibilité et leur réactivité. Plus particulièrement Rafaat pour m'avoir enseigné comment dompter le Facs Fortessa et Céline et Rafaat sans qui la réalisation de mes nombreux tris cellulaires, étape de base pour la plupart de mes expériences. Je remercie également Alex pour son expertise en microscopie, la mise au point de l'expérience FRET et pour son enseignement sur les bases de l'analyse quantitative de données.

Merci à mon comité d'accompagnement de thèse pour les critiques et les idées qui ont émergé lors de ces différentes réunions. Votre regard a permis à cette thèse doctorale de prendre une tournure fort favorable. Merci pour les qualificatifs mélioratifs que vous avez employé à mon égard. Ce, même si je ne considère pas qu'ils me soient tous allouables.

Je remercie d'une manière générale tous mes proches que j'ai ô combien ennuyé avec mes histoires de pseudo-scientifique et de pseudo-chercheur. Soyez sans crainte, ce n'est que le commencement du début mouahaha.

J'aimerais également remercier les différents organismes de financement sans lesquels ce projet n'aurait pu aboutir. Dans ce cadre précis, mes remerciements se tourne vers le FNRS pour la bourse FRIA qu'ils m'ont octroyé et, de même, la fondation Léon Frédéricq grâce à qui, l'achat d'une partie du matériel d'expérimentation, via les bourses annuelles de fonctionnements, a pu se réaliser.

Avant de clôturer cette section, il me reste une personne, dont l'importance à mes yeux n'est pas quantifiable et très difficilement qualifiable, que je me dois de remercier ; Mon tendre et cher Amour Morgane Desonnay. Bien que tu sois arrivée dans ma vie en cours de cette thèse, l'impact que tu as eu et que tu as pour le dénouement de ce projet doctoral a été et est capital. En effet, le déroulement de la thèse est parsemé de moments fort déplaisants provoquant une frustration que seul un chercheur peut connaître. Cependant, la déplaisance de ces moments ainsi que leur portée, depuis toi, est anecdotique et éphémère. Un peu comme ce nuage venant momentanément obscurcir les rayons lumineux émanant du soleil. Et toi, tu es cette brise venteuse poussant le nuage et avec lui l'obscurité. Outre cet environnement que tu m'offres me permettant d'être « chercheur » dans les conditions les plus sereines possibles, tu m'apportes cette confiance personnelle et ce réconfort que toute personne rêverait d'avoir. Dans des aspects plus techniques, ton écoute et ton intérêt pour ce projet qui rythme ma vie m'ont permis l'acquisition progressive et non-parfaite d'un discours scientifique synthétique, vulgarisé et cohérent. De ces discussions ont même vu éclore des hypothèses qui sont aujourd'hui les fondements du modèle proposé dans cette thèse et pour cet article. Mes remerciements aussi longs soient-ils demeureront insignifiants et médiocres face au soutien, l'amour et à tout ce que tu m'apportes. Tout cela m'a permis de mener au mieux cette thèse doctorale et de l'approfondir autant que le temps nous l'a permis. Je t'aime ! <3

Acronymes

ADF	Actin Depolymerizing Factor
ADP	Adénosine DiPhosphates
AP-2	Adaptator Protein-2
AQP2	Aquaporin 2
ARL6IP1	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATF6	Activating transcription factor 6
ATP	Adénosine TriPhosphates
AVPR2	Arginine Vasopressin Receptor 2
BAD	BCL2 associated agonist of cell death
B-ALL	B – Acute Lymphoid leukemia
BCAP	B Cells PI3K Adaptor
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCL6	B cell Lymphoma 6
BCR	B cell Receptor
BLIMP1	B lymphocyte-induced maturation protein-1
BLNK	B Cell Linker
BLP	B Lymphoid Progenitor
BTK	Bruton's Tyrosine Kinase
CBP	CREB-binding protein
CCP	Clathrin Coat Pits
CDK	Cyclin-Dependent kinase
CLL	Chronic lymphoid leukemia
CLP	Common Lymphoid Precursor
CMH II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COS-1	CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
CXCR4	C-X-C motif Chemokine Receptor 4
DAG	Diacylglycérol
DBP5	DNA Bindin Protein 5

DOK1	Docking protein 1
E2A	Enhancer-binding factors E12/E47
EBF1	Early B cell Factor 1
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinases ½
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
FoxO	Forkhead Box O
GLUT4	Glucose Transporter type 4
GRP78	Glucose-Regulated Protein 78
GST	Glutathion S-transférase
HD	Homeodomain
HLH	Helix-Loop-Helix
HSC	Hematopoietic Stem Cells
IGF-II	Insulin-like growth factor 2
IL-7	Interleukin 7
IL7R	Interleukin-7 Receptor
INO/MIP	myo -inositol-1-phosphate
INPP5K	Inositol polyphosphate 5-phosphatase K
Ins(1,4,5)P3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
InsP7	5-diphosphoinositol pentakisphosphate
InsP8	5-triphosphoinositol pentakisphosphate
InsP3R	Inositol trisphosphate receptor
IP	Inositols polyphosphates
IPMK	Inositol Polyphosphate Multikinase
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
IT-HSC	Intermediate Term - Hematopoietic Stem Cells
ITPK	Inositol-Tetrakisphosphate Kinase
LMPP	Lymphoid-primed MultiPotent Progenitor
LT-HSC	Long Term - Hematopoietic Stem Cells

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
M-CSF	Macrophage Colony stimulating Factor
mTORC2	<i>mechanistic Target Of Rapamycine Complex 2</i>
mTORC1	<i>mechanistic Target Of Rapamycine Complex 1</i>
NCoR1	Nuclear receptor corepressor 1
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHEJ	NonHomologous End-Joining
NK	Natural Killer
ORAI	Calcium release-activated calcium channel protein
PAX5	Paired Box 5
PDK1	Phosphoinositide Dependent protein Kinase 1
PH	Plekstrin Homology
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP4K	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase
PIP5K	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase
PI5P4K	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase
Pis1	PtdIns synthase 1
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
pre-BCR	Pre-B Cell Receptor
PRD	Proline Rich Domain
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PtdIns(4,5)P2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns4P	Phosphatidylinositol 4-phosphate
PtdIns5P	Phosphatidylinositol 5-phosphate
PtdIns(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAG1/2	Recombination Activated Gene ½

RasGRPs	Ras guanyl-releasing protein
RE	Réticulum Endoplasmique
RhoGAP	Rho Gtpase Activating Protein
SAGA	Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase
SAM	Sterile Alpha Motif
SFK	Src family kinases
SH-2	Src Homology-2
SH-3	Src Homology-3
SHIP1	Src Homology 2 domain containing Inositol polyphosphate 5-Phosphatase 1
SHIP2	Src Homology 2 domain containing Inositol polyphosphate 5-Phosphatase 2
SKICH	SKIP Carboxyl homology
SLC	Surrogate Light Chain
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOCE	Store-Operated Ca ²⁺ Entry
SP1R	Sphingosine 1-Phosphate Receptor
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
ST-HSC	Short-Term Hematopoietic Stem Cells
STIM1	Stromal interaction molecule 1
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TAD	Transactivation Domain
TBP	TATA box binding protein
TCR	T cell Receptor
TRP	Transient Receptor Potential
WASP	Wiskott–Aldrich Syndrome protein
XBP1	X-box binding protein 1

Résumé

INPP5K ou SKIP est une enzyme qui appartient à la famille des phosphoinositide 5-phosphatases. Cette enzyme, dont la fonction *in vivo* est très peu caractérisée, hydrolyse en condition physiologique le PtdIns(4,5)P2 et le PtdIns(3,4,5)P3. Ces connaissances lacunaires sont la conséquence d'un manque de système d'étude biologique adéquat, comme les souris *Inpp5K^{flox}*. En effet, pour des raisons toujours inconnues, les souris *Inpp5K^{Δ/Δ}*, chez lesquelles INPP5K est inactivée dans toutes les cellules, meurent durant la vie embryonnaire. En raison de la forte expression d'*Inpp5K* dans les cellules du système immunitaire, nous avons généré, en croisant nos souris *Inpp5K^{flox/flox}* avec des souris VAV-CRE, des souris déficientes pour INPP5K spécifiquement dans toutes les cellules hématopoïétiques. L'analyse des souris *Inpp5K^{flox/flox}* VAV-CRE (ou VAV-CRE) a révélé une réduction importante du nombre de lymphocytes B totaux dans le sang, la rate et la moelle osseuse, en comparaison avec des souris contrôles. Ces anomalies sont associées à une présence pratiquement nulle des immunoglobulines sériques. Conséquemment à ces résultats, nous avons analysé le développement précoce des lymphocytes B dans la moelle osseuse des souris VAV-CRE. L'absence d'INPP5K chez ces souris provoque un ensemble complexe d'altérations parmi lesquelles un blocage partiel du développement entre les stades PrePro B (ou Fr.A) et Early Pro B (ou Fr.B). Ces résultats ont été confirmés chez les souris *Inpp5K^{flox/flox}* MB1-CRE (MB1-CRE) chez lesquelles INPP5K est inactivée uniquement dans les lymphocytes B. Pour mieux comprendre le mécanisme responsable de ce blocage partiel, la voie de signalisation du récepteur à l'Interleukine-7 (IL7R), essentielle pour l'initiation et l'engagement des cellules progénitrices dans la lignée des lymphocytes B, a été analysée dans les souris VAV-CRE. Cette analyse a révélé aux stades PrePro B et Early Pro B du développement des lymphocytes B une importante diminution de la phosphorylation de JAK1 et JAK3, deux kinases liées aux deux chaînes du IL7R, ainsi que de STAT5, leur cible, avant et après stimulation par l'IL-7. En aval de STAT5 dans la signalisation du IL7R, l'expression d'EBF1 et de PAX5 sont également significativement diminuées dans les précurseurs des lymphocytes B des souris VAV-CRE. Ces résultats suggèrent qu'INPP5K joue un rôle important dans le contrôle des premières étapes membranaires de l'activation du IL7R. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une augmentation significative de la présence du PtdIns(4,5)P2 membranaire, un des deux substrats d'INPP5K, dans les cellules des stades PrePro B et Early Pro B de la moelle osseuse des souris VAV-CRE par rapport aux souris contrôles. Des analyses par microscopie confocale ont démontré que l'absence d'INPP5K provoque des anomalies dans la formation des microdomaines membranaires GM1⁺ qui sont importants pour la signalisation du IL7R. De plus, des analyses par FRET montrent que l'inactivation d'INPP5K entraîne une altération significative de la structure dynamique du IL7R à l'état basal et en réponse à l'IL-7, comme une augmentation de la distance entre les deux domaines extracellulaires ou ecto-domaines de l'IL7R, une mobilité anormale des deux kinases JAK1 et JAK3 liées aux chaînes IL7R et un gel de la distance entre la partie cytoplasmique de la chaîne alpha du récepteur à l'IL7R (IL7Rα) et la membrane plasmique.

Abstract

**La 5-phosphatase de phosphoinositides INPP5K
régule le développement précoce des lymphocytes B
par le biais du contrôle de la structure et de
la signalisation du récepteur à l'interleukine 7**

Bastien Moës

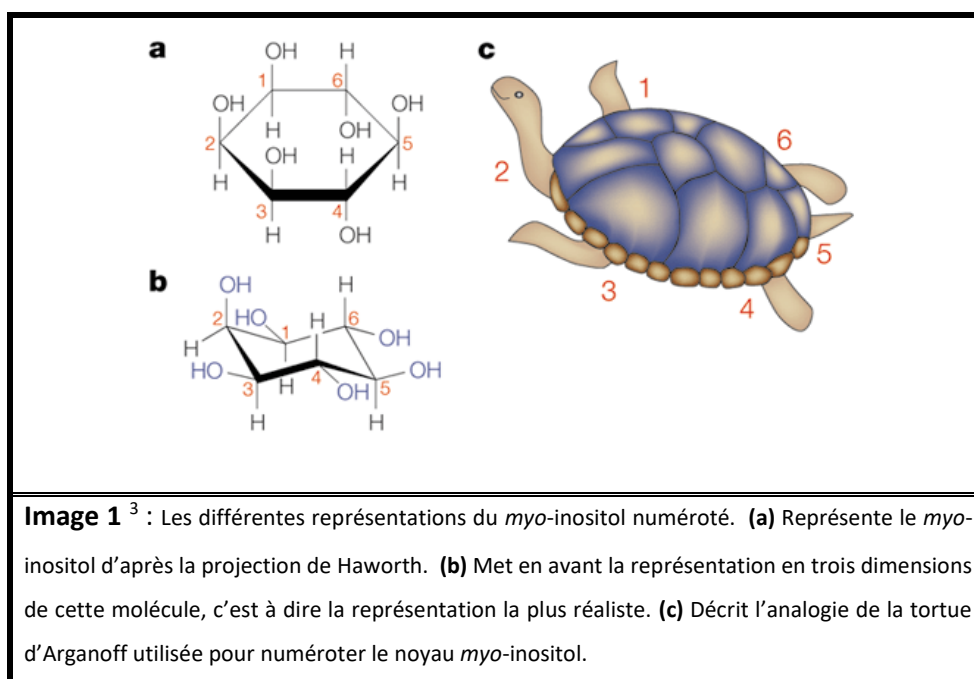
Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Année académique 2021-2022

Introduction

Les inositides et leur métabolisme

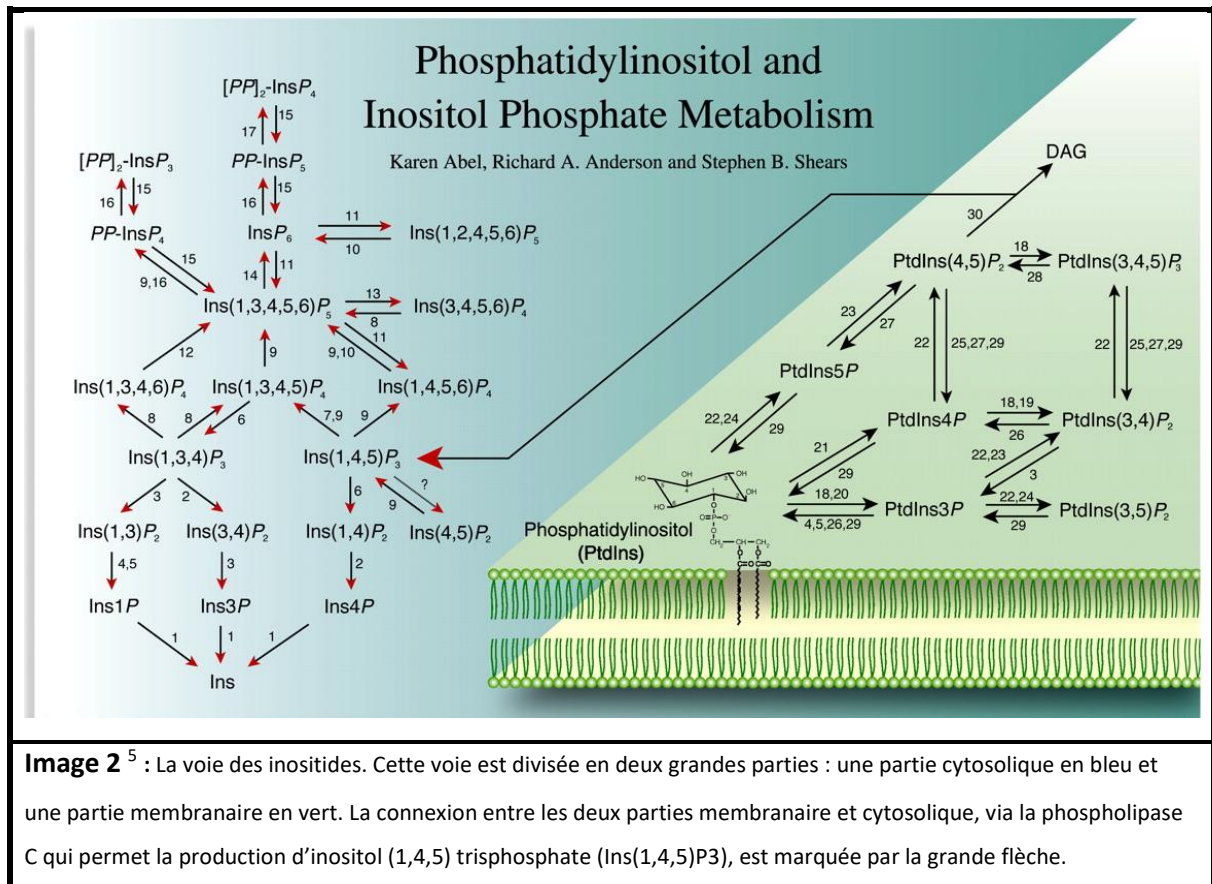
1. Généralités

Le sujet de cette thèse se focalise sur la phosphoinositide 5-phosphatase INPP5K (*Inositol polyphosphate 5-phosphatase K*). Cette phosphatase tient un rôle clé dans le métabolisme des inositides. Les molécules de la famille des inositides furent isolées pour la première fois au milieu du 19^{ème} siècle par le chimiste allemand Josef Scherer. Sémantiquement parlant, le mot inositide tire son origine du tissu duquel cette molécule a été pour la première fois isolée. En effet, le préfixe « *inos* », en grec, signifie muscle ¹. Aujourd'hui, plus de 37 molécules d'inositides différentes impliquées dans de nombreux processus biologiques, ont été recensés dans la littérature ².



La structure chimique des inositides est caractérisée par la présence d'un noyau inositol, plus précisément d'un noyau *myo*-inositol, l'isomère inositol le plus répandu dans la nature ⁴. Ce noyau contient 6 carbones agencés en cyclohexane. Sur chacun de ces carbones se trouve un groupement hydroxyle pouvant être phosphorylé (**Image 1b**). De manière à éviter toute confusion avec les différents énantiomères que possède ce noyau inositol, il a été convenu que la numérotation de ces carbones se ferait en référence à la tortue d'Arganoff. Dans cette analogie, le noyau *myo*-inositol

représente une tortue dont la nageoire avant-droite correspond au premier carbone C1 de ce noyau. La suite de la numérotation se fait dans le sens anti-horaire (**Figure 1c**)³.



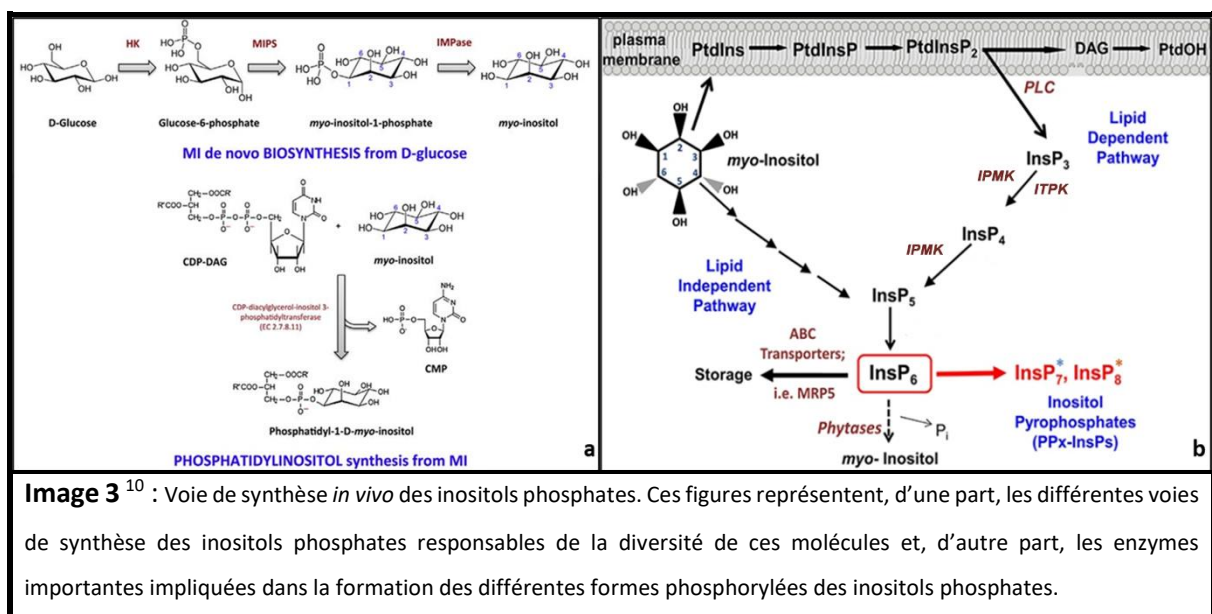
Les molécules apparentées à la famille des inositides sont divisées en deux catégories : celles se localisant dans le cytoplasme (Inositols phosphates) et celles ancrées aux membranes cellulaires par deux acides gras (phosphoinositides) (**Image 2**). Les molécules de la première catégorie sont seulement formées du noyau *myo*-inositol tandis que les molécules de la seconde sont composées d'un noyau *myo*-inositol lié à une molécule de glycérol portant, par l'intermédiaire d'un acide phosphorique, deux acides gras. La présence de ces deux acides gras permet l'ancrage des phosphoinositides aux membranes de la cellule.

2. Les Inositols phosphates (IP)

2.1. Synthèse

Ces molécules possèdent un noyau *myo*-inositol dont la structure a été décrite dans le paragraphe précédent (**Image 1**). Ce groupe de molécules peut être alimenté, chez les mammifères, de diverses manières. La première implique la synthèse *de novo* d'inositol-3-phosphate à partir du glucose-6-

phosphate. Cette réaction fait intervenir une INO/MIP synthase phosphate ⁶. Par conséquent, Cette voie de synthèse relie le métabolisme du glucose et celui des inositides. Cette liaison procure même au *myo*-inositol un effet mimant celui de l'insuline avec, en cas de dérégulation de son taux, l'émergence de nombreux troubles associés à ceux de la dérégulation de la concentration de l'insuline ⁷. La seconde voie à la base de la synthèse des inositols phosphates fait intervenir la PLC (phospholipase C). Cette enzyme catalyse la formation d'Ins(1,4,5)P₃ (Inositol 1,4,5-trisphosphate) et de DAG (diacylglycérol) à partir du PtdIns(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) ¹. L'Ins(1,4,5)P₃ est ensuite la cible de diverses inositides kinases et phosphatases (**Image 2**). Finalement, le *myo*-inositol peut provenir de la dégradation gastro-intestinale de l'inositol 6-phosphate issu de l'alimentation ⁸. Il s'ensuit une absorption au niveau de l'intestin grêle. *In fine*, l'atteinte des tissus s'effectue via le système sanguin (**Image 3a**) ⁹.



Le noyau *myo*- inositol, et principalement sa forme tri-phosphorylée (Ins(1,4,5)P₃), sert de structure de base à l'élaboration des différents inositols phosphates naturels. La formation de la grande diversité des inositols phosphates implique la fonction d'une multitude de kinases et de phosphatases dont les plus connues sont sans aucun doute celles appartenant à la famille ITPK et IPMK (**Image 3b**) ¹¹.

2.2. Rôles

Au-delà de leur rôle de réserves de phosphates, ceci notamment via les formes pyrophosphorylées des inositols phosphates (InsP₇ et InsP₈), ces cyclohexanes possèdent des fonctions essentielles au métabolisme cellulaire. De par leur localisation nucléaire par exemple, plusieurs inositols phosphates régulent l'expression de multiples gènes. Ces mécanismes impliquent une régulation transcriptionnelle

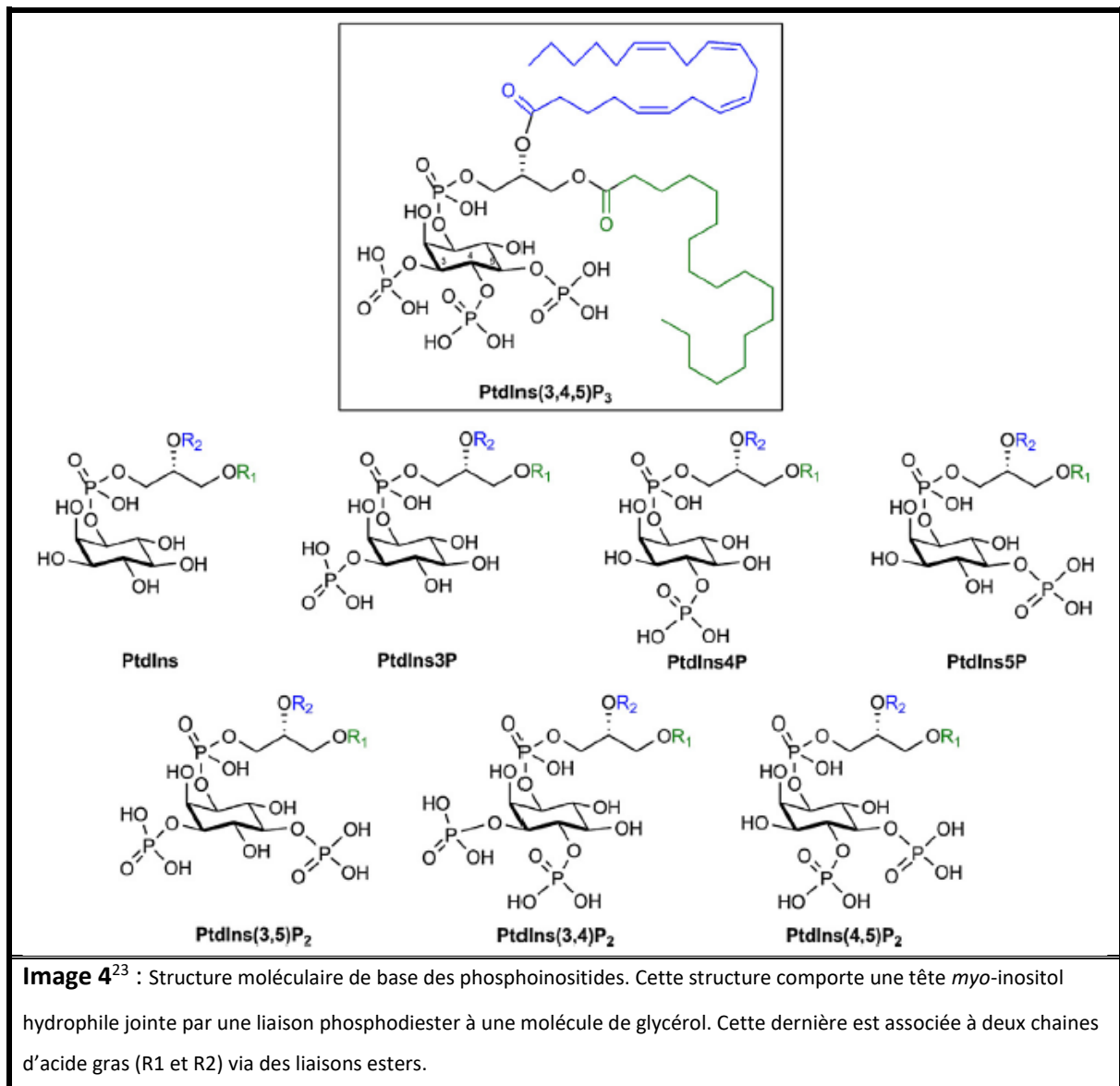
en influençant l'efficacité du complexe SWI/SNF, par le contrôle de l'export de l'ARNm en régulant l'activité de l'ARN hélicase DBP5, ou encore en liant les sous-unités Ku70/80 impliquées dans la recombinaison NHEJ (*NonHomologous End-Joining*) responsable de la réparation de l'ADN ¹²⁻¹⁴.

Une autre fonction importante attribuée aux inositols phosphates, et plus particulièrement à l'Ins(1,4,5)P₃, est la régulation de la libération du calcium du réticulum endoplasmique dans le cytoplasme. Cette fonction est réalisée via la fixation de cet inositol phosphate sur son récepteur ; IP₃R ¹⁵. Cette libération de calcium est essentielle lors de l'activation des lymphocytes par le biais de la voie du BCR (B Cell Receptor) ou du TCR (T Cell Receptor) ^{16,17}.

3. Les Phosphoinositides

La famille des phosphoinositides se compose du phosphatidylinositol (PtdIns) et de ses sept dérivés phosphorylés. Ensemble, ces molécules représentent la seconde catégorie d'inositides dit « lipidiques » ou encore « membranaires » qui possèdent un caractère amphiphile. Ces inositides sont composés d'un noyau *myo*-inositol hydrophile associé à une molécule de glycérol via une liaison phosphodiester unissant le carbone 1 de l'inositol au carbone 3 du glycérol. Ce glycérol est lui-même lié sur ses carbones 1 et 2 à deux chaînes d'acides gras (R1 et R2) grâce à des liaisons esters. Dans la majorité des cas, une de ces chaînes est un acide gras saturé (vert) et l'autre un acide gras insaturé (bleu) (**Image 4**). Chez l'homme, ces deux chaînes d'acide gras sont généralement l'acide stéarique (18:0) et l'acide arachidonique (C20:4) ¹⁸.

Ces inositides lipidiques se localisent principalement à la face cytosolique de la membrane plasmique ^{19,20}. La forme non-phosphorylée des phosphoinositides, le PtdIns, est le précurseur de tous les autres phosphoinositides. Le PtdIns est synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique grâce à l'intervention de PIS1, qui couple le noyau *myo*-inositol au DAG. Une fois synthétisé, le PtdIns est acheminé aux autres membranes cellulaires via des vésicules de transport ou encore par le biais de protéines de transport ^{21,22}. Par la suite, le PtdIns présent au niveau cytosolique des diverses membranes est converti en ses différentes formes phosphorylées. Ces phosphorylations s'effectuent grâce à l'action de différentes kinases (phosphoinositide kinase). Néanmoins, à cause de l'encombrement stérique, seuls les carbones 3, 4 et 5 du noyau *myo*-inositol sont la cible de ces phosphorylations. Ces phosphorylations conduisent donc à la production de 7 phosphoinositides différents (**Image 4**).



Bien qu'ils soient principalement présents au niveau de la membrane plasmique et considérés comme des constituants mineurs de cette dernière, les différents PtdIns se localisent également, comme nous l'avons vu, au niveau de la membrane de différentes organelles subcellulaires. Parmi ces organelles, nous pouvons citer l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, les lysosomes et le noyau ²⁴. Plusieurs études ont démontré que la concentration des PtdIns ainsi que le contrôle de leurs phosphorylations étaient cruciaux pour le développement des organismes eucaryotes ²⁵. La localisation de ces phosphoinositides au niveau de toutes les membranes présentes dans la cellule est le reflet de leur très grande diversité fonctionnelle. Ces fonctions s'étendent du niveau membranaire, avec la régulation de la dynamique membranaire et la régulation de l'activité de canaux ioniques membranaires, à la régulation de processus cellulaires, comme l'endocytose, ou encore de l'activité et de la relocalisation de protéines cytosoliques, comme AKT ou BTK (*Bruton's Tyrosine Kinase*). Les

phosphoinositides jouent également un rôle important dans le contrôle de l'expression génétique et ce au cours de toutes les différentes étapes du développement et de la différenciation des cellules ²⁶⁻²⁸. Ces fonctions sont principalement inculquées aux charges négatives portées par les phosphates ajoutés aux carbones 3, 4 et 5 du noyau *myo*-inositol. Cette charge est responsable, entre autres fonctions, de l'interaction électrostatique avec des acides aminés chargés positivement, comme l'arginine ou encore la lysine, composants de protéines membranaires.

Bien que, comme précédemment mentionné, il existe 7 phosphoinositides différents, seul deux, dans ce manuscrit, retiendront notre attention : le PtdIns(4,5)P2 et le PtdIns(3,4,5)P3. En effet, à ce jour, ce sont les deux seuls phosphoinositides reconnus comme substrats physiologiques de la 5-phosphatase INPP5K.

3.1. Le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate - PtdIns(4,5)P2

(a) Généralités

Le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ou PtdIns(4,5)P2, est le phosphoinositide dont les carbones 4 et 5 du noyau *myo*-inositol sont phosphorylés. Cette molécule, substrat commun de familles d'enzymes très différentes, assure la liaison entre les phosphoinositides membranaires et les inositols phosphates hydrophiles de la voie des inositides. La PLC est l'enzyme responsable de cette liaison. Son isoforme $\gamma 2$, majoritaire dans les lymphocytes B, hydrolyse le PtdIns(4,5)P2 pour produire le DAG (diacylglycérol) et l'Ins(3,4,5)P3, deux seconds messagers importants pour l'activation des lymphocytes B ^{29,30}.

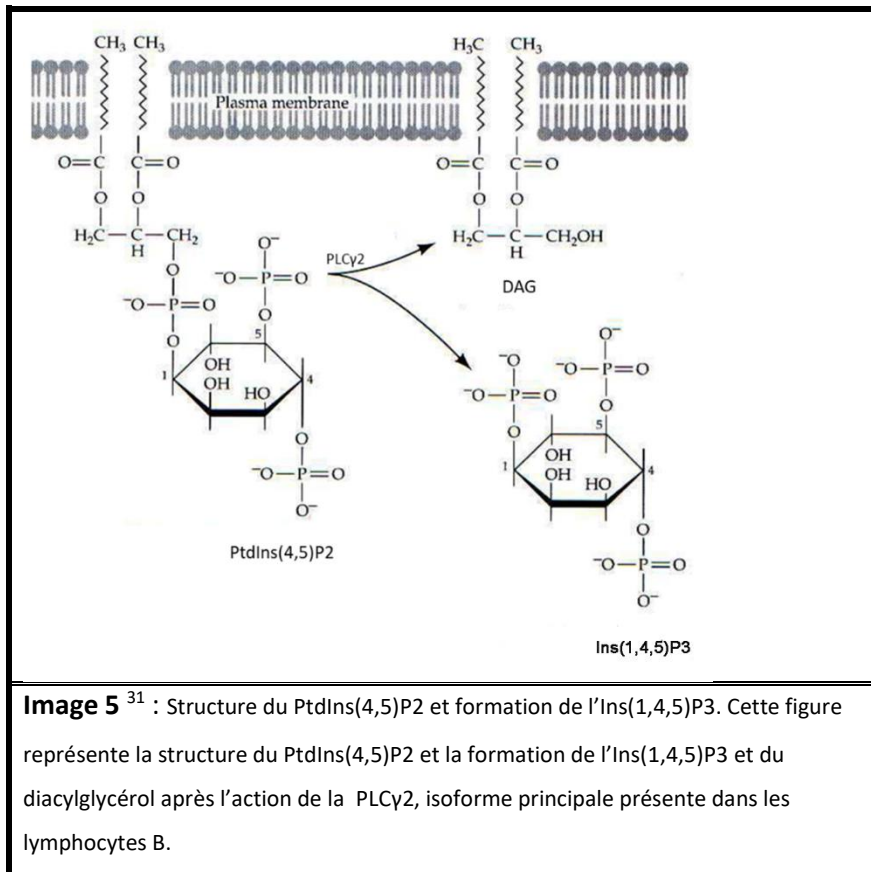
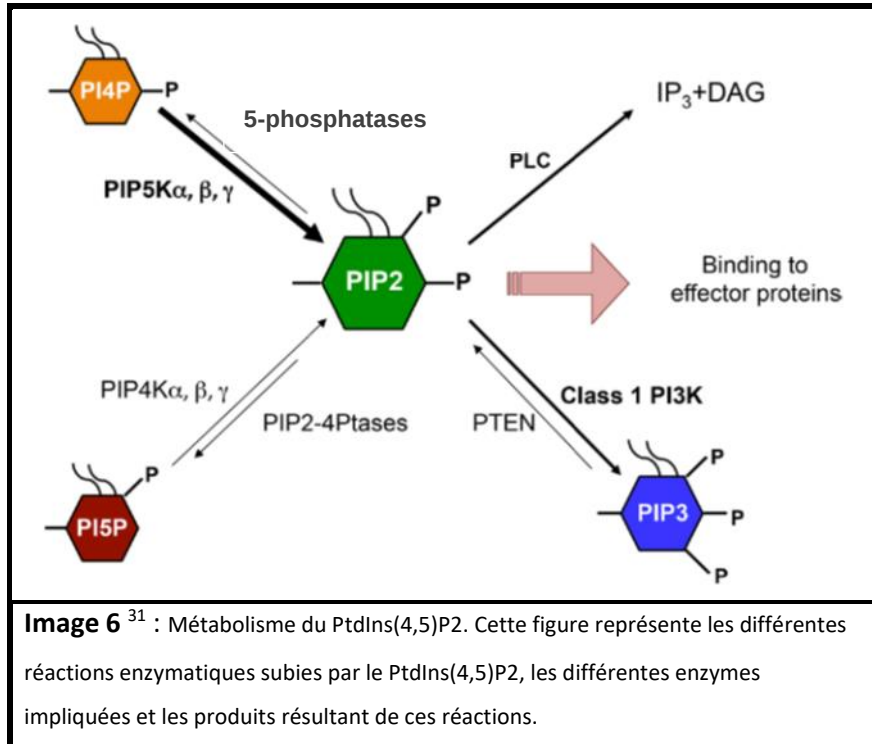


Image 5³¹ : Structure du PtdIns(4,5)P2 et formation de l'Ins(1,4,5)P3. Cette figure représente la structure du PtdIns(4,5)P2 et la formation de l'Ins(1,4,5)P3 et du diacylglycérol après l'action de la PLC_γ2, isoforme principale présente dans les lymphocytes B.

Le PtdIns(4,5)P2 est produit de différentes manières. Premièrement, à partir de phosphoinositides monophosphorylés, comme le PtdIns4P, suite à l'action de la PIP5K, ou encore à partir du PtdIns5P via l'activité de la PIP4K. Notons que dans la plupart des cellules, le PtdIns4P est la principale molécule à l'origine du PtdIns(4,5)P2³². Deuxièmement, cet inositide lipidique peut aussi être produit suite à d'autres réactions enzymatiques que des phosphorylations (**Image 6**). En effet, la déphosphorylation par hydrolyse du PtdIns(3,4,5)P3 par des phosphoinositide 3-phosphatases, famille d'enzymes à laquelle appartient PTEN, conduit également à la production de PtdIns(4,5)P2³⁰. Le PtdIns(4,5)P2 est également la cible d'enzymes. C'est le cas des PI3K qui phosphorylent le PtdIns(4,5)P2 et conduisent à la synthèse du PtdIns(3,4,5)P3, le deuxième substrat d'INPP5K.



Toutes ces enzymes contrôlent la concentration cellulaire du PtdIns(4,5)P2 dans les membranes cellulaires et, par conséquent, ses fonctions. La localisation intracellulaire du PtdIns(4,5)P2 est multiple. Bien que majoritairement retrouvé au niveau de la membrane plasmique, ce phosphoinositide est également localisé au niveau de toutes les autres membranes cellulaires ainsi que dans le noyau^{19 29}.

(b) Fonctions

Un des rôles les plus importants du PtdIns(4,5)P2 découle de son hydrolyse, par la PLC, en Ins(1,4,5)P3, un second messager. Cet inositol phosphate, via sa liaison sur récepteur IP3R situé au niveau du réticulum endoplasmique, régule la voie SOCE (Store Operated Ca^{2+} Entry). Cette voie, au sein de laquelle la liaison des protéines STIM et Orai est essentielle, est prépondérante dans la régulation de la concentration du Ca^{2+} cytoplasmique. Notons que la production de DAG, à partir du PtdIns(4,5)P2, toujours via la PLC, contrôle l'activité de la PKC^{33,34}.

Au niveau de la membrane plasmique, le PtdIns(4,5)P2 joue un rôle de régulateur des transports membranaires et plus particulièrement de l'endocytose médiée par les clathrines²⁶. Cette endocytose est la voie prédominante de l'internalisation sélective des récepteurs membranaires et de leurs ligands lorsqu'ils sont liés. Cette voie implique la formation d'un treillis de clathrines nécessaire à l'endocytose¹⁹. La formation de ces vésicules est provoquée par l'accumulation du PtdIns(4,5)P2 au niveau de la

membrane plasmique ³⁵. Une fois cette vésicule d'endocytose suffisamment grande, elle doit se refermer. Cette étape implique l'hydrolyse du PtdIns(4,5)P2 en PtdIns4P via l'action de phosphoinositide 5-phosphatases comme les synaptojanines 1 et 2 ^{36,37}.

Un autre processus membranaire dans lequel le PtdIns(4,5)P2 est impliqué est l'activation de l'assemblage du cytosquelette d'actine. En effet, ce phosphoinositide réduit la fixation et l'activité de facteurs de dépolymérisation de l'actine, comme la cofiline ou l'ADF (*actin depolymerizing factor*) ³⁸. Le PtdIns(4,5)P2 lie également des protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine, comme les protéines de la famille WASP activant le complexe Arp2/3 ³⁹. Ces interactions sont la preuve de la contribution de ce phosphoinositide dans la formation de diverses structures cellulaires découlant de la polymérisation de l'actine, comme les lammellipodiums et les filopodiums qui facilitent la migration cellulaire et sont stabilisées par des adhésions focales dont la formation est également modulée par le PtdIns(4,5)P2 ^{40,41}.

D'autre part, le PtdIns(4,5)P2 remplit un rôle important dans l'activation de canaux ioniques membranaires. En effet, plusieurs études dans lesquelles des phosphoinositide 5-phosphatases ont été surexprimées ont montré une diminution de l'activité des canaux ioniques corrélée à une diminution de la concentration de PtdIns(4,5)P2 dans la membrane. Cette diminution d'activité a été démontrée pour des canaux calcium ou potassium dépendants, des TRP (*Transient Receptor Potential*) et de multiples canaux ioniques présents au niveau des membranes. Ces résultats démontrent donc la fonction d'activateur de canaux ioniques du PtdIns(4,5)P2. Cette fonction activatrice est la conséquence de l'interaction, via la tête hydrophile du PtdIns(4,5)P2, entre ce phosphoinositide et des acides aminés chargés positivement situés dans la partie transmembranaire et la partie cytoplasmique de ces canaux ioniques ⁴². Notons que des concentrations très importantes de PtdIns(4,5)P2 semblent, paradoxalement, diminuer l'activité des canaux ioniques ⁴³.

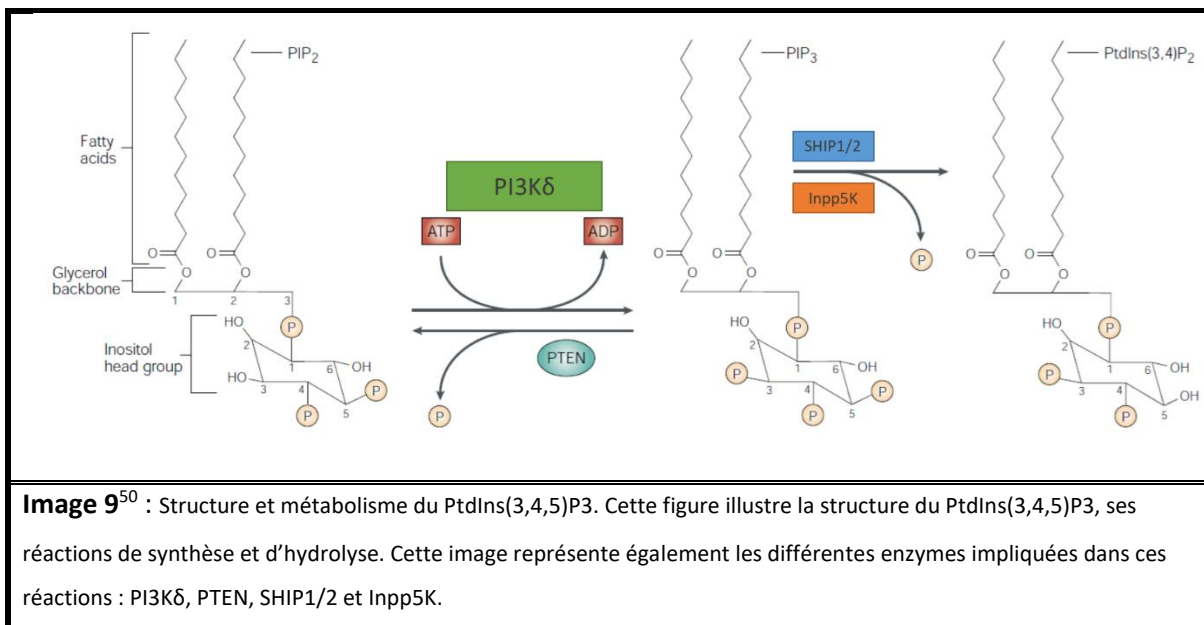
Au niveau du noyau de la cellule, le PtdIns(4,5)P2 est impliqué dans la régulation de l'expression génétique et ce à plusieurs niveaux ²⁹. Premièrement, il a été démontré que le PtdIns(4,5)P2 pouvait réguler la localisation de BAF2, un complexe protéique de remodelage de la chromatine impliqué notamment dans la réparation de l'ADN au sein de la chromatine ⁴⁴. Deuxièmement, le PtdIns(4,5)P2 est impliqué dans le contrôle direct ou indirect de l'activité de l'ARN polymérase de type II et induit, par exemple, une pause lors de l'élongation de la transcription ⁴⁵. Troisièmement, des études dans lesquelles des anticorps dirigés contre le PtdIns(4,5)P2 et les enzymes impliquées dans sa synthèse ont été utilisés suggèrent que ce phosphoinositide se localise principalement dans les *speckles* intranucléaires, lieu de stockage des facteurs d'épissage, et régule le processus d'épissage *in vivo* et *in vitro*. Ce mécanisme de régulation reste à ce jour assez flou ^{46,47}.

Finalement, le PtdIns(4,5)P₂ interagit avec différents domaines comme les domaines FERM, PDZ et PH et, par conséquent, régule la fonction des protéines possédant ces régions³⁴.

3.2. Le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate - PtdIns(3,4,5)P₃

(a) Généralités

Le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, ou PtdIns(3,4,5)P₃, est le seul phosphoinositide tri-phosphorylé. Ces phosphorylations, en raison de l'encombrement stérique, se situent au niveau des carbones 3, 4 et 5 du noyau *myo*-inositol. Le PtdIns(3,4,5)P₃, surtout localisé au niveau de la membrane plasmique, est aussi le deuxième substrat physiologique d'INPP5K. Le PtdIns(3,4,5)P₃, dans les lymphocytes B, est majoritairement synthétisé par PI3Kδ à partir du PtdIns(4,5)P₂⁴⁸. Ce phosphoinositide est également la cible d'autres enzymes : les phosphoinositide phosphatases. Celles-ci sont responsables de son hydrolyse en phosphoinositide bi-phosphorylés. Parmi ces enzymes, PTEN, une phosphoinositide 3-phosphatase, clive le phosphate en position 3 du noyau *myo*-inositol pour former à nouveau le PtdIns(4,5)P₂. Les phosphoinositide 5-phosphatases comme SHIP1/2 ou encore notre enzyme d'intérêt, INPP5K, catalysent la déphosphorylation du carbone 5 du noyau *myo*-inositol⁴⁹.



La fonction du PtdIns(3,4,5)P₃ résulte de sa capacité à fixer des protéines cytoplasmiques comportant un ou plusieurs domaines PH, et à les recruter à la membrane plasmique où elles sont phosphorylées

et activées, déclenchant donc l'activation de nombreuses voies de signalisation dont la plus connue est la voie PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT ⁵¹.

Cette voie PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT est universelle et présente dans toutes les cellules qui composent un organisme multicellulaire. Cependant, dans cet ouvrage, nous nous focaliserons sur le rôle du PtdIns(3,4,5)P3 spécifiquement dans les lymphocytes B et dans certaines voies de signalisation d'intérêt, parmi lesquelles la voie de l'IL7R.

(b) Régulation de la voie PI3K/AKT

La PI3K δ est essentielle dès le développement précoce des lymphocytes B dans la moelle osseuse. En effet, la voie de signalisation de l'IL7R, voie importante pour la survie des lymphocytes B durant les premières étapes de leur développement, active la PI3K δ ⁵². Bien que l'importance de son activation au stade Late Pro B (Fraction C), stade antérieur au stade Large Pre B (Fraction C'), soit toujours controversée, il est maintenant avéré que l'activation de la PI3K δ au stade Large Pre B est essentielle pour le développement des lymphocytes B ⁵³ (**Image 9 et 10**).

La PI3K δ , au cours du développement des lymphocytes B, est également activée par le complexe du pre-BCR, et plus précisément par le co-récepteur CD19 de ce complexe. Une fois la voie du pre-BCR activée, celle-ci induit la phosphorylation de CD19 par l'intermédiaire de la protéine SYK (*Spleen Tyrosine Kinase*) ou des protéines SFK (*Src Family Kinase*). Une fois phosphorylé, CD19 sert de point de fixation à la protéine BCAP (*B-Cell Phosphoinositide 3-Kinase Adapter Protein*), ce qui permet la liaison et l'activation de la PI3K δ à CD19 ⁵⁴. L'importance de l'activation de la PI3K δ est surtout documentée pour la synthèse et l'assemblage du BCR mature. Cet assemblage est un événement essentiel se déroulant, lors de la lymphopoïèse B, au stade Large Pre B et Small Pre B ⁵⁵.

L'activation de la voie du BCR entraîne, de la même manière, celle de la PI3K δ . Cette activation se déroule à quelques détails près comme lors de celle du pre-BCR. Les différences se situent dans le contexte et dans la résultante de l'activation. En effet, dans le cas du BCR, l'activation de la PI3K δ entraîne la prolifération et la survie des lymphocytes B matures dans les ganglions ou la rate, en vue de leur transformation ultérieure en cellules productrices d'anticorps, les plasmocytes.

Il est important de noter ici que les voies décrites plus haut ne sont pas les seules voies qui activent la PI3K δ dans les lymphocytes B. Il en existe une multitude d'autres. Cependant, dans le cas présent, nous nous sommes attardés sur les voies dans lesquelles nous avons étudié la fonction d'INPP5K.

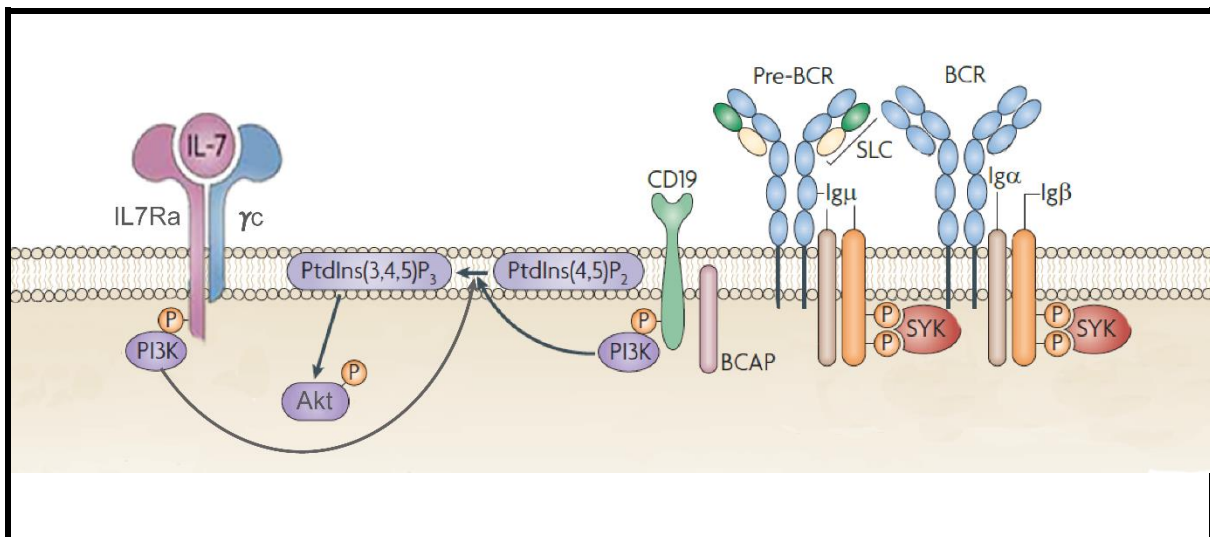


Image 10 : Activation de la PI3Kδ. La PI3Kδ, isoforme majoritaire dans les lymphocytes B, peut être activée par différents récepteurs à activité tyrosine kinase qui sont importants pour le développement et l'activation des lymphocytes B. C'est le cas du récepteur à l'IL-7, du pre-BCR et du BCR. Cette activation, médiée par la phosphorylation d'une chaîne d'un des récepteurs cité précédemment, provoque la synthèse du PtdIns(3,4,5)P₃, initiant l'activation de la voie AKT.

Une fois synthétisé à la membrane par la PI3Kδ, le PtdIns(3,4,5)P₃ recrute la protéine AKT via son domaine PH. Les trois isoformes d'AKT (AKT1, AKT2 et AKT3) sont toutes exprimées dans les lymphocytes B. Secondairement, AKT est sujette à de multiples phosphorylations dont les plus importantes se situent au niveau de la thréonine 308 (T308) et la sérine 473 (S473) ⁵⁶. Une fois positionnée à la membrane suite à sa liaison au PtdIns(3,4,5)P₃, AKT est en premier lieu phosphorylé sur la thréonine 308. Cette phosphorylation est médiée par la protéine PDK1. La phosphorylation d'AKT par PDK1 n'est rendue possible qu'une fois que ces deux protéines sont recrutées à la membrane par le PtdIns(3,4,5)P₃. En effet, ce recrutement membranaire entraîne un changement conformationnel du domaine PH d'AKT et du domaine kinase de PDK1 et, *in fine*, l'initiation de la réaction de phosphorylation sur la thréonine 308 ⁵⁷.

L'activation maximale d'AKT n'a lieu qu'une fois sa sérine 473 phosphorylée. Le complexe responsable de cette phosphorylation est mTORC2. Cette deuxième phosphorylation conforte et maintient l'état d'activation d'AKT ⁵⁸.

L'activation d'AKT est surtout importante pour la survie et la prolifération des cellules, en induisant la phosphorylation des protéines anti-apoptotiques comme BCL-2 et en provoquant l'activation du complexe mTORC1 jouant un rôle important dans la synthèse protéique ⁵⁹. Néanmoins, dans les lymphocytes B, la plus importante des fonctions d'AKT est sans doute de réguler la localisation des facteurs de transcription de la famille FOXO et, plus précisément, ses isoformes FOXO1 et FOXO3 ⁶⁰.

En effet, une fois activée, AKT migre jusqu'au noyau où elle phosphoryle triplement les protéines FOXO. Cette tri-phosphorylation entraîne, de par l'export nucléaire des protéines FOXO, leur inactivation. Bien que les protéines FOXO empêchent l'entrée dans le cycle cellulaire en induisant l'expression de gènes provoquant l'arrêt de ce cycle, dans les lymphocytes B, FOXO1 détient des fonctions plus spécifiques (**Image 11**). Dans le lymphocyte B, FOXO1 déclenche, en effet, l'expression d'EBF1, d'E2A et des recombinaisons RAG 1 et 2, protéines essentielles lors du développement précoce des lymphocytes B sur lesquelles nous reviendrons plus loin ^{61,62}.

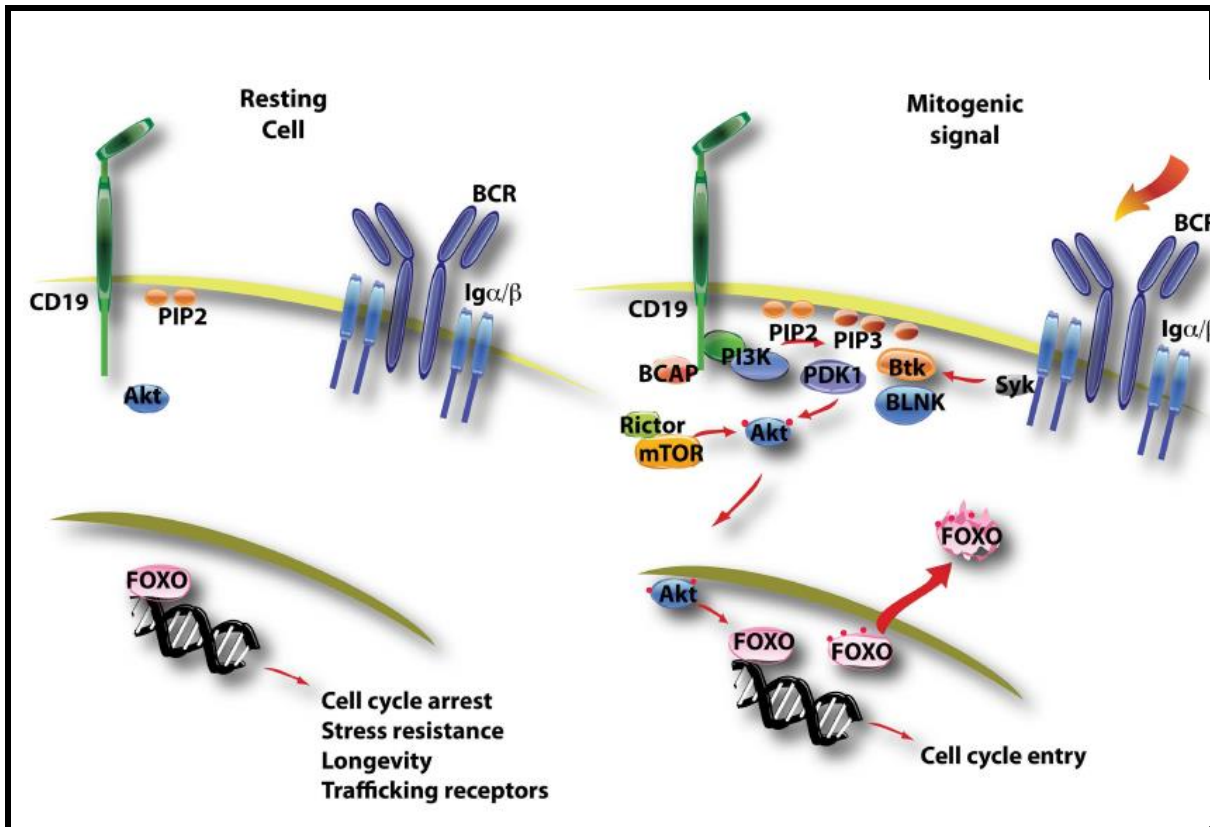


Image 11 ²⁷ : La voie PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT dans les lymphocytes B. L'activation de la voie AKT, sous contrôle indirect de l'activité catalytique de la PI3Kδ, est régulée par la perception d'un signal mitotique : la liaison de l'IL-7 à son récepteur ou celle d'un antigène au BCR, principalement. Ces signaux extracellulaires déclenchent, via AKT, la prolifération et la survie des lymphocytes B. Ces fonctions sont entre autres liées au contrôle du transfert des facteurs de transcription FoxO nucléaires vers le cytoplasme.

LES ENZYMES DU MÉTABOLISME DES PHOSPHOINOSITIDES

1. Généralités

Le précédent chapitre a souligné l'importance des fonctions attribuées aux phosphoinositides dans une grande variété de processus cellulaires. L'essence même du rôle de ces inositides lipidiques, déjà effleurée lors du chapitre précédent, est la régulation spatio-temporelle de la concentration des 7 différents phosphoinositides existants. Cette régulation prend forme dans la modification du noyau *myo*-inositol des phosphoinositides. Ce, plus particulièrement, via une alternance de phosphorylations et de déphosphorylations de ce noyau. Ces réactions sont dépendantes de l'activité d'enzymes issues de deux familles distinctes : Les phosphoinositide kinases et les phosphoinositide phosphatases. Étant donné l'appartenance de notre enzyme d'intérêt, INPP5K, à la famille des phosphoinositide phosphatases, nous ne nous étendrons que très peu sur celle des phosphoinositide kinases.

2. Les phosphoinositide kinases

Les phosphoinositide kinases, comme toutes les kinases, sont des enzymes catalysant l'ajout d'un groupement phosphate sur leur substrat porteur d'une fonction hydroxyle. L'activité de ces enzymes est dépendante de la présence d'une molécule d'ATP (adénosine triphosphate). L'ATP joue un double rôle. Elle sert de donneur de phosphate et de source d'énergie. En effet, son hydrolyse en ADP (adénosine diphosphates) libère la quantité d'énergie nécessaire à la liaison du phosphate sur le substrat (**Image 9**)⁶³.

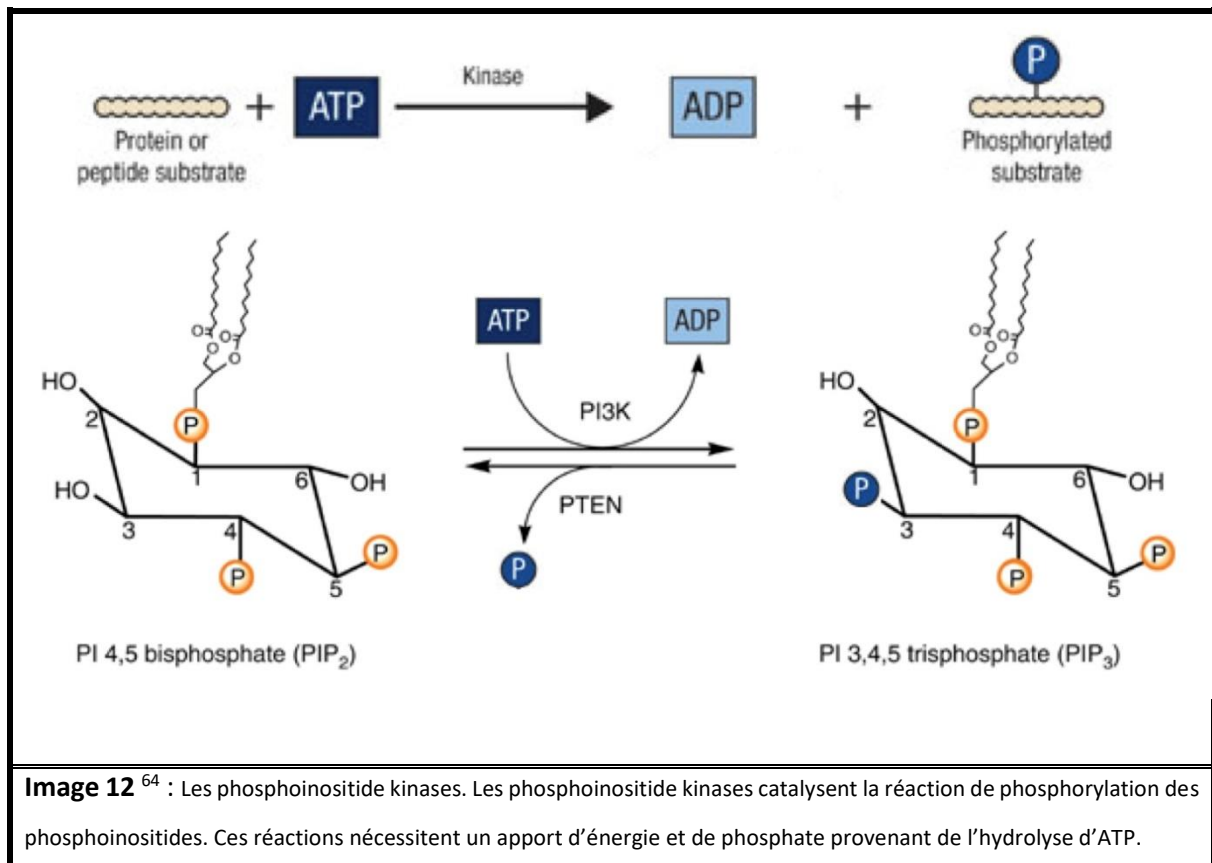


Image 12 ⁶⁴ : Les phosphoinositide kinases. Les phosphoinositide kinases catalysent la réaction de phosphorylation des phosphoinositides. Ces réactions nécessitent un apport d'énergie et de phosphate provenant de l'hydrolyse d'ATP.

La famille de phosphoinositide kinase la plus connue est sans doute la PI3K. En effet, cette enzyme, qui comme nous l'avons vu, catalyse la phosphorylation du PtdIns(4,5)P₂ en PtdIns(3,4,5)P₃, est impliquée dans la voie de signalisation d'AKT (voir régulation de la voie PI3K/PtdIns(3,4,5)P₃/AKT) ⁴. Les processus physiologiques régulés par le PtdIns(3,4,5)P₃ produit par cette enzyme sont particulièrement importants dans les cellules immunitaires. Ces fonctions sont diverses et essentielles pour la cellule, et vont du contrôle de la croissance cellulaire à la dégradation de l'ARN_m ^{65,66}.

Mentionnons également l'enzyme PI5P4K, qui catalyse la synthèse du PtdIns(4,5)P₂ à partir du PtdIns5P, principale réaction menant à la synthèse du PtdIns(4,5)P₂.

3. Les phosphoinositide phosphatases

Les phosphoinositide phosphatases, deuxième grande famille impliquée dans la régulation spatio-temporelle de la concentration des phosphoinositides, sont des enzymes catalysant l'hydrolyse d'un groupement phosphate sur un des carbones du noyau inositol. Étant donné que seuls trois carbones du noyau *myo*-inositol des phosphoinositides sont sujets à des processus de phosphorylations/déphosphorylations, 3 grandes familles de phosphoinositide phosphatases existent.

Cependant, dans le contexte de ce travail, seules les familles des phosphoinositide 3- et 5-phosphatases seront décrites ici.

3.1. Les phosphoinositide 3-phosphatases

(a) *Description*

Les phosphoinositide 3-phosphatases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse du groupement phosphate se trouvant sur le carbone en position 3 du noyau *myo*-inositol. Les substrats de ces enzymes sont le PtdIns(3,4)P₂, le PtdIns(3,5)P₂ et le PtdIns(3,4,5)P₃. L'enzyme la mieux caractérisée de cette famille est PTEN. PTEN puise la majorité de ses fonctions dans son implication au niveau de la voie PI3K/PtdIns(3,4,5)P₃/AKT, elle-même faisant partie de la voie de signalisation de l'IL7R, pre-BCR et du BCR. C'est dans ces cadres précis que nous décrirons les fonctions de PTEN.

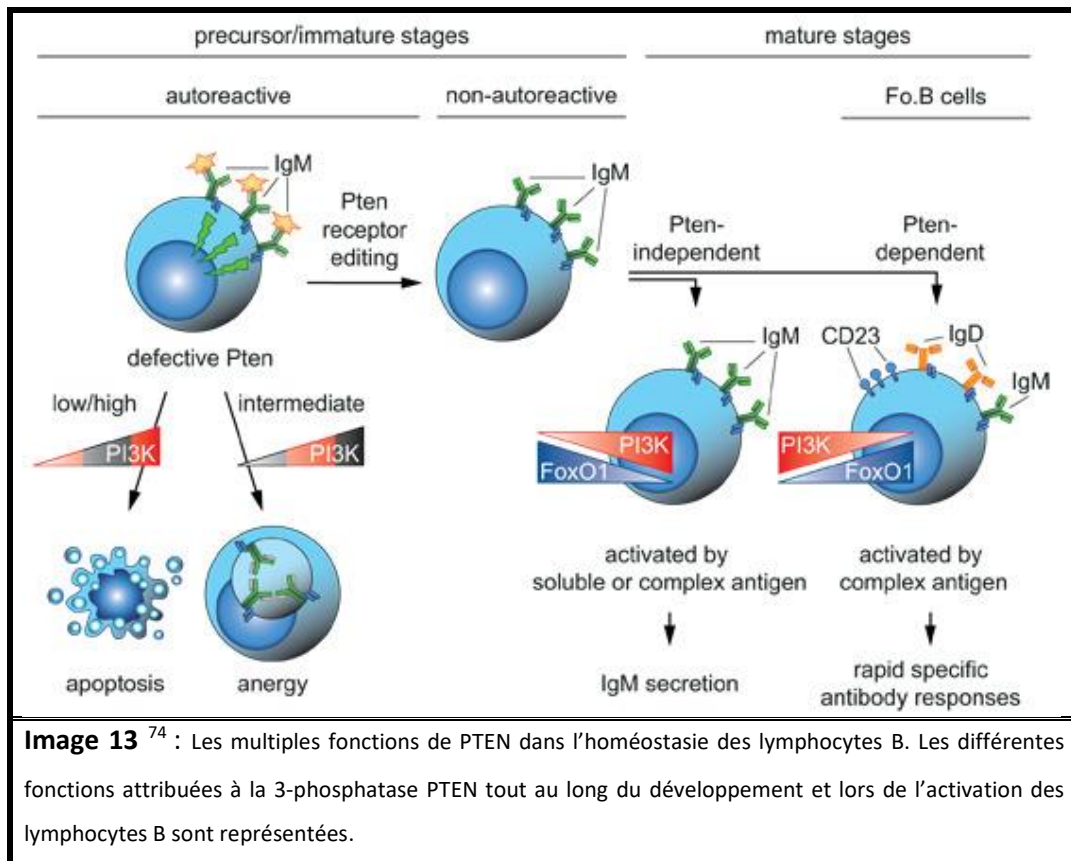
(b) *PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) et les lymphocytes B*

PTEN est un suppresseur de tumeurs qui possède plusieurs domaines protéiques, dont l'unité catalytique 3-phosphatase qui déphosphoryle le PtdIns(3,4,5)P₃ en PtdIns(4,5)P₂ ⁶⁷. Les principales fonctions biologiques de PTEN proviennent de la déphosphorylation du PtdIns(3,4,5)P₃. En effet, la capacité de PTEN à hydrolyser le PtdIns(3,4,5)P₃ lui confère un rôle antagoniste à la PI3K dans la voie de signalisation PI3K/PtdIns(3,4,5)P₃/AKT (**Image 9**) ⁶⁸. La fonction antagoniste de PTEN par rapport à la PI3K lui permet d'atténuer la voie de signalisation du pre-BCR et du BCR ⁶⁹. De par sa fonction inhibitrice de la voie PI3K/PtdIns(3,4,5)P₃/AKT, PTEN joue un rôle à différents niveaux durant la vie des lymphocytes B. Effectivement, PTEN tient une place importante dans le contrôle des processus de tolérance centrale et périphérique et est donc impliquée dans l'émergence de maladies auto-immunes.

La démonstration de ces rôles résulte de l'analyse de l'homéostasie des lymphocytes B en l'absence de PTEN. En effet, l'équipe de Markus Müschen a démontré que la présence de PTEN était essentielle au cours de la tolérance centrale dans la moëlle osseuse, précisément au stade Large Pre B (Fraction C'). En effet, la délétion totale ou partielle de PTEN provoque une hyper activation d'AKT qui induit l'élimination des lymphocytes B auto-immuns ⁷⁰.

Dans les organes lymphoïdes secondaires, PTEN est également important pour la maturation correcte des lymphocytes B en répartissant correctement les lymphocytes B transitionnels (T1B et T2B) en lymphocytes B de la zone marginale (MZB) et folliculaires (FOB) ⁷¹. La régulation de l'expression de PTEN est indispensable pour l'élimination des lymphocytes B auto-immuns. Ce rôle a notamment été

mis en évidence chez des patients atteints d'une maladie auto-immune chez lesquels l'expression de PTEN est significativement diminuée ⁷². Finalement, cette 3-phosphatase joue aussi un rôle important dans le maintien du ratio $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3/\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ au cours de la différenciation des lymphocytes B naïfs (n'ayant pas encore rencontré leur antigène spécifique) en lymphocytes B du centre germinal (GCB) (**Image 13**) ⁷³.

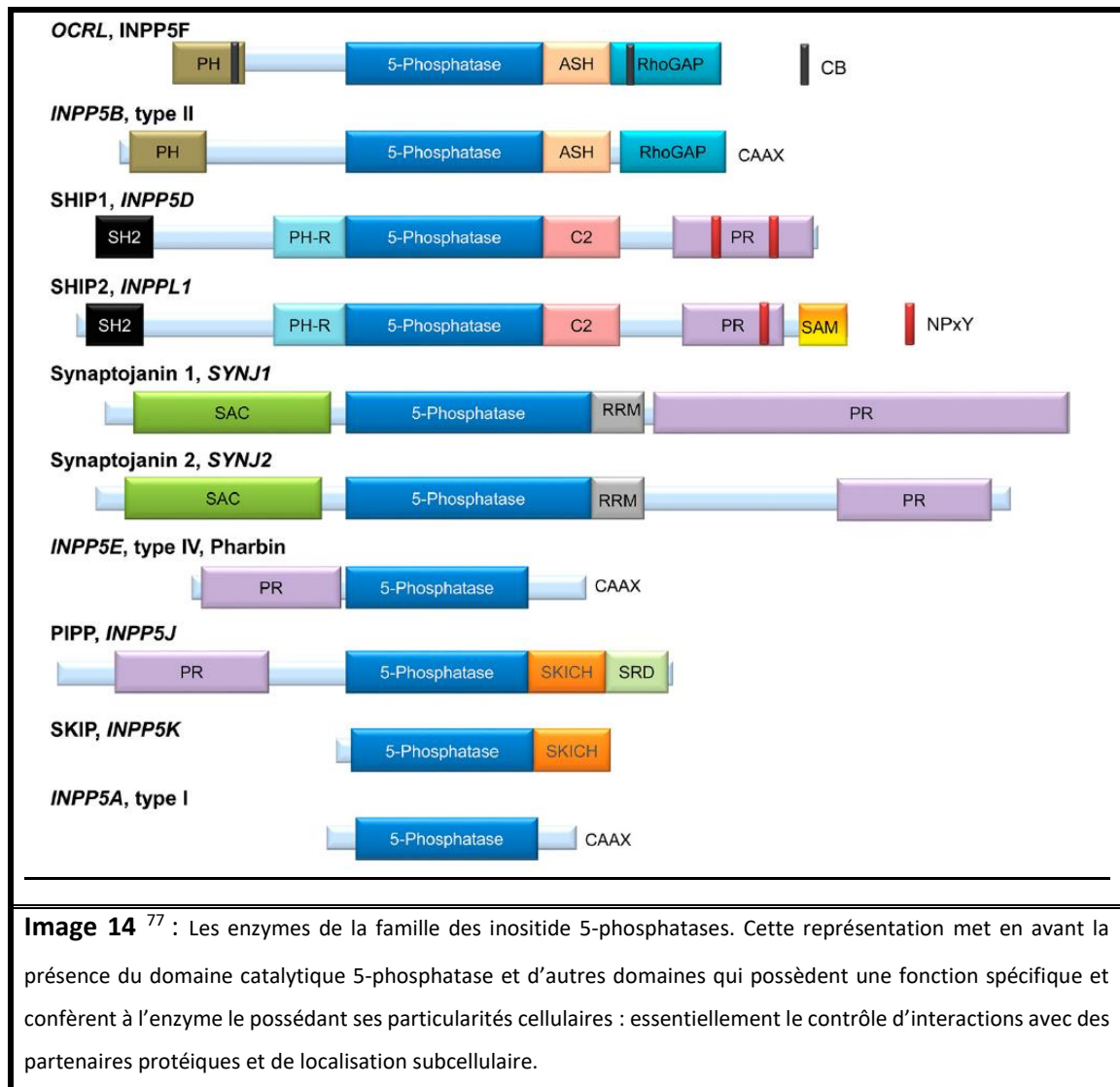


3.2. Les phosphoinositide 5-phosphatases

(a) Description

La famille des phosphoinositide 5-phosphatases comporte 10 enzymes chez les mammifères et 4 chez la levure (**Image 14**). Ces enzymes se caractérisent par la présence d'un domaine catalytique impliqué dans l'hydrolyse d'un groupement phosphate se trouvant sur le carbone en position 5 du noyau *myo*-inositol ²⁵. Ce phosphate peut se trouver sur des inositides cytoplasmiques, comme l' $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ et l' $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, ou sur des inositides membranaires, comme le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, le $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ et le $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ ⁷⁵. De plus, l'alignement des séquences protéiques des domaines 5-phosphatase des 10

membres de cette famille a permis d'identifier 6 régions protéiques conservées qui ont été utilisées pour définir cette famille. Il est intéressant de noter que le domaine 5-phosphatase de ces enzymes partage un mécanisme catalytique semblable aux endonucléases impliquées dans la réparation de l'ADN par excision de bases ⁷⁶.



Outre le domaine catalytique 5-phosphatase, les membres de cette famille possèdent d'autres domaines protéiques. Le domaine PH (Plekstrin Homology), présent au sein de la structure protéique d'INPP5F et INPP5B, impliqué dans la liaison entre ces protéiques et le PtdIns(3,4,5)P3. Le domaine PRD par exemple est présent dans la structure des Synaptojanines 1 et 2 et de Inpp5J ; ce domaine PRD, ou Proline Rich Domain, est connu pour son rôle dans les interactions protéines-protéines comme celles impliquant le domaine SH-3 ⁷⁸. Le domaine SH-2, ou Src Homology type 2, est présent dans la structure de SHIP-1 et SHIP-2 et est responsable de la liaison spécifique à certaines phosphotyrosines.

Ce domaine permet également aux protéines le possédant de moduler l'activité de certaines enzymes⁷⁹. Les domaines SAC-1 (Suppressor of ACTin) et RhoGAP (Rho GTPase Activating Protein), présents exclusivement chez les Synaptonjanines, permettent l'hydrolyse des PtdIns3P, PtdIns4P et PtdIns(4,5)P2 ainsi que du GTP^{75,80}. Le domaine ASH (pour ASPM, SPD-2, Hydin), est présent dans la structure des 5-phosphatases OCRL et Inpp5B et a récemment été identifié comme un domaine permettant d'interagir avec le centrosome⁸¹. Le domaine CAAX, présent dans la composition d'INPP5A et d'INPP5E, régule la localisation membranaire (plasmique ou nucléaire) de ces enzymes via un groupement lipidique⁸². Le domaine SAM (Steril Alpha Motif) est présent dans la structure de la 5-phosphatase SHIP-2 et intervient dans l'homo- et l'hétérodimérisation de cette dernière, ainsi que dans des liaisons de faible affinité avec différents domaines protéiques⁸³. Finalement, le domaine protéique SKICH, qui est présent dans la structure des 5-phosphatases INPP5K et INPP5J, est un domaine impliqué dans des interactions protéines-protéines et dans la localisation membranaire de ces deux enzymes⁸⁴.

(b) *Mécanisme catalytique*

Les phosphoinositide 5-phosphatases sont des enzymes hydrolysant le groupement phosphate porté par le carbone en position 5 du noyau *myo*-inositol provenant aussi bien d'inositides cytoplasmiques que membranaires. Le domaine responsable de cette réaction biochimique, et commun à toutes les enzymes de cette famille, est le domaine 5-phosphatase. Ce dernier est caractérisé par la présence de 6 sous-domaines conservés (**Image 16**)⁷⁶.

Le mécanisme utilisé par l'unité catalytique des 5-phosphatases est semblable au mécanisme d'action des endonucléases apuriques/apyrimidiques, dont le domaine catalytique est assez similaire et implique la présence d'un ion Mg^{2+} .

Avant d'être hydrolysé, le groupement phosphate sur le carbone en position 5 est maintenu dans une poche contenant 6 acides aminés (Asn379, Lys380, His400, Asp477, Asn449 et His549) grâce à l'interaction avec His400, His549, Asn449, Asp447 et avec l'ion Mg^{2+} . Ces acides aminés sont représentés en jaune sur le domaine catalytique (**Image 16**)⁸⁵. Une fois placé dans cette poche, le groupement phosphate est soumis à une attaque nucléophile par une molécule d' H_2O . Toutefois, pour que cette attaque ait lieu, la molécule d' H_2O doit être activée. L'hypothèse actuelle est que cette activation est déclenchée par Asp447, sur base de la structure d'INPP5B. Une fois hydrolysé, le phosphate inorganique résultant de l'hydrolyse et l'ion Mg^{2+} sont évacués du site catalytique par les acides aminés Asn275 et Glu303⁸⁶. La manière dont le phosphoinositide résultant de cette hydrolyse sort du site catalytique n'a pas encore été clairement élucidée.

	1	2
Inpp5A	VLLV TAN VGSLFDD-----PENLQKNWLREFYQVL-----HTHKPHFMAL HCQE FGG	
Inpp5E	LFVA TWN MQGQKEL-----PAS-LDEFL-----PTEADYTQDLYVI STQE GC-	
SHIP-1	IFIG TWN MGNAPP-----PKK-ITSWFLSKGQGK--TRDDSADYIPHDYVI STQE DP-	
SHIP-2	VFIG TWN MGSVPP-----PKN-VTSWFTSKGLGK--ALDEVTVTIPHDYVF STQENS -	
SYNJ-1	VCVG TWN VNGGKQFRSIAFNQT-LTDWLLDAPKLAGIQEFQDKRSKPTDIFAI STQEMV -	
SYNJ-2	IAVG TWN VNGGKQFRSNLLGTAE-LTDWLLDAPQLSGAVDSQDD-GSPADVFAI STQEMV -	
Inpp5K	VHV TWN VASAAP-----TVD-LSDLLQLNNQ-----D-GSPADVFAI STQEMV -	
PIPP	ITVV TWN VGTAAMP-----PDD-VTSLLHLGSG-----DLNLDIYII STQEMN -	
Inpp5B	FFVG TYN VNGQSP-----KEC-LRPWLS-----HDNDGADMI STQEVN -	
OCRL	FFVG TWN VNGQSP-----DSS-LEPWLD-----HSALAPDVYCV STQELD -	
Inpp5A	KNYEASMSHVDKFKVKELLSSDAMKEYNRARVYLDENYKSQEHFTALGSFYFLHESLKNIY	
Inpp5E	-----SDRREWET-----RLQETLGPQY	
SHIP-1	-----LGEKEWLE-----LLRHSLQEV	
SHIP-2	-----VGDRWLD-----LLRGGLKELT	
SYNJ-1	-----ELNAGNIVNASTTNQKLWAV-----ELQKTISRDN	
SYNJ-2	-----ELSAGNIVNASTTNRKMWGE-----QLQKAISRSH	
Inpp5K	-----FGIIS-L-LSDAAFEDPWSS-----LFMDMLSP-L	
PIPP	-----SMINK-R-LKDALFTDQWSE-----LFMDALGP-F	
Inpp5B	-----LSKEA-FFFHDTPKEEWFK-----AVSESLHPDA	
OCRL	-----LSTEAFYFESVKEQEWSL-----AVERGLPSKA	
Inpp5A	QFDFKAKKYKKVTGKEIYSDTLESTPMLEKEKFPQDY-----FPECKWSRKGFI	
Inpp5E	VLLS--SAAHGV--LYMS-----LFIRDLIWFCSEVEYSTVTTTRIVSQIKTKGALGVSF	
SHIP-1	SMTFKTVAIHTLWNIRIV-----VLAKPEHENRISHICTDNVKTGIANTLG NK GAVGVSF	
SHIP-2	DLDYRPIAMQSLWNIKVA-----VLVKPEHENRISHVSTSSVKTGIANTLG NK GAVGVSF	
SYNJ-1	--KYVLLASEQLVGVCLE-----VFIRPQHAPFIRDVAIDTVKTGMGGATG NK GAVAIRM	
SYNJ-2	--RYILLTSAQLVGVCLE-----IFVRPYHVPFIRDVAIDTVKTGMGGKAG NK GAVGIRF	
Inpp5K	--NFVKISQVRMQGLLL-----VFAKYQHLPIYIISTKSTPTGLYGYWG NK GGVNVCL	
PIPP	--NFVLVSTVRMQGVILL-----LFAKYHLPFLRDVQDCTRTGLGGYWG NK GGVSVRL	
Inpp5B	--KYAKVKFVRLVGIMLL-----LYVKQEHAAYISEVEAETVGTGIMGRMG NK GGVAIRF	
OCRL	--KYRKVQLVRLVGMML-----IFARKDQCQYIRDVATETTTGTGIMGKM NK GGVAVRF	
	3	
Inpp5A	CIADCAFDLV TH LFHDASNLVAVETSPSVYSGVRHK-ALGYV-L-----DRIIDQRFE	
Inpp5E	TFFGTSFLFI TS HFTSGDGKVAERL---LDYSRTIQALALPRNVPDTPNYPSSAGDVTTR	
SHIP-1	MFNGTSLGFV NS HLTSGSEKKLRN---QNYMNILRFLALGD-----KKLSPFNITHR	
SHIP-2	MFNGTSFGFV NS HLTSGNEKTTRN---QNYLDILRLLSLGD-----RQLSAFDISLR	
SYNJ-1	LFHTTSLCFV CS HFAAGQSQVKERN---EDFVEIARKLSFPMG-----RMLFS	
SYNJ-2	QLHSTSFCFV CS HLTAGQSQVKERN---EDYREITHKLSFSPG-----RNIFS	
Inpp5K	KLYGYVYI IN CHLPPHMYNNDQRL---EHFDRIELESITFEGYDV-----PNILD	
PIPP	AAFGHMLCFL NC HLPAHMDKAEQRK---DNFQTILSLQQFQGPQA-----HGILD	
Inpp5B	QLHNTSICVV NS HAAHTEEYERN---QDYRDICSRMQFPQVDPSQPP-----LTINK	
OCRL	VFHNTTFCIV NS HAAHVEEFERN---QDYKDICARMTFSVPNQTVPQ-----VNIMK	
	4	
Inpp5A	KVSYFVF EDEN FLDSKSVVETLCTKATMQTVRAADTNEVVKLIFRESNDRKVVQLEK	

Inpp5E	FDEVFWF EDENF LSGGRVAVE-----AFLKQKPE---VDVLALLQ---
SHIP-1	FTHLFWL EDINY VELPTWEAE-----AIIQKIKQ---QQYSDLLA---
SHIP-2	FTHLFWF EDINY LDMDI---Q-----EILNYISR---REFEPLLR---
SYNJ-1	HDYVFWC EDENY IDLP---NE-----EVKELIRQ---QNWDSLIA---
SYNJ-2	HDYVFWC EDINY IDLT---YE-----EVFYFVKR---QDWKKLME---
Inpp5K	HDLILWF EDNFI IEDFG--LL-----FVQESITR---KYYKELWE---
PIPP	HDLVFWF EDINFI IESYD--LH-----FVKFAIDS---NQLHQLWE---
Inpp5B	HDVILWL EDINY IEELD--VG-----KVKKLVEE---KAFQTLYA---
OCRL	HDVVIWL EDINY LCMPD--AS-----EVKSLINK---NELHKLLK---
Inpp5A	KLFDYFNQDVFRDNGTALLEFDKELSVFKDRLYELDISFPSPYPSEDSS-QGEQ----
Inpp5E	-----HDQLTREMKGKGSIF-----RGFEEAEIHFLPSYKFDIGKD-TYDS----
SHIP-1	-----HDQLLLERKDQKVF-----LHFEEEEITFAPTYRFERLTRDKYAYTKQK
SHIP-2	-----VDQLNLEREKHKVF-----LRFSEEEISFPPTYRYERGSRDYAWHKQK
SYNJ-1	-----GDQLINQKNAGQIF-----RGFLEGKVTFAPTYKYDLFSE-DYDT----
SYNJ-2	-----FDQLQLQKSSGKIF-----KDFHEGAVNFGPTYKYDVGSA-AYDT----
Inpp5K	-----KDQLFIKKNDQLL-----REFQEGPLLFPTYKFDHRHSN-NYDT----
PIPP	-----KDQLNMAKNTWPIL-----KGFQEGPLNFAPTFKFDVGTN-KYDT----
Inpp5B	-----HDQLKIQVAARTIF-----DGFTEGEITFQPTYKYDTGSD-DWDT----
OCRL	-----FDQLNIQRTQKKAF-----ADFNEGEINFVPTYKYDSKTD-RWDS----

	<u>5</u>	<u>6</u>
Inpp5A	--YMNTRC PAWCDE ILM SLSAKELVLKS-----ESEEKVATYDHI-----GPNVCM GDHKPV FLAF	
Inpp5E	--TSKQRT PSYTDI VLYKSR-----HKGDICPMKYSSCPGIKT SDHRPV YGLF	
SHIP-1	ATGMKYNL PSWCDE VLWKS Y-----PLVHVVCQSYGSTSDIMT SDHSPV FATF	
SHIP-2	PTGVRTNV PSWCDE ILWKS Y-----PETHIICNSYGCTDDIVT SDHSPV FGTF	
SYNJ-1	--SEKCR T PAWTDI VLWRRRKWPFDRSAEDLDLLNASFQDESKILYTWTPGTLHLYGRAELKT SDHKPV VALI	
SYNJ-2	--SDKCR T PAWTDI VLWWRKKHPYDKTAGELNLLDSDLGDPQIRHTWSPGTLKYYGRAELQA SDHRPV LAIV	
Inpp5K	--SEKKRK PAWTDI ILWRLKRQPSQASPLASSV-----PTSIFLLTLKKNYVSHMAYSI SHHKPV TGTF	
PIPP	--SAKKRK PAWTDI ILWKVKAPSGGPS--GR-----ESHRLQVTQHSYRSHMEYTV SDHKPV AAQF	
Inpp5B	--SEKCR A PAWCDE ILWKGK-----NITQLSYQSHMALKT SDHKPV SSVF	
OCRL	--SGKCRV PAWCDE ILWRGI-----NVNQLHYRSHMELKT SDHKPV SALF	

Image 16 : Conservation de séquence de l'unité catalytique des différentes 5-phosphatases. Les séquences en acides aminés représentent le résultat de l'alignement multiple des différentes inositide 5-phosphatases de souris par l'algorithme Clustal omega. La numérotation de 1 à 6 et les cadres rouges représentent les différents sous-domaines conservés définissant l'unité catalytique de la famille des inositide 5-phosphatases. Les acides aminés jouant un rôle direct et essentiel dans la réaction catalytique sont marqués en jaune.

(c) Importance et fonctions biologiques

Bien que la famille des phosphoinositide 5-phosphatases soit composée de 10 membres différents partageant souvent des substrats semblables, ces enzymes semblent remplir chacune des fonctions spécifiques non redondantes. En effet, des mutations touchant les gènes des différentes 5-

phosphatases ont été identifiées comme responsables de différentes maladies chez l'homme. Parmi celles-ci, la maladie de Dent et le syndrome oculo-cerebro-renal de Lowe, caractérisés par une insuffisance rénale, un retard de croissance, des altérations mentales et le développement d'une cataracte sont causées par des mutations inactivatrices dans le gène de la 5-phosphatase *Ocr1*⁷⁵. Des mutations dans le gène de la 5-phosphatase *Inpp5e* sont, elles, responsables du syndrome de Joubert et de MORM, deux ciliopathies génétiques rares⁸⁷. Des polymorphismes dans le gène *Ship-2* sont associés au développement du diabète de type II, et l'augmentation de l'expression de certaines 5-phosphatases a été démontrée dans le syndrome de Down, la maladie d'Alzheimer et le cancer.

Les 5-phosphatases jouent un rôle important dans de nombreux processus cellulaires, comme la voie de signalisation de l'insuline, le transport protéique, la phagocytose, le recyclage des vésicules synaptiques, l'homéostasie du Ca^{2+} , la prolifération et la migration cellulaire ainsi que dans la régulation de la polymérisation de l'actine (**Image 17**)^{75,77,88-90}. Il ne s'agit pas ici de faire une liste exhaustive de toutes les fonctions attribuées aux inositide 5-phosphatases, mais simplement de rendre compte de leur importance et de leurs rôles essentiels et non-redondants dans les organismes vivants. Les fonctions d'INPP5K ne sont pas décrites ci-dessus mais font l'objet d'un chapitre entier plus loin. Cependant, avant de donner une description détaillée d'INPP5K, nous allons nous attarder sur deux phosphoinositide 5-phosphatases qui jouent des rôles importants dans les lymphocytes B : SHIP-1 et SHIP-2. Les fonctions de ces deux 5-phosphatases seront uniquement décrites ici dans le contexte des lymphocytes B.

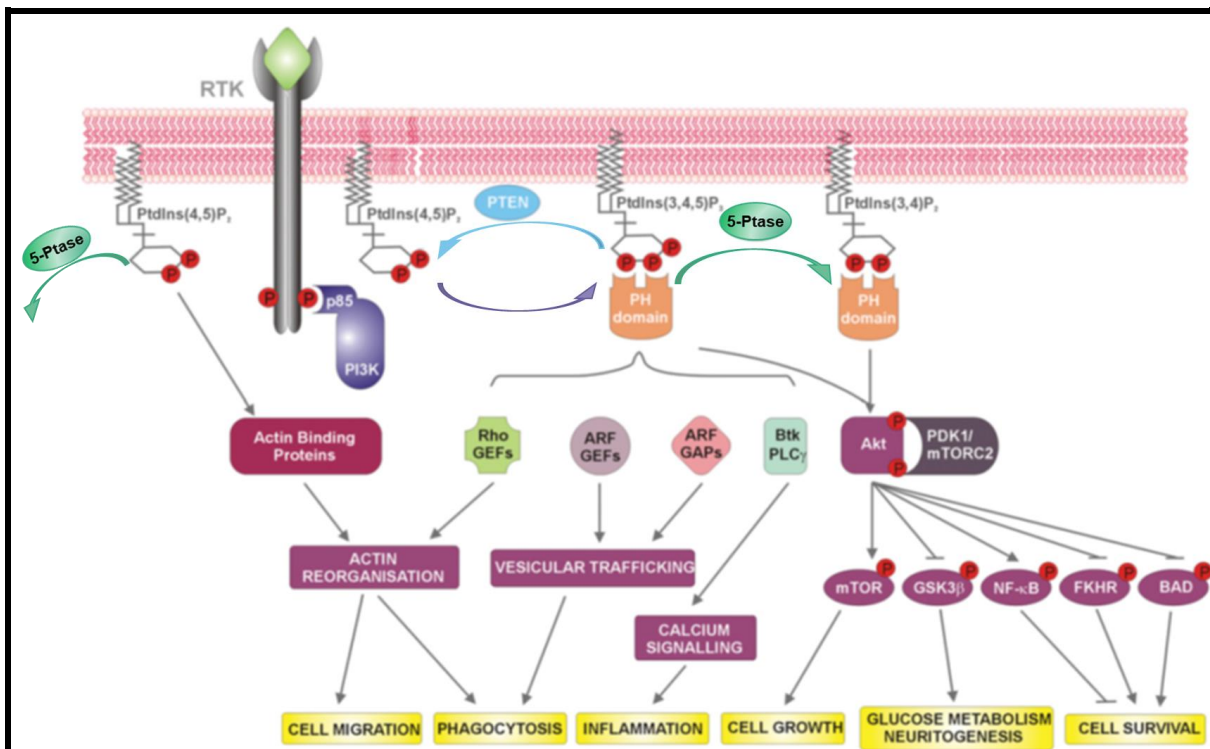


Image 17 ²⁵ : Diverses fonctions physiologiques contrôlées par les phosphoinositide 5-phosphatases. Cette image représente les différentes fonctions physiologiques qui sont sous le contrôle des phosphoinositide 5-phosphatases et qui découlent généralement de la régulation de la concentration du PtdIns(4,5)P₂ et du PtdIns(3,4,5)P₃. L'importance de ces régulations est démontrée chez l'homme par les conséquences pathologiques des mutations inactivatrices qui ciblent ces 5-phosphatases.

(d) *SHIP-1 (Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase-1) et les lymphocytes B*

La structure de SHIP-1 se caractérise, en plus de son domaine 5-phosphatase central, par la présence d'un domaine SH-2 amino-terminal et d'un domaine PRD, tous deux importants pour la localisation membranaire de l'enzyme et pour sa fixation à des récepteurs présents à la surface des lymphocytes B (**Image 14**) ^{75,88}. SHIP-1 est presque exclusivement exprimée dans les cellules hématopoïétiques où elle régule certaines fonctions immunitaires importantes ⁷⁵.

La principale fonction de SHIP-1 dans les lymphocytes B est son implication dans la régulation négative de la voie PI3K/PtdIns(3,4,5)P₃/AKT dans le contexte de la signalisation en aval des pre-BCR et BCR, via l'hydrolyse du PtdIns(3,4,5)P₃ en PtdIns(3,4)P₂ ⁴⁹. Le rôle de SHIP-1 dans ces signalisations est démontré par le développement de maladies auto-immunes ou de leucémies chez les patients dont l'expression de cette phosphatase est altérée. Dans ces contextes, la diminution de l'expression de

SHIP-1 est soit induite par la surexpression du microRNA-155, soit provoquée par des mutations génétiques ^{49,91}.

*(e) SHIP-2 (Src homology 2 (SH2) domain containing inositol
polyphosphate 5-phosphatase-2) et les lymphocytes B*

SHIP-2, tout comme SHIP-1, possède un domaine 5-phosphatase et un domaine SH2. Ces deux domaines démontrent, respectivement, 64 et 53 pourcents d'identité entre les protéines SHIP-2 et SHIP-1 ⁹². Le substrat principal du domaine 5-phosphatase de SHIP-2 est le PtdIns(3,4,5)P3. SHIP-2, au contraire de SHIP-1, contient un domaine SAM indispensable pour sa dimérisation.

Les cellules CLL, et en particulier les lymphocytes B impliqués dans cette leucémie, ont la caractéristique d'exprimer des kinases dont l'activité est dérégulée. Cette dérégulation provoque généralement un accroissement de la survie de ces cellules cancéreuses. La voie PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT figure parmi les signalisations dérégulées. Cette dérégulation apparaît surtout dans un contexte provoqué par l'augmentation de l'expression de SHIP-2 ⁹³. En effet, en agissant sur les concentrations de PtdIns(3,4,5)P3 et de PtdIns(3,4)P2, la surexpression de SHIP-2 induit la suractivation d'AKT d'une manière PtdIns(3,4)P2 dépendante. C'est précisément la suractivation d'AKT dépendante du PtdIns(3,4)P2 qui induit la survie de ces lymphocytes B leucémiques. De surcroît, la suractivation de cette phosphatase induit le maintien d'un taux élevé de calcium intracellulaire, également impliqué dans la survie de ces lymphocytes B cancéreux, même si, la corrélation entre surexpression de SHIP-2 et taux élevé de calcium intracellulaire n'est toujours pas entièrement établie **(Image 19)** ⁹⁴.

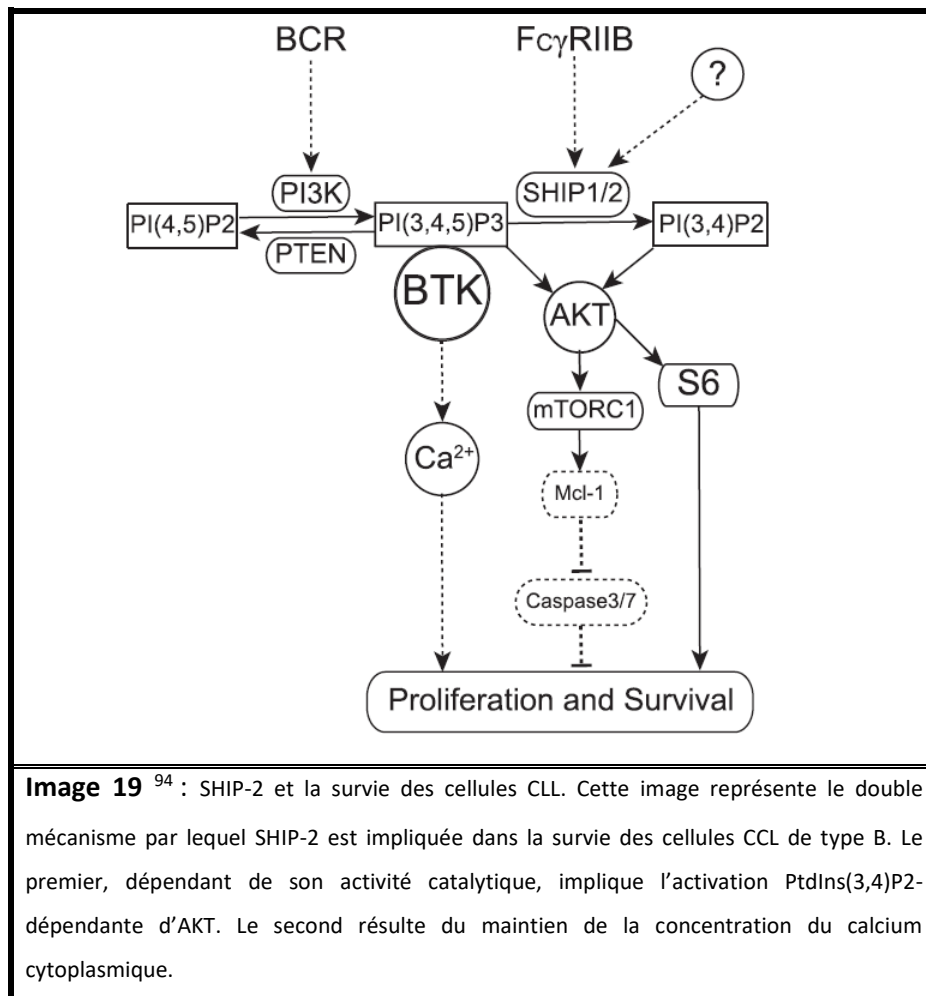


Image 19 ⁹⁴ : SHIP-2 et la survie des cellules CLL. Cette image représente le double mécanisme par lequel SHIP-2 est impliquée dans la survie des cellules CCL de type B. Le premier, dépendant de son activité catalytique, implique l'activation PtdIns(3,4)P2-dépendante d'AKT. Le second résulte du maintien de la concentration du calcium cytoplasmique.

LA PHOSPHOINOSITIDE 5-PHOSPHATASE INPP5K

1. Identification

La découverte d'INPP5K, relevant du souhait de l'équipe du docteur Takenawa d'identifier de nouvelles phosphoinositide 5-phosphatases, eu lieu en 2000. En effet, l'utilisation d'une sonde nucléotidique codant pour une partie très conservée du domaine catalytique des phosphoinositide 5-phosphatases connues a permis à cette équipe d'identifier trois transcrits différents provenant de l'épissage alternatif d'un gène codant pour une nouvelle phosphoinositide 5-phosphatase. En raison de l'expression considérable de ce nouveau gène dans le cœur, les muscles squelettiques et les reins, cette enzyme fut nommée SKIP pour *Skeletal muscle and Kidney enriched Inositol Phosphatase* ⁹⁵. Cependant, selon la nomenclature internationale acceptée, le nom officiel de cette 5-phosphatase est INPP5K, pour Inositol polyphosphate 5-phosphatase K.

L'utilisation d'un anticorps de lapin dirigé contre un fragment protéique humain d'INPP5K limité par les acides aminés 137-448 a révélé, par Western Blot, deux signaux distincts à 42 et 51 kDa sur des extraits tissulaires ⁹⁵. Par la suite, toujours sur des extraits protéiques de tissus humains, une troisième isoforme du produit de la version humaine du gène *INPP5K* a été identifiée à environ 36 kDa, cette fois-ci, avec un anticorps reconnaissant un peptide de fusion des régions C- et N-terminales de cette protéine humaine ⁸⁴.

Chez la souris, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre les 16 derniers acides aminés de la partie C-terminale de la version murine de la protéine INPP5K sur des extraits protéiques de tissus murins a permis la mise en évidence de quatre isoformes différentes : 54, 51, 42 et 36 kDa ⁹⁶.

Ces différents résultats démontrent la production de multiples isoformes protéiques à partir de la version murine ou humaine du gène codant pour la protéine INPP5K, suggérant la présence d'épissage alternatif ou encore de domaines de clivage protéolytique. Cependant, à ce jour, les raisons de la présence et la fonction spécifique des diverses isoformes de la protéine INPP5K n'ont pas encore été clarifiées. Il serait d'autant plus intéressant d'identifier leurs dissemblances fonctionnelles que la présence de ces différentes isoformes semblent être spécifiques de certains tissus ⁹⁶.

2. Structure génétique

La version humaine du gène *INPP5K*, situé sur le chromosome 17 (17p13.3) et sa version murine, localisée sur le chromosome 11 (11pB5) sont toutes deux composées de 12 exons. Bien que le nombre d'exons soit identique, le nombre d'acides aminés résultant des transcrits humains et murins est différent. Chez l'humain, la protéine compte au maximum 448 acides aminés alors que chez la souris, elle en compte 468. Malgré la prédiction d'un grand nombre de transcrits différents du gène *Inpp5K* chez la souris et chez l'humain par différentes plateformes, comme eEnsembl, seuls trois transcrits distincts chez l'humain et quatre chez la souris ont été identifiés en laboratoire.

3. Structure protéique

Les versions murines et humaines de la protéine INPP5K partagent une très grande homologie. Une des différences réside dans l'existence de 18 acides aminés supplémentaires au niveau de la partie N-terminale de la version murine.

En sa qualité de phosphoinositide 5-phosphatase, INPP5K possède un domaine catalytique 5-phosphatase. En plus de ce domaine catalytique caractéristique, cette enzyme possède un domaine N-terminal et un domaine SKICH (**Image 21**).

3.1. Le domaine catalytique 5-phosphatase

Le domaine 5-phosphatase catalyse *in vitro* l'hydrolyse du groupement phosphate positionné sur le carbone 5 du noyau *myo*-inositol de l'Ins(1,4,5)P3, l'Ins(1,3,4,5)P4, du PtdIns(4,5)P2 et du PtdIns(3,4,5)P3.

Cependant, l'activité catalytique réelle ou physiologique d'INPP5K sur certains de ces inositides reste toujours controversée. En effet, l'affinité de cette enzyme pour le PtdIns(4,5)P2 semble beaucoup plus importante que pour les trois autres substrats testés⁹⁵. De plus, une autre étude met en doute l'activité catalytique physiologique d'INPP5K sur l'Ins(1,4,5)P3 et l'Ins(1,3,4,5)P4⁸⁴. Finalement, l'utilisation de bactéries transfectées avec un plasmide d'expression pour *Inpp5K* a permis de démontrer que cette enzyme hydrolyse principalement le PtdIns(4,5)P2 mais a aussi une légère activité 5-phosphatase sur le PtdIns(3,4,5)P3⁹⁷. Ensembles, ces résultats montrent que l'Ins(1,4,5)P3 et l'Ins(1,3,4,5)P4 ne sont pas des substrats physiologiques d'INPP5K et que son substrat principal est le PtdIns(4,5)P2.

Notons cependant que ces résultats ont été générés dans des conditions qui ne sont pas parfaitement physiologiques. En effet, l'une des études a été effectuée à l'aide d'une bactérie exprimant la version

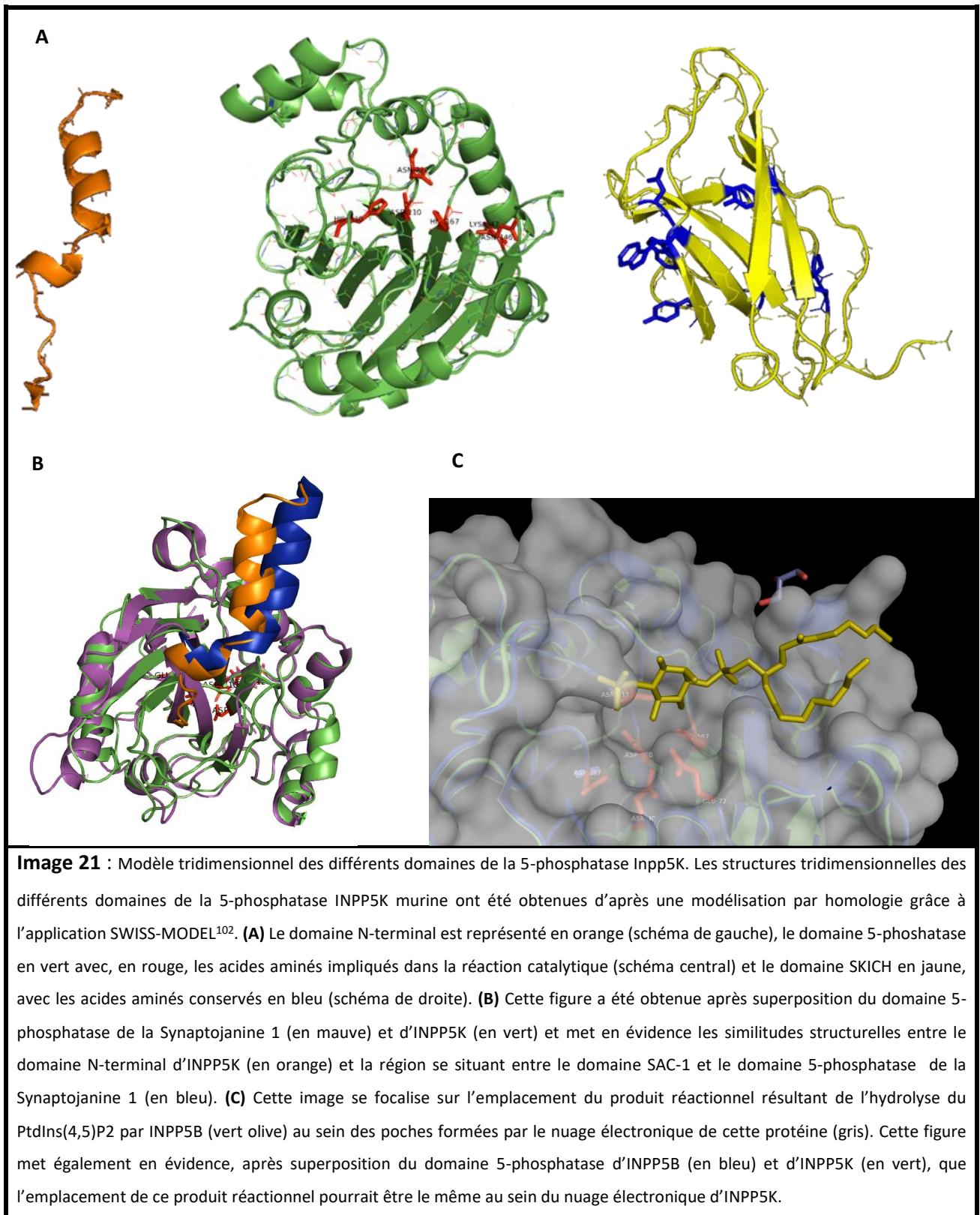
humaine d'INPP5K, tandis que dans les autres, la mesure de l'activité a été réalisée sur une protéine INPP5K couplée à la GST ou à une sonde hexa-histidine ⁹⁸.

3.2. Le domaine SKICH

Le domaine SKICH, pour SKIP Carboxyl Homology, est situé à l'extrémité C-terminale de la protéine et est responsable de la localisation subcellulaire d'INPP5K. Il est également impliqué dans des interactions entre protéines partenaires. En effet, il a été démontré dans des cellules stimulées par l'EGF ou l'insuline, que la forme complète et naturelle d'INPP5K se localisait au niveau de la membrane plasmique, tandis que la forme d'INPP5K dépourvue de ce domaine SKICH avait une distribution périnucléaire ⁸⁴. De plus, des partenaires protéiques du domaine SKICH d'INPP5K ont été identifiés, dont la protéine GRP78 et la protéine PAK1 ⁹⁹. Plus récemment, MAD2L1BP, une protéine principalement nucléaire régulant la mitose, a été identifiée comme impliquée dans la migration d'INPP5K du cytoplasme vers le noyau. Cette migration résulterait de sa translocation nucléaire à partir de la zone péri-nucléaire¹⁰⁰. Cependant, la nature précise de l'interaction entre INPP5K et MAD2L1BP reste floue. Notons que le domaine SKICH est également présent dans la protéine TAX1BP1, un régulateur négatif de NF- κ B et d'IRF3. La cristallisation de cette dernière protéine a permis de définir la structure tridimensionnelle du domaine SKICH, révélant un site de liaison potentiel aux protéines 14-3-3 ¹⁰¹.

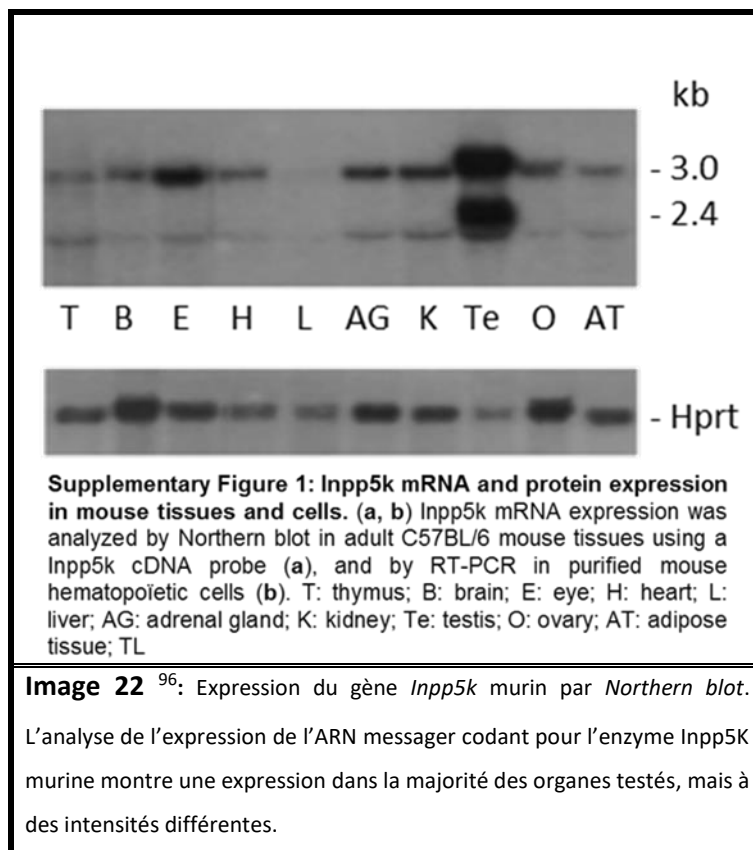
3.3. Le domaine N-terminal

Le troisième et dernier domaine présent dans INPP5K est le domaine N-terminal. Celui-ci est le plus court des trois domaines de l'enzyme et aucune fonction ne lui a encore été attribuée. De manière intéressante, c'est à ce niveau-là que réside la plus grosse différence entre les versions complètes des protéines INPP5K humaine et murine.

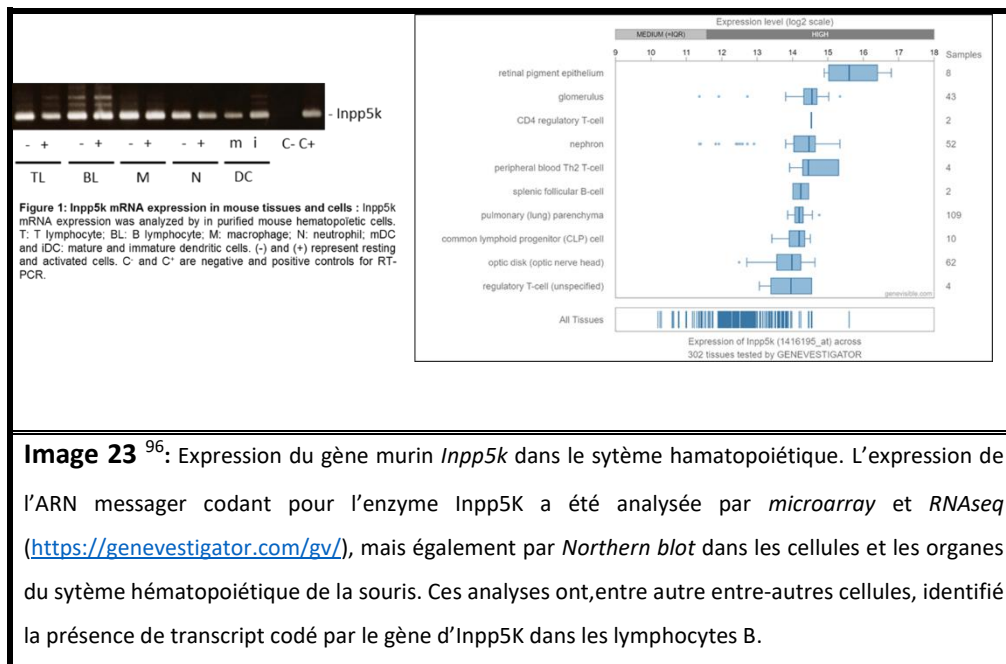


4. Expression et Localisation

Actuellement, mis à part dans le rein, aucune autre donnée n'a été publiée concernant l'expression de la protéine INPP5K naturelle dans les organes de souris ⁹⁶. En effet, la majorité des données publiées concernent l'expression de l'ARN_m codant pour cette 5-phosphatase. L'analyse par *Northern blot* de l'expression de l'ARN_m codant pour *Inpp5K* montre une expression dans la quasi-totalité des organes testés chez la souris, à savoir le thymus, le cerveau, l'œil, le cœur, les glandes surrénales, les reins, les testicules, les ovaires et les tissus adipeux (**Image 22**).



Comme nous l'avons observé, la 5-phosphatase *Inpp5K* est exprimée de manière ubiquitaire. Ceci est d'autant plus vrai pour le système hématopoïétique où l'expression de l'ARN_m codant pour le gène *Inpp5K* a été mise en évidence dans de très nombreux types cellulaires, dont les lymphocytes B avant et après activation (**Image 23**) ⁹⁶.



La localisation intracellulaire de la protéine INPP5K est double et dépendante des conditions de stimulation de la cellule. Dans des conditions normales, non stimulées, cette enzyme se trouve principalement dans la région périnucléaire et colocalise avec deux marqueurs du réticulum endoplasmiques : la calnexine et la concanavaline A. Cependant, dans des cellules stimulées par l'EGF ou l'insuline, INPP5K se localise au niveau de la membrane plasmique, plus particulièrement au niveau des *ruffles* membranaires, où la polymérisation de l'actine est importante⁸⁴. Il est intéressant de noter que la localisation intracellulaire d'INPP5K est généralement contrôlée par des interactions avec d'autres protéines, comme par exemple avec ARL6IP1, GRP78 ou encore PAK1^{100,103}. Bien que la nature exacte de ces interactions ne soit pas encore entièrement élucidée, ces interactions impliqueraient au moins le domaine SKICH d'INPP5K¹⁰⁰. Finalement, et même si son mécanisme d'entrée dans le noyau reste toujours inconnu, il a été montré que l'enzyme INPP5K était aussi présente dans le noyau des hépatocytes infectés par le HBV (Hépatite B Virus). Une fois dans le noyau de ces cellules, cette 5-phosphatase inhibe l'expression de gènes viraux durant la réplication du virus¹⁰⁴.

4.1. Fonctions

Actuellement, relativement peu de fonctions ont été attribuées à la 5-phosphatase INPP5K *in vivo* dans un contexte tout à fait physiologique. En effet, la majorité des fonctions qui ont été définies pour cette enzyme l'ont été *in vitro* ou en culture cellulaire suite à l'expression hétérologue de l'enzyme. De cette constatation vient l'intérêt d'entreprendre des études portant sur l'identification de la ou des fonctions d'INPP5K *in vivo* chez la souris.

(a) Régulation de la voie de l'insuline

La capacité d'INPP5K à hydrolyser le PtdIns(3,4,5)P3 en PtdIns(3,4)P2 lui confère un rôle potentiel dans la voie de signalisation de l'insuline et dans celle de certains facteurs de croissance. Cette régulation est médiée par la voie PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT. Dans des cellules musculaires squelettiques en culture non stimulées, INPP5K se localise au niveau de la face cytosolique du RE. Cette localisation est contrôlée par la protéine GRP78 grâce à la liaison établie entre cette dernière protéine et le domaine SKICH d'INPP5K ^{99,105}. Cependant, dans des conditions de culture induisant un stress du RE, des altérations de repliement des protéines apparaissent. La production de ces protéines altérées à une double conséquence qui mène à la translocation membranaire d'INPP5K. D'une part, elles permettent l'activation d'ATF6 et de XBP1, tous deux des facteurs de transcription qui induisent l'augmentation de l'expression du gène *Inpp5K*. D'autre part, elles déclenchent la migration du complexe GRP78-INPP5K, par un mécanisme encore inconnu, vers la membrane plasmique ^{103,105,106}.

Suite à la stimulation des cellules par l'insuline, Takenawa et ses collaborateurs ont montré que le complexe INPP5K-GRP78 migre vers la membrane plasmique. Une fois positionné au niveau de cette membrane, INPP5K se détache de la protéine GRP78 et lie, également via son domaine SKICH, la forme active de la protéine PAK1, formant un complexe avec PDK1 et AKT2. Ceci active finalement INPP5K qui peut, à présent, hydrolyser le PtdIns(3,4,5)P3. Cette hydrolyse empêche PDK1 d'activer/phosphoryler AKT2. L'hydrolyse du PtdIns(3,4,5)P3 par INPP5K mène donc à l'inhibition de la voie de signalisation insuline/PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT. De cette inhibition résulte une résistance à l'insuline ^{106,107}. À côté de son rôle dans l'inhibition de la réponse intracellulaire à l'insuline, INPP5K a une autre fonction inhibitrice dans le métabolisme du glucose. En effet, Takenawa, une fois de plus, a montré que cette enzyme lie, sous la tutelle de PAK1, la GTPase RAC1 (*ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*). Cette dernière induit la translocation du transporteur de glucose GLUT4 au niveau de la membrane plasmique. Une fois positionné dans la membrane, ce transporteur GLUT4 permet l'entrée du glucose dans la cellule. Cependant, la liaison de RAC1 avec INPP5K inhibe cette entrée, empêchant en même temps la translocation du transporteur GLUT4 vers la membrane plasmique (**Image 24**) ^{107,108}.

Dans le but de confirmer les résultats obtenus par l'analyse de cultures cellulaires sur le rôle d'INPP5K dans la voie de signalisation de l'insuline, le groupe de Takenawa a généré des souris INPP5K^{-/-} (Pps^{Brdm1/Brdm1})¹ et INPP5K^{+/-} (Pps^{Brdm1/+}). Les souris INPP5K^{-/-} meurent pendant la vie embryonnaire au jour E 10.5. L'analyse des souris INPP5K^{+/-}, via l'étude de la tolérance de ces souris à l'insuline, au glucose et de l'activation de la voie insuline/PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT dans les muscles squelettiques,

¹ Souris génétiquement modifié possédant une mutation décalant le cadre de lecture génétique à partir de l'exon 7 dans le gène codant pour INPP5K.

a montré que l'inactivation d'un seul allèle du gène *Inpp5k* entraînait une légère augmentation de la sensibilité à l'insuline ¹⁰⁹.

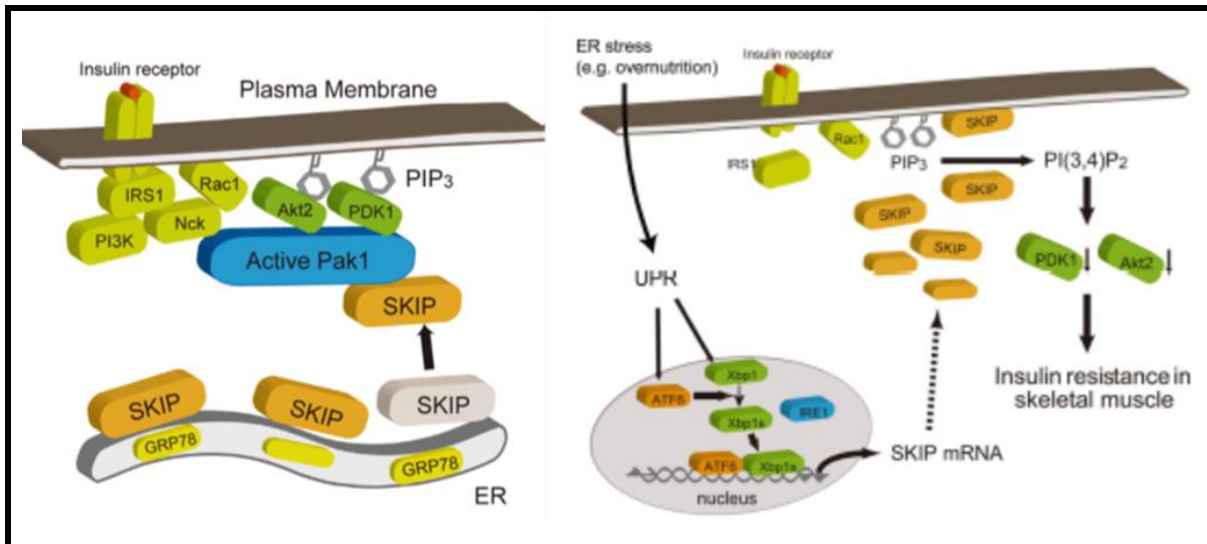


Image 24 ¹⁰³: Effet inhibiteur d'INPP5K dans la voie de signalisation de l'insuline. Lorsque les cellules musculaires squelettiques sont stimulées par l'insuline, INPP5K migre de sa localisation au niveau du RE vers la membrane plasmique. Une fois relocalisé au niveau de cette membrane, INPP5K hydrolyse le PtdIns(3,4,5)P3 en PtdIns(3,4)P2, prévenant l'activation d'AKT2 et limitant la réponse cellulaire à la stimulation par l'insuline.

(b) Osmorégulation

De par la forte expression d'INPP5K dans le rein, le rôle de cette 5-phosphatase dans ce tissu a été investigué dans une souris transgénique sur-exprimant INPP5K. Ces souris transgéniques, dont la surexpression d'INPP5K a été réalisée via la transfection de lentivirus dans les embryons, présentent une plus faible osmolarité plasmique que les souris contrôles et l'expression des gènes AVPR2 et AQP2, codant pour le récepteur à la vasopressine V2 et pour l'Aquaporine-2, est significativement plus importants dans le rein de ces souris transgéniques. Ces deux protéines sont en fait deux composants clés de la voie de signalisation impliquée dans le contrôle de la concentration de l'urine finale par les cellules du tube collecteur du rein. Ces résultats définissent donc le rôle d'INPP5K dans la régulation de l'osmolarité plasmique via le contrôle de la voie de signalisation AVPR2/AQP2 et du métabolisme de l'eau dans le tube collecteur du rein chez la souris ⁹⁶.

(c) Régulation de la migration cellulaire

La surexpression du gène *Inpp5k* a été mise en évidence dans des cellules de glioblastome, des tumeurs primaires cérébrales ¹¹⁰. Pour investiguer la fonction d'INPP5K dans ces cellules tumorales, l'équipe du Dr. CA Mitchell a produit des cellules de glioblastome sur-exprimant ou sous-exprimant INPP5K. Ces nouveaux outils ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel d'INPP5K dans la migration de ces cellules et dans la formation des adhésions focales. En effet, grâce à son action catalytique sur le PtdIns(4,5)P₂, qui normalement stabilise les adhésions focales et stimule la polymérisation de la F-actine, INPP5K contrôle négativement la formation du cytosquelette. De plus, Mitchell et ses collaborateurs ont montré que, dans les cellules de glioblastome sur-exprimant INPP5K, les lamellipodium, des protrusions membranaires induisant la migration cellulaire, sont instables. Or, le maintien de ces protrusions cellulaires est favorisé par le PtdIns(4,5)P₂. Ces travaux montrent qu'INPP5K régule de manière négative la migration des cellules de glioblastome ¹¹¹.

(d) Régulation de la différenciation cellulaire

INPP5K est également fortement exprimé dans les cellules musculaires. Il a été montré que MYOD, un facteur de transcription spécifique des cellules musculaires, contrôle l'expression de l'ARN_m et de la protéine INPP5K ¹¹². De plus, l'extinction de l'expression du gène codant pour cette 5-phosphatase dans des lignées de cellules musculaires a montré une corrélation avec l'expression de la myogénine. La myogénine est une protéine dont le pic d'expression a lieu 48 heures après l'initiation de la différenciation des cellules musculaires en culture. De manière intéressante, le traitement avec un inhibiteur d'AKT des cellules musculaires chez lesquelles l'expression d'INPP5K est réduite reverse le phénotype. Ces travaux démontrent le rôle régulateur d'INPP5K sur la voie de signalisation PI3K/PtdIns(3,4,5)P₃/AKT dans un autre contexte physiologique que celui de la réponse à l'insuline, celui de la différenciation musculaire. Le fait que l'expression de l'IGF-II, un facteur de croissance jouant un rôle critique dans la différenciation musculaire et dont l'expression est contrôlée par la voie de signalisation PI3K/PtdIns(3,4,5)P₃/AKT, soit significativement diminuée dans les cellules musculaires où l'expression d'INPP5K est éteinte montre la capacité d'INPP5K à inhiber la différenciation des cellules musculaires en culture ^{113–115}.

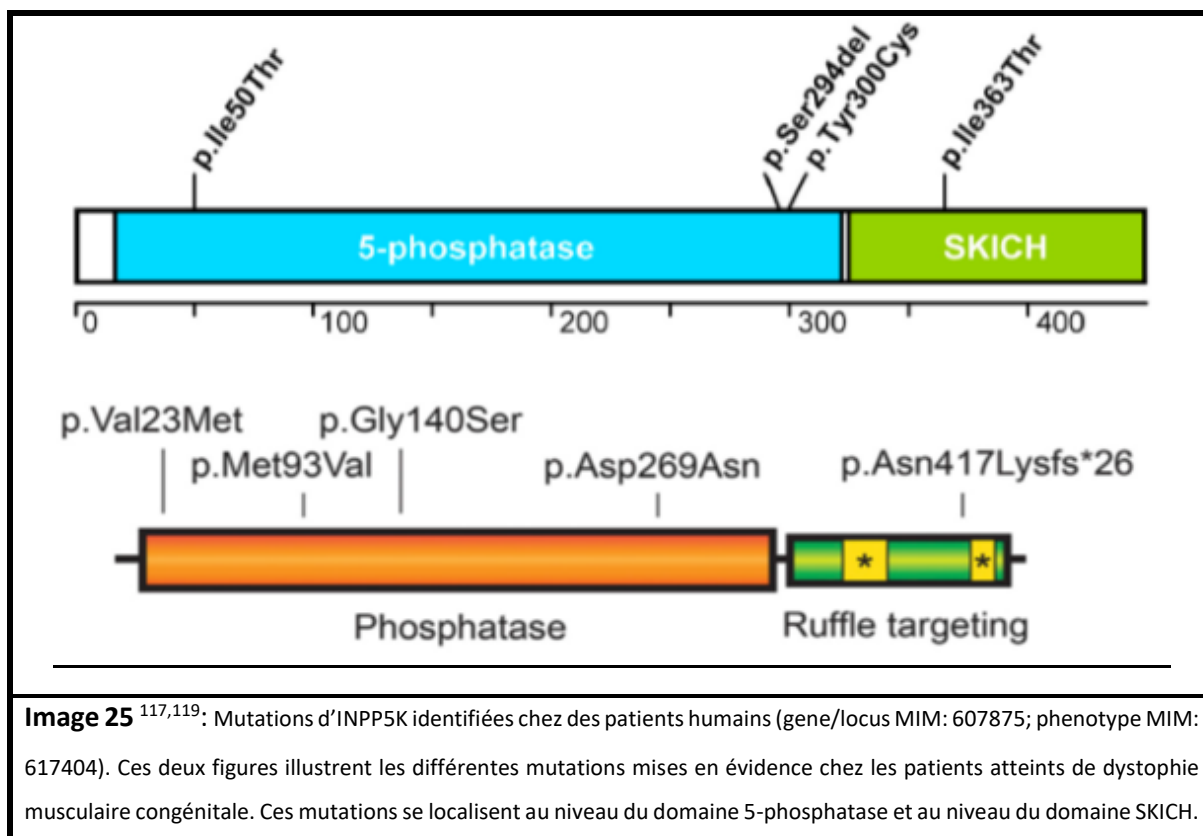
(e) Contrôle de la structure du RE

Comme nous l'avons précédemment mentionné, INPP5K interagit à la face cytoplasmique du RE avec la protéine ARL6IP1 dont les mutations génétiques sont responsables d'anomalies structurales du RE

¹⁰⁰⁻¹¹⁶. En 2018, il a été démontré que l'inactivation d'INPP5K provoque une diminution des tubules du RE en favorisant l'expansion de ses feuillettes à la périphérie de la cellule. De manière intéressante, ce phénotype reproduit celui lié à la délétion de la protéine ARL6IP1. L'intégrité des domaines 5-phosphatase et SKICH d'INPP5K est essentielle pour cette fonction. Cependant, le contrôle de la structure du RE ne semble pas impliquer le PtdIns(4,5)P2. En effet, lors de l'inactivation d'INPP5K dans ce système, aucune altération de la distribution ou de la quantité du PtdIns(4,5)P2 n'a été détectée ¹⁰⁰.

(f) Implication dans des maladies humaines

En 2017, deux équipes de chercheurs ont identifié des mutations dans le gène *INPP5K* chez des patients atteints d'une forme de dystrophie musculaire congénitale associée à une cataracte et à un retard de développement cérébral ¹¹⁷⁻¹¹⁹. Les mutations identifiées chez ces patients se localisent au niveau du domaine 5-phosphatase, diminuant son activité catalytique sur le PtdIns(4,5)P2, ou du domaine SKICH provoquant alors une localisation subcellulaire altérée (**Image 25**) ^{117,119}. À la vue de ces résultats, il semblerait que le PtdIns(4,5)P2 puisse être considéré comme facteur pathogénique important dans cette maladie complexe. Il faut noter ici qu'à l'exception d'une augmentation de l'expression de l' α -dystroglycan, aucun autre marqueur musculaire n'est altéré chez ces patients, au contraire de patients souffrant d'autres dystrophies musculaires. Ce n'est que très récemment que l'équipe du Dr C.A. Mitchell a identifié le rôle d'INPP5K dans le développement de ces dystrophies musculaires. En effet, de par la perte importante de leur fonction d'hydrolyse du PtdIns(4,5)P2 des versions mutantes d'INPP5K présentes chez les patients atteints de cette pathologie, la régénération des lysosomes lors de l'autophagie ne se réalise pas correctement dans les cellules musculaires. C'est précisément, dans ce contexte, que cette précédente altération est responsable du développement de dystrophie musculaire¹²⁰.



(g) Prédictions de fonctions

Le locus du gène *INPP5K* est localisé, chez l'homme, sur le chromosome 17 et, plus particulièrement, au niveau 17p13.3. La disparition de ce locus est associée au développement de plusieurs cancers chez l'homme ¹²¹. De plus, il a été montré que le gène de cette 5-phosphatase était sous-exprimé dans le cancer de l'endomètre ¹²². Ces deux données expérimentales suggèrent que la 5-phosphatase INPP5K pourrait jouer un rôle de suppresseur de tumeur *in vivo* chez l'homme.

Le stress oxydatif dans la maladie de Parkinson est un des mécanismes pouvant jouer un rôle dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques. L'urée est une molécule qui joue un rôle antioxydant très important dans le sérum. De fait, un taux faible d'urée dans le sérum des patient atteint de Parkinson est un facteur prédisposant au développement de cette maladie. Or, une association entre un SNP identifié dans le gène *Inpp5k* et une diminution de la concentration de l'urée dans le sérum a été établie. Cette découverte, selon les auteurs, pourrait signifier qu'INPP5K joue un rôle dans le développement de la maladie de Parkinson ¹²³.

LA BIOLOGIE DES LYMPHOCYTES B

1. La Moëlle osseuse

1.1. Description globale

Le système hémato-lymphoïde est composé d'une multitude de cellules matures et fonctionnelles dont le développement s'effectue dans les organes lymphoïdes primaires. Hormis les lymphocytes T, issus du thymus, l'ontogénie de toutes les autres cellules hématopoïétiques, chez le mammifère adulte, se déroule dans la moelle osseuse. Celle-ci se localise dans la cavité centrale des os longs. Parmi le développement de ces cellules, nous retrouvons celui des lymphocytes B.

La structure anatomique de la moelle osseuse peut être simplifiée en différentes niches ou sous-structures anatomiques qui représentent chacune, en réalité, un microenvironnement local qui maintient et régule un type bien défini de cellules souches ou de progéniteurs ¹²⁴. Ces niches sont généralement emplies de cellules non-hématopoïétiques (cellules endothéliales, cellules stromales,...) interagissant par le biais de cytokines et de facteurs de croissance avec les cellules hématopoïétiques en cours de développement. Ces interactions ont pour but de réguler la survie, la différenciation et la prolifération de ces progéniteurs hématopoïétiques ^{125,126}. Parmi ces niches, notre intérêt se portera surtout celle des cellules HSC (*Hematopoietic Stem Cells*) et celles des progéniteurs de lymphocytes B.

2. La différenciation des lymphocytes B

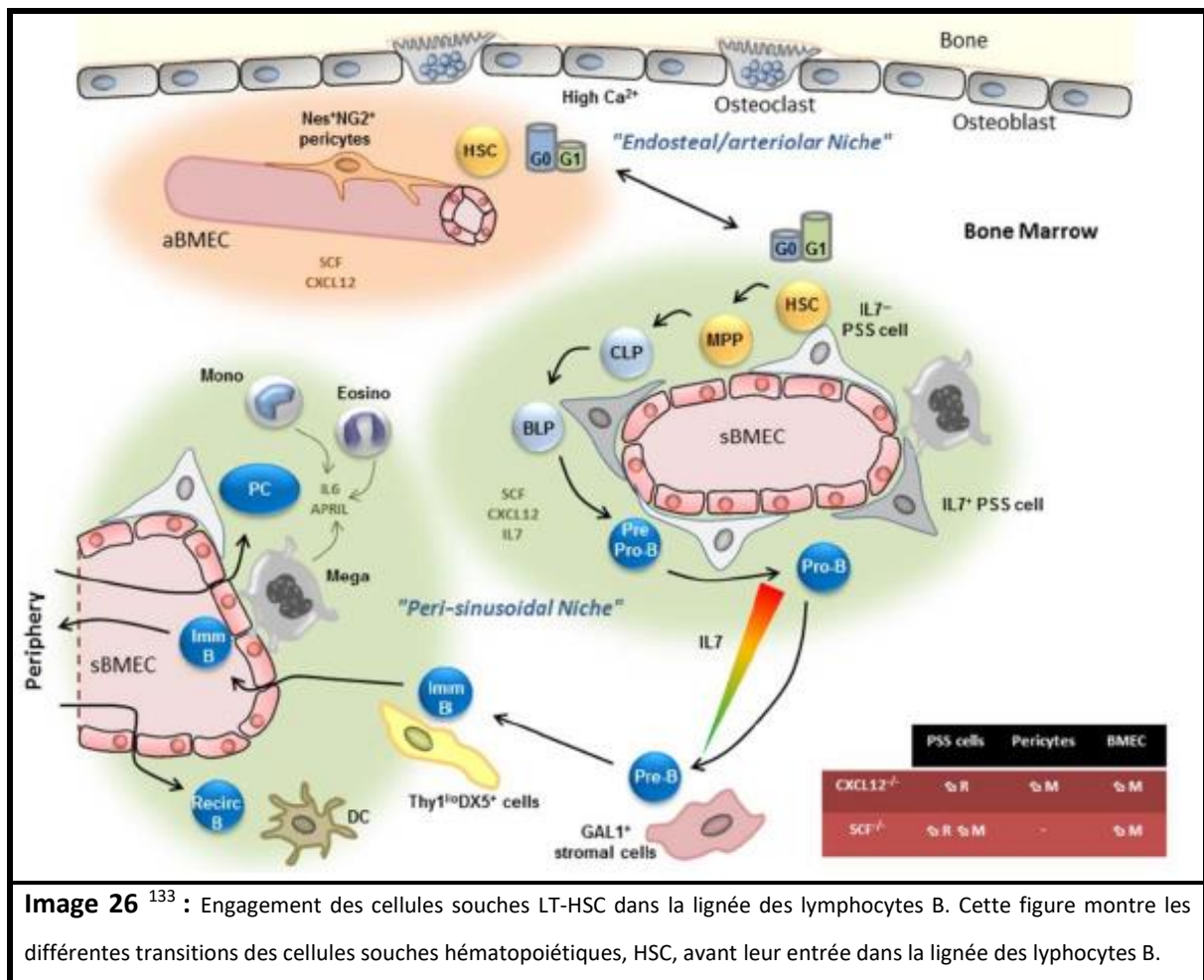
2.1. Engagement dans la lignée des lymphocytes B

Comme mentionné ci-dessus, il existe une niche à laquelle est apparentée un type bien spécifique de cellules souches : les cellules HSC (*Hematopoietic Stem Cells*). Ces cellules sont les précurseurs de toutes les cellules hématopoïétiques connues à ce jour, des érythrocytes aux lymphocytes B en passant par les cellules dendritiques. Au-delà de leur propriété totipotente, les HSC possèdent la caractéristique d'une longévité de vie importante et d'une capacité d'auto-renouveaulement ¹²⁷.

Avant d'entrer dans la lymphopoïèse B et de former des lymphocytes B matures et fonctionnelles, les HSC doivent transiter par diverses étapes de différenciation. Bien que souvent représentés comme une population cellulaire homogène, les HSC se déclinent en trois types cellulaires distincts. Cette déclinaison repose sur le degré qu'ont ces cellules à s'auto-renouveler, à leur durée de vie et à leur

propension à se différencier ¹²⁸. Ainsi, cette déclinaison comprend les LT-HSC (Long Term - Hematopoietic Stem Cells) , les IT-HSC (Intermediate Term - Hematopoietic Stem Cells) et les ST-HSC (Short-Term Hematopoietic Stem Cells) ¹²⁹.

Par la suite, ces cellules enclencheront progressivement l'expression de gènes spécifiques à une lignée hématopoïétique bien particulière et perdront graduellement, par la même occasion, leur propriété totipotente. Dans le cas échéant, c'est-à-dire l'engagement dans la lignée des lymphocytes B, les HSC destinés à devenir des lymphocytes B perdront, dans un premier temps, leur totipotence ainsi que leur capacité d'auto-renouvellement pour un pouvoir de différenciation restreint vers la lignée lymphoïde et myéloïde. Ces cellules, les LMPP (*lymphoid-primed multipotent progenitor*), se distinguent de leur prédécesseurs par l'enclenchement de l'expression de la tyrosine kinase FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*) responsable de la perte de cette capacité d'auto-renouvellement ¹³⁰. La progression des cellules LMPP en progéniteurs communs des lymphocytes, ou CLP (*Common Lymphoid Precursor*), marque l'entrée des cellules dans la lignée lymphoïde. Les cellules CLP se caractérisent principalement par l'augmentation de l'expression du récepteur à l'IL-7 (IL7R) ¹³¹. Ces cellules gardent la capacité de se différencier en lymphocytes B, en lymphocytes T et en cellules NK (*Natural Killer*). Il faudra attendre la transition des CLP en BLP (*B Lymphoid Progenitor*), caractérisée par l'expression de la protéine Ly6D, pour une entrée quasi exclusive dans la lignée des lymphocytes B (**Image 26**) ¹³².



2.2. La lymphopoïèse B

L'entrée des cellules dans la lignée des lymphocytes B est marquée par l'expression de la protéine de surface B220 (*Protein tyrosine phosphatase, receptor type C*). L'acquisition de ce marqueur de surface, caractéristique de toutes les cellules de la lignée des lymphocytes B, marque l'entrée dans l'étape la plus précoce de différenciation de cette lignée: l'étape PrePro B (Fr.A)¹³³. La suite de la différenciation des lymphocytes B peut être vue comme une acquisition progressive d'un BCR fonctionnel reconnaissant uniquement un antigène du non-soi. La transition de chaque étape de différenciation est liée d'une part à un événement de recombinaison du BCR, à un processus de sélection et à une reprogrammation génétique importante. De cette reprogrammation découle l'expression de marqueurs cellulaires utilisés pour identifier les cellules à chaque stade de différenciation de la lignée des lymphocytes B. L'expression différentielle de ces marqueurs est utilisée pour qualifier les différents stades de différenciation des lymphocytes B dans la moelle osseuse, mais plusieurs nomenclatures ont émergé. Présentement, nous utiliserons la nomenclature dite de « Hardy ». Cette

dernière scinde les étapes de différenciation en fractions. Ces fractions s'étalent de la Fr. A (PrePro B) à la Fr.F (lymphocytes B matures circulants) (**Image 27**)¹³⁴.

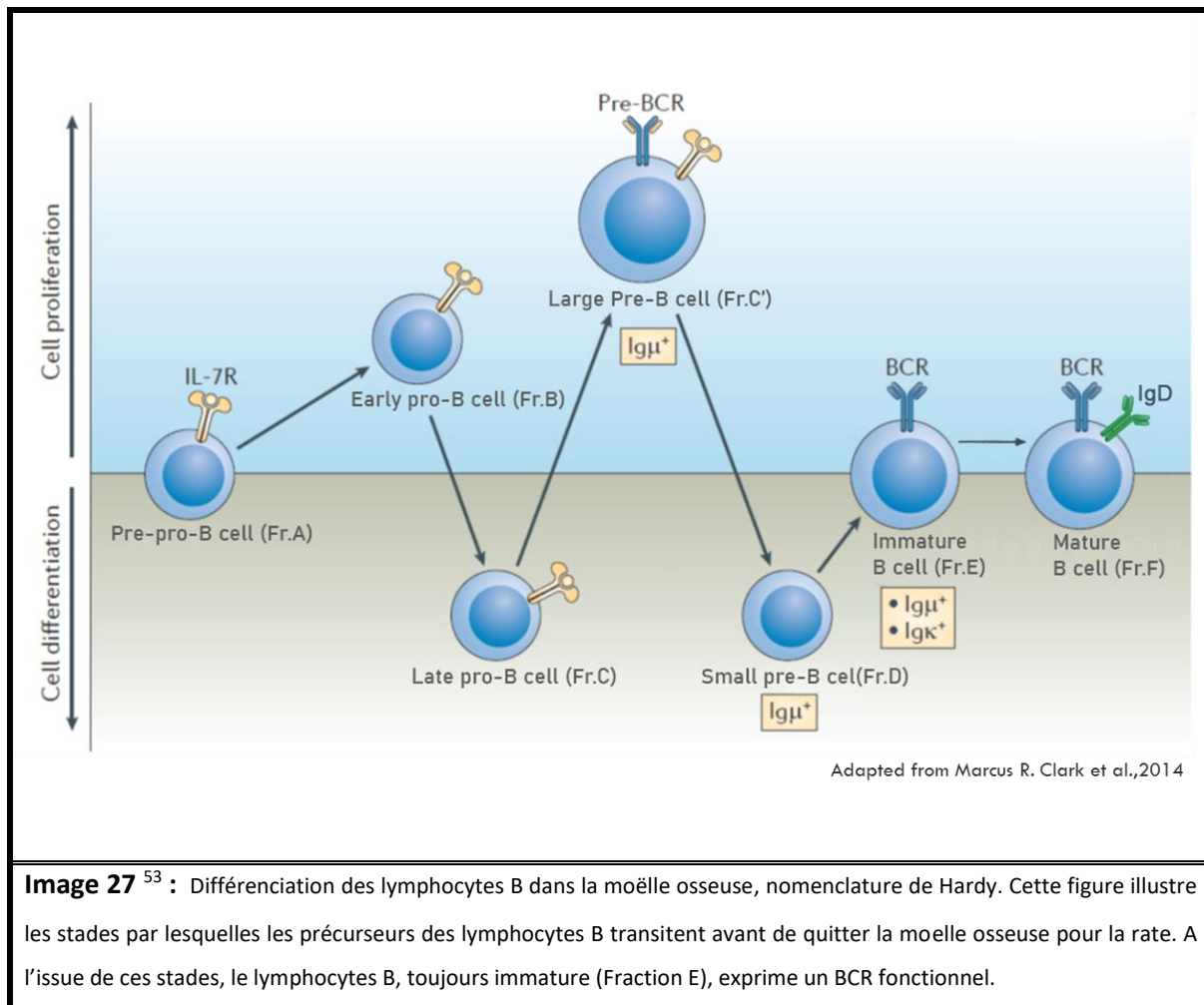


Image 27⁵³ : Différenciation des lymphocytes B dans la moëlle osseuse, nomenclature de Hardy. Cette figure illustre les stades par lesquels les précurseurs des lymphocytes B transitent avant de quitter la moëlle osseuse pour la rate. A l'issue de ces stades, le lymphocytes B, toujours immature (Fraction E), exprime un BCR fonctionnel.

(a) Stade PrePro B – Fr. A

Au-delà de l'expression de la protéine de surface B220, la transition des BLP vers le stade PrePro B ou Fr. A requiert une localisation particulière dans une micro-niche spécifique : IL-7⁺/CXCL12⁺⁺. À ce jour, trois micro-niches par lesquelles les lymphocytes B transiteront durant leur différenciation ont été identifiées : IL-7⁺⁺/CXCL12⁻, IL-7⁺/CXCL12⁺, IL-7⁻/CXCL12⁺⁺ (**Image 28**)¹³⁵. Au cours de la différenciation des lymphocytes B, le déplacement entre ces différentes micro-niches est rendu possible par la variation de l'expression des récepteurs IL7R et CXCR4 (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 4*). La transition du stade PrePro B, ou Fr. A, vers le stade suivant est associé à la migration vers une micro-niche IL-7⁺⁺/CXCL12⁻. À ce moment, la voie de signalisation du récepteur à l'IL-7 est prédominante et cette voie enclenche l'expression de trois facteurs de transcription : E2A, EBF1 et PAX5, qui sont essentiels pour l'initiation et le maintien de l'engagement dans la lignée des lymphocytes B (**Image 28**)

¹³⁶⁻¹³⁷. La voie de signalisation du récepteur à l'IL-7 est impliquée de manière diversifiée pendant la transition de la Fr. A à la F. C'. À la vue de son importance tant pour le développement des lymphocytes B que pour la thématique de cette thèse, une section entière lui sera consacrée plus loin.

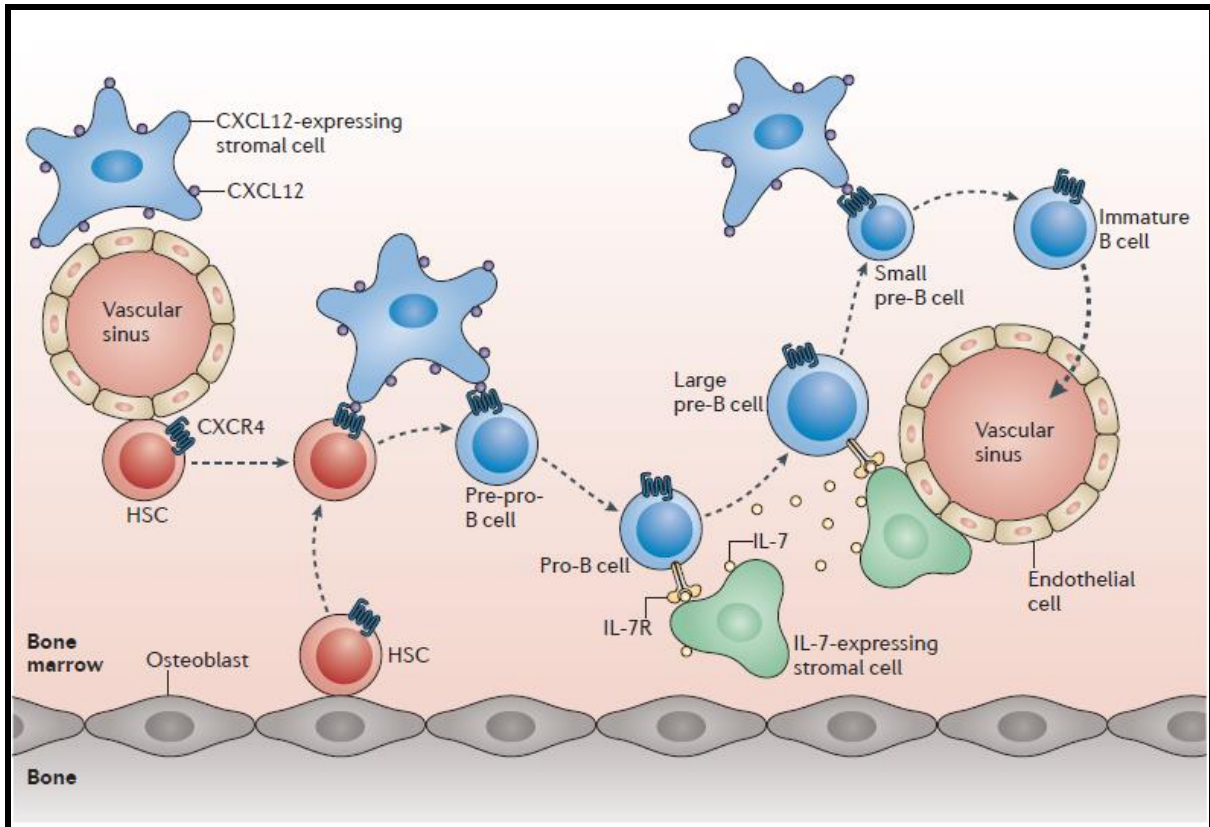


Image 28 ⁵³: Les différentes micro-niches impliquées dans la différenciation des lymphocytes B. Les cellules PrePro B nouvellement formées migrent d'une micro-niche IL7/CXCL12⁺⁺ vers une micro-niche IL7⁺⁺/CXCL12⁻ où elles se différencient en Early et Late Pro B (Pro-B). Par la suite, les cellules Late Pro B se dirigent vers une micro-niche IL7⁺/CXCL12⁺ pour transiter vers le stade Large Pre B pour finalement migrer vers une micro-niche IL7/CXCL12⁺⁺ afin de se différencier en Small Pre B et finalement en Immature B.

(b) Stades Early et Late Pro B – Fr. B et C

Aux stades Early Pro B et Late Pro B (ou Fr. B et C), les cellules se localisent dans une micro-niche IL-7⁺⁺/CXCL12⁻. Cette localisation permet l'établissement d'un ancrage dans la lignée des lymphocytes B. Tout ceci fait suite à l'expression antérieure d'EBF1¹³⁸. En effet, EBF1 est responsable de l'augmentation de l'expression du facteur de transcription considéré comme le gardien de l'identité et de la fonction des lymphocytes B : PAX5 (*PAir Box 5*). L'inactivation de PAX5 dans ces cellules provoque un arrêt strict de la différenciation des lymphocytes B au stade Early Pro B (ou Fr. B) ¹³⁹.

Ce rôle de gardien identitaire provient de sa capacité de régulation d'une très grande gamme de gènes. D'une part, PAX5 est impliqué dans la répression de l'expression de gènes responsables de l'engagement dans d'autres lignée cellulaire. PAX5 réprime, entre autre, l'expression de M-CSF (*Macrophage Colony stimulating Factor*) requis pour le développement des macrophages, ou encore de NOTCH1 qui permet la spécification dans la lignée des lymphocytes T ¹⁴⁰. D'autre part, PAX5 enclenche la production d'une centaine de protéines caractéristiques des lymphocytes B. C'est le cas pour la production du corécepteur CD19, des protéines CD79B et BLNK (*B Cell Linker*), toutes impliquées dans la voie du BCR. PAX5 induit également la production des recombinaisons RAG1/2 (*Recombination Activating 1/2*) responsables de la recombinaison des différents segments de l'immunoglobuline de surface (IgS), un composant du BCR ¹⁴¹. Nous pouvons également noter le rôle de PAX5 dans le maintien de l'expression d'EBF1 ¹⁴². Au-delà de sa fonction de facteur de transcription, PAX5 régule une étape cruciale pour la transition des cellules de la Fr. B et de la Fr. C : la recombinaison des segments V (*Variable*), D (*Diversity*) et J (*Joining*) de la chaîne lourde de l'immunoglobuline de surface (IgS). Plus précisément, PAX5 provoque la contraction du locus *Igh* permettant ainsi le rapprochement de ces différents segments ¹⁴³. La différence majeure entre la Fr. B et la Fr. C réside dans le type de recombinaisons qui a lieu à ces deux stades. En effet, durant le stade Early Pro B, ou Fr. B, la recombinaison a lieu entre les segments D et J de la chaîne lourde de l'IgS de surface (**Image 29**).

Par contre, le stade Late Pro B ou Fr. C, se caractérise par la recombinaison du segment V avec les segments DJ nouvellement recombinaisonnés ¹⁴⁴. Ces événements de recombinaisons D_H-J_H et $V_H-D_HJ_H$ sont étroitement liés avec l'activation de la voie du récepteur à l'IL-7. En outre, cette voie de signalisation régule à la fois positivement et négativement ces événements de recombinaison. Positivement, en enclenchant indirectement l'expression des recombinaisons RAG1/2 et en rendant le locus *Igh* accessible à ces recombinaisons ^{145,146}. Et négativement, de par son action sur l'induction transcriptionnelle de la cycline D3 qui favorise l'entrée dans le cycle cellulaire. Or, l'entrée dans le cycle cellulaire induit la dégradation de RAG1/2 ^{147,148}.

Notons qu'au cours de ces deux stades de différenciation, un réseau transcriptionnel complexe est responsable des changements phénotypiques de ces cellules. Si, lors de cette section, nous n'avons qu'effleuré la complexité de ce réseau, c'est tout bonnement parce qu'une section entière lui sera dédiée.

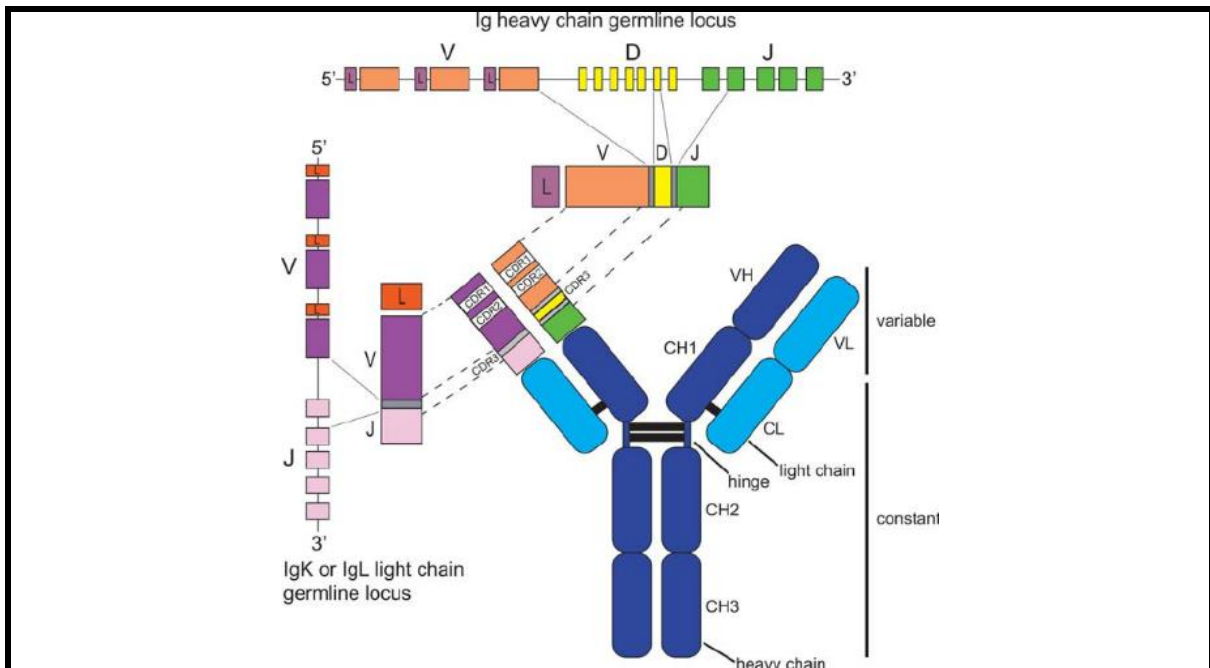


Image 29 ¹⁴⁹ : Les différents segments composant les chaînes lourdes (H) et légères (L) de l'immunoglobuline membranaire. Ce schéma représente les différents segments composant la chaîne lourde (VDJ) et légère (VJ). Ces segments sont associés au cours des différentes étapes de la différenciation des lymphocytes B. Les segments de la chaîne lourde subissent une recombinaison au cours des stades Early et Late Pro B, tandis que la recombinaison des segments de la chaîne légère a lieu au stade Large Pre B. Etant donné que chaque famille de segment (V, D et J) est composée de différents exons, il en résulte un accroissement de la diversité du répertoire des Ig membranaires synthétisées.

(c) Stades Large, Small Pre B et Immature B – Fr. C', D et E

L'entrée dans le stade Large Pre B (ou Fr. C') est initiée par la migration vers une micro-niche IL7⁺/CXCL12⁺ et par l'assemblage de la chaîne lourde nouvellement recombinaisonnée avec la pseudo-chaîne légère ou SLC (*Surrogate Light Chain*) pour former le pre-BCR (*pre-B Cell Receptor*). Cette pseudo-chaîne est composée de deux polypeptides VpreB et $\lambda 5$ ¹⁵⁰. À la suite de cet assemblage, afin de vérifier la fonctionnalité de la chaîne lourde nouvellement synthétisée, une étape de sélection positive a lieu. Ce processus, au cours duquel la signalisation du pre-BCR est testée, est un des composants de ce qui est nommé la tolérance centrale ¹⁵¹. La voie de signalisation en aval du pre-BCR joue un rôle prédominant pour la poursuite de la transition vers le stade Small Pre B, ou Fr.D. D'une part, la voie de signalisation du pre-BCR entre directement en compétition avec celle du récepteur à l'IL-7, en atténuant l'activation de cette dernière. L'atténuation de la voie du récepteur à l'IL-7 est si importante qu'à ce stade, c'est la voie du pre-BCR qui est maintenant en charge de l'induction de la prolifération et de la survie des cellules. D'autre part, la voie du pre-BCR initie l'expression du facteur IRF4, ce qui entraîne l'ouverture du locus *Igk* et la recombinaison des segments V et J de la chaîne légère via

l'activation de RAG1/2, ainsi que l'accroissement de l'expression du récepteur CXCR4 provoquant, par la même occasion, la migration des cellules du stade Large Pre B vers une niche IL-7/CXCL12⁺⁺ ^{152,153}.

La recombinaison des segments V et J de la chaîne légère et leur association à la chaîne lourde induisent, *de facto*, la synthèse d'un BCR. Ce récepteur occupe, de par son rôle essentiel dans l'activation des lymphocytes B, une place centrale dans la biologie de ces cellules. La synthèse du BCR ainsi que le positionnement au niveau d'une micro-niche IL7/CXCL12⁺⁺ marque l'entrée de ces cellules dans le stade Small Pre B, ou Fr. D.

Les cellules de la Fr. D sont soumises à une ultime étape du processus de tolérance centrale : la sélection négative. Celle-ci vise à tester l'auto-réactivité du BCR. L'issue de cette sélection est quadruple. Premièrement, le signal intracellulaire délivré par le BCR à la suite de la liaison d'un antigène du soi est fort. Ceci provoquera la mort de la cellule par apoptose. Ce processus est connu sous le nom de *délétion clonale*. Deuxièmement, ce signal intracellulaire intense peut aussi induire une nouvelle étape de recombinaison des segments de la chaîne légère de l'IgS. Nous parlerons dans ce cas de *réédition du récepteur* puisqu'un autre BCR sera synthétisé sur base de la nouvelle recombinaison de la chaîne légère. Troisièmement, si le signal intracellulaire émis à la suite de la liaison de l'auto-antigène au BCR est faible, la cellule deviendra *anergique* : l'expression du BCR à la surface de la cellule et la signalisation en aval de ce dernier seront fortement diminuées. La quatrième et dernière issue est celle où, suite à la liaison à un antigène du soi, la signalisation intracellulaire en aval du BCR est intermédiaire (entre faible et forte, donc). Dans ce dernier cas de figure, le lymphocyte B ne subit aucun changement au niveau de la structure de son BCR et continue sa maturation. Une fois cette ultime étape passée, les cellules transitent par le stade Immature B, ou Fr. E. Ceci termine leur développement dans la moelle osseuse et ces cellules positivement et négativement sélectionnées migrent finalement vers les organes lymphoïdes secondaires pour achever leur maturation ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

3. La voie de signalisation du récepteur à l'interleukine-7 (IL7R)

La transition des précurseurs des lymphocytes B vers le stade Early Pro B ou Fr. B, est caractérisée par l'acquisition complète de l'identité spécifique aux lymphocytes B, mais également par une expansion très prononcée de ces cellules précurseurs. Ces processus sont contrôlés par une voie de signalisation mise en place à ce stade : la voie du récepteur à l'interleukine-7 (IL7R). En effet, la cascade de signalisation en aval de ce récepteur contrôle l'expression de PAX5 et, de manière exclusive au stade Early Pro B ou Fr. B, la survie et la prolifération des cellules. L'importance de cette voie, à ce stade, est démontrée par le blocage sévère de la différenciation des lymphocytes B au stade Early Pro B chez les souris déficientes pour l'IL-7, l'IL7R α ou un des composants importants de cette voie ^{157,158}. Notons que

le rôle de la voie de signalisation de l'IL7R n'est pas, dans la lignée des lymphocytes B, exclusive aux cellules du stade Early Pro B (Fr. B). Cette voie contrôle également d'autres fonctions entre le stade PrePro B (Fr. A) et le stade Large Pre B (Fr. C'). Néanmoins, c'est au stade Early Pro B (Fr. B) que sa fonction est plus importante.

3.1. La signalisation

La voie du récepteur à l'IL-7 a pour principale fonction de transmettre un signal adaptatif aux cellules exprimant l'IL7R à la suite de la liaison de l'interleukine-7 (IL-7) sur ce récepteur. Dans le contexte de la lymphopoïèse B, cette cytokine est sécrétée par les cellules stromales et les ostéoblastes de la moelle osseuse ¹⁵⁹.

(a) *Adaptation membranaire*

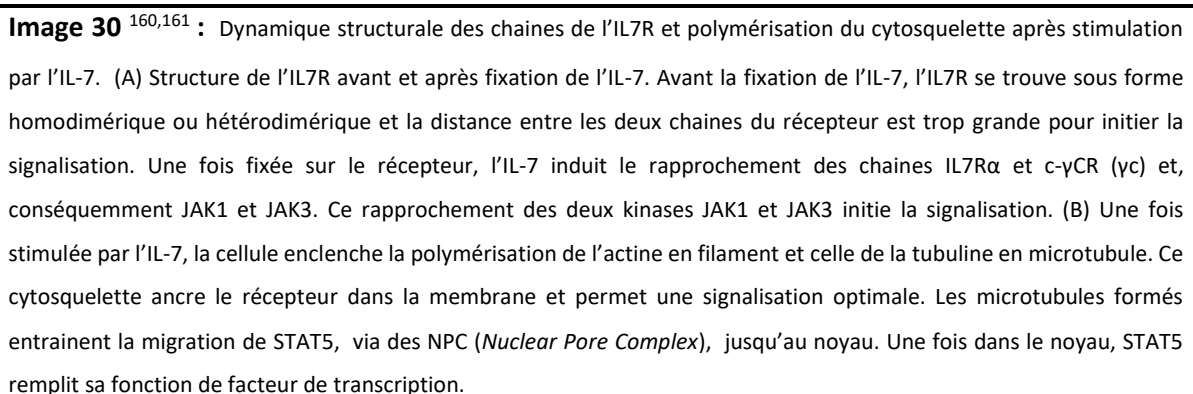
L'IL7R, dont l'importance considérable pour les cellules au stade Early Pro B (Fr. B) a été soulignée, est un dimère protéique composé de la chaîne alpha à l'IL7R (IL7R α ou CD127) et de la chaîne commune gamma (c- γ CR ou CD132) ⁵². Ce complexe protéique se trouve sous différentes formes : homodimère (IL7R α -IL7R α) ou hétérodimère (IL7R α - c- γ CR) ¹⁶⁰.

Lors de la liaison de l'IL-7 sur IL7R préformé, plusieurs modifications membranaires se produisent. Premièrement, cette liaison induit l'augmentation de la taille des microdomaines GM1⁺ (ganglioside M1) provoquant un ralentissement de la diffusion de ce récepteur dans la membrane plasmique. Le ralentissement de la diffusion latérale du récepteur permettra le rapprochement de la chaîne IL7R α avec la chaîne c- γ CR. Le rapprochement de ces deux chaînes, qui achèvera la formation de l'IL7R, est maintenu par la polymérisation de l'actine en microfilament et par l'assemblage de la tubuline en microtubules. Cet ancrage du récepteur sous sa forme active (IL7R + IL-7), liée au cytosquelette, favorise la transduction du signal jusqu'au noyau (**Image 30**) ^{160,161}.

(b) *Transduction du signal*

Le rapprochement des deux chaînes cytoplasmiques de l'IL7R active plusieurs axes de signalisation. Premièrement, cet événement stimule l'axe JAK/STAT. En effet, la distance entre les Janus kinases JAK1 et JAK3, respectivement associées aux régions cytoplasmiques de l'IL7R α et du c- γ CR, diminue suite à la liaison de l'IL-7 sur son récepteur ¹⁶². La diminution de cette distance initie la transphosphorylation des JAKs et, par la même occasion, enclenche l'activation de JAK1 et JAK3. JAK1, maintenant phosphorylée/activée, phosphoryle la tyrosine 449 de l'extrémité C-terminale de la partie cytosolique

de l'IL7R α . Cette phosphorylation crée un site de fixation pour le domaine Src de STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5*). Secondairement, les protéines JAK phosphorylent STAT5, ce qui induit sa dimérisation et sa migration via le microtubule, vers le noyau. Une fois localisée dans le noyau, STAT5 agit en tant que facteur de transcription pour une grande variété de gènes ^{161,163}. La fonction centrale de STAT5 dans cette voie a été démontrée grâce à la restauration du développement des lymphocytes B dans des souris *Il7r^{-/-}* suite à l'expression d'une forme constitutivement active de STAT5 ¹⁶⁴. Le deuxième axe activé par la voie de l'IL7R est celui d'ERK/MAPK. L'importance de la signalisation ERK/MAPK, en aval de la voie de l'IL7R, a été identifiée suite au blocage du développement des lymphocytes B entre les stades Pro B et Pre B chez les souris déficientes pour ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*). Néanmoins, la manière dont les protéines ERK1/2 sont activées après la liaison de l'IL-7 à son récepteur reste toujours incomprise ¹⁶⁵. Finalement, la liaison de l'IL-7 à son récepteur enclenche un dernier axe de signalisation : l'axe PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT. Cependant, la fonction de cet axe n'est pas aussi claire qu'elle l'est pour l'axe JAK/STAT. En effet, il a été démontré dans des cellules Pre B que de hautes concentrations d'IL-7 (5ng/ml) activent l'axe PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT, tandis que de faibles concentrations d'IL-7 (0,1ng/ml) l'inhibent. De surcroît, Il s'avèrerait que la réponse des lymphocytes B à l'IL-7 dépende de son stade de différenciation. Ceci a été démontré par les altérations induites suite à l'inactivation des différentes sous-unités de la PI3K. Chez ces souris génétiquement modifiées, le développement des lymphocytes B s'arrête au stade Pre B. Cependant, aucune différence biologique n'a été identifiée au stade Pro B ¹⁶⁶. En définitive, bien qu'un modèle simpliste de la signalisation de la voie de l'IL7R soit accepté, il reste plusieurs zones d'ombre ne demandant qu'à être éclaircie. Ces éclaircissements sont d'autant plus importants que les effets de l'inactivation de la voie de l'IL7R sont parfois différents chez l'homme et la souris.



Au cours du développement des lymphocytes B, comme discuté dans la section précédente, les précurseurs des lymphocytes B transitent par différents stades. À chaque stade de différenciation est associé un ou plusieurs processus essentiels à l'avancée des lymphocytes B dans ce développement. Ces processus induisent la prolifération des cellules et favorisent leur survie. Entre les stades PrePro B (Fr. A) et Large Pre B (Fr. C'), la voie de l'IL7R y tient un rôle prépondérant. Notons que l'importance de

la voie de l'IL7R pour la survie et la prolifération est la plus marquée durant les stades Early et Late Pro B (Fr. B et C).

(a) Prolifération des précurseurs des lymphocytes B

De manière à pouvoir entrer et progresser dans le cycle cellulaire, les précurseurs des lymphocytes B se situant entre les stades PrePro B (Fr. A) et Large Pre B (Fr. C') doivent activer des cyclines et des cyclines kinases (CDK). Outre cette activation, l'expression ou l'activation des inhibiteurs de ces kinases (CIP) doit être diminuée.

Nous avons précédemment énoncé l'activation de STAT5, un facteur de transcription, à la suite de la stimulation de la voie de l'IL7R par l'IL7. Ce même facteur de transcription, en inhibant l'expression de BCL6, conduit à l'augmentation de l'expression de la protéine MYC¹⁶⁷. MYC est impliqué à divers niveaux dans l'entrée des lymphocytes B dans le cycle cellulaire. Retenons ici son rôle de répresseur des protéines P21 et P27, deux inhibiteurs du cycle cellulaire, ainsi que celui de régulateur positif de l'expression des CDK4, CDK6 et de la cycline D¹⁶⁸. À côté de la régulation de l'expression de MYC, STAT5 initie la transcription de la cycline D3, une cycline essentielle pour la prolifération des lymphocytes B aux stades Pro B et Pre B¹⁴⁷. Une fois produits, la cycline D3 et les kinases CDK4 et CDK6 permettent la traduction du facteur de transcription E2F. Finalement, ce dernier active l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire.

(b) Survie des précurseurs des lymphocytes B

Au-delà de l'induction de la prolifération, la voie de l'IL7R est même impliquée dans le maintien de la survie des progéniteurs des lymphocytes B. Cette survie est promue par l'augmentation du rapport entre la quantité de protéines anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-XL et MCL-1) et celle des protéines apoptotiques (BAX, BAD et BIM). Bien que l'augmentation de ce ratio puisse être déclenchée par les axes JAK/STAT et PI3K/AKT, l'implication de l'un ou l'autre axe dépend du stade de différenciation dans lequel se trouve les précurseurs des lymphocytes B. En effet, aux stades Early-late Pro B (Fr. B-C), seul l'axe JAK/STAT contribue à la survie des cellules. Plus précisément, STAT5 induit l'expression de BCL-2 et de MCL-1^{169,170}. L'axe PI3K/AKT, pour sa part, est responsable de la survie des lymphocytes B au stade Large Pre B (Fr.C'). En effet, en entraînant, l'export nucléaire de FOXO par phosphorylation, AKT déclenche l'expression de BCL-2¹⁷¹. Outre cette régulation, AKT inhibe également l'expression de BAD, l'antagoniste de BCL-2¹⁷².

(c) Régulation de la recombinaison de la chaîne lourde de l'IgS

Finalement, une dernière et très importante fonction est inculquée à cette voie : la régulation de la recombinaison des segments VDJ du gène codant pour la chaîne lourde de l'IgS. Cette régulation s'exerce au travers du contrôle de l'expression des gènes codant pour les recombinases *Rag1/2*. Paradoxalement, l'activation des axes JAK/STAT et PI3K/AKT est inversement proportionnelle à l'expression de la protéine RAG ¹⁷³. Pour comprendre comment aux stades Pro B (Early et Late) la voie de l'IL7R permet l'expression de RAG, il faut considérer que l'expression de l'IL7R est hétérogène à la surface de ces cellules. Cette hétérogénéité d'expression engendre une régulation positive et mutuelle entre IL7R et FOXO. Notons que FOXO est directement impliqué dans l'activation de l'expression des gènes *Rag1* et *Rag2* ¹⁶⁶. Dans ce modèle, la stimulation du IL7R par l'IL-7 provoque la déstabilisation des protéines FOXO qui normalement régulent de manière positive l'expression de l'IL7R α . Donc, au final, la stimulation de la cellule par IL-7 diminue l'expression de son récepteur, ce qui entraîne une augmentation de l'expression de FOXO. C'est donc l'oscillation entre l'expression élevée et faible de l'IL7R α qui donne lieu, lors de sa faible expression, à l'induction de l'expression des gènes *Rag* qui entraîne la recombinaison. Indépendamment de la régulation de la protéine RAG, la voie de l'IL7R rend accessible, via l'acétylation des histones, le locus de la chaîne lourde de l'IgS ¹⁷⁴.

3.3. Réseau transcriptionnel dépendant de la voie de l'IL7R

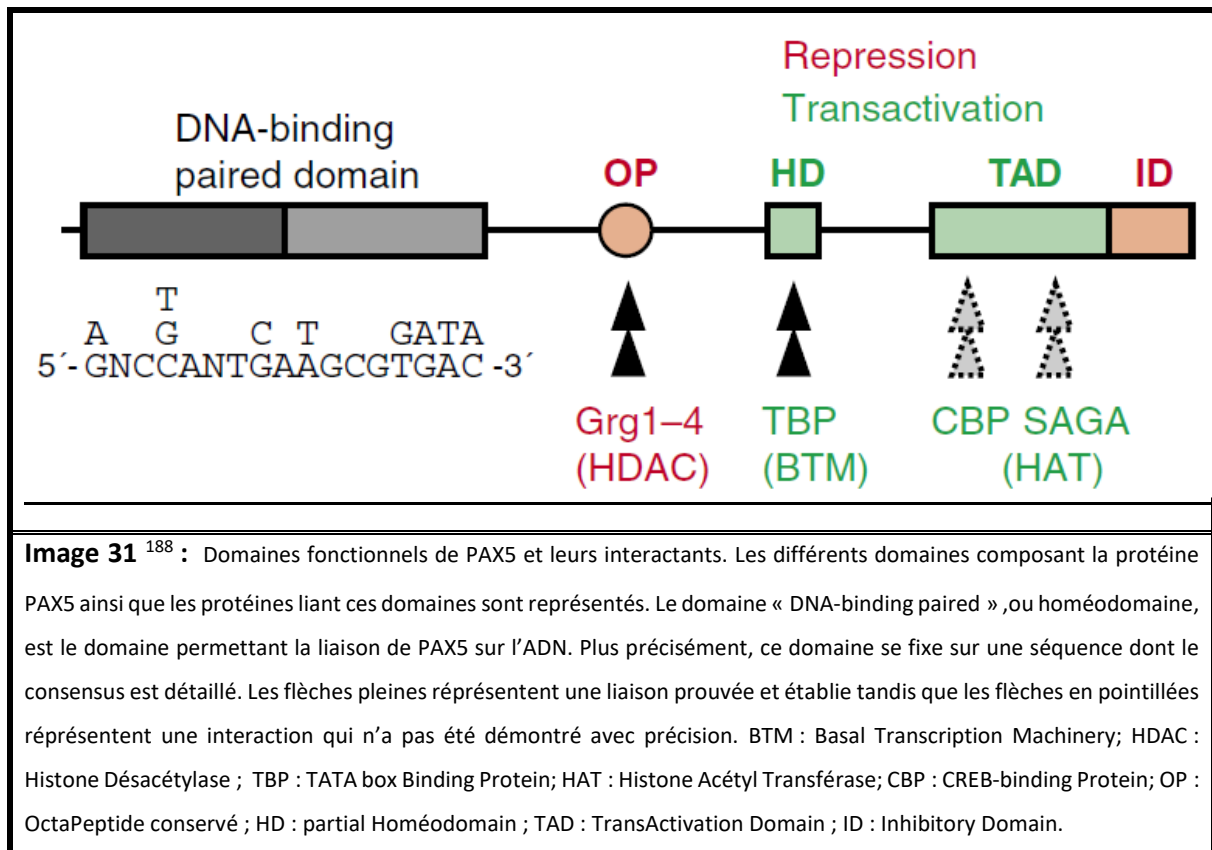
Au-delà de l'expression de marqueurs de surface, l'entrée des cellules dans la lignée des lymphocytes B se caractérise par l'enclenchement de l'expression de gènes spécifiques à cette lignée. Ces gènes codent pour des protéines dont les fonctions sont typiques des lymphocytes B. L'expression de cet ensemble de gènes est sous le contrôle d'un réseau de facteurs de transcription. L'expression de ces facteurs de transcription est séquentielle et en lien avec les différents stades du développement des lymphocytes B.

La mise en place de ce réseau transcriptionnel est initiée par l'expression, dans les CLP, du gène *e2a* qui code pour les sous-unités E12 et E47 deux facteurs de transcription du groupe HLH (*Helix-Loop-Helix*) ¹⁷⁵. L'importance de l'expression de ce gène pour l'engagement dans la lignée des lymphocytes B a été démontrée au cours de l'analyse des souris *E2A*^{-/-} chez lesquelles aucune cellule n'exprime le marqueur B220 ^{175,176}. De surcroît, chez ces souris, l'expression d'EBF1 est très faible et celle de PAX5 est absente ¹⁷⁷. Ces altérations sont partiellement expliquées par la fixation et l'activation du promoteur distal (α) d'*EBF1* et la régulation de l'expression du gène *Il7ra* par *E2A* ¹⁷⁸.

L'expression d'EBF1, deuxième composant de ce réseau, marque la transition vers le stade PrePro B (Fr. A) et l'entrée partielle des cellules dans la lignée des lymphocytes B ¹⁷⁹. Hormis E2A, l'expression génique d'EBF1 est enclenchée, via ces deux promoteurs α et β , par d'autres protéines. Dans un premier temps, seul le promoteur α est accessible et peut être activé par E2A, par le biais de la voie de l'IL7R (STAT5) et par EBF1 lui-même. Par la suite, le promoteur β est disponible et est activable par PAX5 et ETS1 ¹⁸⁰. Cette activation antérieure induit la création d'une boucle d'activation rétroactive. En effet, parmi les gènes ciblés par l'activation d'EBF1 se trouve le facteur de transcription clé pour la lignée de lymphocytes B : PAX5. Notons également la présence de *Foxo1* (*forhead box O1*) dans les gènes dont l'expression est contrôlée par EBF1. La régulation de FOXO1 induit donc, également, la formation d'une autre boucle d'activation rétroactive ¹⁸¹. Ce dernier facteur est directement impliqué dans la voie PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT.

Bien que déjà légèrement exprimé au stade PreProB (Fr. A), l'augmentation de l'expression de PAX5, par le biais direct d'EBF1 et, indirect de STAT5, initie la transition des lymphocytes B dans le stade Early ProB (Fr. B) ¹⁸². Cette étape, dirigée par PAX5, marque l'entrée complète des cellules dans la lignée des lymphocytes B. L'importance de PAX5 dans la totale acquisition identitaire des lymphocytes B est mise en exergue dans les cellules ProB PAX5^{-/-}. En effet, ces cellules possèdent encore un potentiel de dédifférenciation en cellules fonctionnelles d'autres lignées, comme en macrophage après stimulation avec du M-CSF, ou encore en lymphocytes T lors du traitement de ces cellules avec du DL-1 ^{139,183}. Cette fonction, PAX5 la doit à sa capacité de régulation d'un très grand nombre de gènes, comme mentionné précédemment ; enclenchement de l'expression de gènes identitaires des lymphocytes B et répression de gènes apparentés à d'autres lignées ¹⁸⁴. Cette fonction, dont est doté PAX5, tire son origine dans la liaison qui peut s'établir entre certains de ses domaines et différentes protéines remodelant la structure de la chromatine. Effectivement, une fois fixé sur l'ADN via son homéodomain N-terminal, PAX5 peut recruter deux types de protéines. D'une part, des protéines qui imposeront localement une conformation active au gène, comme les protéines CBP, SAGA ou encore TBP. Ce recrutement est médié par les domaines HD et TAD se trouvant à l'extrémité C-terminal de PAX5. D'autre part, PAX5 recrute également des protéines qui enclencheront, via l'assignation de modifications répressives, l'inactivation de gènes cibles. C'est le cas pour l'histone désacétylase NCoR1 (**Image 31**) ^{141,185}. L'expression de PAX5 le long du développement et de la maturation des lymphocytes B est constante du stade Early Pro B (Fr. B) au stade plasmablaste (précurseurs des plasmocytes). La transition des lymphocytes B en plasmocytes est, elle, contrôlée par différents facteurs, dont IRF4 et BLIMP1. Au cours de cette transition, l'expression d'IRF4 est augmentée, ce qui, enclenche l'expression de BLIMP1. BLIMP1, à son tour, réprime l'expression de PAX5. La répression de PAX5 marque donc le passage vers

une autre lignée ^{186,187}. Effectivement, moléculairement et phénotypiquement, les plasmocytes sont fortement dissemblables des autres types de lymphocytes B.



3.4. La voie de l'IL7R et la leucémie lymphoïde aigue de type B (B-ALL)

Au cours des sections précédentes, un point crucial pour le développement correct des lymphocytes B a été soulevé : le maintien du contrôle quantitatif et spatio-temporel de l'activation de la voie de signalisation de l'IL7R. La perte de ce contrôle, de nature hétérogène, est à l'origine du développement de la leucémie lymphoïde aigue de type B, ou B-ALL.

La B-ALL est une leucémie caractérisée par un blocage partiel précoce dans la lignée des lymphocytes B, entre les stades Early Pro B (Fr. B) et Large Pre B (Fr. C'). Ce blocage induit une sortie de certains de ces précurseurs de la différenciation normale et une expansion prononcée de ces cellules leucémiques ¹⁸⁹. Cette leucémie, bien que pouvant atteindre les adultes et les personnes âgées, touche majoritairement les jeunes enfants. La B-ALL est peu répandue, avec une prévalence de 1 à 5 sur 100.000 personnes par an ¹⁹⁰. Bien que l'origine de cette leucémie soit hétérogène, la B-ALL est induite

par des altérations génétiques, comme des translocations chromosomiques ou encore des mutations de gènes ¹⁹¹.

Parmi ces différentes translocations, celle formant le chromosome de Philadelphie, ou BCR-ABL1 (Ph⁺ B-ALL), est présente dans 3-5 % des cas de B-ALL. Cette translocation provoque l'élaboration du gène de fusion BCR-ABL1. Ce gène de fusion code pour une enzyme à activité tyrosine kinase constitutivement active qui induit la prolifération et la survie cellulaire ¹⁹². L'effet prolifératif induit par la protéine de fusion ABL1-BCR est similaire à celui de STAT5, un composant clé de la voie de l'IL7R ^{193,194}. Le rôle de STAT5 dans la B-ALL a été confirmé par l'analyse de souris transgéniques haplodéficientes pour *Pax5* ou *Ebf1* qui expriment une forme constitutivement active de STAT5 (CA-STAT5). Ces souris *Pax5*^{+/-} ou *Ebf1*^{+/-} CA-STAT5 développent en effet une B-ALL, démontrant que, chez la souris, le blocage partiel de la différenciation des lymphocytes B (effet *Pax5*^{+/-} ou *Ebf1*^{+/-}) doit être associé à une activation constitutive de STAT5 (effet CA-STAT5) pour que la B-ALL survienne ¹⁹⁵.

À côté des translocations, des mutations génétiques ponctuelles sont également impliquées dans le développement de la B-ALL chez l'homme. La mutation de trois gènes ou groupes de gènes spécifiques retiendra ici notre attention. Premièrement, la mutation d'un des gènes codant pour une enzyme du groupe des Janus Kinases (JAK1, JAK2, JAK3 et TYR2), dont les protagonistes JAK1 et JAK3 sont directement liés à la voie de l'IL7R. Dans la plupart des cas de B-ALL, la mutation d'une de ces enzymes est associée à un réarrangement du gène *Crfl2*. Ensemble, ces deux altérations génétiques induisent l'activation constitutive de STAT5 ¹⁹¹. Deuxièmement, des mutations au niveau du récepteur IL7R, qui induisent l'émergence d'une version constitutivement active de ce récepteur. Parmi ces mutations, certaines provoquent l'apparition de cystéines au niveau de la portion juxtamembranaire du domaine extracellulaire de l'IL7R α . L'apparition de cette ou ces cystéines excédentaire(s) est responsable de la création d'un pont disulfure avec l'autre chaîne du récepteur, ce qui, *in fine*, produit une version constitutivement active de l'IL7R ¹⁹⁶. Troisièmement, la mutation du gène codant pour le facteur de transcription PAX5. Ces mutations, fortement hétérogènes, sont identifiées chez environ 30% des patients atteints de B-ALL ¹⁹⁷. Cependant, il semble que chez la souris, l'inactivation partielle de PAX5, *per se*, ne soit pas suffisante pour induire le développement de la B-ALL. En effet, comme indiqué plus haut, la présence d'un second élément pathogène induisant une augmentation de la prolifération des cellules, comme une forme constitutivement active de STAT5, soit essentielle pour induire le développement d'une B-ALL ¹⁹⁵.

En conclusion, les preuves apportées par les anomalies génétiques portées par les patients atteints de B-ALL ainsi que les modèles murins de B-ALL démontrent l'importance de la régulation minutieuse de la voie de l'IL7R et son caractère pro-oncogène en cas de dérégulation.

Objectifs

La section introductive illustrant les rôles de la phosphoinositide 5-phosphatase INPP5K, l'enzyme phare de ce projet, a montré que ses fonctions ont été établies dans un contexte non physiologique. En effet, la majorité des fonctions inculquées à INPP5K sont issues soit d'études *in vitro* ou en culture cellulaire, soit réalisées après expression cellulaire d'une version modifiée de l'enzyme. La forte expression de l'ARNm d'INPP5K mise en évidence dans les différentes cellules du système hématopoïétique, l'absence d'étude et de fonctions définies pour INPP5K dans ce système ont poussé le laboratoire hôte à générer des souris $\text{Inpp5K}^{\text{flox/flox}}$ VAV-CRE. Ces souris, obtenues après croisement de souris $\text{Inpp5K}^{\text{flox/flox}}$ et de souris $\text{B6.Cg-Commd10}^{\text{Tg(Vav1-icre)A2Kio/J}}$, n'expriment plus INPP5K dans les cellules du système hématopoïétique. La création de cet outil important, élément manquant pour l'élucidation des fonctions physiologiques d'INPP5K dans les cellules hématopoïétiques, constitue la base du travail de recherches de ma thèse doctorale.

Au cours de mon mémoire de Master, une analyse globale du système hématopoïétique des souris $\text{Inpp5K}^{\text{flox/flox}}$ VAV-CRE (ou VAV-CRE) a été entreprise. Parmi les nombreuses anomalies induites par l'absence d'INPP5K dans ce système, nous avons observé que beaucoup d'entre-elles concernent l'homéostasie des lymphocytes B. En effet, une diminution significative du nombre des lymphocytes B totaux dans la moelle osseuse, dans la rate et dans le sang des souris VAV-CRE a été mise en évidence. À ces altérations s'ajoutent une diminution très importante de la concentration des IgM, IgG et IgA dans le sérum de ces souris génétiquement modifiées. C'est sur la base de ces résultats préliminaires que le projet de ma thèse doctorale a été bâti. En effet, nous étions désireux d'établir plus précisément la ou les fonctions de la 5-phosphatase INPP5K dans la biologie des lymphocytes B. Notre travail de thèse s'est tout particulièrement concentré sur le développement précoce de ces cellules dans la moelle, car c'est dans cet organe qu'a lieu la toute première étape de la différenciation de ces cellules et qu'une forte diminution du nombre des lymphocytes B totaux y avait été détectée dans les souris VAV-CRE.

Conséquemment à cela, plusieurs questionnements ont émergé : Comment expliquer l'altération du nombre de lymphocytes B totaux dans la moelle osseuse des souris VAV-CRE ? Les anomalies observées dans les lymphocytes B de la moelle des souris VAV-CRE sont-elles la conséquence directe d'un rôle intrinsèque d'INPP5K dans ces cellules ? À quel(s) stade(s) du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse la présence d'INPP5K est-elle importante ? Si un stade spécifique est identifié, quelle fonction ou processus physiologique essentiels sont régulés par INPP5K ? Et finalement, par quel mécanisme moléculaire INPP5K contrôle-t-elle cette fonction ou processus ?

Autant de questions (et de réponses apportées) desquelles ont jailli d'autres questions auxquelles, avec le temps qui nous était imparti, nous avons tenté de répondre de la manière, je l'espère, la plus séduisante et convaincante possible.

Section expérimentale

The 5-phosphatase INPP5K/PtdIns(4,5)P2 axis controls IL-7 receptor dynamic structure and signaling during early B cell development

Short title: INPP5K and IL7 receptor structure and signaling

Bastien Moës¹, Patricia Molina-Ortiz^{1,5}, Coraline Radermecker², Adeline Rosu^{3,6}, Charles-Andrew Vande Catsyne¹, Sufyan Ali Sayyed^{1,7}, Abdelhalim Azzi^{1,8}, Ramon Merino⁴, Christophe J. Desmet³, Stéphane Schurmans¹

¹Laboratory of Functional Genetics, ²Laboratory of Immunophysiology, ³Laboratory of Cellular and molecular Immunology, GIGA Research Centre, Université de Liège, Avenue de l'Hôpital 11, 4000-Liège, Belgium;

⁴Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC-Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander, Spain

Corresponding author: Stéphane Schurmans, Laboratory of Functional Genetics, GIGA Research Centre, building B34, Université de Liège, rue de l'Hôpital 11, 4000-Liège, Belgium

Phone : +32 4 3663372 ; fax : +32 4 3664198 ; email : sschurmans@uliege.be

⁵Current address: BioIVT, 2A Orchard Rd, Royston SG8 5HD, United Kingdom.

⁶Current address: Immunology-Vaccinology Laboratory, Department of Infectious and Parasitic Diseases, FARAH, University of Liège, 4000, Liège, Belgium.

⁷Current address: Ablynx Sanofi, Technologiepark-Zwijnaarde 21, 9052 Gent, Belgium.

⁸Current address: Cutaneous Biology Research Center, MGH-Harvard Medical School, 55 Fruit Street, Boston, MA 02114, USA.

Abstract:

Genetic inactivation of the phosphoinositide 5-phosphatase INPP5K in mouse hematopoietic cells led to alterations in white blood cell counts. The B cell lineage was particularly affected by the loss of INPP5K with major defects in bone marrow and splenic B cell development, and a nearly complete absence of serum immunoglobulins, suggestive of the involvement of INPP5K in IL7 receptor, preBCR and/or BCR signaling pathways. Here, we focused our analysis on the partial blockade between fractions A and B during bone marrow B cell development, which is highly dependent on the IL7 receptor/PAX5 signaling pathway. Loss of INPP5K was associated with increased levels of plasma membrane PtdIns(4,5)P2, one of the INPP5K substrate, and with altered dynamic structures of the IL7 receptor ectodomains and of JAK1-JAK3 kinases. We discovered that the IL7 receptor alpha chain interacts with INPP5K and contains a very conserved positively-charged polybasic amino acid sequence in its cytoplasmic juxtamembrane region which might establish stronger ionic interactions with negatively-charged PtdIns(4,5)P2 in the absence of INPP5K, and freeze its structure. As a consequence of these dynamic structural alterations, defects in IL7 receptor signaling culminating in decreased EBF1 and PAX5 transcription factors expression, in microdomain formation and in cytoskeletal reorganization were detected in the absence of INPP5K. Altogether, our results suggest that the lipid 5-phosphatase INPP5K interacts with the IL7 receptor alpha chain and hydrolyses plasma membrane PtdIns(4,5)P2 near the IL7 receptor to the accurate level which allows the requisite structure and mobility of the IL7 receptor alpha chain and bound JAK1 kinase for optimal signaling in basal and IL7-stimulated conditions.

Introduction:

As the unique source of a diverse immunoglobulin repertoire, B cells are an indispensable part of humoral and adaptive immunity. Signaling via the Interleukin-7 (IL7) receptor (IL7R), the pre-B cell antigen receptor (pre-BCR) and the B cell antigen receptor (BCR) is essential for B cell commitment, development, proliferation, survival and functions, including antibody production and secretion (Jani et al., 2020; McLean et al., 2020; Tanaka et al., 2020). Mutations affecting these crucial signaling pathways result in diverse forms of immune deficiency, autoimmunity and B cell leukemia (Clark et al., 2014; Herzog et al., 2009; Katerndah et al., 2017; Petkau et al., 2019). More specifically, IL7R drives bone marrow progenitors to commit into the B cell lineage, and mice lacking IL7R have a severe impairment in B lymphopoiesis (Corcoran et al., 1998; Peschon et al., 1994). IL7R also controls proliferation and survival of bone marrow B cell progenitors until the fraction C'/large Pre B cell stage, where the pre-BCR is expressed at the cell surface (Clark et al., 2014; Corcoran et al., 1998; Erlandsson et al., 2005). Most of the regulatory and functional responses downstream of the IL7R are similar in mice and humans, and humans B cell development is also absolutely dependent on the IL7R signaling pathway (Clark et al., 2014; Giliani et al., 2005; Milford et al., 2016; Parrish et al., 2009; Puel et al., 1998). Downstream of the IL7R, PAX5 is the transcription factor responsible for B cell lineage commitment and for control of recombination at the heavy-chain locus (Cobaleda et al., 2007; Medvedovic et al., 2011; Mikkola et al., 2002). PAX5 expression during early bone marrow B cell differentiation is regulated by JAK1-3/STAT5 and phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3)/AKT signaling (Abdelrasoul et al., 2018; Clark et al., 2014; Hirokawa et al., 2003; Ochiai et al., 2012; Reth et al., 2014). Consequently,

inactivating mutations in PAX5, JAK1-3, STAT5, PI3K regulatory subunit p85 α or PI3K catalytic subunits p110 α and p110 δ are known to impair B cell development (Fruman et al., 1999; Hammarén et al., 2018; Kleppe et al., 2018; Lorenzini et al., 2017; Suzuki et al., 1999; Nutt et al., 1997; Nutt et al., 1999; Ramadani et al., 2010; Rodig et al., 1998).

We previously reported that the *Inpp5k* mRNA is abundantly expressed in the mouse hematopoietic system, including unstimulated and stimulated B cells (Pernot et al., 2011). Public databases like *Immgen* and *Genevestigator* confirmed the wide and abundant expression of *Inpp5k* mRNA in almost all mouse and human hematopoietic cell types and during all stages of B cell differentiation in bone marrow and spleen. However, the role of this phosphoinositide (PI) 5-phosphatase in hematopoietic and B cell compartments is totally unknown. INPP5K (Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase K, or SKIP (for Skeletal muscle and Kidney enriched Inositol Phosphatase)) is a member of the PI 5-phosphatases family whose protein structure is comprised of a N-terminal catalytic domain which hydrolyses both PtdIns(4,5)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃, followed by a SKICH domain at the C-terminus which is responsible for protein-protein interactions and subcellular localization of the enzyme (Schurmans et al., 2021). Partially inactivating mutations in INPP5K have been detected in patients with a rare form of autosomal recessive congenital muscular dystrophy with cataract, short stature and intellectual disability (Wiessner et al., 2017; Osborn et al., 2017). According to the literature, INPP5K functions encompass control of insulin signaling, endoplasmic reticulum stress response and structural integrity, cytoskeleton organization, lysosome homeostasis, cell adhesion and migration, and play a role in myoblast differentiation, renal osmoregulation and cancer (McGrath et al., 2021; Schurmans et al., 2021). Thus, the general objective of

this study was to define the functions and mechanisms of INPP5K action in hematopoietic cells using a new genetically-modified mouse model allowing cell specific inactivation of this 5-phosphatase.

Results:

Hematopoietic deletion of INPP5K induces severe lymphopenia and hypoglobulinemia in mice

In order to study the effects of the *Inpp5k* gene inactivation on mouse hematopoietic cells differentiation and to define the functions of the 5-phosphatase in these cells, a mutant *Inpp5k*^{flox/+} mouse was generated in which two intronic LoxP sites were introduced upstream of exon 2 and downstream of exon 3 in the *Inpp5k* gene (Figure S1). Crossing *Inpp5k*^{flox/+} mutants with *PGK-Cre* mice generated *Inpp5k*^{Δ/+} mice with a full body heterozygous deletion of exons 2 and 3 which encode amino acids residues 33-105 of the INPP5K catalytic domain. Intercrosses between *Inpp5k*^{Δ/+} mice failed to yield any live *Inpp5k*^{Δ/Δ} newborns, confirming previously published results indicating that total INPP5K inactivation in mouse is embryonic lethal (Table S1) (Ijuin et al., 2008). *Inpp5k*^{flox/+} Vav-Cre and *Inpp5k*^{flox/flox} Vav-Cre (VAV-CRE) mice were obtained by crossing *Inpp5k*^{flox/+} mice with mice expressing the Cre recombinase in all hematopoietic cells under the control of the murine Vav promoter. The INPP5K protein was absent from blood leukocytes isolated from VAV-CRE mice, confirming the efficiency of the recombination in these cells (Figure S2). Blood leukocytes concentration was significantly decreased in VAV-CRE mice, as compared with control mice (Figure 1A). This alteration was mainly a consequence of a very severe decrease in total blood lymphocytes concentration (Figure 1A). Decreased concentrations of basophils and increased concentrations of neutrophils and monocytes were also detected in VAV-CRE blood (Figure 1A). Circulating red cells and platelets concentrations were normal in VAV-CRE mice (Figure 1A). Flow cytometry analysis on blood lymphocytes indicated that concentrations of circulating CD19⁺ B as well of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were significantly decreased in

VAV-CRE mice compared with control mice (Figure 1B). Finally, levels of circulating IgM, IgG and IgA were extremely low in the blood of VAV-CRE mice (Figure 1C).

Hematopoietic- and B cell-restricted deletion of INPP5K impairs normal B cell differentiation and maturation

The dramatic alterations of blood CD19⁺ B cell and immunoglobulin concentrations in VAV-CRE mice are highly suggestive of an important role for INPP5K in this lymphocyte subset. For this reason and because the INPP5K protein is expressed at all stages during B cell development (Figure S3), we focused our study on the analysis of B cells (Figure 2A). In the bone marrow of VAV-CRE mice, counts of multipotent and oligopotent progenitors, including multipotent progenitors, common myeloid progenitors and common lymphoid progenitors, were normal compared with control mice (Figure S4). In the bone marrow, loss of INPP5K resulted in a significant decrease in B220⁺ B cells and in a complex pattern of alterations during B cell differentiation (Figure S5 and Figure 2B and 2C). Indeed, cell counts were increased in fraction A and decreased in fraction B of VAV-CRE mice, as compared with control mice. This pattern was consistent with a partial blockade at the transition between these 2 subsets (Figure 2C). Cell counts in fraction C/C' were normal in VAV-CRE mice, but severely decreased in fractions D, E and F, compared with control mice (Figure 2C). In the spleen of VAV-CRE mice, total CD19⁺ B cell counts and counts of T1, T2, FO and MZ B cell subsets as well as of plasmablasts were significantly decreased, as compared with control mice (Figures 2D and S6). Counts of plasma cells were similar in VAV-CRE and control mice (Figure S6). In order to exclude that reduced expression of the INPP5K protein in other hematopoietic cells than B cells indirectly contributes to the B cell phenotype detected in VAV-CRE mice, *Inpp5k*^{flox/flox}

MB1-Cre mice were generated where the Cre recombinase is expressed exclusively in B cells under the control of the murine CD79A promoter. In *Inpp5k*^{flox/flox} MB1-Cre mice, level of INPP5K protein was as high as in control mice in fraction A, but markedly reduced in fractions B/C-C', in agreement with published data showing that expression of the Cre recombinase in MB1-Cre mice begins at the transition between fractions A and B (Figure S7). Accordingly, cell counts in fraction A were similar in *Inpp5k*^{flox/flox} MB1-Cre and control mice, and the partial block detected above in VAV-CRE mice appeared one stage later, between fractions B and C/C' (Figure S8). As in VAV-CRE mice, cell counts in fractions D, E and F were significantly decreased in *Inpp5k*^{flox/flox} MB1-Cre mice, as well as blood IgM and IgG immunoglobulins levels (Figures S8 and S9).

Altogether, our results indicate that reduced expression of INPP5K in hematopoietic cells results in various leukocytes defects, including alterations in B cell differentiation and maturation at critical stages known to be controlled by the IL7R/PAX5 signaling pathway (fractions A/B) and by the expression of the pre-BCR (fractions C-C'/D) and the BCR (fractions E and F, and splenic B cell subsets) at the cell surface. They also indicate that reduced expression of INPP5K specifically in the B cell lineage is sufficient to reproduce these alterations, supporting an intrinsic role of INPP5K during B cell development and function. In subsequent steps of this study, we focused on the alterations observed in fractions A and B during early bone marrow B cell differentiation in VAV-CRE mice and on the role of INPP5K in IL7R/PAX5 signaling pathway.

Loss of INPP5K alters IL7R signaling and Pax5 expression in fractions A and B of developing B cells

In mice, the IL7R/PAX5 signaling pathway plays an essential role for initiating and maintaining B cell lineage commitment in the bone marrow. Accordingly, loss of IL7R α /CD127, a component of the IL7R with the common- γ chain receptor (c- γ CR)/CD132), or of PAX5 results in a nearly total blockade at early stages of B cell differentiation (Cobaleda et al., 2007; Corcoran et al., 1998; Medvedovic et al., 2011; Mikkola et al., 2002; Peschon et al., 1994). Cell surface expression of IL7R α and c- γ CR were similar in fractions A and B of VAV-CRE and control mice (Figure S10). By contrast, PAX5 level was significantly decreased in these 2 fractions in VAV-CRE mice, as compared with control mice (Figure 3A). As PAX5 is known to control D_H–J_H and distal V_H–D_HJ_H rearrangements at the IgH locus (Ebert et al., 2011; Fuxa et al., 2004; Hesslein et al., 2003; Nutt et al., 1997), we probed these recombination events in VAV-CRE and control bone marrow B cells. Reduced PAX5 expression in bone marrow VAV-CRE B cells was indeed associated with a decreased intensity of the PCR signal corresponding to the recombined D_H–J_H and distal V_HJ558–D_HJ_H amplicons (Figure 3B). As expected from previous reports, the PAX5-independent proximal V_H7183–D_HJ_H recombination was not affected in VAV-CRE mice (Figure 3B). Because PAX5 level during early bone marrow B cell differentiation is controlled by PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT and JAK1-3/STAT5/EBF1 signaling downstream of the IL7R (Abdelrasoul et al., 2018; Clark et al., 2014; Hirokawa et al., 2003; Ochiai et al., 2012; Reth et al., 2014), members of these signaling pathways were analyzed in VAV-CRE and control bone marrow B cells. Levels of phospho-AKT^{S473} (p-AKT^{S473}) and total AKT were similar in VAV-CRE and control B cells from fractions A and B, both before and 2 or 10 min after addition of IL7 (Figures 3C and S10). Since p-

AKT^{S473} was proposed in the literature to negatively control PAX5 level in bone marrow B cells (Ochiai et al., 2012), our results suggest that the PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT^{S473} signaling is not responsible for the decreased PAX5 level and the partial blockade observed between fractions A and B during VAV-CRE B cell differentiation. In the second signaling pathway known to control PAX5 expression, levels of EBF1, a transcription factor that is connected to PAX5 in a complex positive feedback loop (Clark et al., 2014; Decker et al., 2009; Hirokawa et al., 2003; Reth et al., 2014; Roessler et al., 2007), were significantly decreased in VAV-CRE B cells from fractions A and B, as compared with control B cells (Figure 3D). Upstream of EBF1, p-STAT5 levels were also significantly decreased in VAV-CRE B cells from fractions A and B as compared with control B cells, both before and up to 10 min after addition of IL7, despite similar or slightly increased levels of total STAT5 (Figure 3E and Figure S10). Upstream of STAT5, in B cells from fraction A, levels of p-JAK1^{Y1022} and p-JAK3 were significantly decreased in VAV-CRE mice as compared with control mice, both before and up to 10 min after addition of IL7, despite similar levels of total JAK1 and JAK3 levels (Figures 3F, 3G and S10). Data were slightly more complex in the few B cells remaining in fraction B of VAV-CRE mice: levels of p-JAK1^{Y1022} in this fraction were also significantly decreased, as in fraction A, but p-JAK3 levels tended to be slightly increased in VAV-CRE B cells from fraction B, as compared with control B cells (Figures 3F and 3G). Again, total JAK1 and JAK3 levels were similar in VAV-CRE and control B cells from fraction B, as in fraction A (Figure S10). Finally, levels of p-IL7R α ^{Y449}, the phospho-Tyrosine which seems essential for binding of STAT5 and regulatory subunits of class IA PI3K to the carboxy-terminal end of the IL-7R α cytoplasmic domain (Corcoran et al., 1996; Jiang et al., 2004; Lin et al., 1995; Venkitaraman et al., 1994; Wofford et al., 2008), were

similar in cells of fractions A and B in control and VAV-CRE mice (Figure S11). It is noteworthy here that PAX5 and EBF1 levels were also significantly decreased in B cells from fraction B in *Inpp5k*^{flox/flox} MB1-Cre mice where INPP5K level is specifically reduced in the B cell lineage (Figure S12). Altogether, our results suggest that reduced expression of INPP5K in VAV-CRE bone marrow B cells negatively impacts on the early plasma membrane steps of IL7R signaling in these cells.

Role and mechanism of action of INPP5K during the early plasma membrane steps of IL7R activation and signaling in bone marrow B cells

INPP5K comprises a N-terminal catalytic domain which hydrolyses both PtdIns(4,5)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃ substrates, followed by a SKICH domain at the C-terminus which is responsible for protein-protein interactions and INPP5K subcellular localization (Schurmans et al., 2021). As mentioned above, levels of p-AKT^{S473} and total AKT before and after IL7 addition were similar in VAV-CRE and control B cells of fractions A and B, suggesting that PtdIns(3,4,5)P₃ does not play an obvious role in the bone marrow B cell phenotype observed in VAV-CRE mice. In contrast, flow cytometry analysis revealed that the PtdIns(4,5)P₂ signals were significantly increased in VAV-CRE B cells of fractions A and B, as compared with control B cells, especially in the latter fraction where the PtdIns(4,5)P₂ signal in VAV-CRE B cells was more than twice that found in control B cells (Figure 4A, left and central panels). Immunofluorescence studies on B220⁺CD43⁺ bone marrow B cells confirmed that the PtdIns(4,5)P₂ signal was increased in VAV-CRE mice compared to control mice (Figure 4A, right panel). According to the literature, both INPP5K and the cytoplasmic region of the IL7R α chain have GRP78/BiP/HSP5a protein as a common interactor (Ijuin et al., 2015 and 2016; Rose et al., 2010; Wiessner et al., 2017). Thus, the

possibility that INPP5K and the IL7R α chain are present in the same protein complex in control bone marrow B cells was tested by immunoprecipitation. When the IL7R α chain was immunoprecipitated, INPP5K protein signal was detected in the precipitate by Western blotting (Figure 4B). Conversely, after INPP5K immunoprecipitation, the IL7R α chain signal was detected in the precipitate (Figure 4B). As a specificity control, we used INPP5J/PIPP, another phosphoinositide 5-phosphatase: after INPP5J immunoprecipitation, no IL7R α chain signal was detected by Western blotting, confirming the specificity of the IL7R α chain-INPP5K complex (Figure 4B). Immunofluorescence studies with antibodies directed against the extracellular domain of the IL7R α chain, INPP5K or PtdIns(4,5)P₂ revealed that both proteins and INPP5K substrate were mostly present at the plasma membrane in control bone marrow B cells before and 2-10 min after addition of IL7 (Figure 4C).

Binding of IL7 on its heterodimeric IL7R has been reported to rapidly induce conformational changes in IL7R α and c- γ CR ectodomains, pulling their cytoplasmic domains close together. As a consequence, IL7R α and c- γ CR cytoplasmic domain-bound JAK1 and JAK3 kinases transphosphorylate each other when tethered in close contact by the IL7-activated receptor (Babon et al., 2014; McElroy et al., 2012; Walsh et al., 2012). Concomitantly, the number of GM1⁺ membrane microdomains increases at the cell surface, and an actin microfilament meshwork is induced under the plasma membrane, which anchors the IL7-activated receptor and thus stabilizes the formation of the cytoplasmic signaling complex. Microtubules are formed that cross the cytoplasm and reach the nucleus membrane within a few minutes after addition of IL-7. Finally, p-STAT5 is carried along these newly formed microtubules toward the nucleus (Tamarit et al., 2013). The IL7R conformational changes induced after IL7 stimulation were analyzed using an indirect fluorescence resonance energy

transfer (FRET) assay previously described by Guala et al., 2018. In order to validate this assay in control bone marrow B220⁺CD43⁺ B cells, we first defined the maximal and the minimal FRET efficiency using donor and acceptor fluorophores-labeled antibodies directed against the same target (JAK1, close proximity, positive control) or against 2 targets present in different subcellular compartments (JAK1 in the cytoplasm and PAX5 in the nucleus, remoteness, negative control). As expected, the energy transfer between the excited donor and the acceptor fluorophores, or FRET efficiency, was very high when antibodies bound to the same JAK1 target, and close to zero when they bound to JAK1 and PAX5 remote targets (Figure S13). Second, we tested if this indirect FRET assay was able to detect the IL7R structural changes reported in the literature in response to IL7. Thus, the relative proximity between IL7R α and c- γ CR ectodomains and between JAK1 and JAK3 kinases was analyzed in control bone marrow B220⁺CD43⁺ B cells in response to IL7 (Figure 4D-F). The energy transfer between the excited donor and the acceptor fluorophores-labelled antibodies bound either to c- γ CR and IL7R α ectodomains or to JAK3 and JAK1 kinases significantly increased after addition of IL7, reflecting their closer proximity in activated IL7R, in agreement with previous reports (Figures 4E and 4F) (Babon et al., 2014; McElroy et al., 2012; Walsh et al., 2012). By contrast, the analysis of VAV-CRE bone marrow B220⁺CD43⁺ B cells revealed a totally different pattern of energy transfer between the same targets, despite their similar expression in control and VAV-CRE B cells (Figure 4E-F and Figure S10). Indeed, in VAV-CRE B cells, energy transfer between excited donor and acceptor fluorophores-labelled antibodies bound to c- γ CR and IL7R α ectodomains was significantly lower compared with control B cells, both in basal and IL7-stimulated conditions, suggesting that the 2 ectodomains of the IL7R are more distant in the absence of INPP5K (Figures 4E). Moreover,

energy transfer between the excited donor and acceptor fluorophores-labelled antibodies bound to JAK3 and JAK1 in basal condition was slightly but significantly higher in VAV-CRE B cells, as compared with control B cells, suggesting a closer proximity between these kinases in the absence of INPP5K and IL7 (Figure 4F). Surprisingly, IL7 addition did not modify the energy transfer between JAK3 and JAK1 in VAV-CRE B cells, and this energy transfer after IL7 stimulation was significantly lower as compared with control B cells (Figure 4F). Altogether, our indirect FRET results indicate that significant alterations occur in IL7R conformational structure in the absence of INPP5K, both in basal and IL7-stimulated conditions. Importantly, they indicate that the distance between the IL7R cytoplasmic domains bound JAK1 and JAK3 kinases is reduced in VAV-CRE B cells compared to control B cells in basal condition, but unchanged in response to IL7, being frozen at a distance intermediate between basal and IL7-stimulated conditions in control B cells. There are multiple functional roles assigned to PtdIns(4,5)P₂, which is increased in VAV-CRE bone marrow B cells (Figure 4A). Notably, ionic interactions between its negatively charged phosphates and polybasic amino acid sequences present in membrane proteins, including receptors, are known to regulate protein structure and function (Aivazian et al., 2000; Arkhipov et al., 2013; Chen et al., 2015; Chouaki-Benmansour et al., 2018; Deford-Watts et al., 2009; Endres et al., 2013; Heo et al., 2006; Li et al., 2014; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2011). These positively-charged polybasic amino acid sequences are classically localized in the cytoplasmic domain of the protein, close to the transmembrane domain, allowing interaction with acidic phospholipids present in the inner leaflet of the plasma membrane; these sequences are organized in clusters of basic amino acids that are separated by a suitable distance, which is ideal for interaction with PtdIns(4,5)P₂ and its multiple charges;

these clusters are separated by hydrophobic residues, which further stabilize the ionic protein–lipid interaction, and contain very few acid residues (Li et al., 2014). Analysis of the amino acids sequence of the c-γCR cytoplasmic domain did not reveal the presence of such a polybasic sequence. By contrast, in the IL7Rα chain, a positively-charged polybasic amino acid sequence was detected which perfectly fulfills all the above criteria to participate in such ionic interactions with PtdIns(4,5)P2 (Figure 5A). This sequence was remarkably conserved between species, suggestive of an important functional role (Figure 5A). In order to analyze the proximity between the IL7Rα chain cytoplasmic domain and the plasma membrane, a likely reflection of the strength of the ionic interaction between the IL7Rα chain polybasic sequence and plasma membrane PtdIns(4,5)P2, we used a donor fluorophore-labelled DiO' membrane probe and an acceptor fluorophore-labelled antibody directed against p-IL7Rα^{Y449} in an indirect FRET assay (Figure 5B). In basal condition, the energy transfer between the excited donor DiO' membrane fluorophore and the acceptor fluorophore-labeled antibody bound to p-IL7Rα^{Y449}, which is similarly expressed in control and VAV-CRE B cells (Figure S11), was significantly higher in VAV-CRE B cells compared with control B cells, reflecting the closer proximity of p-IL7Rα^{Y449} to the plasma membrane when INPP5K is reduced (Figure 5B). Addition of IL7 on control B cells significantly increased energy transfer between the excited donor DiO' membrane fluorophore and the acceptor fluorophore-labeled antibody bound to p-IL7Rα^{Y449}, as compared with basal condition. By contrast, when compared with basal condition, energy transfer was not modified after addition of IL7 on VAV-CRE B cells (Figure 5B). Altogether, our FRET results suggest that the distance between the polybasic sequence-containing IL7Rα cytoplasmic domain and the plasma membrane is lower in VAV-CRE B cells compared to control B cells, indicative of an

increased ionic interaction between the polybasic sequence and PtdIns(4,5)P₂. This distance in VAV-CRE B cells is not modified by the addition of IL7 and seems frozen in an intermediate between basal and IL7-stimulated conditions in control B cells, likely causing the perturbations observed in IL7R signaling.

Loss of INPP5K results in altered membrane and cytoskeletal organization

We next investigated the impact of these IL7R dynamic structural alterations on downstream membrane and cytoskeletal organization in basal and IL7-stimulated conditions. First, membrane microdomains were labeled through ganglioside GM1 with cholera toxin B (CtxB) tagged with AF488, in order to monitor their number, volume and GM1 staining intensity at the surface of VAV-CRE and control B220⁺CD43⁺ bone marrow B cells (Figure 6A) (Tamarit et al., 2013). In control B cells, an increased number of GM1⁺ microdomains was detected 10 min after addition of IL7, as compared with non-stimulated condition (Figure 6A, left graph). In addition, a decreased GM1⁺ microdomain volume associated with an increased GM1 staining intensity were observed after addition of IL7, as compared with the basal condition, reproducing results obtained in IL7-stimulated human CD4⁺ T cells (Tamarit et al., 2013). These latter changes reached a peak 2 min after IL7 addition (Figure 6A, central and right graphs). In VAV-CRE B cells, number of GM1⁺ microdomains was normal in basal condition and slightly increased 2 and 10 min after addition of IL7, as compared with control B cells (Figure 6A, left graph). By contrast, their volume and GM1 staining intensity were already significantly altered before IL7 stimulation (Figure 6A, central and right graphs). Interestingly, addition of IL7 did not dramatically modify these 2 parameters, on the contrary to control B cells (Figure 6A, central and right graphs). Second, reorganization of the actin and tubulin

cytoskeleton was analyzed in B220⁺CD43⁺ bone marrow B cells before and after IL7 addition, as previously described for T cells (Tamarit et al., 2013). An obvious difference was observed in actin organization 2 min after IL7 addition: the cortical actin skeleton reorganization was already clearly detected in VAV-CRE B cells while still not in control B cells, indicating that reduced INPP5K protein level accelerates actin skeleton reorganization (Figure 6B). By contrast, no difference in actin staining was observed between VAV-CRE and control B cells before or 10 min after IL7 addition (Figure 6B). As expected from the literature (Tamarit et al., 2013), a significant number of microtubules formed in control B cells 2 and 10 min after IL7 addition, as compared with basal condition (Figure 6C). On the contrary, in VAV-CRE B cells, tubulin staining was diffuse throughout the cytoplasm, forming only very few microtubules of low intensity staining after addition of IL7 (Figure 6C). Altogether, these results indicate that reduced expression of INPP5K protein in bone marrow B cells results in altered GM1⁺ microdomains and cytoskeletal organization. Interestingly, the volume of microdomains and GM1⁺ intensity were already altered in basal condition and remained largely unchanged after IL7 addition, like frozen at an intermediate level between basal and IL7-stimulated conditions in control B cells, mimicking thus some of the IL7R structural alterations observed in VAV-CRE B cells.

Discussion:

Using a combination of new *in vivo* loss of function mouse models specific for INPP5K in hematopoietic or B cells and *ex vivo* cell biology studies on primary bone marrow B cells, we discovered a B cell-intrinsic role for INPP5K in the control of IL7R dynamic structure and signaling, PAX5 expression and early B cell development. Indeed, we show here that INPP5K interacts with the IL7R α chain and that loss of INPP5K is associated with increased PtdIns(4,5)P2 level in bone marrow B cells and with altered basal and IL7-stimulated conformational structure of the IL7R signaling complex. These structural alterations include the distance between IL7R α and c- γ CR ectodomains, between JAK1 and JAK3 kinases which are constitutively bound to IL7R α and c- γ CR cytoplasmic domains respectively, and between the IL7R α carboxy-terminal region (p-IL7R α ^{Y449}) and the plasma membrane. Our results suggest that stronger ionic interactions between the very conserved positively-charged amino acids sequence discovered in the cytoplasmic IL7R α juxtamembrane region and the increased level of negatively-charged plasma membrane PtdIns(4,5)P2 in VAV-CRE B cells play an essential mechanistic role in these structural alterations. Indeed, the IL7R α chain and the IL7R α chain-bound JAK1 kinase seem frozen in an intermediate structure between basal and IL7-stimulated conditions in control B cells. Downstream of the membrane IL7R complex, these dynamic structural alterations are probably responsible for the defects observed in IL7R signaling, culminating in a significantly decreased expression of EBF1 and PAX5, two transcription factors known to be essential for initiating and maintaining B cell lineage commitment from the fraction A in the bone marrow. Ionic interactions between polybasic amino acids sequences and plasma membrane acidic phospholipids, including PtdIns(4,5)P2, are known to impact on protein

subcellular localization, structural conformation and/or functions (Li et al., 2014). The EGF receptor, the CD3 ϵ and CD3 ζ T cell co-receptors, the membrane IgG receptor and other receptors contain cytoplasmic juxtamembrane polybasic sequences that ionically interact with plasma membrane phosphoinositides and, through these ionic interactions, control receptor conformation, activity and downstream signaling (Aivazian et al., 2000; Arkhipov et al., 2013; Chen et al., 2015; Chouaki-Benmansour et al., 2018; Deford-Watts et al., 2009; Endres et al., 2013; Heo et al., 2006; Li et al., 2014; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2011). In a few cases, reducing plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ level by expression of *exogenous*, genetically-modified phosphoinositides 5-phosphatases like yeast Inp54p or mammalian INPP5J and synaptojanin was shown to alter receptor dynamic conformation, activation and signaling (Chouaki-Benmansour et al., 2018). Our present results extend this concept and for the first time define the *endogenous* 5-phosphatase which controls plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ level. Thus, we propose a model where INPP5K interacts with the IL7R α chain and hydrolyses plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ near the IL7R to the accurate level which allows the requisite structure and mobility of the IL7R α chain and bound JAK1 kinase for optimal signaling in basal and IL7-stimulated conditions. In VAV-CRE B cells, the structure of the IL7R α chain and bound JAK1 kinase in basal condition is frozen in an intermediate between resting and IL7-activated conditions in control B cells, but it seems sufficient to partially activate microdomains formation. Indeed, independently of IL7, volume and GM1 staining intensity of microdomains in VAV-CRE B cells mimic a partial IL7R activation in control cells. By contrast, in comparison with basal condition, addition of IL7 on VAV-CRE B cells did not induce significant changes in microdomains volume and GM1 intensity staining, as if the IL7R was largely unresponsive to IL7 in these cells.

Altered microdomains formation in VAV-CRE B cells could also participate to IL7R signaling defects (Tamarit et al., 2013; Hryniewicz-Jankowska et al., 2014).

It is noteworthy here that a similar mechanism involving stronger ionic interactions between plasma membrane phosphoinositides and polybasic sequences could also play a role downstream in B cell development in VAV-CRE mice, when the preBCR and BCR complexes are expressed at the B cell surface. Indeed, our preliminary results indicate that INPP5K interacts with CD19, an essential component of these 2 receptor complexes, and that the cytoplasmic juxtamembrane domain of CD19 also contains a very conserved LHLQRALV**LRKRKR**MTDPT**RRFFK**VT**PPP** potential polybasic sequence. This mechanism could partially explain some of the alterations detected in VAV-CRE mice at the transition between bone marrow fractions C/C' and D (preBCR complex, Figure 2C) as well as in splenic B cell subsets (BCR complex, Figure S5). Of course, other mechanisms could co-exist to explain B cell developmental alterations or defect in immunoglobulin production in VAV-CRE mice and this warrants further studies.

The physiological role of the IL7/IL7R signaling pathway is not limited to the control of early B cell development: this pathway is also critical for T cell development, for both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ lineages, for development and survival of naïve and memory T cells as well as innate lymphoid cells (iLC) (Barata et al., 2019). Accordingly, loss of INPP5K in VAV-Cre mice was associated with decreased number of splenic $\alpha\beta$ naïve and memory T cells, as well as of lung iLC2 and $\gamma\delta$ T cells, suggestive of a similar pathological mechanism involving freezing of the IL7R α chain and altered IL7R signaling in these cells. By contrast, blood concentrations of red cells and platelets, which are not dependent on the IL7R pathway for their development, were normal in VAV-CRE mice (Figure 1A).

The IL7-IL7R signaling pathway is implicated in human and mouse immunodeficiency, autoimmune and chronic inflammatory diseases, as well as in cancer (reviewed in Barata et al., 2019). IL7 not only induces survival and proliferation of B (B-ALL) and T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells but also contributes to leukemia development. In pediatric B cell precursor ALL (BCP-ALL), high levels of IL7R expression is associated with CNS involvement and relapse, and more than 70% of individuals with T-ALL present with IL7R-positive blasts. In this context, it is noteworthy that 2 studies reported that Inpp5k mRNA levels are significantly altered in human BCP- and B-ALL/TCP- and T-ALL (J Clin Oncol 2010/05/20 and Blood 2011/06/09, doi: 10.1200/JCO.2009.23.4732 and doi: 10.1182/blood-2010-12-324004). The same IL7-IL7R signaling pathway is also under study for therapeutic purposes in cancer, autoimmune and infectious diseases (reviewed in Barata et al., 2019). Indeed, targeting of the IL7R α signaling pathway may lead to improved outcomes in a subset of ALL human patients (Cramer et al., 2016). Our present results suggest to consider INPP5K both in the pathogenesis and the therapy of ALL.

Materials and Methods

Mice

The targeting vector *Inpp5k*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi/PRPGS00065_A_A10} (Figure S1) was purchased from EuMMCR/EUCOMM and electroporated into C57BL/6 ES cells by Cyagen Biosciences, Inc. Correctly targeted ES cell clones were electroporated with the PGK-FLP-obpA plasmid to delete the LacZ-Neo cassette, resulting in *Inpp5K*^{flox/+} ES cells. *Inpp5K*^{flox/+} mice, where exons 2 and 3 of the *Inpp5K* gene are flanked by LoxP sites, were obtained by Cyagen Biosciences after *Inpp5K*^{flox/+} ES cells injection in blastocysts. These mice crossed with *Vav1-iCre* (B6.Cg-Commd10^{Tg(Vav1-icre)A2Kio/J}) or *mb1-Cre* (C(Cg)-*Cd79a*^{tm1(cre)Reth/EhobJ}) mice. All mice were housed in an animal facility with a 12 h light/12 h dark cycle and had free access to food and water throughout the study period. All mouse studies were authorized by the Animal Care Use and Review Committee of the University of Liege.

Reagents and antibodies

BV711 anti-mouse CD45R/B220 (#563892), BUV737 anti-mouse CD24/HAS (#565308), APC anti-mouse IgM (#562032), PE-CF594 anti-AKT^{pS473} mAb (#562465), BV421 anti-mouse LY-51/BP1 (#740013), PE anti-mouse EBF1 (#565494), PE anti-mouse CD8a (#553032) and FITC anti-mouse CD4 (#553046) antibodies were purchased from BD Biosciences. APC rat anti-mouse CD43 (#143207), BV 421TM anti-mouse CD19 (#115538), AF 647 anti-PAX5 (#649704), PE anti-STAT5^{pY694} (#699605), AF 647 anti-mouse CD3ε (#100324), biotin anti-mouse CD127/IL7Rα (#135006), PE anti-mouse CD132/common γ chain (#132305) and purified anti-mouse CD127/IL7Rα (#135002) antibodies were purchased from Biolegend. Anti-JAK1^{pY1022} (#STJ90314), anti-JAK3^{pY980/981} (#STJ196341), anti-IL7Rα^{pY449} (#STJ90721) and anti-mouse CD132 (#STJA0001285) antibodies were purchased from St-John's laboratory. AF 488

Cholera Toxin Subunit B (CtxB, #C34775), AF 546 cross-adsorbed goat anti-rat IgG (H+L) (#A-11081), AF 546 cross-adsorbed goat anti-rabbit IgG (H+L) (#A-11010), AF 488 highly cross-adsorbed goat anti-rabbit IgG (H+L) (#A-11034), TRITC cross-adsorbed goat anti-rat IgG (H+L) (#A18876) and AF 647 highly cross-adsorbed goat anti-rabbit IgG (H+L) (#A-21245) secondary antibodies, as well as JAK3 polyclonal antibody (7HCLC) (#711602) were purchased from Invitrogen. Anti-PtdIns(4,5)P2 biotin (#117Z B045) antibody was purchased from Tebu-Bio. Human/mouse/rat JAK1 antibody (#MAB4260) was purchased from RD System. AF 488 α -Tubulin (B-7) (#sc-5286) antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Clean-Blot™ IP Detection Reagent (HRP) (#21230) and DiO'/DiOC18(3) (3,3'-Diocadecyloxacarbocyanine Perchlorate) (#D275) products were purchased from Thermofisher. β -Actin (13E5) rabbit mAb (#4970S) was purchased from CST. CD127/IL7R polyclonal antibody (#17626-1-AP) was purchased from Proteintech. PE anti-mouse CD43 (leukosialin) (#120431) antibody was purchased from eBioscience. Rabbit anti-mouse INPP5J and INPP5K antibodies were produced by Eurogentec and peptide affinity-purified in the Laboratory of Functional Genetics.

Cell isolation

Bone marrow was taken from femurs and tibias of 8- to 16-week-old mice. Tibias and femurs were first flushed with PBS/10mM EDTA + 2% FBS, filtrated on a 50 μ m membrane and centrifuged 5min at 350g. Then, pellet was resuspended in 5 ml of red blood lysis buffer (0,414g NH₄Cl; 50mg KHCO₃; EDTA 1mM pH8) 10min at RT. Lysis reaction was stopped by adding 10ml of PBS/10mM EDTA + 2% FBS and the resuspended solution was centrifuged 5min at 350g. Spleen was taken from 8- to 16-week-old mice and pressed in a 6 wells plate containing 2ml of red blood lysis buffer, 3 more ml were added and then incubated 10min at RT. Lysis was stopped with 10ml

of PBS/10mM EDTA + 2% FBS and the solution was filtered on a 50µm membrane and then centrifuged 5min at 350g. Cardiac puncture was performed on 8- to 12- week-old mice to collect blood in EDTA tube. Blood was then suspended in 10ml of red blood lysis buffer for 5min at RT and then centrifuged 5min at 350g. This step was realized two or three times. Pellets from bone marrow, spleen and blood cells were resuspended in 1ml of PBS/10mM EDTA + 2% FBS and alive cells were counted on a Neubauer counting chamber (Hirschmann # 8100103) with Trypan blue (Thermoscientific # SV30084.01).

Hematology analyzer

Blood cells were quantified with a Cell Dyn 3500 analyzer (Abott Diagnostic).

D_H-J_H, V_HJ558-D_HJ_H and V_HJ7183-D_HJ_H recombination analysis

Bone marrow B cells and neutrophils were purified with Mouse CD45R (B220) MicroBeads (#130-049-501) and Mouse Neutrophil Isolation Kit (#130-097-658) from Miltenyi Biotec, respectively. Genomic DNA was prepared for PCR by lysing bone marrow cells (10⁶) with 350µl of TNES (400mM NaCl⁺ 100mM EDTA pH 8-8,5 +0,6% SDS) + 0,2% proteinase K (Thermofisher Scientific #4333793) at 55°C during 3h. Vortexing was performed each 30min. NaCl 6M (100µl) was added and DNA containing solution was centrifuged at 14000g during 10min. EtOH 100% (300 µl) was added to the supernatant. This solution was centrifuged at 14000g during 10min after 4 up and down mixing. Supernatant was removed, 300µl of EtOH 70% was added and centrifugation was performed at 14000g during 10min. Supernatant was removed and pellet was dried during 30min. Pellet was dissolved in 100µl of Tris-HCl pH 7,5-8,5 at 55°C during 1h. DNA was quantified with Thermo Scientific™ Spectrophotomètres NanoDrop™ 2000 / 2000c. PCR reaction (10µl) was prepared with GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase kit (Promega # M7405): 1µl DNA template (100ng)+ 3,2µl dH₂O

1µl primer + 2µl buffer + 1µl MgCl₂ + 0,8µl dNTP (Applied Biosystems #362275). The following primers, J_H3 (5'-GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG-3'), DH (5'-CGAATTCGATTTTGTCAAGGGATCTACTACTGTG-3'), V_H558 (5'-CGAGCTCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAAC-3'), V_H7183 (5'-CGGTACCAAGAACAACCTGTTCTGCAAATGACC-3') were used to amplified recombined segments: 94°C-2min; (94°C - 1min; 60°C - 1min; 72°C - 1min45sec) X35; 72°C -10min. PCR products were charged on 1% gel and D_H-J_H, V_H558-D_HJ_H and V_H7183-D_HJ_H amplicons were detected at 1033, 716 and 333 bp, respectively.

Blood immunoglobulins quantification

Cardiac puncture was performed on 8- to 12- week-old mice and blood was incubated at RT during at least 30 min and then centrifuged 5 min at 350g. The supernatant was removed in another tube. This step was repeated at least 2 times. Serum levels of IgG, IgM and IgA were determined by ELISA. Briefly, for VAV-CRE and control mice, plates were coated with goat anti-mouse IgG, goat anti-mouse IgM or goat anti-mouse IgA specific antibodies and the assays were developed with the respective alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse isotype specific antibodies (all from Sigma). Results were expressed in µg/ml for IgG and IgM or ng/ml for IgA antibodies in reference to a standard curve obtained with a mouse reference serum (ICN Biomedicals Inc.). For MB1-CRE and control mice, blood immunoglobulins quantification was determined with IgM Mouse Uncoated ELISA Kit (Plates #88-50470) and IgG (Total) Mouse Uncoated ELISA Kit (Plates # 88-50400-86), both purchased from Invitrogen. Absorbance analysis was performed by Tecan Infinite 200 Pro from LabX.

Cell phenotyping, protein expression, Interleukin-7 (IL7) stimulation and FACS analysis

For phenotyping, cells isolated from bone marrow, spleen and blood were diluted to 10^6 cells/ml and then blocked with 100 μ l of PBS/10mM EDTA + FBS 5% + 2,5 ng/ml purified rat anti-mouse CD16/CD32 (BD Biosciences #553141) 20min at 4°C. Cells were then centrifuged 5min at 350g. Blood cells were stained with CD3 ϵ , CD4, CD8 and CD19, splenic cells with CD19 and bone marrow cells with B220, CD43, CD24, BP-1, IgM and IgD for 30min at 4°C. Each mix was supplemented by 1/1000 Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience # 65-0865-14). For protein expression analysis, cells isolated from bone marrow were diluted to 5×10^6 cells/ml and then blocked with 100 μ l of PBS/10mM EDTA + FBS 5% + 2,5 ng/ml purified rat anti-mouse CD16/CD32 (BD Biosciences #553141) for 20min at 4°C. Cells were centrifuged 5min at 350g and stained with B220, CD43, CD24, BP-1 antibodies and Fixable Viability Dye eFluor™ 780 in PBS/10mM EDTA + FBS 5% solution for 30min at 4°C. Stained cells were washed 2 times in PBS/10mM EDTA +FBS 2% for 5min at 350g, and then fixed with PAF 2% (Sigma Aldrich #HT501128) for 20min at 4°C. Cells were plasma and nuclear membranes-permeabilized with Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience #00-5523-00) for 30min at 4°C. Cells were washed 2 times in PBS/10mM EDTA +FBS 2% and stained 50min at RT with Alexa Fluor® 647 anti-PAX5 and PE anti-mouse EBF1 antibodies diluted in 100 μ l of PBS/EDTA+FBS 2% solution. For ex-vivo IL-7 stimulation analysis, cells isolated from bone marrow were diluted to 5×10^6 cells/ml and then blocked with 100 μ l of PBS/10mM EDTA + FBS 5% + 2,5 ng/ml purified rat anti-mouse CD16/CD32 (BD Biosciences #553141) for 20min at 4°C. Cells were centrifuged 5min at 350g, stained with B220, CD43, CD24, BP-1 antibodies and Fixable Viability Dye eFluor™ 780 in PBS/10mM EDTA + FBS 5% solution for 30min at 4°C and washed 2 times in PBS/10mM EDTA +FBS 2%. Mouse IL-7 Recombinant Protein (Invitrogen # RP-8664) (2ng/ml) was added to cells at 37°C for 0 (without IL-

7), 2 and 10min. The activation was stopped by fixating cells with 2% PAF (Sigma Aldrich # HT501128) 15min at 4°C. Cells were washed 2 times in PBS/10mM EDTA +FBS 2%. Cells were plasma membrane-permeabilized with Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience # 88-8824-00). Cells were stained with PE-CF594 mouse anti-AKT^{pS473}, PE anti-STAT5^{pY694}, anti-JAK1^{pY1022} and anti-JAK3^{pY980/981} antibodies diluted in permeabilization buffer for 50min at RT and washed 2 times in PBS/10mM EDTA +FBS 2%. Cells were stained with PE-labeled F(ab')₂-goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody (Invitrogen #A10542) for 15min at RT. BD FACSFortessa was used for cell phenotyping. Mean fluorescence intensity (MFI) of specific markers was quantified on B cell subpopulations using FlowJo. Results were analyzed using FlowJo (Tree Star, Ashland, USA).

Immunofluorescence, FRET and Airyscan microscopy analysis

Bone marrow cells were isolated and total B cells were purified with mouse CD45R (B220) MicroBeads (#130-049-501). Purified cells were stained with BV711 anti-mouse CD45R/B220, Fixable Viability Dye eFluor™ 780 and APC rat anti-mouse CD43 or PE anti-mouse CD43 antibodies diluted in 100µl of PBS/10mM EDTA + FBS 5%. FSC-W and FSC-A discrimination was used to exclude doublet cells, and Fixable Viability Dye eFluor™ 780 was used to discriminate between dead and living cells. B cells precursors were sorted as B220⁺CD43⁺ cells using BD FACS Aria III 4L sorter. Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (Thermo Scientific # 154534PK) was coated with Poly-D-lysine hydrobromide (Sigma-Aldrich #P7280) at least 2h at RT. Sorted B220⁺CD43⁺ cells (50µl containing 2-4x10⁵ cells) were fixed on slide for 1h at RT. Mouse IL-7 Recombinant Protein (Invitrogen # RP-8664) (2ng/ml) was added to fixed cells for 0 (without IL-7), 2 and 10min at 37°C. For GM1⁺ microdomains detection, activation was stopped by fixating cells with 2% PAF (Sigma Aldrich # HT501128) for

15min at 4°C and cells were incubated with AF 488 Cholera Toxin Subunit B (CtxB) overnight at 4°C. GM1⁺ microdomains were defined according to a fluorescence volume threshold. This volume threshold (0,002μm³) was experimentally defined using Imaris software in order to exclude background and non-specific fluorescence. For immunofluorescence, activation was stopped by fixating cells with 2% PAF (Sigma Aldrich # HT501128) for 15min at 4°C (for IL7Rα, INPP5K and PtdIns(4,5)P2 staining) and with MetOH 100% at -20°C for 20min (for α-Tubulin and β-Actin staining). Cells were washed 2 times in PBS/10mM EDTA +FBS 2%, blocked and permeabilized with a solution containing PIPES 0,65% + NaCl 0,8% + KCl 0,02% +saponin 0,5% + goat serum 10% for 45min at 4°C. Cells were stained with INPP5K, IL7Rα, PtdIns(4,5)P2, α-Tubulin and β-Actin antibodies diluted in PIPES 0,65% + NaCl 0,8% + KCl 0,02% +saponin 0,1% + goat serum 10% solution overnight at 4°C. Cells were washed 3 times in PBS solution and then incubated with secondary antibodies for 2h at 4°C. Cells were washed once in PBS, incubated for 10min with DAPI 10mM 1/1000 (Thermofisher # D1306) and washed 3 times with dH₂O. Slide chambers were mounted using ProLong (Invitrogen# P36970). Zeiss LSM880 Airyscan/SIM was used for Z-stacks images acquisition. Orthogonal reconstructions of the Z-stacks images were obtained with Zen blue and Zen black edition software. For FRET, cell activation was stopped by fixating cells with 2% PAF (Sigma Aldrich # HT501128) for 15min at 4°C. Cells were stained with rat anti-mouse IL7Rα, rabbit anti-mouse CD132 antibodies or DiO' overnight at 4°C, or were permeabilized with Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience # 88-8824-00) for 45min at 4°C and stained with rat anti-mouse JAK1, rabbit anti-mouse JAK3 or rabbit anti-IL7Rα^{pY449} antibodies overnight at 4°C. Cells were washed 3 times in PBS and then incubated with AF546 cross-adsorbed goat anti-rat IgG (H+L) and AF488 highly cross-adsorbed goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary

antibodies for 2h at 4°C. Cells were washed once in PBS, incubated 10min with DAPI 10mM 1/1000 (Thermofisher # D1306) and washed 3 times with dH₂O. Slide chambers were mounted using ProLong (Invitrogen# P36970). DIO' and AF488 highly cross-adsorbed goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody were excited with 488 nm laser line (Donor alone) and visualized using the bandpass 500 - 545 +LP 575 Airyscan filter (IDD) or visualized using the 595/40 bandpass + LP 655 Airyscan filter (IDA'). AF546 cross-adsorbed goat anti-rat IgG (H+L) was excited with 561nm laser line (Acceptor alone) and visualized using the bandpass 500 - 545 +LP 575 Airyscan filter (IDA) or using the 595/40 bandpass + LP 655 Airyscan filter (IAA). For FRET emission (Donor + Acceptor), only visualization using the 595/40 bandpass + LP 655 Airyscan filter was performed after 561 nm laser line excitation (IA'), but after 488 nm laser line excitation, visualization was performed using the bandpass 500 - 545 +LP 575 Airyscan filter (ID) and using the 595/40 bandpass + LP 655 Airyscan filter (IA). FRET efficiency was obtained according to validated calculation that remove fluorescence background (Guala et al., 2018):

- Donor alone (AF488)

$$B = (IDA') / (IDD)$$

IDA' = Fluorescence intensity from $\lambda_{\text{donor excitation}}$ and $\lambda_{\text{acceptor emission}}$

IDD = Fluorescence intensity from $\lambda_{\text{donor excitation}}$ and $\lambda_{\text{donor emission}}$

- Acceptor alone (AF546)

$$D = (IDA) / (IAA)$$

IDA = Fluorescence intensity from $\lambda_{\text{donor excitation}}$ and $\lambda_{\text{acceptor emission}}$

IAA = Fluorescence intensity from $\lambda_{\text{acceptor excitation}}$ and $\lambda_{\text{acceptor emission}}$

- Donor and Acceptor (AF488 + AF546)

ID = Fluorescence intensity from $\lambda_{\text{donor excitation}}$ and $\lambda_{\text{donor emission}}$

IA= Fluorescence intensity from λ_{donor} excitation and $\lambda_{\text{acceptor}}$ emission

IA'= Fluorescence intensity from $\lambda_{\text{acceptor}}$ excitation and $\lambda_{\text{acceptor}}$ emission

$\text{FRET}_{\text{corr}} = \text{IA} - \text{B} \cdot \text{ID} - \text{D} \cdot \text{IA}'$

$\text{FRET}_{\text{efficiency}} = \text{FRET}_{\text{corr}} / \text{ID}$

Zeiss LSM880 Airyscan/SIM was used for Snap images acquisition. Fiji was used for script generation, FRET efficiency calculation and image production.

Immunoprecipitation, SDS-PAGE and Western blotting

Bone marrow cells were isolated and B cells were purified by using mouse CD45R (B220) MicroBeads (#130-049-501). Purified cells were stained with BV711 anti-mouse CD45R/B220, Fixable Viability Dye eFluor™ 780 and APC rat anti-mouse CD43 or PE anti-mouse CD43 antibodies diluted in 100µl of PBS/10mM EDTA + FBS 5%. FSC-W and FSC-A discrimination was used to exclude doublet cells, and Fixable Viability Dye eFluor™ 780 was used to discriminate between dead and living cells. B cells precursors were sorted as B220⁺CD43⁺ cells using BD FACSAria III 4L sorter. Cells were centrifuged 5min at 350g, resuspended at 3x10⁶ cells/100µl of protein lysis buffer (Tris-HCl pH 7,4 20mM + NaCl 150mM + MgCl₂ 1,5mM + NP-40 1% + EGTA 1mM + glycerol 10%) for 30min at 4°C and centrifuged for 7min at 14000g. Supernatant (20µl) was kept as “Input” and the rest was incubated with 50µg of biotin-IL7Rα antibody or 26µg of biotin-INPP5K antibody at 4°C overnight. The next day, NeutAvidin Agarose Resins (20µl, Thermo Scientific #29202) was added and incubated for 1h at RT. The mixture was centrifuged for 2min at 2500g, the supernatant was kept as “1st Supernatant” and 500µl of PBS + 1% NP-40 was added. IP solution was finally washed 4 times (centrifugation for 2min at 2500g and resuspension in 500µl of PBS + 1% NP-40) and dissolved in 5µl of Laemilli buffer 4X (8% SDS, 25% glycerol, 8% 2-mercaptoethanol, 0,02% bromophenol blue and 0,25 M Tris HCl, pH 6) and in 15 µl of

PBS + 1% NP-40. Finally, the protein solution was loaded on a 8% polyacrylamide gel. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane using Trans-Blot Turbo Transfer System (BIO-RAD). The membrane was blocked with TBST + 5% milk solution for 1h at RT and incubated with primary rabbit anti-mouse INPP5K, INPP5J and IL7R α antibodies overnight at 4°C. The membrane was washed 3 times in TBST solution, and proteins detection was performed using Clean-Blot™ IP Detection Kit (HRP) (Thermo Scientific # 21232) and Amersham Hyperfilm ECL (Fisher #10534205).

Statistical analysis

Respect of the assumptions of normal distribution of residuals and homoscedasticity was verified, and data were presented as mean + SEM as well as individual values, unless otherwise indicated. Data from independent experiments were pooled for analysis in each data panel, unless otherwise indicated. Statistical analyses were performed using Prism 8 (GraphPad Software). Unpaired *t* test was performed unless otherwise indicated in the figure legends. We considered a P-value lower than 0,05 as significant. N.S.: $P > 0,05$; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; ****: $P < 0,0001$.

References:

Abdelrasoul, H., Werner, M., Setz, C.S. et al. PI3K induces B-cell development and regulates B cell identity. *Sci Rep* 2018; 8: 1327. doi.org/10.1038/s41598-018-19460-5.

Aivazian, D., Stern, L. J. Phosphorylation of T cell receptor zeta is regulated by a lipid dependent folding transition. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 1023-6. doi: 10.1038/80930.

Arkhipov, A., Shan, Y., Das, R., Endres, N. F., Eastwoo, M. P., Wemmer, D. E., Kuriyan, J., Shaw, D. E. Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell* 2013; 152:557–569.

Babon, J. J., Lucet, I. S, Murphy, J. M., Nicola, N. A., Varghese, L. N. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem J.* 2014; 462: 1–13. doi:10.1042/BJ20140712.

Barata, J. T. , Durum, S. K., Seddon, B. Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nat Immunol.* 2019; 20:1584-1593. doi: 10.1038/s41590-019-0479-x.

Chen, X., Pan, W., Sui, Y., Li, H., Shi, X., Guo, X., Qi, H., Xu, C., Liub, W. Acidic phospholipids govern the enhanced activation of IgG-B cell receptor. *Nat Commun.* 2015; 6: 8552. doi: 10.1038/ncomms9552.

Chouaki-Benmansour, N., Ruminski, K., Sartre, A.-M., Phelipot, M.-C., Salles, A., Bergot, E., Wu, A., Chicanne, G., Fallet, M., Brustlein, S., Billaudeau, C., Formisano, A., Mailfert, S., Payrastre, B., Marguet, D., Brasselet, S., Hamon, Y., He, H.-T. Phosphoinositides regulate the TCR/CD3 complex membrane dynamics and activation. *Sci Rep.* 2018; 21:4966. doi: 10.1038/s41598-018-23109-8.

Clark, M.R. et al. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14:69–80.

Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., Busslinger, M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 2007; **8**:463–470.

Corcoran, A. E., Smart, F. M., Cowling, R. J., Crompton, T., Owen, M. J., Venkitaraman, A.R. The interleukin-7 receptor α chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis. *EMBO J.* 1996; **15**:1924–1932.

Corcoran, A.E. et al. Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature* 1998; **391**:904–907.

Cramer, S. D., Aplan, P. D., Durum, S. K. Therapeutic targeting of IL-7R α signaling pathways in ALL treatment. *Blood* 2016; **128**:473–478.

Decker, T., Pasca di Magliano, M., McManus, S., Sun, Q., Bonifer, C., Tagoh, H., Busslinger, M.. Stepwise activation of enhancer and promoter regions of the B cell commitment gene Pax5 in early lymphopoiesis. *Immunity* 2009; **30**:508-20. doi: 10.1016/j.immuni.2009.01.012.

Deford-Watts, L. M., Tassin, T. C., Becker, A. M., Medeiros, J. J., Albanesi, J. P., Love, P. E., Wülfing, C., van Oers, N. S. C.. The cytoplasmic tail of the T cell receptor CD3 epsilon subunit contains a phospholipid-binding motif that regulates T cell functions. *J. Immunol.* 2009; **183**: 1055–1064.

Ebert, A., McManus, S., Tagoh, H., Medvedovic, J., Salvagiotto, G., Novatchkova, M., Tamir, I., Sommer, A., Jaritz, M., Busslinger, M.. The distal V_H gene cluster of the *Igh* locus contains distinct regulatory elements with Pax5 transcription factor-dependent activity in Pro-B cells. *Immunity* 2011; **34**:175–187.

Endres, N. F., Das, R., A. Smith, W., Arkhipov, A., Kovacs, E., Huang, Y., Pelton, J. G., Shan, Y., D. Shaw, E., Wemmer, D. E., Groves, J. T., Kuriyan, J.. Conformational

Coupling across the Plasma Membrane in Activation of the EGF Receptor. *Cell* 2013; 152: 543-556.

Erlandsson, L. et al. Both the pre-BCR and the IL-7R α are essential for expansion at the pre-BII cell stage in vivo. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35:1969–1976.

Fruman, D.A., et al. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85 α . *Science* 1999; 283:393–397.

Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E., Busslinger, M. Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev.* 2004; 18: 411–422. doi: 10.1101/gad.291504

Giliani, S. et al. Interleukin-7 receptor α (IL-7R α) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients.

Immunol. Rev. 2005; 203:110–126.

Guala, D., Bernhem, K., Ait Blal, H., Jans, D., Lundberg, E., Brismar, H., Sonnhammer, E. L. L. Experimental validation of predicted cancer genes using FRET. *Methods Appl. Fluoresc.* 2018; 6:035007. doi.org/10.1088/2050-6120.

Hammarén, H. M., Virtanen, A. T, Raivola, J., Silvennoinen, O. The regulation of JAKs in cytokine signaling and its breakdown in disease. *Cytokine* (2018). doi: 10.1016/j.cyto.2018.03.041.

Hesslein, D. G. T., Pflugh, D. L., Chowdhury, D, Bothwell, A. L. M., Sen, R., Schatz, D. G. Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments. *Genes Dev.* 2003; 17:37-42. doi: 10.1101/gad.1031403.

Heo, W. D., Inoue, T, Park, W. S., Kim, M. L., Park, B. O., Wandless, T. J., Meyer, T. PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* 2006; 314:1458-61. doi: 10.1126/science.1134389.

Herzog, S. et al. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9:195–205.

Hirokawa, S., Sato, H., Kato, I., Kudo, K. EBF-regulating Pax5 transcription is enhanced by STAT5 in the early stage of B cells. *Eur J Immunol.* 2003; 33:1824-9. doi: 10.1002/eji.200323974.

Hryniewicz-Jankowska, A., Augoff, K., Biernatowska, A., Podkalicka, J., Sikorski, A. F. Membrane rafts as a novel target in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1845:155-65. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.01.006.

Ijuin, T., Yu, Y. E., Mizutani, K., Pao, A., Tateya, S., Tamori, Y., Bradley, A., Takenawa, T.. Increased insulin action in SKIP heterozygous knockout mice. *Mol Cell Biol.* 2008; 28:5184-95. doi: 10.1128/MCB.01990-06.

Ijuin, T., Hatano, N., Hosooka, T., Takenawa, T. Regulation of insulin signaling in skeletal muscle by PIP3 phosphatase, SKIP, and endoplasmic reticulum molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015; 1853: 3192-201.

Ijuin, T., Hatano, N., Takenawa, T. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) binds directly to PIP3 phosphatase SKIP and determines its localization. *Genes Cells* 2016; 21:457-65.

Jani, P. K., Kubagawa, H., Melchers, F. A rheostat sets B-cell receptor repertoire selection to distinguish self from non-self. *Curr Opin Immunol.* 2020; 67:42-49. doi: 10.1016/j.coi.2020.07.003.

Jiang, Q., Li, W. Q., Hofmeister, R. R., Young, H. A., Hodge, D. R., Keller, J. R., Khaled, A. R., Durum, S. K. Distinct Regions of the Interleukin-7 Receptor Regulate Different Bcl2 Family Members. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 6501–6513. doi: 10.1128/MCB.24.14.6501-6513.2004

Katerndah, C.D.S. et al. Antagonism of B cell enhancernetworks by STAT5 drives leukemia and poor patient survival. *Nat. Immunol.* 2017; 18:694–704.

Kleppe, M., Spitzer, M. H., Li S., Hill, C. E., Dong, L., Papalexi, E., et al. Jak1 Integrates cytokine sensing to regulate hematopoietic stem cell function and stress hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 2018; 22:277. doi: 10.1016/j.stem.2017.

Li, L., Shi, X., Guo, X., Li, H., Xu, C. Ionic protein-lipid interaction at the plasma membrane: what can the charge do? *Trends Biochem Sci.* 2014; 39:130-40. doi: 10.1016/j.tibs.2014.01.002.

Lin, J. X., Migone, T. S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J. A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E. T., Mietz, J., John, S., Leonard, W. J. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 1995; 2:331-9. doi: 10.1016/1074-7613(95)90141-8.

Lorenzini, T., Dotta, L., Giacomelli, M., Vairo, D., Badolato, R. STAT mutations as program switchers: turning primary immunodeficiencies into autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2017; 101:29–38. doi: 10.1189/jlb.5RI0516-237RR.

McElroy, C. A., Holland, P. J., Zhao, P., Lim, J.-M., Wells, L., Eisenstein, E., Walsh, S. T. R. Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109:2503-8. doi: 10.1073/pnas.1116582109.

McGrath, M. J., Eramo, M. J., Gurung, R., Sriratana, A., Gehrig, S. M., Lynch, G. S., Lourdes, S. R., Koentgen, F., Feeney, S. J., Lazarou, M., McLean, C. A., Mitchell, C. A. Defective lysosome reformation during autophagy causes skeletal muscle disease. *J Clin Invest.* 2021;131:e135124. doi: 10.1172/JCI135124.

McLean, K. C., Mandal, M. It Takes Three Receptors to Raise a B Cell. *Trends Immunol.* 2020; 41:629-642. doi: 10.1016/j.it.2020.05.003.

Medvedovic, J., Ebert, A., Tagoh, H., Busslinger, M. Pax5: a master regulator of B cell development and leukemogenesis. *Adv Immunol.* 2011; 111:179-206.
doi: 10.1016/B978-0-12-385991-4.00005-2.

Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M., Busslinger, M. Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science* 2002; 297:110–113.

Milford, T.A. et al. TSLP or IL-7 provide an IL-7R α signal that is critical for human B lymphopoiesis. *Eur. J. Immunol.* 2016; 46 :2155–2161.

Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., Busslinger, M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999; 402:14–20.

Nutt, S. L., Urbánek, P., Rolink, A., Busslinger, M. Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes & Dev.* 1997; 11:476-491.

Ochiai, K. et al. A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nature Immunol.* 2012; 13:300–307.

Osborn, D. P. S., Pond, H. L., Mazaheri, N., Dejjardin, J., Munn, C. J., Mushref, K., Cauley, E. S., Moroni, I., Pasanisi, M. B., Sellars, E. A., Hill, R. S., Partlow, J. N., Willaert, R. K., Bharj, J., Malamiri, R. A., Galehdari, H., Shariati, G., Maroofian, R., Mora, M., Swan, L. E., Voit, T., Conti, F. J., Jamshidi, Y., Manzini, M. C. Mutations in INPP5K Cause a Form of Congenital Muscular Dystrophy Overlapping Marinesco-Sjögren Syndrome and Dystroglycanopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 2017; 100:537-545.

Parrish, Y.K. et al. IL-7-dependence in human B lymphopoiesis increases during progression of ontogeny from cord blood to bone marrow. *J. Immunol.* 2009; 182:4255–4266.

Pernot, E., Terryn, S., Cheong, S. C., Markadieu, N., Janas, S., Blockmans, M., Jacoby, M., Pouillon, V., Gayral, S., Rossier, B. C., Beauwens, R., Erneux, C., Devuyst, O., Schurmans, S. The inositol Inpp5k 5-phosphatase affects osmoregulation through the vasopressin-aquaporin 2 pathway in the collecting system. *Pflugers Arch.* 2011; 462:871-83. doi: 10.1007/s00424-011-1028-0.

Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsde, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J. D., Davison, B. L. Early Lymphocyte Expansion Is Severely Impaired in Interleukin 7 Receptor-deficient Mice. *J. Exp. Med.* 1994; 180:1955-1960.

Petkau, G., Turner, M. Signalling circuits that direct early B-cell development. *Biochem. J.* 2019; 476:769–778.

Puel, A. et al. Defective IL7R expression in T-B+ NK+ severe combined immunodeficiency. *Nat. Genet.* 1998; 20:394–397.

Ramadani, F. et al. The PI3K isoforms p110 α and p110 δ are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci. Signal.* 2010; 3, ra60.

Reth, M., Nielsen, P. Signaling circuits in early B-cell development. *Adv Immunol.* 2014; 122:129-75. doi: 10.1016/B978-0-12-800267-4.00004-3.

Rodig, S. J., Meraz, M. A., White, J. M., Lampe, P. A., Riley, J. K., Arthur, C. D., et al. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 1998; 93:373–83.

Roessler, S., Györy, I., Imhof, S., Spivakov, M., Williams, R. R., Busslinger, M., Fisher, A. G., Grosschedl, R. Distinct promoters mediate the regulation of Ebf1 gene expression by interleukin-7 and Pax5. *Mol Cell Biol* 2007; 27:579-94. doi: 10.1128/MCB.01192-06.

Rose, T., Pillet, A.-H., Lavergne, V., Tamarit, B., Lenormand, P., Rousselle, J.-C., Namane, A., Thèze, J. Interleukin-7 compartmentalizes its receptor signaling complex to initiate CD4 T lymphocyte response. *J Biol Chem.* 2010; 285:14898–14908.

Schurmans, S., Vande Catsyne, C. A., Desmet, C., Moës, B. The phosphoinositide 5-phosphatase INPP5K: From gene structure to in vivo functions. *Adv Biol Regul.* 2021; 79:100760. doi: 10.1016/j.jbior.2020.100760.

Suzuki, H. et al. Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Science* 1999; 283:390–392.

Tamarit, B., Bugault, F., Pillet, A.-H., Lavergne, V., Bochet, P., Garin, N., Schwarz, U., Thèze, J., Rose, T.. Membrane microdomains and cytoskeleton organization shape and regulate the IL-7 receptor signalosome in human CD4 T-cells. *J. Biol. Chem.* 2013; 288:8691-8701. Doi: 10.1074/jbc.M113.449918.

Tanaka, S., Baba, Y. B Cell Receptor Signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1254:23-36. doi: 10.1007/978-981-15-3532-1_2.

Venkitaraman, A. R., Cowling, R. J. Interleukin-7 induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the alpha chain of the interleukin-7 receptor. *Eur J Immunol.* 1994; 24:2168-74. doi: 10.1002/eji.1830240935.

Walsh, S. T. R. Structural insights into the common γ -chain family of cytokines and receptors from the interleukin-7 pathway. *Immunol Rev.* 2012; 250: 303–316. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01160.x.

Wiessner, M., Roos, A., Munn, C. J., Viswanathan, R., Whyte, T., Cox, D., Schoser, B., Sewry, C., Roper, H., Phadke, R., Marini Bettolo, C., Barresi, R., Charlton, R., Bönnemann, C. G., Abath Neto, O., Reed, U. C., Zanoteli, E., Araújo Martins Moreno, C., Ertl-Wagner, B., Stucka, R., De Goede, C., Borges da Silva, T., Hathazi, D.,

Dell'Aica, M., Zahedi, R. P., Thiele, S., Müller, J., Kingston, H., Müller, S., Curtis, E., Walter, M. C., Strom, T. M., Straub, V., Bushby, K., Muntoni, F., Swan, L. E., Lochmüller, H., Senderek, J. Mutations in INPP5K, Encoding a Phosphoinositide 5-Phosphatase, Cause Congenital Muscular Dystrophy with Cataracts and Mild Cognitive Impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 2017; 100:523-536.

Wofford, J. A., Wieman, H. L., Jacobs, S. R., Zhao, Y., Rathmell, J. C. IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* 2008; 111:2101-11. doi: 10.1182/blood-2007-06-096297.

Xu, C., Gagnon, E., Call, M. E., Schnell, J. R., Schwieters, C. D., Carman, C. V., Chou, J. J., Wucherpfennig, K. W. Regulation of T Cell Receptor Activation by Dynamic Membrane Binding of the CD3 ϵ Cytoplasmic Tyrosine-Based Motif. *Cell* 2008; 135: 702-713.

Zhang, H., Cordoba, S.-P., Dushek, O., van der Merwe, P. A. Basic residues in the T-cell receptor ζ cytoplasmic domain mediate membrane association and modulate signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108: 19323-19328.

doi.org/10.1073/pnas.1108052108

Acknowledgments:

We would like to thank the members of the GIGA-Molecular Biology of Diseases Unit for helpful discussions, and Prof. Muriel Moser (IBMM, ULB, Gosselies) for help with mice breeding. We thank the GIGA-In Vitro Imaging (cell imaging and flow cytometry) and GIGA-Mouse Facility platforms for discussions and technical support. B. M. and C.-A. V. C. were supported by a grant from the FRIA/FRS-FNRS (Fonds National de la Recherche Scientifique belge). This work was supported by grants from the Université de Liège (FRS #, to S. S.; Actions de Recherche Concertées (ARC) #, to S. S.), the Fonds Léon Frédéricq (to B. M. and C.-A. V. C.), and the FRS-FNRS (CDR # and PDR #, to S. S.). We declare no financial/commercial conflict of interests.

Figure Legends

Figure 1

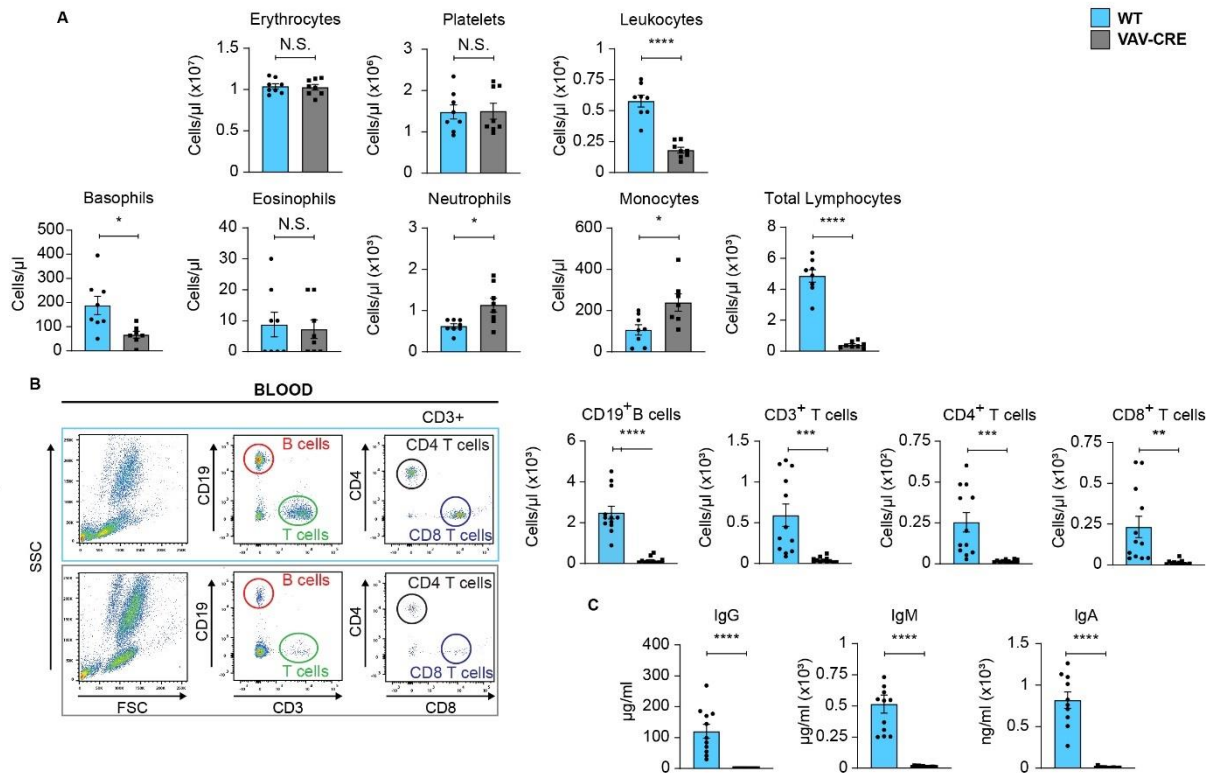


Figure 1: Loss of INPP5K protein in VAV-CRE mice induces severe blood leukocytes and immunoglobulins alterations. **A.** Flow cytometry analysis and quantification of *Inpp5k*^{flx/flx} (WT, blue columns) and *Inpp5k*^{flx/flx} Vav-Cre (VAV-CRE, grey columns) blood cells concentration using a FC 500 Beckman Coulter (n=9 mice per group). **B.** FACS analysis and quantification of WT and VAV-CRE CD19⁺, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ blood lymphocytes concentrations (n=12 mice per group). Upper panel: morphology graphics (SSC/FSC) and blood lymphocytes staining strategy; lower panel: quantification of blood lymphocytes. **C.** ELISA analysis of WT (blue columns) and VAV-CRE (grey columns) blood IgM, IgG and IgA immunoglobulins concentrations. Results represent individual mice and means ± SEM. *P* values were calculated using unpaired nonparametric *t* test. N.S.: *P*>0,05; *: *P*<0,05; **: *P*<0,01; ***: *P*<0,001; ****: *P*<0,0001.

Figure 2

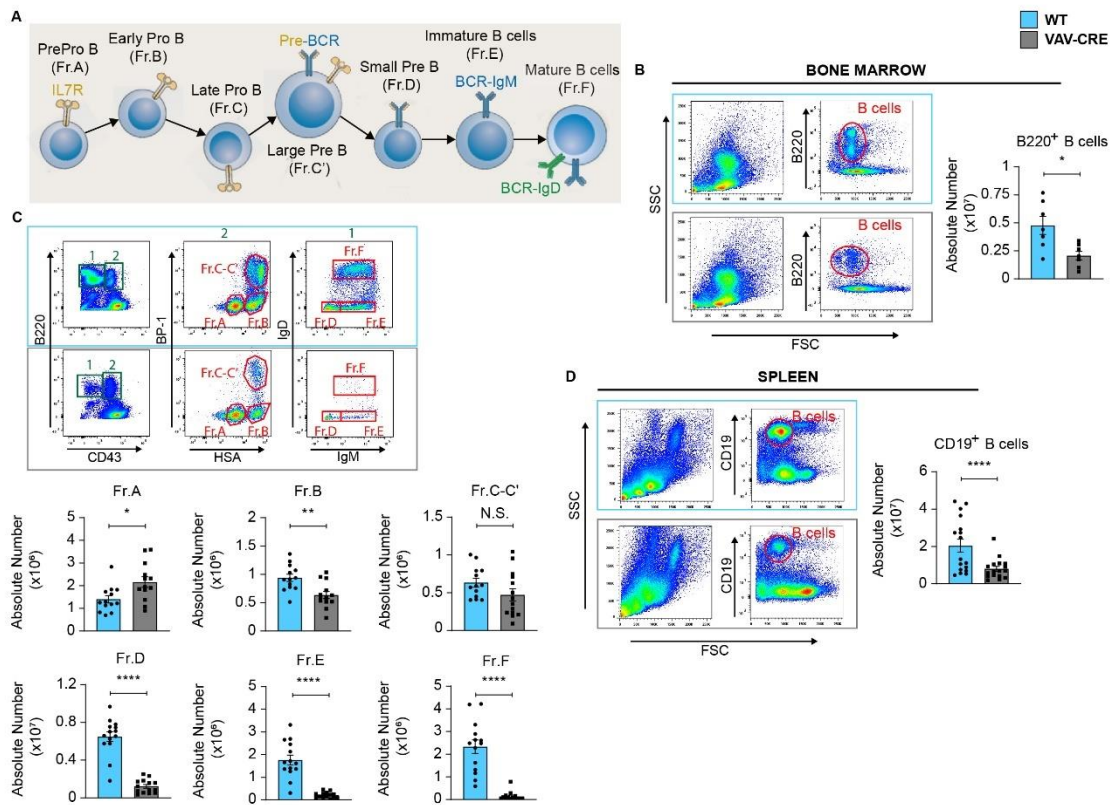


Figure 2: Reduced expression of INPP5K protein results in altered B cell differentiation and maturation. A. Representative figure of early B cell development in the mouse bone marrow according to Hardy's nomenclature. The different stages, from fraction A (PrePro B) to F (mature B cells) as well as essential receptors driving the differentiation (IL7R, Pre-BCR and BCR) are represented. **B.** Numbers of bone marrow B220⁺ B cells were analyzed by flow cytometry in control (WT, blue columns) and VAV-CRE (grey columns) mice. Left panels: morphology graphic (SSC/FSC) and staining strategy for B220⁺ bone marrow B cells; right graph: total numbers of bone marrow B220⁺ B cells isolated from 2 femurs and 2 tibias. Results represent individual mice (n=7 mice per group) and means $\pm$ SEM. **C.** Flow cytometry analysis of control (WT, blue columns) and VAV-CRE (grey columns) bone marrow B cells development according to Hardy's nomenclature. Left panels: staining strategy for the different stages of early B cell development in the bone marrow: fraction A (B220⁺CD43⁺BP-1⁻HSA⁻); Fraction B (B220⁺CD43⁺BP-1⁻HSA⁺); Fractions C-C' (B220⁺CD43⁺BP-1⁺HSA⁺); Fraction D (B220⁺CD43⁺BP-1⁺HSA⁺); Fraction E (B220⁺CD43⁺BP-1⁺HSA⁺); Fraction F (B220⁺CD43⁺BP-1⁺HSA⁺); Fraction F (B220⁺CD43⁺BP-1⁺HSA⁺). Right panels: bar graphs showing absolute numbers of B cells in each fraction. **D.** Flow cytometry analysis of CD19⁺ B cells in the spleen. Left panels: morphology graphic (SSC/FSC) and staining strategy for CD19⁺ spleen B cells. Right graph: total numbers of spleen CD19⁺ B cells isolated from 2 femurs and 2 tibias. Results represent individual mice (n=7 mice per group) and means $\pm$ SEM.

Fraction D (B220⁺CD43⁻IgM⁻IgD⁻); Fraction E (B220⁺CD43⁻IgM⁺IgD⁻) and Fraction F (B220⁺CD43⁻IgM⁺IgD⁺). Right graphs: numbers of B cells in each fraction, according to their percentage and the total number of cells isolated from 2 femurs and 2 tibias. Results represent individual mice (n=15 mice per group) and means $\pm$ SEM. **D.** Flow cytometry analysis of control (WT, blue column) and VAV-CRE (grey column) splenic CD19⁺ B cells numbers. Left panels: morphology graphic (SSC/FSC) and staining strategy for CD19⁺ bone marrow B cells; right graph: total numbers of splenic CD19⁺ B cells. Results represent individual mice (n=17 mice per group) and means $\pm$ SEM. *P* values were calculated using unpaired nonparametric *t* test. N.S.: *P*>0,05; *: *P*<0,05; **: *P*<0,01; ***: *P*<0,001; ****: *P*<0,0001.

Figure 3

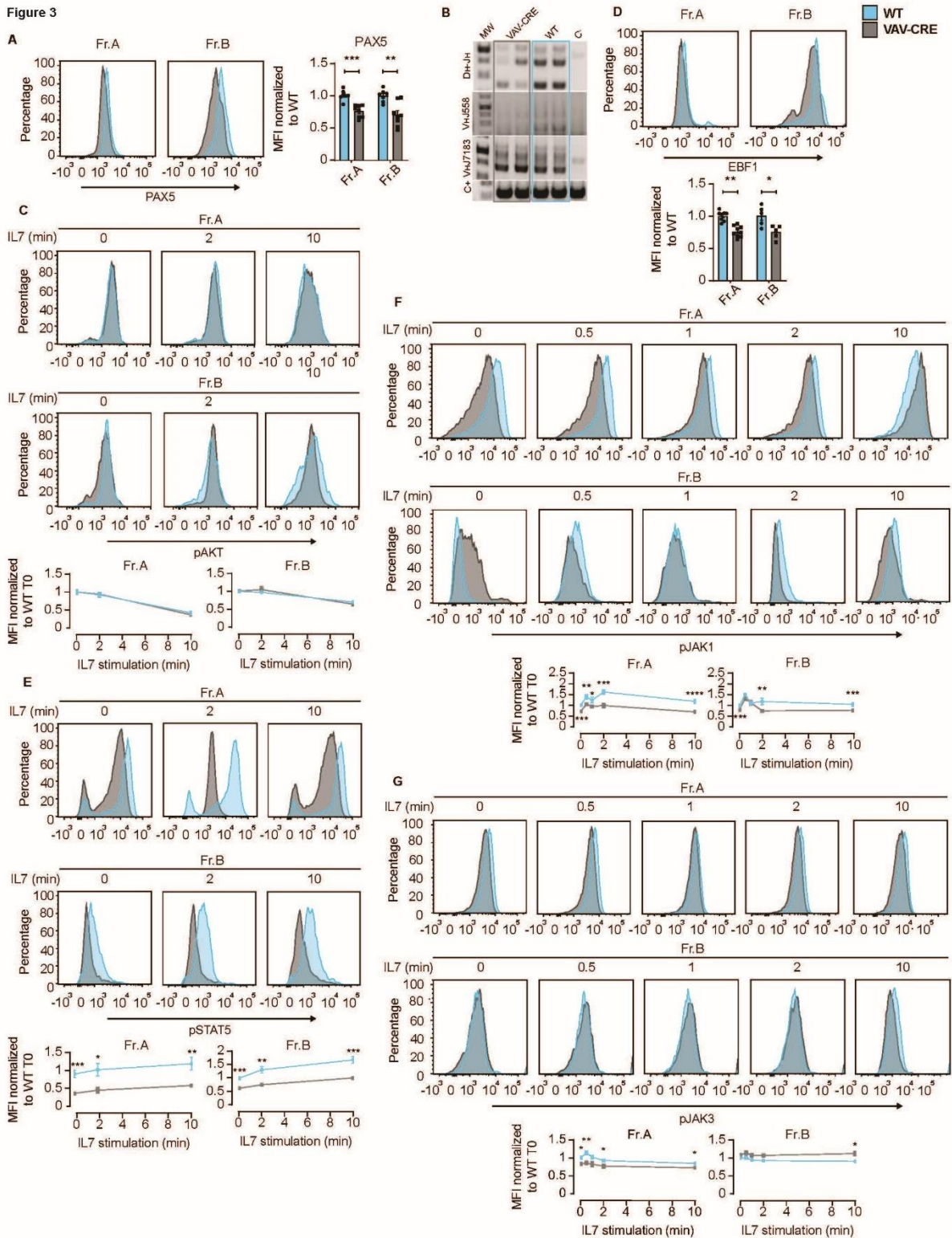


Figure 3: Reduced expression of INPP5K results in altered IL7R signaling and Pax5 expression in fractions A and B of the bone marrow. A. PAX5 protein expression was analyzed by flow cytometry after plasma and nuclear membranes

permeabilization of control (WT, blue areas and columns) and VAV-CRE (grey areas and columns) cells from fractions A and B. Left panels: representative MFI histograms of PAX5 protein expression. Right graph: quantitative expression of PAX5 protein after MFI normalization to WT mean MFI. Results represent individual mice (n=8 to 9 mice per group) and means $\pm$ SEM. **B.** PAX5-dependent D_H-J_H and V_HJ558-D_HJ_H as well as PAX5-independent V_H7183-D_HJ_H rearrangements were analyzed by PCR with specific primers using genomic DNA purified from facs-sorted WT and VAV-CRE B220⁺CD43⁺ bone marrow B cells as templates. PCR amplification of the *Gapdh* gene served as a positive control (C⁺). Genomic DNA isolated from facs-sorted CD11b⁺Ly6G⁺ bone marrow neutrophils (C⁻) served as a negative control. Results represent the prominent amplicons obtained from 2 WT and 2 VAV-CRE mice and correspond to the amplified D_H-J_H3, V_HJ558-D_HJ_H and V_HJ7183-D_HJ_H segments at the IgH locus. MW: molecular weight markers. **C.** Flow cytometry analysis of p-AKT^{S473} (pAKT) in plasma membrane-permeabilized cells from fractions A and B isolated from control (WT, blue areas and lines) and VAV-CRE (grey areas and lines) mice, before (0) and 2 and 10 min after ex-vivo addition of IL-7 (2 ng/ml) at 37°C. Upper panels: representative MFI histograms of p-AKT^{S473}. Lower graph: quantitative expression of p-AKT^{S473} normalized to WT mean MFI at t=0 (before IL7 addition). Results are representative of 2 independent experiments for a total of 6 mice. **D.** EBF1 protein expression was analyzed by flow cytometry after plasma and nuclear membranes permeabilization of control (WT, blue areas and columns) and VAV-CRE (grey areas and columns) cells from fractions A and B. Left panels: representative MFI histograms of EBF1 protein expression. Right graph: quantitative expression of EBF1 protein after MFI normalization to WT mean MFI. Results represent individual mice (n=5 to 9 mice per group) and means $\pm$ SEM. **E.** Flow cytometry analysis of p-STAT5^{Y694} (pSTAT5) in

plasma membrane-permeabilized cells from fractions A and B isolated from control (WT, blue areas and lines) and VAV-CRE (grey areas and lines) mice, before (0) and 2 and 10 min after *ex-vivo* addition of IL-7 (2 ng/ml) at 37°C. Left panels: representative MFI histograms of p-STAT5^{Y694}. Right graphs: quantitative expression of p-STAT5^{Y694} normalized to WT mean MFI at t=0 (before IL7 addition). Results are representative of a total number of 6 mice. **F-G.** Flow cytometry analysis of p-JAK1^{Y1022} (pJAK1) (**F**) and p-JAK3^{Y980/981} (pJAK3) (**G**) in plasma membrane-permeabilized cells from fractions A and B isolated from control (WT, blue areas and lines) and VAV-CRE (grey areas and lines) mice, before (0), 0.5, 1, 2 and 10 min after *ex-vivo* addition of IL-7 (2 ng/ml) at 37°C. Left panels: representative MFI histograms of p-JAK1^{Y1022} (**F**) and p-JAK3^{Y980/981} (**G**). Right graphs: quantitative expression of p-JAK1^{Y1022} (**F**) and p-JAK3^{Y980/981} (**G**) normalized to WT mean MFI at t=0 (before IL7 addition). Results are representative of 4 independent experiments for a total number of 8-12 mice. *P* values

were calculated using unpaired nonparametric t test. N.S.: $P>0,05$; *: $P<0,05$; **: $P<0,01$; ***: $P<0,001$; ****: $P<0,0001$.

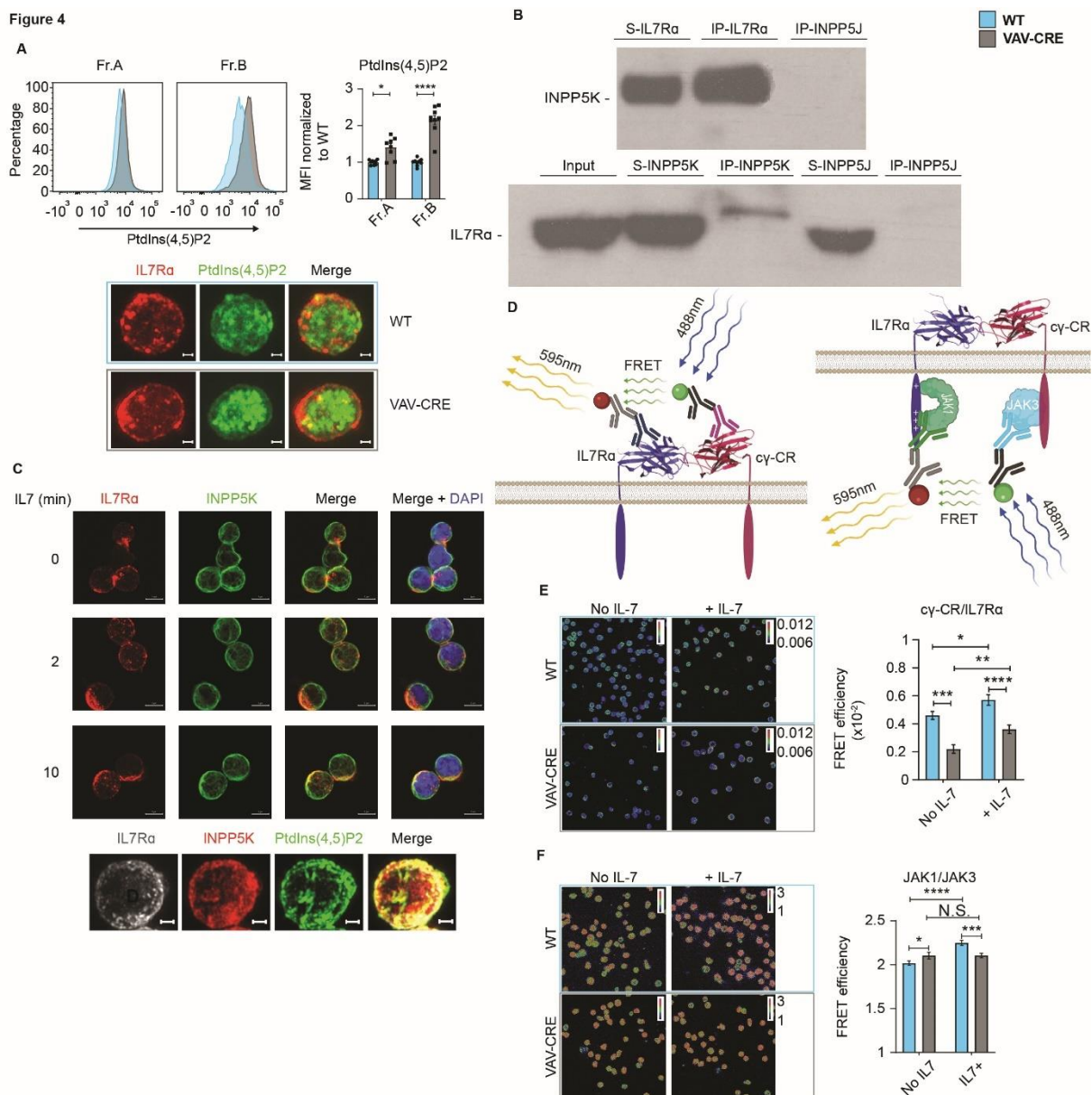


Figure 4: Role and mechanism of INPP5K action during the early plasma membrane steps of IL7R activation and signaling in bone marrow B cells. A. PtdIns(4,5)P2 signal was analyzed by flow cytometry and confocal microscopy in plasma membrane-permeabilized cells from fractions A and B (for flow cytometry) and in plasma membrane-permeabilized bone marrow B220⁺CD43⁺ sorted cells (for confocal microscopy) from control (WT, blue areas and columns) and VAV-CRE (grey areas and columns) mice. Left panels: representative MFI histograms of

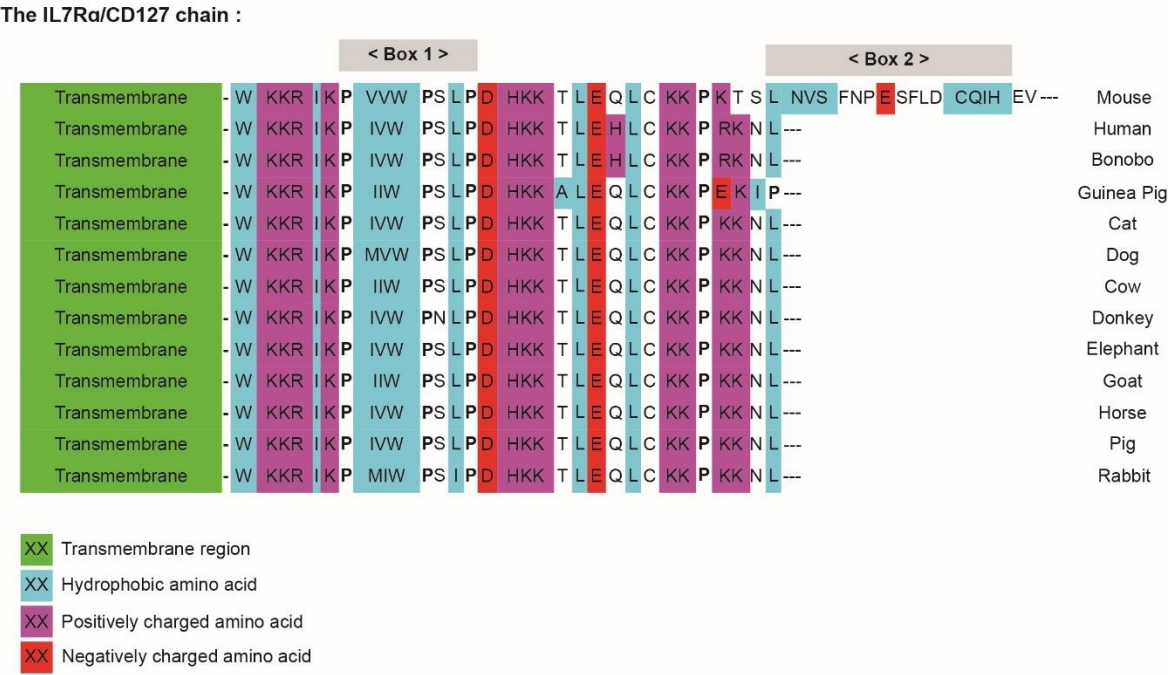
PtdIns(4,5)P2 signal. Central graph: quantitative PtdIns(4,5)P2 signal after MFI normalization to WT mean MFI. Results represent individual mice (n=9 mice per group) and means $\pm$ SEM. Right panels: representative confocal microscopy pictures (100X) of bone marrow B220⁺CD43⁺ sorted cells from WT and VAV-CRE mice. The IL7R α (red) antibody was added to cells before plasma membrane-permeabilization while the PtdIns(4,5)P2 antibody was added after permeabilization. White scale bars: 1 μ m. **B.** Proteins complex analysis by co-immunoprecipitation followed by Western blotting using IL7R α ectodomain and INPP5K antibodies in bone marrow B220⁺CD43⁺ sorted cells from control mice. Upper panel: Western blotting with the INPP5K antibody on protein lysates from the 1st supernatant (S-IL7R α) and from the IL7R α (IP-IL7R α) and the INPP5J (IP-INPP5J) immunoprecipitates. Lower panel: Western blotting with the IL7R α antibody on the crude protein lysate (Input) and the protein lysates from the 1st supernatants (S-INPP5K and S-INPP5J) and from the INPP5K (IP-INPP5K) and the INPP5J (IP-INPP5J) immunoprecipitates. **C.** Confocal microscopy analysis of IL7R α ectodomain, INPP5K and PtdIns(4,5)P2 membrane localization in bone marrow B220⁺CD43⁺ sorted cells from control mice. Upper panels: representative confocal pictures (100X) of IL7R α (red) and INPP5K (green) localization before (0) or 2 and 10 min after *ex-vivo* addition of IL-7 (2ng/ml) at 37°C. The IL7R α antibody was added to cells before plasma membrane permeabilization while the INPP5K antibody was added after permeabilization. DAPI (blue) was used as a nuclear marker. White scale bar: 5 μ m. Lower panels: representative confocal pictures (100X) of IL7R α (white), INPP5K (red) and PtdIns(4,5)P2 (green) localization in bone marrow B220⁺CD43⁺ sorted cells from control mice. The IL7R α antibody was added to cells before plasma membrane permeabilization while INPP5K and PtdIns(4,5)P2 antibodies were added after permeabilization. White scale bars: 1 μ m.

D. An indirect FRET strategy was used to analyze the proximity between IL7R α and c- γ CR ectodomains (left panels) and between JAK1 and JAK3 kinases (right panels). Primary antibodies directed against IL7R α and c- γ CR ectodomains or against JAK1 and JAK3 kinases as well as fluorophore-labeled secondary antibodies that specifically recognized the constant part of one of the primary antibody were used. The green marker attached to the first secondary antibody represents the donor fluorophore (AF488) and the red one attached to the other secondary antibody the acceptor fluorophore (AF546). The closer the distance between the two probed proteins (IL7R α and c- γ CR ectodomains; JAK1 and JAK3 kinases), the higher the energy transfer and the resulting FRET signal (FRET efficiency). **E-F.** Indirect FRET analysis of IL7R α /c- γ CR ectodomains (**E**) and JAK1/JAK3 kinases (**F**) proximity in bone marrow B220⁺CD43⁺ sorted cells from control (WT, blue columns) and VAV-CRE (grey columns) mice, before and after addition of IL-7 (2ng/ml) for 2min at 37°. (**E**). Upper panels: representative confocal pictures (63X) of energy transfer (FRET efficiency) between AF488 (c- γ CR) and AF546 (IL7R α) labeled secondary antibodies. FRET efficiency was calculated according to the indirect FRET method validated in Guala, D., 2018. The rainbow scale represents the energy transfer between the two fluorophores, from 0,006 (blue) to 0,012 (white). Lower graph: the quantitative energy transfer between the two indirectly labeled c- γ CR and IL7R α ectodomains (FRET efficiency) is presented. Results represent means $\pm$ SEM (n=148 to 220 cells analyzed per group, from 6 mice) (**F**). Upper panels: representative confocal pictures (63X) of energy transfer (FRET efficiency) between AF488 (JAK3) and AF546 (JAK1) labeled secondary antibodies. FRET efficiency was calculated as described above. The rainbow scale represents the energy transfer between the two fluorophores, from 1 (blue) to 3 (white). Lower graph: the quantitative energy transfer

between the two indirectly labeled JAK3 and JAK1 kinases (FRET efficiency) is presented. Results represent means $\pm$ SEM (n=180 to 242 cells analyzed per group, from 6 mice). *P* values were calculated using unpaired nonparametric t test. N.S.: $P > 0,05$; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; ****: $P < 0,0001$.

Figure 5

A



B

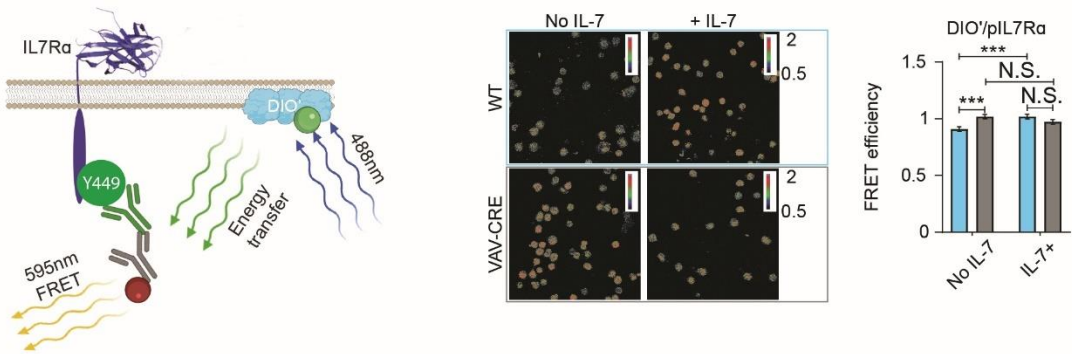


Figure 5: Reduced expression of INPP5K results in alteration in the dynamic structure of the IL7Rα cytoplasmic domain relative to the plasma membrane.

A. Presence of a conserved positively-charged polybasic amino acid sequence in the juxtamembrane region of the IL7Rα cytoplasmic domain: sequences alignment of the juxtamembrane regions from different species. Box 1 and 2 (grey) represent the two JAK1 binding domains on the IL7Rα chain. The transmembrane region (green), hydrophobic (blue), positively (purple) and negatively (red) charged amino acids are

represented. **B.** An indirect FRET strategy was used to analyze the proximity between the fluorescent plasma membrane DiO' probe and p-IL7R α^{Y449} located at the carboxyterminal end of the IL7R α cytoplasmic domain in bone marrow B220 $^{+}$ CD43 $^{+}$ sorted cells from control (WT, blue columns) and VAV-CRE (grey columns) mice, before and after addition of IL-7 (2ng/ml) for 2min at 37°. Upper panels: representative confocal pictures (63X) of energy transfer (FRET efficiency) between AF488- (DIO') and AF546- (p-IL7R α^{Y449}) labeled secondary antibody. FRET efficiency was calculated according to the indirect FRET method validated in Guala, D., 2018. The rainbow scale represents the energy transfer between the two fluorophores from 0,5 (blue) to 2 (white). Lower graph: the quantitative energy transfer between the two fluorophores-labeled DIO' and p-IL7R α^{Y449} (FRET efficiency) is presented. Results represent means $\pm$ SEM (n=135 to 206 cells analyzed per group, from 6 mice). *P* values were calculated using unpaired nonparametric t test. N.S.: *P*>0,05; ***: *P*<0,001.

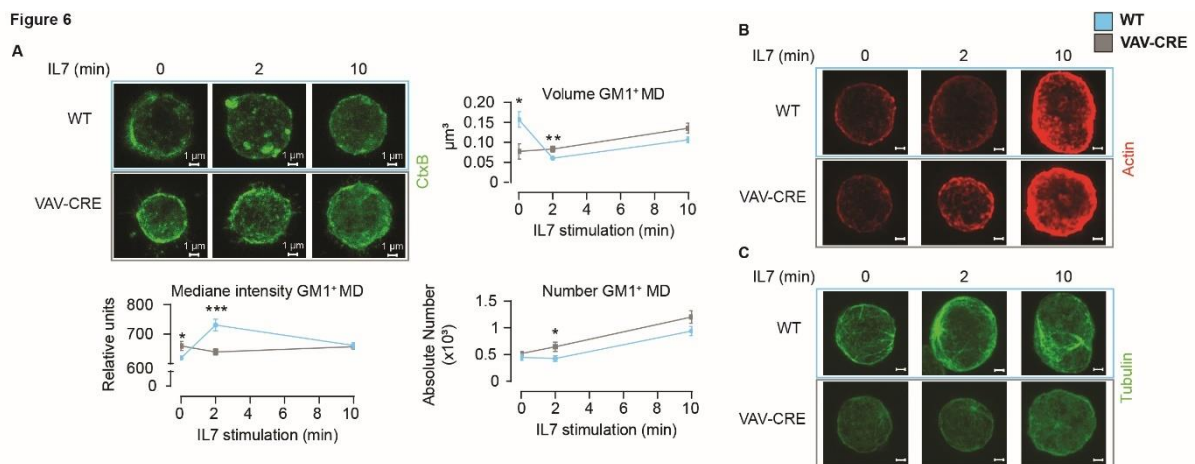


Figure 6: Reduced expression of INPP5K results in altered membrane and cytoskeletal organization. **A.** Upper panels: representative confocal pictures (100X) of GM1 $^{+}$ membrane microdomains stained with AF488-labeled Cholera Toxin B (CtxB, green) on B220 $^{+}$ CD43 $^{+}$ sorted B cells from control and VAV-CRE mice before (0) and

2 or 10 min after *ex-vivo* addition of IL-7 (2ng/ml) at 37°C. White scale bar: 1µm. Lower graphs: GM1⁺ microdomain (GM1⁺ MD) number, volume and fluorescence intensity were analyzed by confocal microscopy after staining with AF488-labeled CtxB in B220⁺CD43⁺ sorted B cells from control (WT, blue lines) and VAV-CRE (grey lines) mice before (0) and 2 or 10 min after *ex-vivo* addition of IL-7 (2ng/ml) at 37°C. Results represent means ± SEM (n=30 cells from 3 mice per group). **B-C**. Representative confocal pictures (100X) of actin (red, **B**) and tubulin (green, **C**) staining of plasma membrane-permeabilized B220⁺CD43⁺ sorted bone marrow B cells from control (WT) and VAV-CRE mice before (0) and 2 or 10 min after *ex-vivo* addition of IL-7 (2ng/ml) at 37°C. White scale bars: 1µm. *P* values were calculated using unpaired nonparametric t test. N.S.: *P*>0,05; *: *P*<0,05; **: *P*<0,01; ***: *P*<0,001; ****: *P*<0,0001.

Supplementary information

Table S1: Homozygous deletion of exons 2 and 3 of the mouse *Inpp5k* gene results in embryonic death. Female *Inpp5k*^{Δ/+} mice were mated and followed every day before and after delivery. Newborns were counted every day and genotyped between 18 and 23 days after birth by PCR.

Couple (♂ x ♀):	Newborns genotype	Observed number (%)	Expected %
<i>Inpp5k</i> ^{Δ/+} x <i>Inpp5k</i> ^{Δ/+}	<i>Inpp5k</i> ^{+/+}	12/42 (28,6)	25
	<i>Inpp5k</i> ^{Δ/+}	30/42 (71,4)	50
	<i>Inpp5k</i> ^{Δ/Δ}	0/42 (0)***	25

Statistics (Student's *t*-test): ***: P<0.001.

Supplementary figure legends

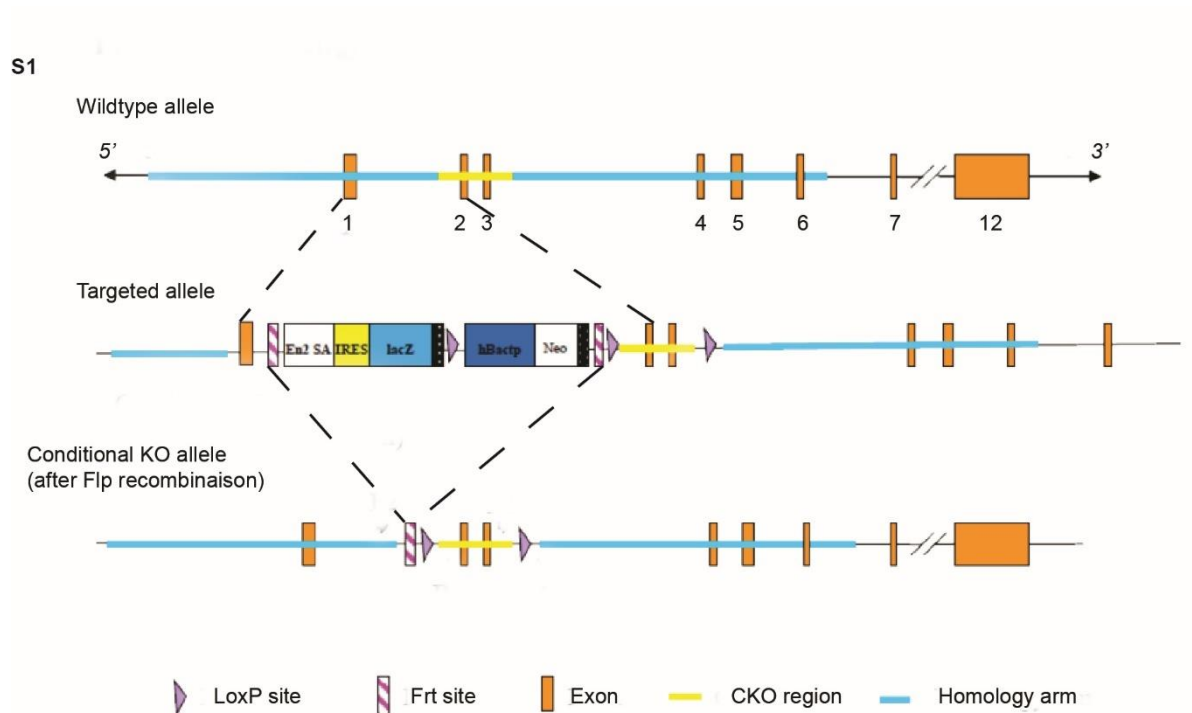


Figure S1: Generation of *Inpp5K*^{fllox/+} mutant mice. The mouse wildtype, targeted and conditional knockout (KO) *Inpp5k* alleles are represented. Orange boxes denote exons; the blue and the yellow lines represent the homology arms of the targeting vector and the conditional knockout (CKO) region, respectively; purple triangles are LoxP sites and pink and white striped boxes are Frt sites. The targeting vector contains 2 cassettes: the first with a En2 splice acceptor (SA) site followed by an internal ribosome entry site (IRES) and a lacZ gene, the second with a human β actin promoter (hBactp) followed by the neomycin phosphotransferase gene (Neo). The CKO allele is represented after Flp recombination.

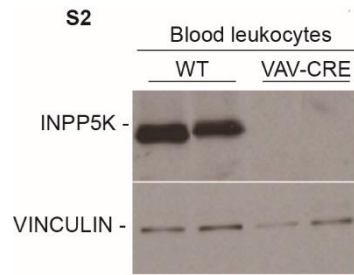


Figure S2: Loss of INPP5K protein in blood leukocytes isolated from VAV-CRE mice. INPP5K protein expression was analyzed by Western blotting on blood leukocytes protein extracts isolated from 2 controls (WT) and 2 VAV-CRE mice. Vinculin was used as a loading control protein.

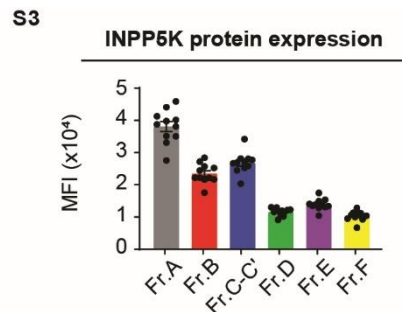


Figure S3: INPP5K protein expression in bone marrow B cells from control mice. Expression of the INPP5K protein was analyzed by flow cytometry in fractions A to F of bone marrow B cells isolated from control mice. Results represent individual mice (n=10 to 12 mice per group) and means $\pm$ SEM of mean fluorescence intensity (MFI).

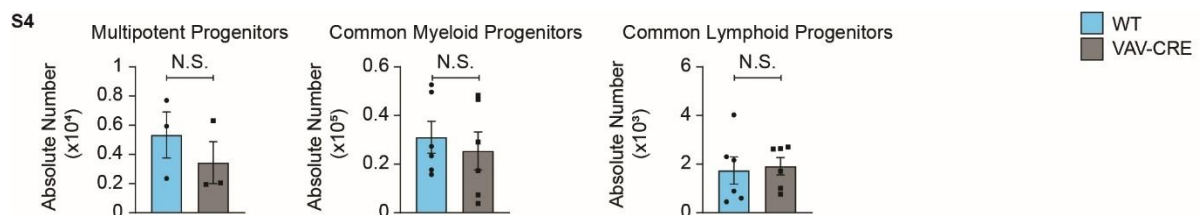


Figure S4: Normal numbers of hematopoietic progenitor cells in the absence of INPP5K. Numbers of multipotent, common myeloid and common lymphoid progenitors were analyzed by flow cytometry in control (WT, blue columns) and VAV-CRE (grey columns) bone marrows. Results represent individual mice (n=3 to 6 mice per group) and means $\pm$ SEM. N.S.: $P > 0.05$.

S5

Fr.A Fr.B Fr.C-C'

Percentage

INPP5K

WT
VAV-CRE
C^{-/-}

Fraction	WT (Peak)	VAV-CRE (Peak)	C ^{-/-} (Peak)
Fr.A	~10 ⁴	~10 ¹	~10 ¹
Fr.B	~10 ⁴	~10 ¹	~10 ¹
Fr.C-C'	~10 ⁴	~10 ¹	~10 ¹

Representative MFI histograms of INPP5K protein expression in bone marrow B cells precursors (fractions A, B and C-C') from control (WT, blue areas) and VAV-CRE (grey areas) mice. The black areas are representative of the fluorochrome-labelled secondary antibody alone, as negative control. INPP5K protein expression was analyzed after plasma membrane permeabilization.

The figure displays flow cytometry data for B cell populations in WT (blue) and VAV-CRE (grey) mice. The top left shows a series of flow cytometry plots for WT mice, starting with FSC vs CD19 (gating for CD19⁺), followed by CD21 vs CD21 (gating for T2 and FO B), then CD21 vs CD19 (gating for MZ B and T1), and finally B220⁺ vs CD19 (gating for PB and PC). The bottom left shows a series of flow cytometry plots for WT mice, starting with CD23 vs CD23 (gating for 2), followed by IgM vs IgM (gating for T2 and FO B), then IgM vs IgM (gating for MZ B and T1), and finally CD138 vs CD138 (gating for PB and PC). The right side of the figure shows bar graphs of the absolute number of cells (x10⁶) for each population. The legend indicates WT (blue) and VAV-CRE (grey).

Population	WT (x10 ⁶)	VAV-CRE (x10 ⁶)	Significance
T1	~1.5	~0.5	**
T2	~2.0	~0.5	***
FO B	~1.2	~0.3	****
MZ B	~2.0	~0.8	***
PB	~4.8	~0.5	****
PC	~0.7	~0.4	N.S.

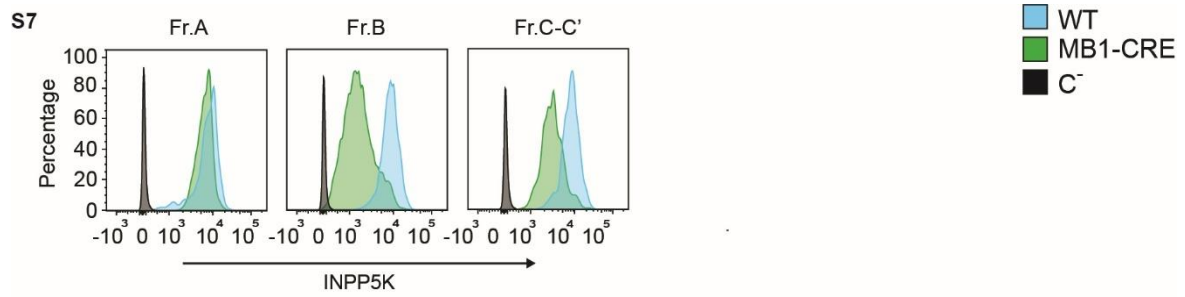


Figure S7: Reduced expression of INPP5K protein in *Inpp5k*^{flox/flox} MB1-CRE B cell precursors. Representative MFI histograms of INPP5K protein expression in bone marrow B cells precursors (fractions A, B and C-C') from control (WT, blue areas) and *Inpp5k*^{flox/flox} MB1-CRE (MB1-CRE, green areas) mice. The black areas are representative of the fluorochrome-labelled secondary antibody alone, as negative control. INPP5K protein expression was analyzed after plasma membrane permeabilization.

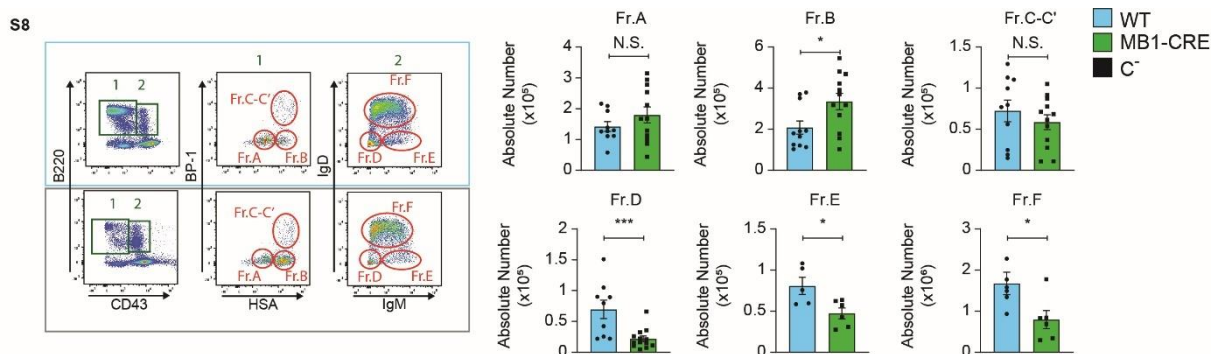


Figure S8: Reduced expression of INPP5K protein in *Inpp5k*^{flox/flox} MB1-CRE mice results in altered B cell differentiation. Flow cytometry analysis of control (WT, blue columns) and *Inpp5k*^{flox/flox} MB1-CRE (MB1-CRE, green columns) bone marrow B cell development according to Hardy's nomenclature. Left panels: staining strategy for the different stages of early B cell development in the bone marrow: Fraction A (B220⁺CD43⁺BP-1⁻HSA⁻); Fraction B (B220⁺CD43⁺BP-1⁺HSA⁺); Fractions C-C' (B220⁺CD43⁺BP-1⁺HSA⁺); Fraction D (B220⁺CD43⁻IgM⁻IgD⁻); Fraction E (B220⁺CD43⁻IgM⁺IgD⁺); Fraction F (B220⁺CD43⁻IgM⁺IgD⁺).

IgM⁺IgD⁻) and Fraction F (B220⁺CD43⁺IgM⁺IgD⁺). Right graphs: numbers of B cells in each fraction, according to their percentage and the total number of cells isolated from 2 femurs and 2 tibias. Results represent individual mice (n=5 to 12 mice per group) and means $\pm$ SEM. *P* values were calculated using unpaired nonparametric *t* test. N.S.: *P*>0,05; *: *P*<0,05; ***: *P*<0,001.

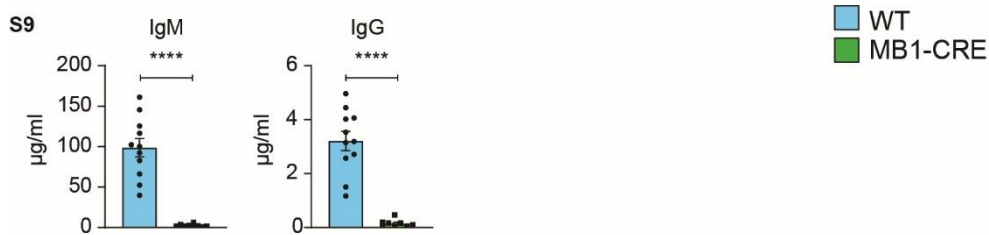


Figure S9: Reduced expression of INPP5K protein in *Inpp5k*^{flx/flx} MB1-CRE mice results in decreased blood levels of IgM and IgG immunoglobulins. ELISA analysis of blood control (WT, blue columns) and *Inpp5k*^{flx/flx} MB1-CRE (MB1-CRE, green columns) IgM and IgG immunoglobulins concentrations. Results represent individual mice (n=11 mice per group) and means $\pm$ SEM. *P* values were calculated using unpaired nonparametric *t* test. ****: *P*<0,0001.

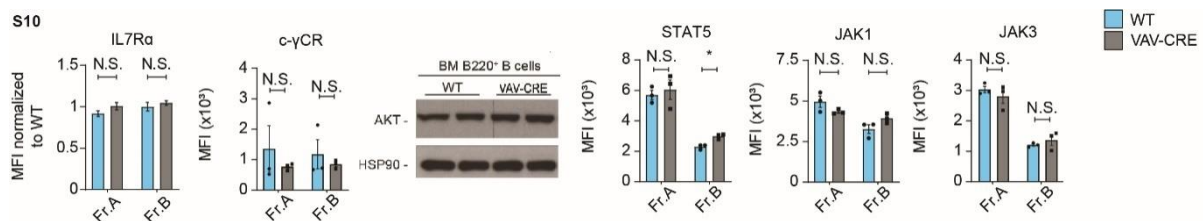


Figure S10: Normal levels of IL7R α , c- γ CR, AKT, STAT5 JAK1 and JAK3 proteins in bone marrow VAV-CRE B cells. Expression of IL7R α , c- γ CR, STAT5, JAK1 and JAK3 proteins was analyzed by flow cytometry in cells of fractions A and B from control (WT, blue columns) and VAV-CRE (grey columns) mice. Expression of AKT protein was analyzed by Western blotting in bone marrow B220⁺ B cells from WT and VAV-CRE mice. HSP90 was used as a loading control in the blot experiment. Results

represent MFI normalized to WT mean MFI (IL7R α) and MFI (c- γ CR, JAK1, JAK3 and STAT5) in individual mice (n=3 to 6 mice per group) and means $\pm$ SEM. *P* values were calculated using unpaired nonparametric *t* test. N.S.: *P*>0,05; *: *P*<0,05.

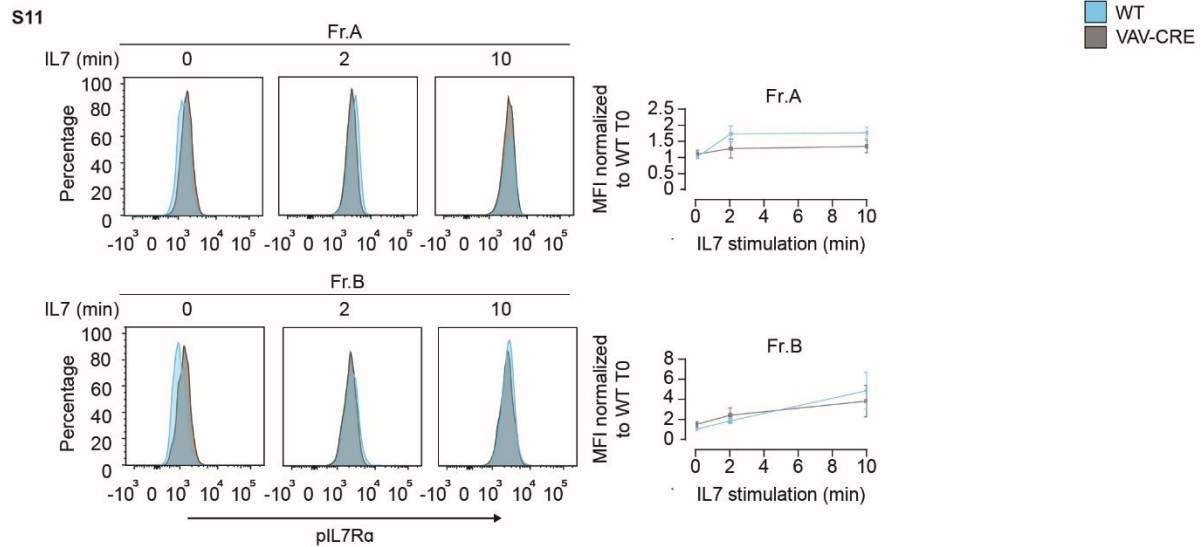


Figure S11: Normal level of p-IL7R α ^{Y449} in VAV-CRE B cells from bone marrow fractions A and B. Phosphorylation of the IL7R α chain at Y⁴⁴⁹ was analyzed by flow cytometry with a p-IL7R α ^{Y449} (pIL7R α) antibody in plasma membrane-permeabilized bone marrow B cells from control (WT, blue areas and lines) and VAV-CRE (grey areas and lines) mice. Left panels: representative MFI histograms of p-IL7R α ^{Y449} in fraction A (above) and B (below) B cells before (0) and 2 or 10 min after *ex-vivo* addition of IL-7 (2ng/ml) at 37°C. Right graphs: quantitative analysis of p-IL7R α ^{Y449} signal in fractions A (above) and B (below) B cells from control (WT, blue lines) and VAV-Cre (grey lines) mice, normalized to WT mean MFI before IL-7 stimulation (T0). Results represent means $\pm$ SEM (n=8-9 mice per group). *P* values were calculated using unpaired nonparametric *t* test. N.S.: *P*>0,05.

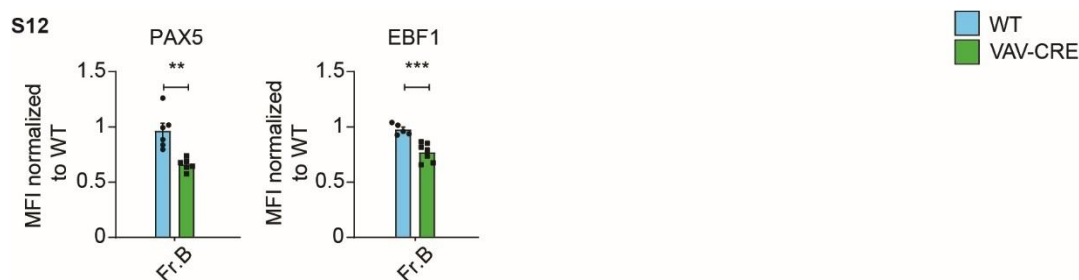


Figure S12: Reduced expression of INPP5K protein in *Inpp5k*^{flox/flox} MB1-CRE mice results in decreased PAX5 and EBF1 levels in B cells precursors. PAX5 and EBF1 proteins expression was analyzed by flow cytometry after plasma and nuclear membranes permeabilization of control (WT, blue columns) and *Inpp5k*^{flox/flox} MB1-CRE (MB1-CRE, green columns) cells from fraction B. Graphs represent the quantitative expression of PAX5 (left) and EBF1 (right) proteins after MFI normalization to WT mean MFI. Results represent individual mice (n=6 mice per group) and means ± SEM. *P* values were calculated using unpaired nonparametric *t* test. **: *P*<0,01; ***: *P*<0,001.

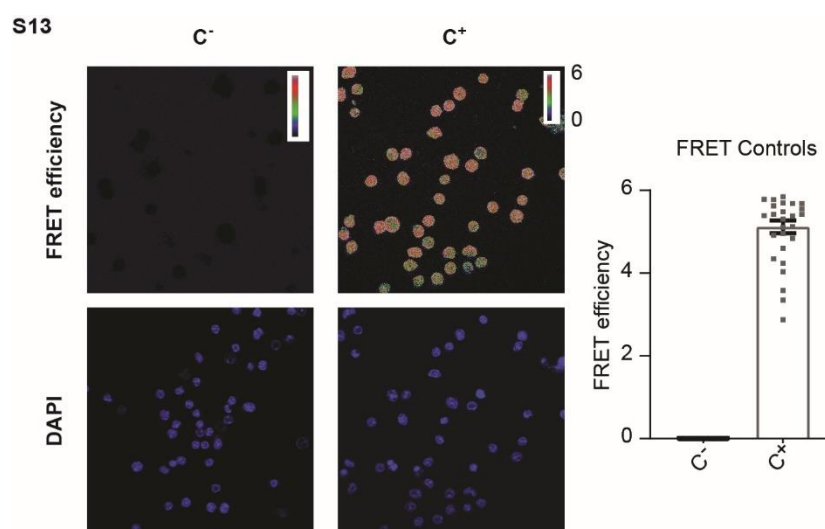


Figure S13: Positive and negative control conditions for indirect FRET experiments.

In order to define the maximal and the minimal FRET efficiency, bone marrow B220⁺CD43⁺ cells were sorted from control mice, incubated either with a primary rat anti-mouse JAK1 antibody and then with 2 secondary goat anti-rat IgG antibodies

labeled with AF546 or AF488 (as positive control, C⁺), or with primary rat anti-mouse JAK1 and rabbit anti-PAX5 antibodies and then with AF546-labeled goat anti-rat IgG and AF488-labeled goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (as negative control, C⁻). Left Panels: representative confocal pictures (63X) of energy transfer (FRET efficiency, upper 2 panels) between AF488- and AF546-labeled secondary antibodies; the corresponding nuclear staining (DAPI) is presented in the lower 2 panels. The rainbow scale represents the energy transfer between the two fluorophores, from 0 (blue) to 6 (white). Right graph: the quantitative energy transfer between AF488- and AF546-labeled secondary antibodies (FRET efficiency) is presented. Results represent individual cells and means $\pm$ SEM.

Conclusions et perspectives

S'appuyant sur des résultats montrant la très forte expression d'INPP5K dans les différentes cellules de la lignée hématopoïétique, nous étions désireux de mieux comprendre la ou les raisons de cette expression abondante dans le système hématopoïétique et, plus particulièrement, dans les lymphocytes B. Dans ce but, une nouvelle lignée de souris génétiquement modifiées, les souris INPP5K^{flox/flox} VAV-CRE (VAV-CRE), qui n'expriment plus INPP5K dans le système hématopoïétique, a été générée. Les résultats d'une première étude générale du système hématopoïétique de ces souris ont révélé que l'absence d'INPP5K provoque d'importantes anomalies au sein de différentes cellules de ce système. Cependant, ces altérations sont particulièrement impressionnantes dans les lymphocytes B et ce, déjà précocement, au cours de leur développement (**Figure 1A et 2D**). Effectivement, ces souris VAV-CRE présentent un nombre très faible de lymphocytes B totaux dans la moelle osseuse en comparaison avec des souris contrôles (**Figure 2B**). À la suite de ces résultats, nous avons logiquement concentré nos recherches sur la mise en évidence des processus biologiques altérés et du mécanisme moléculaire par lequel l'absence d'INPP5K les induit.

L'initiation de cette recherche centralisée sur les lymphocytes B a été réalisée en analysant le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse selon la nomenclature de Hardy ¹³⁴. Au cours de cette analyse, des résultats suggestifs de rôles multiples d'INPP5K lors du développement des lymphocytes B ont été observés. D'une part, l'augmentation du nombre de cellules du stade PrePro B (Fr. A) et la diminution du nombre de cellules du stade Early Pro B (Fr. B) dans la moelle osseuse des souris VAV-CRE par rapport aux souris contrôles nous ont conduit à étudier les stades précoces de la différenciation des lymphocytes B dans la moelle et la voie de signalisation IL7R/PAX5. D'autre part, l'effondrement drastique du nombre de cellules de la moelle des souris VAV-CRE à partir du stade Small Pre B (Fr. D) suggère qu'INPP5K est également impliqué dans un autre processus important, plus tardif, de la différenciation des cellules B de la moelle osseuse (**Figure 2C**).

Dans l'optique de nous assurer que ces altérations, suite à l'inactivation d'INPP5K, étaient bien induites directement par des rôles intrinsèques de cette phosphatase dans les lymphocytes B, nous avons généré une autre lignée de souris génétiquement modifiées, les souris INPP5K^{flox/flox} MB1-CRE (MB1-CRE), qui ont la caractéristique de ne plus exprimer INPP5K uniquement dans les lymphocytes B. La comparaison des résultats de l'analyse de la différenciation des lymphocytes B dans les souris VAV-CRE et MB1-CRE a montré plusieurs différences, comme un nombre non-altéré de cellules au stade PrePro B (Fr. A) ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules du stade Early Pro B (Fr. B) dans les souris MB1-CRE. À l'opposé, la chute drastique du nombre de cellules à partir du stade Small Pre B (Fr. D) dans la moelle osseuse chez les souris MB1-CRE a été révélée (**Figure S8**).

Les différences observées entre les deux lignées de souris VAV-CRE et MB1-CRE peuvent s'expliquer par le stade différent à partir duquel l'expression d'INPP5K est abolie mais également via l'efficacité de la recombinaison induite par la CRE. De fait, l'expression d'INPP5K est intégralement abolie dans les lymphocytes B de la moelle des souris VAV-CRE et ce, dès le stade PrePro B (Fr. A), alors que chez les souris MB1-CRE, l'expression d'INPP5K n'est que partiellement abaissée à partir du stade Early Pro B (Fr. B) (**Figure S5 et S7**).

Ensemble, ces résultats indiquent qu'au cours du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse, INPP5K contrôle les transitions vers les stades Early Pro B (Fr. B) et Small Pre B (Fr. D).

La transition des lymphocytes B du stade PrePro B (Fr. A) vers le stade Early Pro B (Fr. B) est sous le contrôle du facteur de transcription PAX5 (*PAir Box 5*). L'augmentation de son expression à ces stades de différenciation est essentielle pour l'entrée complète, définitive et irréversible des cellules progénitrices dans la lignée des lymphocytes B, via une acquisition identitaire totale des lymphocytes B^{139,182}. Pour ces raisons et, puisque l'inactivation de PAX5 chez la souris induit un phénotype similaire quoique beaucoup plus prononcé au phénotype observé dans nos souris VAV-CRE, l'expression de PAX5 a été prioritairement analysée¹⁹⁸. L'analyse par FACS de l'expression de PAX5 dans les cellules du stade PrePro B (Fr. A) et Early Pro B (Fr. B) de la moelle osseuse des souris VAV-CRE et MB1-CRE a révélé que l'absence d'INPP5K, dans ces deux différents contextes, conduit à une diminution significative de l'expression de ce facteur de transcription essentiel (**Figure 3A et S10**). Dans le but de confirmer cette anomalie mais également en vue d'investiguer les conséquences de l'altération de l'expression de PAX5, nous avons analysé les différentes étapes de la recombinaison de la chaîne lourde de l'IgS chez les souris VAV-CRE et contrôles. Cette analyse PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a mis en exergue une diminution de l'activité régulatrice de PAX5 au cours de ce processus de recombinaison. En effet, une diminution de l'intensité du signal relatif à la recombinaison des segments D_HJ_H et V_HJ558, deux étapes de recombinaison sous le contrôle de PAX5, a été observée sur des extraits d'ADN génomique de lymphocytes B isolés de la moelle de souris VAV-CRE, en comparaison avec les souris contrôles (**Figure 3B**). Par la suite, de manière à mieux caractériser l'implication d'INPP5K dans la régulation de l'expression de PAX5, la voie de signalisation en aval du récepteur à l'IL7 (IL7R), connue dans la littérature pour réguler l'expression de PAX5, a été investiguée. Cette voie de l'IL7R, au-delà de sa fonction de contrôle de l'expression de PAX5, est par ailleurs essentielle pour la prolifération, la survie et la différenciation des progéniteurs des lymphocytes B, en particulier au stade Early Pro B (Fr. B). Tant et si bien que des altérations dans cette voie conduisent généralement à un blocage à ce stade^{170,173,199}.

En aval de l'IL7R, le premier axe de contrôle de l'expression de PAX5 est l'axe PI3K/PtdIns(3,4,5)P3/AKT, dans lequel le PtdIns(3,4,5)P3, un substrat physiologique d'INPP5K, y joue une fonction activatrice. Dans un contexte de lymphopoïèse B, cet axe inhibe l'expression de PAX5^{166,200}. L'analyse par FACS de l'activation/phosphorylation d'AKT (p-AKT^{S473}) avant et après activation *ex-vivo* des cellules du stade PrePro B (Fr. A) et Early Pro B (Fr. B) avec de l'IL-7 n'a révélé aucune différence significative entre les souris contrôles et les souris VAV-CRE. Cette absence de dissemblance suggère que la fonction régulatrice d'INPP5K est indépendante du PtdIns(3,4,5)P3 et de cet axe (**Figure 3C**).

Le deuxième axe capable de réguler l'expression de PAX5 en aval de l'IL7R est l'axe JAK/STAT5/EBF1. Malgré l'imprécision des connaissances actuelles sur la régulation de PAX5 par cette axe, il est accepté que l'activation de cet axe agit positivement sur l'expression de PAX5¹³⁸. L'exploration de cet axe a été entreprise par FACS via l'expression d'EBF1, un autre facteur de transcription clé pour le développement précoce des lymphocytes B. Cette analyse a révélé que dans les cellules des stades PrePro B (Fr. A) et Early Pro B (Fr. B) des souris VAV-CRE et MB1-CRE, l'expression d'EBF1 est significativement amoindrie par rapports aux souris contrôles (**Figure 3D et S10**). Conséquemment, nous avons logiquement porté notre attention sur les étapes situées plus en amont dans cet axe en analysant l'activation de STAT5 (p-STAT5^{Y694}), de JAK1 (p-JAK1^{Y1022}) et de JAK3 (p-JAK3^{Y785}) avant et après activation *ex-vivo* des cellules des stades PrePro B (Fr. A) et Early Pro B (Fr. B) de souris contrôles et VAV-CRE avec de l'IL-7. Les résultats ont démontré que la régulation de l'expression de PAX5 par INPP5K s'effectue par la régulation de l'axe JAK/STAT/EBF1 de la voie de l'IL7R (**Figure 3E, 3F et 3G**).

Après la mise en évidence de l'altération de l'activation de JAK1 et JAK3 dans les cellules des stades PrePro B (Fr. A) et Early Pro B (Fr. B) des souris VAV-CRE et étant donné que cette activation est un des premiers événements qui fait suite à la liaison de l'IL-7 sur IL7R, le rôle d'INPP5K a été investigué au cours des premiers événements membranaires de cette voie. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus après analyse, par FACS et par IF, du signal PtdIns(4,5)P2 dans les cellules des stades PrePro B (Fr. A) et Early Pro B (Fr. B) des souris VAV-CRE (**Figure 4A**). En effet, ces analyses montrent que l'absence d'INPP5K est associée, dans ces cellules, à une augmentation significative du signal PtdIns(4,5)P2 dans la membrane plasmique. Par conséquent, ces résultats suggèrent que la fonction d'INPP5K, dans la voie de l'IL7R est PtdIns(4,5)P2-dépendante. Néanmoins, l'identification, via une expérience de co-immunoprécipitation, de l'interaction entre IL7R α et INPP5K laisse suggérer, si nous excluons que cette interaction est essentielle pour positionner INPP5K à la membrane en vue d'hydrolyser du PtdIns(4,5)P2, une fonction régulatrice distincte d'INPP5K dans cette voie. Toutefois pouvons-nous exclure que cette interaction ait lieu dans ce sens ? La nature exacte de l'interaction entre INPP5K et IL7R, directe ou indirecte, reste inconnue. Cependant, le domaine SKICH d'INPP5K pourrait être impliqué dans cette interaction, comme il l'est dans les interactions connues d'INPP5K

avec d'autres partenaires protéiques. Notons, ici, que la protéine GRP78 interagit à la fois avec la région cytoplasmique de l'IL7R α et avec le domaine SKICH d'INPP5K^{99,119,201,202}. GRP78 est par conséquent un excellent candidat pour remplir cette fonction d'intermédiaire. Quelle que soit la nature exacte de cette interaction, l'ensemble de ces résultats nous pousse à localiser avec plus de précision le rôle d'INPP5K dans les étapes membranaires très précoces de la voie de l'IL7R.

Après la liaison de l'IL-7 à son récepteur, plusieurs événements membranaires sont essentiels pour la transmission correcte du signal à la cellule et la transduction optimale de ce dernier jusqu'au noyau. En premier lieu, la liaison de l'IL-7 à son récepteur induit un changement de conformation des ecto-domaines des chaînes IL7R α et c- γ CR, rapprochant, de ce fait, les parties cytoplasmiques de ces deux chaînes. De ce rapprochement découle une plus grande proximité des kinases JAK1 et JAK3 et, *in fine*, leur transactivation^{160,203}. L'analyse, par FRET indirect, de cette dynamique structurale a souligné l'importance de la présence d'INPP5K dans le mouvement des régions extracellulaires des chaînes IL7R α et c- γ CR ainsi que des deux JAKs qui sont constitutivement liées aux régions cytoplasmiques de ces deux précédentes chaînes. En effet, l'absence d'INPP5K dans les cellules B220⁺CD43⁺ de la moelle osseuse des souris VAV-CRE est associée à une augmentation de la distance séparant les deux ecto-domaines des chaînes IL7R α et c- γ CR, à la fois à l'état basal et après stimulation avec de l'IL-7. De manière très intéressante, lors de ces mêmes analyses FRET, une plus grande proximité entre JAK1 et JAK3 a été détectée avant stimulation avec de l'IL-7 lorsque INPP5K est absent, mais la distance séparant ces deux kinases n'est pas modifiée après l'ajout d'IL-7 chez les souris VAV-CRE (**Figure 4E et 4F**). En résumé, en l'absence d'INPP5K, les régions cytoplasmiques des deux chaînes du IL7R et les kinases qu'elles lient semblent être figées, déjà à l'état basal, dans une structure anormale et intermédiaire entre les structures basales et activées du IL7R des cellules des souris contrôles, entraînant, probablement, des altérations de la transduction du signal en aval du récepteur.

Les premières conséquences de la liaison de l'IL-7 sur son récepteur sont la formation de microdomaines GM1⁺ membranaires et le ralentissement de la diffusion latérale des chaînes du récepteur dans la membrane. En parallèle, la mise en place du cytosquelette et plus particulièrement la polymérisation de l'actine et de la tubuline est initiée²⁰². Nos analyses par microscopie confocale ont démontré que la présence d'INPP5K est essentielle autant pour la formation correcte des microdomaines GM1⁺ que pour la polymérisation de l'actine et de la tubuline dans les cellules B220⁺CD43⁺ de la moelle osseuse, avant et après stimulation avec de l'IL-7. Plus précisément, et ce même si l'interprétation de ces résultats reste assez délicate, le nombre, le volume et l'intensité relative au marquage GM1⁺ de ces microdomaines sont altérées dans les cellules des souris VAV-CRE par rapport aux souris contrôles (**Figure 4G, 4H et 4I**). En l'absence d'INPP5K, dans ce contexte cellulaire particulier, une désorganisation de la membrane plasmique semble donc s'opérer. Cette

désorganisation pourrait être la conséquence de l'augmentation du PtdIns(4,5)P2 membranaire. Par conséquent, l'augmentation de la concentration de ce phosphoinositide pourrait perturber l'homéostasie de la membrane plasmique.

L'analyse minutieuse de la structure primaire de la partie cytoplasmique de l'IL7R α montre la présence d'un motif d'acides aminés chargés positivement très conservé chez de nombreuses espèces (**Figure 5A**). En complétant ces informations avec l'augmentation de la présence du PtdIns(4,5)P2 dans la membrane de ces cellules et, de ce fait, l'accroissement fort probable de la charge négative de la membrane plasmique des cellules B220⁺CD43⁺ des souris VAV-CRE, nous avons émis l'hypothèse que les altérations spatiales des différents couples de protéines testées (IL7R α /c- γ CR et JAK1/JAK3) observées en l'absence d'INPP5K pourraient être expliquées (entièrement ou partiellement) par une interaction électrostatique plus importante entre les acides aminés chargés positivement de la partie cytoplasmique de l'IL7R α et les charges négatives du PtdIns(4,5)P2.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons comparé la variation de la distance entre la membrane plasmique et la partie cytoplasmique de l'IL7R α avant et après stimulation de cellules de moelle isolées de souris VAV-CRE et contrôles avec l'IL-7. À cette fin, après s'être assuré que l'expression de ce récepteur était identique en l'absence et en présence d'INPP5K, nous avons employé une sonde fluorescente liant spécifiquement la membrane plasmique et, comme marqueur de la région cytoplasmique de l'IL7R α , un anticorps ciblant la tyrosine 449 phosphorylée. Cette analyse FRET indirecte a révélé que l'absence d'INPP5K est associée à une diminution de la distance séparant la région cytoplasmique de l'IL7R α de la membrane plasmique déjà avant toute stimulation avec de l'IL-7 (**Figure 5B**). Cette observation confirme le phénomène d'immobilisation de l'IL7R, phénomène précédemment décrit lors de l'analyse de la distance entre JAK1 et JAK3 dans les souris VAV-CRE. En conclusion, en l'absence d'INPP5K, au contraire de ce qui est observé dans les cellules B220⁺CD43⁺ contrôles, la distance entre la chaîne alpha du IL7R et la membrane plasmique n'est pas modifiée lors de la stimulation par l'IL-7.

L'objectif initial de cette thèse, de ce projet, de cette étude était d'étendre nos connaissances sur la fonction d'une enzyme fort peu caractérisée, INPP5K, dans un contexte cellulaire bien précis : les cellules du système hématopoïétique. Dans cette entreprise, l'emploi de divers modèles murins de souris génétiquement modifiées a été précieux. En effet, l'inactivation d'INPP5K dans toutes les cellules du système hématopoïétique (VAV-CRE) ou spécifiquement dans les lymphocytes B (MB1-CRE) a permis d'inculquer des nouvelles fonctions à INPP5K, à la fois dans le système immunitaire et, de manière plus spécifique et moléculaire, dans les lymphocytes B.

En premier lieu, est ressorti de cette analyse fonctionnelle, l'importance primordiale d'INPP5K dans le développement de certaines lignées de cellules hématopoïétiques parmi lesquelles les lymphocytes B. En effet, l'inactivation de cette phosphatase entraîne une agammaglobulinémie et une lymphocytopenie sévère ainsi que diverses autres altérations dans le système hématopoïétique. Bien que certaines expériences aient été initiées dans ce but, il serait intéressant, à ce stade, d'évaluer la survie de ces souris VAV-CRE et MB1-CRE dans un environnement plus infectieux, non dépourvu de pathogènes comme dans notre animalerie SOPF (*Specific and Opportunistic Pathogen Free*). Par exemple, en transférant ces souris dans une animalerie moins propre, ou les infectant avec différents agents pathogènes (virus, bactéries, parasites,...) et en analysant leur mortalité, leur réaction immunitaire et production d'immunoglobulines en réponse à ces infections. Dans ce même but, l'immunisation contre différentes molécules dont la réponse connue est T-indépendante (DNP-Ficoll, LPS,...) ou T-dépendante (DNP-KLH,...) est également une expérience intéressante à réaliser.

L'évaluation plus poussée de la fonction d'INPP5K dans l'homéostasie des lymphocytes B a conduit à l'identification de rôles capitaux tout le long du développement précoce des lymphocytes B dans la moelle osseuse. Un de ces rôles les plus évident est sans aucun doute celui qui permet la transition des progéniteurs des lymphocytes B du stade PreProB (Fr. A) vers le stade Early Pro B (Fr. B). *A posteriori*, la chute drastique des cellules à partir du stade Small Pre B (Fr.D) de nos souris génétiquement modifiées laisse suggérer un second rôle important pour INPP5K lors de la mise en place et/ou de l'activation de la voie de signalisation du pre-BCR avec, sans doute, un impact sur le processus de tolérance centrale et périphérique. Des analyses de ces processus de signalisation par le pre-BCR et le BCR sont en cours au laboratoire sur les souris VAV-CRE.

En accord avec les résultats de l'analyse de nos systèmes biologiques, nous nous sommes focalisés sur les anomalies survenant lors de la transition entre le stade PreProB (Fr. A) et Early Pro B (Fr.B). Dans d'autres systèmes d'études plus radicaux, comme les souris déficientes pour PAX5, il est apparu que l'identité des lymphocytes B était fortement altérée et que ces cellules PAX5^{-/-} pouvaient se redifférencier en d'autres types cellulaires. Pouvons-nous, en tenant compte de ces dissemblances, toujours considérer les cellules B persistant dans les souris VAV-Cre après le stade Early Pro B (Fr.B) comme des lymphocytes B ? À contrario, ces cellules INPP5K^{-/-} ne sont-elles pas, au même titre que les lymphocytes B PAX5^{-/-}, encore capables de se différencier en divers types cellulaires issues du système hématopoïétique¹³⁹ ? Cette perte d'identité est-elle également perturbée dans les cellules plasmatiques normalement chargées de produire et sécréter les immunoglobulines ? En effet, à la vue de l'omniprésence de nombreux plasmocytes dans la rate des souris VAV-CRE et MB1-CRE, mais également de leur incapacité à sécréter correctement des immunoglobulines, nous sommes en mesure de nous questionner sur la corrélation entre cette altération fonctionnelle et une perte d'identité de

ces cellules. Dans ce cadre, une analyse morphologique et fonctionnelle des plasmocytes semble également nécessaire.

En explorant la voie de signalisation de l'IL7R, voie prépondérante lors de la transition des lymphocytes B du stade PreProB (Fr. A) au stade Early Pro B (Fr. B), nous avons découvert qu'INPP5K est impliqué dans cette voie et ce dès les premières étapes membranaires. Plus exactement, nos résultats illustrent l'importance de la présence d'INPP5K près du IL7R pour le contrôle de la dynamique structurale de ce récepteur à la fois à l'état basale et réponse à l'IL-7. Dans l'optique de mieux caractériser l'interaction entre INPP5K et la chaîne alpha du IL7R, des cellules HEK293 pourraient être transfectées avec des plasmides produisant la version murine des protéines INPP5K et de l'IL7R α , avec ou sans GRP78. Les résultats des expériences de co-immunoprécipitations, utilisant des anticorps anti-IL7R α ou anti-INPP5K suivies, de la révélation par Western-blot, nous éclaireront sur la nature directe ou indirecte, c'est-à-dire GRP78-dépendante ou non, de l'interaction entre INPP5K et IL7R α . Ensuite, afin de définir précisément les domaines d'interaction de ces protéines, des versions mutées des protéines INPP5K, IL7R α et, éventuellement GRP78, pourraient être employées dans des cellules HEK293. Ces expériences permettraient également de mieux définir le rôle respectif de l'unité catalytique et du domaine SKICH d'INPP5K, et ainsi attribuer, à ce dernier domaine, une fonction importante autre que la simple interaction avec IL7R α .

À la suite de nos résultats relatif aux expériences FRET indirect sur des lymphocytes B B220⁺CD43⁺, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le rapprochement de la partie cytoplasmique de l'IL7R α avec la membrane plasmique, est induite par une plus grande interaction électrostatiques entre les acides basiques juxtamembranaires de la partie cytoplasmique de l'IL7R α et les charges négatives portées par le PtdIns(4,5)P2. Pour confirmer ou réfuter cette hypothèse, dans un premier temps, du PtdIns(4,5)P2 sera additionné à des précurseurs de lymphocytes B B220⁺CD43⁺ isolés de la moëlle osseuse de souris contrôles. À la suite de cet ajout, une analyse par FRET indirect ciblant la proximité de la partie cytoplasmique de l'IL7R α avec la membrane plasmique sera réalisée. Dans un second temps, une démonstration plus direct de la liaison du peptide basique juxtamembranaire de la partie cytoplasmique de l'IL7R α à des liposomes contenant des concentrations croissantes de PtdIns(4,5)P2 sera effectuée. La composition de ces liposomes mimera celle de la face interne de la membrane plasmique. Si les résultats de ces expériences s'avèrent être en accord avec notre hypothèse, afin de déterminer le ou les acides aminés essentiel(s) pour la liaison électrostatique entre l'IL7R α et le PtdIns(4,5)P2, nous pourrions pousser notre vice de soif de connaissance bien plus loin en mutant spécifiquement certain(s) acide(s) aminé(s) basique(s) de ce cluster juxtamembranaire en acide aminé neutre comme l'alanine. Cette expérience impliquant, la présence de liposomes chargés ou non en PtdIns(4,5)P2, pourrait être répétée avec CD19, un élément important du complexe des pre-BCR et

BCR qui contrôle leur signalisation, dont un peptide basique a également été identifié comme étant présent dans sa partie juxtamembranaire. Les relevés de la littérature montrant qu'un des interactants de CD19 est également GRP78, nous ont poussé à spéculer sur la présence d'INPP5K dans le même complexe protéique que CD19 ainsi que sur l'importance de cette 5-phosphatase pour le maintien des concentrations du PtdIns(4,5)P2 et/ou du PtdIns(3,4,5)P3 autour du pre-BCR et du BCR. Cette hypothèse permettrait éventuellement d'expliquer en partie les conséquences de l'inactivation d'INPP5K observées plus tardivement lors la différenciation des lymphocytes B lorsque les preBCR et BCR sont exprimés et fonctionnels à la surface des cellules.

Sous un angle plus translationnel ou clinique, il n'est pas insensé de se questionner sur les conséquences physiopathologiques du blocage partiel entre les stades PrePro B (Fr. A) et Early Pro B (Fr. B) et des altérations d'expression de PAX5 induites par l'inactivation d'INPP5K. En effet, un phénotype similaire est observé au cours de la leucémie lymphoblastiques de type B (B-ALL) ^{195,204-206}. Les personnes atteintes de cette leucémie, qui se développe principalement chez les jeunes enfants et les personnes âgées, présentent dans 30% des cas des mutations affectant fortement l'activité ou l'expression de PAX5 ²²³. Au-delà de ces mutations de PAX5, plusieurs études révèlent que des altérations et ou des mutations d'autres éléments de la voie de l'IL7R sont également impliquées dans le développement de B-ALL ²⁰⁷. Une des lignées murines modèle pour l'étude de cette leucémie présente d'ailleurs une activation constitutive de STAT5 et est PAX5^{+/-} ²⁰⁸. À partir de ces informations, nous pouvons nous questionner sur les conséquences des mutations inactivatrices du gène INPP5K, sur leurs implications dans la pathogenèse de cette maladie et dans la prédisposition au développement de la B-ALL, rendant compte, dès lors, d'un rôle suppresseur de tumeurs pour INPP5K. Au contraire, notre questionnement pourrait porter sur l'inactivation d'INPP5K et son impact négatif sur la phosphorylation de STAT5 et, plus généralement sur la voie de signalisation de l'IL7R, ce qui constituerait une approche thérapeutique de cette maladie encore très agressive. Dans le but d'aborder ces questions, des études comparatives de l'expression d'INPP5K dans les lymphocytes B de la moelle osseuse de sujets sains et de patients atteints de la B-ALL pourraient être réalisées. Au-delà de cette analyse d'expression différentielle, l'identification d'une fonction d'INPP5K dans la B-ALL pourrait être investigué via l'emploi de lignées de cellules BA/F3 exprimant, comme une certaine proportion des patients B-ALL, suite à des mutations dans la région juxtamembranaire du domaine extracellulaire de l'IL7Rα un IL7R constitutivement activé qui induit, à lui seul, la prolifération des cellules. La subséquente réduction, dans ces cellules de l'expression (shRNA ou siRNA dirigé contre INPP5K) ou l'inactivation complète (CRISPR) d'INPP5K ainsi que, l'analyse de la phosphorylation de STAT5 et de la prolifération indépendamment de facteurs de croissance participera, éventuellement, à l'identification d'INPP5K comme nouvelle cible thérapeutique potentiel contre le développement de

la B-ALL. Finalement, l'investigation du caractère invasif des précurseurs de lymphocytes B issus de souris VAV-CRE de même que l'analyse de leur présence dans d'autres organes que la moelle osseuse, comme la rate et les ganglions, pourrait être entreprise.

En conclusion à ce travail et sur base de nos résultats de l'analyse fonctionnelle d'INPP5K dans la voie de l'IL7R, un modèle moléculaire illustrant le rôle d'INPP5K, dans ce contexte particulier vous est présenté ci-dessous.

En interagissant directement ou indirectement avec la chaîne alpha du IL7R, INPP5K se localiserait à proximité de la membrane plasmique. L'activité catalytique de cette enzyme maintiendrait la concentration membranaire du PtdIns(4,5)P2 optimale autour du IL7R, et, *de facto*, sa charge négative, essentielle pour le maintien d'une dynamique structurelle de ce récepteur compatible avec une signalisation adéquate en condition basale et après stimulation avec de l'IL-7. En l'absence d'INPP5K, l'accumulation anormale de PtdIns(4,5)P2 dans la membrane plasmique autour du IL7R favoriserait une interaction électrostatique plus intense entre les charges positives des acides aminés basiques de la partie cytoplasmique juxtamembranaire de l'IL7R α et l'excès de charges négatives du PtdIns(4,5)P2 membranaire. L'absence d'INPP5K pourrait conduire, à l'état basal, à un rapprochement anormal de la région cytoplasmique de la chaîne alpha du IL7R avec la membrane plasmique et, *ergo*, à une plus grande proximité entre les deux kinases JAK1 et JAK3. Cette distance plus faible entre les deux JAKs à l'état basal serait responsable des modifications de microdomaines GM1⁺ qui sont déjà visibles avant la stimulation avec l'IL-7. Cependant, cette distance ne serait pas suffisamment petite que pour entraîner une transactivation optimale de JAK1 et JAK3. Dès lors, en l'absence d'INPP5K et après stimulation avec de l'IL-7, les interactions ioniques plus fortes entre la chaîne alpha du IL7R et la membrane plasmique seraient responsables de l'immobilité de la structure du récepteur, empêchant les modifications dynamiques de la structure des chaînes du IL7R en réponse à l'IL-7 et altérant l'efficacité de la transduction du signal en aval du récepteur (**Image 32**).

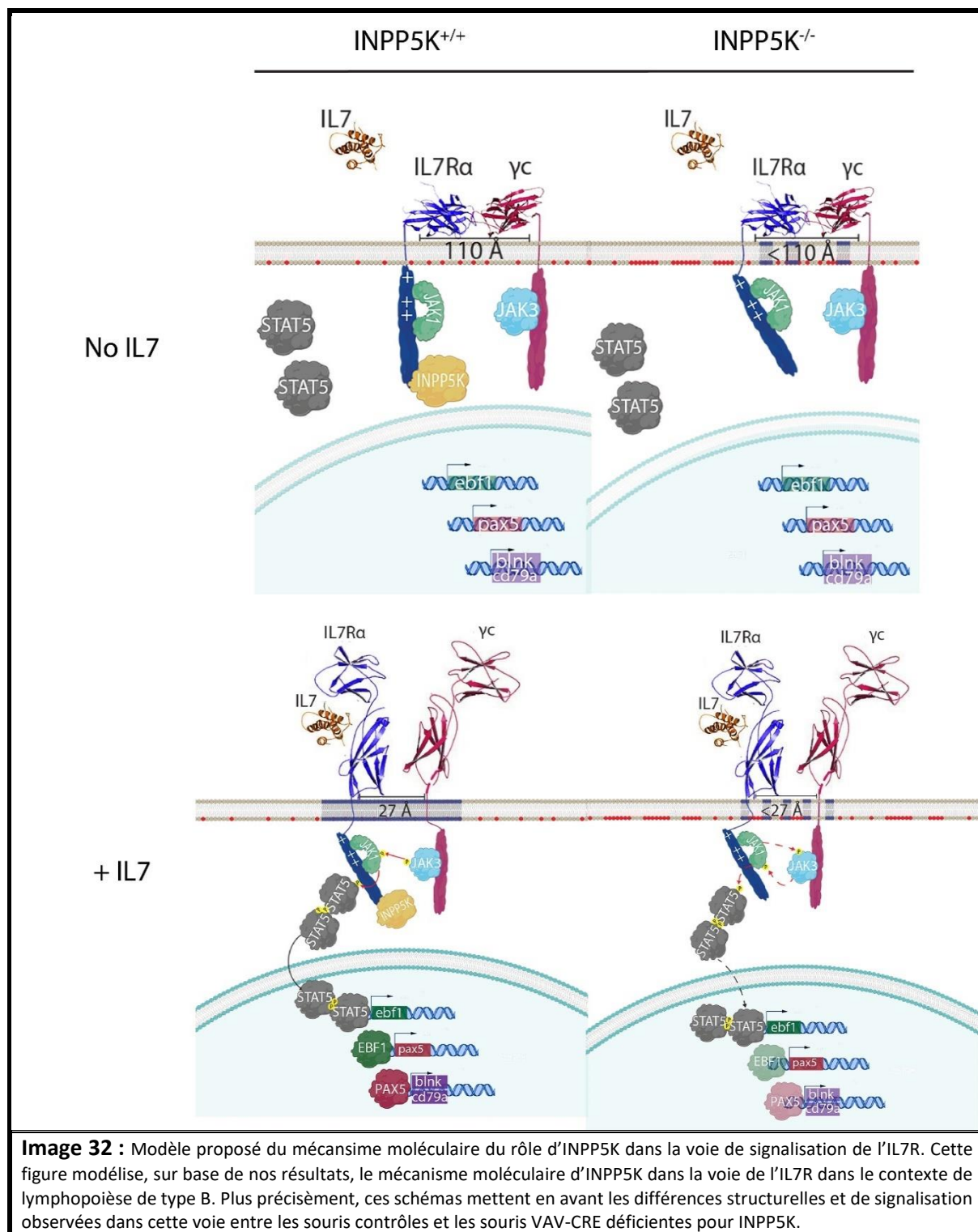
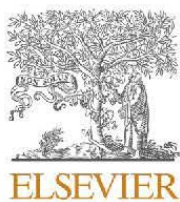


Image 32 : Modèle proposé du mécanisme moléculaire du rôle d'INPP5K dans la voie de signalisation de l'IL7R. Cette figure modélise, sur base de nos résultats, le mécanisme moléculaire d'INPP5K dans la voie de l'IL7R dans le contexte de lymphopoïèse de type B. Plus précisément, ces schémas mettent en avant les différences structurales et de signalisation observées dans cette voie entre les souris contrôles et les souris VAV-CRE déficientes pour INPP5K.

Annexes



Contents lists available at ScienceDirect

Advances in Biological Regulation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbior

The phosphoinositide 5-phosphatase INPP5K: From gene structure to *in vivo* functions

Stéphane Schurmans^{a,b,*}, Charles-Andrew Vande Catsyne^a, Christophe Desmet^c, Bastien Moës^a

^a Laboratoire de Génétique Fonctionnelle, GIGA-Research Centre, Building B34, CHU Sart-Tilman, Université de Liège, Avenue de l'Hôpital 11, 4000-Liège, Belgium

^b Secteur de Biochimie Métabolique Vétérinaire, Département des Sciences Fonctionnelles, Faculté de Médecine Vétérinaire, Building B42, Université de Liège, Quartier Vallée 2, Avenue de Cureghem 7A-7D, 4000-Liège, Belgium

^c Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA-Research Centre, Building B34, CHU Sart-Tilman, Université de Liège, Avenue de l'Hôpital 11, 4000-Liège, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords:

Inositol
Phosphoinositide
5-Phosphatase
INPP5K
SKIP
Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
Congenital muscular dystrophy
Cataract
Intellectual disability
Insulin signaling
Insulin resistance
Endoplasmic reticulum
Endoplasmic reticulum stress
Unfolded protein response

ABSTRACT

INPP5K (Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase K, or SKIP (for Skeletal muscle and Kidney enriched Inositol Phosphatase)) is a member of the phosphoinositide 5-phosphatases family. Its protein structure is comprised of a N-terminal catalytic domain which hydrolyses both PtdIns(4,5)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃, followed by a SKICH domain at the C-terminus which is responsible for protein-protein interactions and subcellular localization of INPP5K. Strikingly, INPP5K is mostly concentrated in the endoplasmic reticulum, although it is also detected at the plasma membrane, in the cytosol and the nucleus. Recently, mutations in INPP5K have been detected in patients with a rare form of autosomal recessive congenital muscular dystrophy with cataract, short stature and intellectual disability. INPP5K functions extend from control of insulin signaling, endoplasmic reticulum stress response and structural integrity, myoblast differentiation, cytoskeleton organization, cell adhesion and migration, renal osmoregulation, to cancer. The goal of this review is thus to summarize and comment recent and less recent data in the literature on INPP5K, in particular on the structure, expression, intracellular localization, interactions and functions of this specific member of the 5-phosphatases family.

1. Introduction

Phosphatidylinositol (PtdIns) is composed of a glycerol backbone esterified to two fatty acid chains and a phosphate, and attached to a polar head group, the cyclic polyol *myo*-inositol, that extends into the cytoplasm. This inositol head group has free hydroxyl groups at positions D2 through D6, and those at positions D3, D4 and D5 can be phosphorylated into 7 potential combinations by 3-, 4- and 5-kinases, respectively. The 7 phosphorylated forms of phosphatidylinositol are named phosphoinositides, are present in cell membranes

Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; PtdIns(3,4,5)P₃, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate; PtdIns(4,5)P₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; UPR, unfolded protein response.

* Corresponding author. Laboratoire de Génétique Fonctionnelle, GIGA-Research Centre, building B34, CHU Sart-Tilman, Université de Liège, avenue de l'Hôpital 11, 4000-Liège, Belgium.

E-mail address: sschurmans@uliege.be (S. Schurmans).

<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2020.100760>

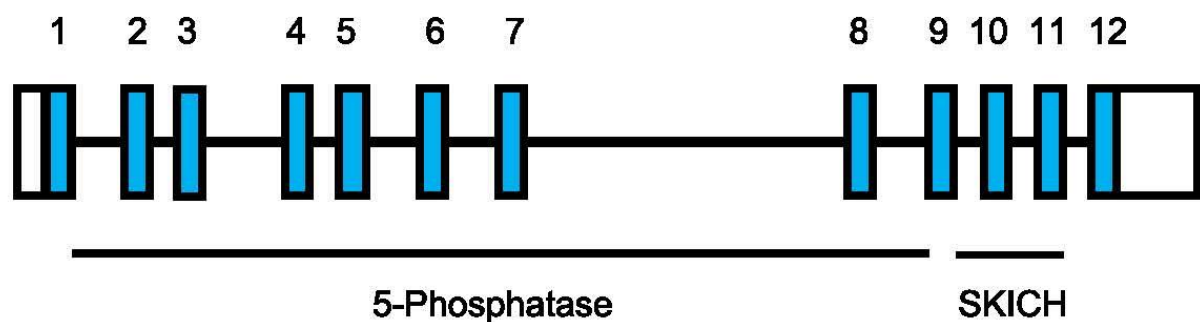
Received 28 September 2020; Received in revised form 5 October 2020; Accepted 9 October 2020

Available online 10 October 2020

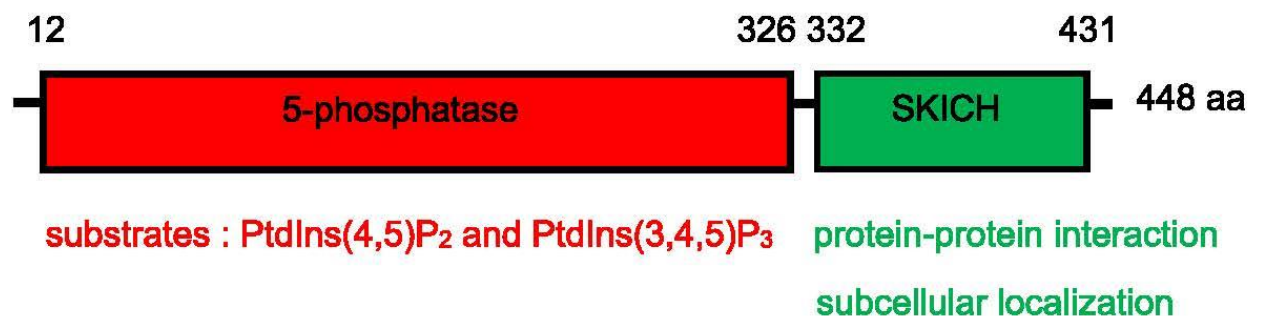
2212-4926/© 2020 Published by Elsevier Ltd.

and play important role in many biological processes, essentially by interacting with specific proteins (Grabon et al., 2019). Indeed, each cellular membrane compartment has a characteristic composition of phosphoinositide species, and this phosphoinositide signature attracts a specific set of functionally important proteins to that membrane, or directly regulates the activity level of integral membrane proteins (Falkenburger et al., 2010). Beside kinases, phosphoinositide metabolism is also regulated by members of phospholipases C and phosphatases families. Phosphates added at positions D3, D4 and D5 of the inositol head group by kinases can be removed by 3-, 4- and 5-phosphatases, respectively (Blero et al., 2007). The mammalian 5-phosphatases family comprises 10 members. These members share an inositol 5-phosphatase domain with a set of conserved amino acids and a general comparable structural organization. Except for one member, INPP5A, they all catalyze the dephosphorylation of PtdIns(4,5)P₂ and/or PtdIns(3,4,5)P₃ at the 5- position, generating PtdIns(4)P and/or PtdIns(3,4)P₂, respectively (Ramos et al., 2019a). Interestingly, 5-phosphatase isoenzymes have been individually implicated in human diseases, such as ciliopathies (INPP5E), the oculo-cerebrorenal syndrome of Lowe

A. DNA:



B. PROTEIN:



C. MUTATIONS:

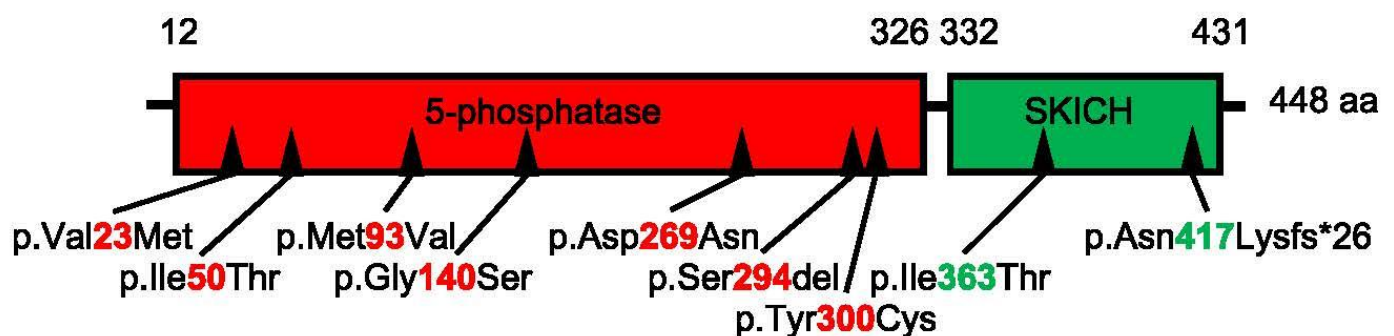


Fig. 1. The human INPP5K gene and protein, as well as mutations discovered in patients. A. Relationship between coding exons (blue boxes) and the 5-phosphatase and SKICH domains of the INPP5K protein. White boxes are 5' and 3' untranslated regions. Exons are numbered from 1 to 12. B. The 5-phosphatase (red box, amino acids 12–326) and the SKICH (green box, amino acids 332–431) domains of the 448 amino-acids INPP5K protein, and their known functions. C. The 9 mutations discovered so far in the 5-phosphatase (red box and numbers) and the SKICH (green box and numbers) domains of the INPP5K protein in patients with a rare form of autosomal recessive congenital muscular dystrophy.

(INPP5F) or opsismodysplasia, a rare congenital skeletal dysplasia (INPPL1) (Ramos et al., 2019). The goal of this review is to summarize and comment recent and less recent data in the literature on INPP5K, in particular on the *in vivo* function of this member of the 5-phosphatases family in man and genetically-modified animals.

2. Official full name/symbol and synonym

The official full name for the *INPP5K* gene is Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase K. However, *SKIP* (for Skeletal muscle and Kidney enriched Inositol Phosphatase) was first used when this 5-phosphatase was discovered by Takenawa's team in 2000 (Ijuin et al., 2000).

3. INPP5K gene, transcripts and proteins in man and mouse

The human *INPP5K* gene is located on the telomeric region of the short arm of chromosome 17 (17p13.3), on the reverse strand between nucleotides 1,494,577 and 1,516,742. The gene comprises 12 exons and generates a 2706 bp transcript coding for a 448 amino acids protein with a theoretical 51.1 kDa molecular mass (Fig. 1; e!Ensembl). Many splice variants of *INPP5K* are reported in public databases, giving potential proteins of 84–229 amino acids in length. However, the *in vivo* relevance of these transcripts is currently unknown. By contrast, two interesting transcripts containing insertions of 231 and 390 bp between exon 1 and 2 of the 2706 bp transcript described above have been reported (Ijuin et al., 2000; e!Ensembl). They both lead to the production of the same 372 amino acids/42.7 kDa protein that lacks the first 76 amino acids of the 51.1 kDa INPP5K protein, probably by using a second Start codon present in exon 3. Both ~51.1 and ~42.7 kDa signals were detected in tissue and cell line protein extracts by Western blotting using an affinity-purified rabbit antibody directed against amino acid residues 137–448 of the human INPP5K protein (Ijuin et al., 2000). An additional ~36 kDa signal of unknown amino-acid sequence was also detected by Western blotting using an affinity-purified rabbit antibody raised against a fusion peptide representing the N- and C-terminal seven amino acids of human 51.1 kDa INPP5K protein (Gurung et al., 2003).

In mouse, the *Inpp5k* gene is located on the long arm of chromosome 11 (11qB5), on the forward strand between nucleotides 75,630,988 and 75,648,871. The mouse *Inpp5k* gene also comprises 12 exons, as in man, and generates a 2679 bp transcript coding for a 468 amino acids protein with a theoretical molecular mass of 54.2 kDa (e!Ensembl). Two splice variants giving potential proteins of 39 and 112 amino acids in length are reported in the databases, but their *in vivo* relevance is unknown. When mouse tissues protein extracts were probed by Western blotting with an affinity-purified rabbit antibody raised against the RSFLREDTLYEPEPQI carboxy-terminal peptide of the INPP5K mouse protein, ~54 and ~42 kDa signals were clearly detected (Pernot et al., 2011). A third ~51 kDa signal was specifically observed in testis and brain and, in the kidney, a fourth ~36 kDa signal was also present in addition to the ~42 kDa signal (Pernot et al., 2011). The exact amino-acid sequence and origin of these 51, 42 and 36 kDa signals are currently unknown.

In conclusion, these results indicate that mouse and human *INPP5K* genes have a very similar structure and lead to the production of full length 54.2 and 51.1 kDa catalytically active INPP5K proteins, respectively. Additional truncated INPP5K proteins probably also arise from either alternative splicing, the use of alternative Start codon or simply from partial proteolysis, which are also detected by Western blotting with specific antibodies. The exact biological activity of these truncated proteins is currently unknown.

4. Expression of INPP5K mRNAs and proteins in human and mouse tissues and cells

Results from Northern blotting, RT-PCR and Western blotting indicate that expression of INPP5K mRNA and protein is rather ubiquitous in human and mouse tissues and cells lines (Ijuin et al., 2000; Pernot et al., 2011). Importantly, INPP5K is particularly abundant in skeletal muscle, heart, brain, kidney, testis and eye (see below). Hematopoietic cells also express INPP5K mRNA and protein, including resting and activated lymphocytes, neutrophils, macrophages and dendritic cells (Pernot et al., 2011).

In addition to the full length 54.2 kDa mouse and 51.1 kDa human INPP5K proteins, mouse 51, 42 and 36 kDa signals as well as human 42.7 and 36 kDa signals were detected by Western blotting (Ijuin et al., 2000; Gurung et al., 2003; Pernot et al., 2011). Intriguingly, tissues and cell lines express either a single INPP5K protein or a combination of full length and/or truncated INPP5K proteins. For example, the mouse C2C12 cell line and mouse ovary only express the 42 kDa truncated protein. By contrast, full length 54.2 kDa and truncated 42 kDa proteins are both detected in mouse spleen. The most intriguing combination is probably in the mouse kidney where a very strong 36 kDa signal is associated with faint 54.2, 51 and 42 signals in the cortex, whereas faint 42 and 36 kDa signals are detected in the medulla (Pernot et al., 2011).

Physiological and physiopathological conditions associated with an increased INPP5K mRNA/protein expression include skeletal muscle cell differentiation (Xiong et al., 2011; Ijuin and Takenawa, 2012a), endoplasmic reticulum stress and activation of the unfold protein response (Ijuin et al., 2015a) as well as insulin resistance, obesity and diabetes (Ijuin et al., 2015a). In cancer, *INPP5K* mRNA expression was found either significantly increased (endometrial carcinoma (Hedberg Oldfors et al., 2015), prostate cancer (Flaig et al., 2017), glioblastoma (Davies et al., 2015), renal cancer (Jones et al., 2005)) or decreased (lung adenocarcinoma (Gao et al., 2017), glioblastoma (Davies et al., 2015)), depending on the cancer cell type.

5. Human and mouse INPP5K protein structure and catalytic activity

When compared to the human 448 amino-acids/51.1 kDa INPP5K protein, the mouse 468 amino-acids/54.2 kDa INPP5K protein is

characterized by the presence of an additional peptide of 18 residues of unknown function at the N-terminus. With the exception of this peptide at the N-terminus, human and mouse INPP5K protein structure is identical and simple: a catalytic domain comprising of the two conserved and specific motifs of the 5-phosphatases family is present at the amino-terminus of the protein (residues 12–326 of the human 51.1 kDa protein and 30–345 of the murine 54.2 kDa protein), followed by a SKICH domain at the carboxy-terminus (residues 332–431 of the human 51.1 kDa protein and 351–450 of the murine 54.2 kDa protein) (Fig. 1). Accordingly, the human 372 amino acids/42.7 kDa protein described above, which lacks the first 76 amino acids of the 51.1 kDa full length INPP5K protein, is unlikely to harbor 5-phosphatase activity.

INPP5K hydrolyses both PtdIns(4,5)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃, but exhibits greatest activity towards PtdIns(4,5)P₂ (Ijuin et al., 2000; Gurung et al., 2003; Schmid et al., 2004; Pernot et al., 2011). No phosphatase activity was detected against PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(5)P, Ins(1,4,5)P₃ or Ins(1,3,4,5)P₄ (Gurung et al., 2003; Schmid et al., 2004).

The ~100 amino-acid SKICH domain (for SKIP carboxy-homology domain) has an Ig-like β -barrel structure and a molecular surface dominated by negatively charged regions which may interact with components of the plasma membrane (Yang et al., 2015). The SKICH domain and surrounding sequences present at the C-terminus of INPP5K mediates interactions with specific proteins and regulate intracellular localization (Gurung et al., 2003; Dong et al., 2018). For example, after growth factor/insulin stimulation, the SKICH domain mediates INPP5K translocation from its endoplasmic reticulum localization in basal conditions to the plasma membrane. The SKICH domain of INPP5K is composed of a core sequence allowing a constitutive plasma membrane association and of surrounding sequences specific to INPP5K that contribute to endoplasmic reticulum localization of the protein in basal conditions (Gurung et al., 2003; Dong et al., 2018).

6. INPP5K interacting proteins

Lists of proteins potentially interacting with the INPP5K protein are available in BioGRID (37 potential interactors), CORUM (1 potential complex: ID 2639, the HES1 promoter-Notch enhancer complex), IntAct (38 potential interactors), MINT (7 potential interactors) and STRING (10 predicted functional partners) public databases and are summarized on www.uniprot.org/uniprot/Q9BT40. The present review will be limited to 6 interacting proteins which have been carefully analyzed by different teams as part of specific studies on INPP5K.

6.1. GRP78/BiP/HSP5a and activated PAK1

Ijuin and collaborators proposed a model in which, in basal conditions, cytosolic INPP5K directly interacts via its SKICH domain with GRP78/Glucose regulated protein 78, a luminal ER chaperone protein involved in ER stress and the UPR (Ijuin and Takenawa, 2012b, 2015a, 2015b, 2015c and 2016). However, in this model, the unresolved issue is how INPP5K which is present in the cytosol and at the cytosolic side of the ER membrane interacts with luminal ER GRP78 (Ijuin et al., 2016). After insulin stimulation, the INPP5K-GRP78 complex migrates from ER to the plasma membrane, where activated PAK1/p21-activated protein kinase 1 competitively binds through a 11 amino-acids peptide within its kinase domain to INPP5K in place of GRP78, linking INPP5K to the complex of proteins associated with the insulin receptor. Binding of INPP5K to activated PAK1 and this complex via its SKICH domain leads to PtdIns(3,4,5)P₃ dephosphorylation, decreased AKT2 phosphorylation and insulin signaling inactivation (see below for the physiologic effect of this regulation). The co-immunoprecipitation of expressed tagged INPP5K and GRP78 proteins was reproduced by another team (Wiessner et al., 2017).

6.2. SODD/BAG4

According to Rahman and collaborators, the direct interaction between the molecular co-chaperone SODD/Silencer of Death Domains and INPP5K following growth factor stimulation exerts an inhibitory effect on INPP5K PtdIns(3,4,5)P₃ 5-phosphatase catalytic activity. Consequently, this interaction enhances the recruitment of PtdIns(3,4,5)P₃-effectors at the plasma membrane and reduces that of PtdIns(3,4)P₂, resulting in a tight regulation of actin polymerization, cell adhesion, spreading and migration (Rahman et al., 2011). Upon growth factor stimulation, SODD co-localized with INPP5K both in the cytosol and at the plasma membrane. No interaction was detected in basal conditions. In contrast, *SODD*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts exhibited reduced AKT phosphorylation following growth factor stimulation, associated with increased INPP5K PtdIns(3,4,5)P₃-5-phosphatase activity (Rahman et al., 2011).

6.3. ARL6IP1

ARL6IP1/ADP Ribosylation Factor Like GTPase 6 Interacting Protein 1 is a protein with reticulon-like features whose mutations result in hereditary spastic paraplegia, a pathology frequently associated with dysfunction of proteins that control ER morphology (Blackstone et al., 2011; Novarino et al., 2014; Yamamoto et al., 2014; Nizon et al., 2018). ARL6IP1 is embedded in the ER membrane via 4 transmembrane domains but its N- and C-terminal regions protrude in the cytosol (Dong et al., 2018). Dong and collaborators convincingly demonstrated that the interaction with ER ARL6IP1 protein is responsible for INPP5K recruitment from the cytosol to the cytosolic side of the ER membrane and that, like ARL6IP1, INPP5K is enriched in newly formed ER tubules. Importantly, knockdown of either protein resulted in structural ER alterations (Dong et al., 2018; Ramos et al., 2020). The ARL6IP1 cytosolic N-terminal region and a surface of INPP5K at the interface of the catalytic domain and the SKICH domain were implicated in the INPP5K-ARL6IP1

interaction (Dong et al., 2018).

6.4. MAD2L1BP/p31(*comet*)/CMT2

Yeast-two-hybrid analysis revealed MAD2L1BP/MAD2L1 binding protein, a nuclear-enriched protein binding to the mitotic spindle assembly checkpoint MAD2A protein during cell cycle surveillance, as a potential INPP5K interactor (Rual et al., 2005). In EGFP-INPP5K-expressing HeLa cells, mCherry-MAD2L1BP co-expression resulted in a massive translocation of INPP5K from ER to the nucleus and in a marked nuclear INPP5K accretion (Dong et al., 2018). However, the interaction between native proteins was not analyzed and interacting domains in INPP5K and MAD2L1BP proteins were not defined. Thus, the physiological relevance of this interaction remains to be defined.

6.5. 2/5C HBV core protein

Interestingly, the SKICH domain of INPP5K was reported to interact with amino acids 116–149 of the 2/5C human hepatitis B virus (HBV) core protein (Hung et al., 2009). The interaction with 2/5C HBV core protein induces INPP5K migration from ER to the nucleus.

7. Intracellular localization of INPP5K

In non-stimulated conditions, immunofluorescence studies revealed that both endogenous and exogenous tagged INPP5K proteins are mostly concentrated in the ER, co-localizing with calreticulin and calnexin ER markers, and that little or no staining is detected at the plasma membrane (Ijuin et al., 2000; Gurung et al., 2003; Dong et al., 2018; Ramos et al., 2018, 2020). As mentioned above, at the cytosolic side of the ER membrane, INPP5K binds to the N-terminal region of ARL6IP1 which protrudes in the cytosol (Dong et al., 2018). Interaction of INPP5K with luminal ER GRP78 has also been described, but the molecular mechanism is still unresolved (Ijuin et al., 2016). It is noteworthy here that mammalian INPP5K shares this ER localization with the yeast phosphoinositide 5-phosphatase Inp54p. Inp54p is a 44 kDa protein which consists of a N-terminal PtdIns(4,5)P2 5-phosphatase domain and a C-terminal leucine-rich tail that is sufficient to target the protein to the cytosolic side of the ER membrane (Wiradjaja et al., 2001). After growth factor or insulin stimulation, INPP5K is transiently translocated from the ER to the plasma membrane, where it could bind to activated PAK1, SODD or still undefined plasma membrane ligands via its SKICH domain (see above). At the plasma membrane, INPP5K co-localizes with submembranous actin at the leading edge of the cell, specifically at membrane ruffles (Gurung et al., 2003; Ijuin and Takenawa, 2003, 2012b, 2016). Finally, Ramos and collaborators recently reported that INPP5K, beside its known ER, plasma membrane and cytosolic localizations, is also present in the nucleus of the human U-251 malignant glioblastoma (MG) cell line (Ramos et al., 2020). In this cell line, about half of the nuclear INPP5K staining co-localized with SC-35⁺ speckles, where PtdIns(4,5)P2 has been previously detected.

8. INPP5K mutations are responsible for a rare form of autosomal recessive congenital muscular dystrophy with cataract, short stature and intellectual disability in man

In 2017, 2 research teams reported that biallelic mutations in the *INPP5K* gene cause a form of congenital muscular dystrophy with early-onset cataract, short stature and cognitive impairment (gene/locus MIM: 607875; phenotype MIM: 617404) (Wiessner et al., 2017; Osborn et al., 2017). A total of 9 causative *INPP5K* alleles were identified: 7 in the catalytic region and 2 in the SKICH domain (Fig. 1). All 7 catalytic mutants and one of the SKICH domain mutant (p.Asn417Lysfs*26) exhibited moderate to severe decrease in PtdIns(4,5)P2 phosphatase activity *in vitro*, as compared with control INPP5K protein (Wiessner et al., 2017; Osborn et al., 2017). The second SKICH domain mutant, p. Ile363Thr, had normal PtdIns(4,5)P2 phosphatase activity but displayed a striking tendency for a more diffuse intracellular distribution in transfected cells than control INPP5K protein (Wiessner et al., 2017). It is noteworthy here that patients homozygous for the p. Ile50Thr catalytic mutant had a variable penetrance for muscular dystrophy and intellectual disability, leaving in one patient the ocular manifestation as the main phenotype and suggesting a role for epigenetic factors and/or genetic modifiers in the phenotype (Yousaf et al., 2018). Electromyography showed myopathic changes in the muscles of all affected individuals tested, in association with normal sensory and motor nerve conduction. Muscle pathology was largely non-specific, showing variable degrees of dystrophic features, including increased range of muscle fiber size and diameter, muscle fibrosis, excess adipose tissue, occasional fibers with centrally located nuclei or vacuoles, rare necrotic fibers, and a few basophilic regenerating fibers. There were no abnormalities of blood vessels, inflammatory changes, or group atrophy. Immunohistochemical analysis of classical skeletal muscle markers was normal, except for α -dystroglycan expression, which was reduced in 2 of the 12 affected individuals tested (Wiessner et al., 2017; Osborn et al., 2017). Transmission electron microscopy revealed several fibers with pronounced reduction of myofibrils and disrupted Z line material (Wiessner et al., 2017). Unfortunately, attempts to identify alterations in biological processes in which INPP5K had been previously implicated (see below) were unsuccessful, and thus the pathogenic mechanism of this rare congenital muscle disease remains totally unknown. Indeed, skin fibroblasts from individuals homozygous for the p. Ile50Thr INPP5K mutation and from control subjects showed no difference in AKT phosphorylation in response to IGF-II stimulation, in the expression of markers of the unfolded protein response (UPR, an ER stress reaction), nor in the levels of autophagy markers in response to rapamycin and bafilomycin A1 treatment. Finally, all 4 INPP5K mutant proteins tested, including p. Ile363Thr in the SKICH domain, bound to GRP78 in a similar way to control INPP5K (Wiessner et al., 2017). In connection with the congenital muscular dystrophy observed in human INPP5K mutants, it is important to note that 3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in intron

1 and 6 as well as in exon 12 of the porcine *INPP5K* gene have been associated with some meat traits, including muscle fiber number (Xiong et al., 2011, 2012). Furthermore, *INPP5K* gene-modified *Pps^{Brdm1/+}* heterozygous mice had higher amounts of quadriceps muscle compared with wild-type mice (Ijuin et al., 2008).

9. INPP5K functions in cellular and animal models

9.1. The zebrafish as a model for the human congenital muscular dystrophy caused by biallelic mutations in the *INPP5K* gene

Inpp5k is present in two copies in the zebrafish genome: *inpp5ka* and *inpp5kb*, with 48 and 44% identity to human *INPP5K*, respectively. At 1 and 2 days post-fertilization (dpf), mRNA quantification indicated that *inpp5ka* is respectively 7- and 16-fold higher expressed than *inpp5kb* (Osborn et al., 2017). *In vivo* experiments were conducted either by injecting *inpp5ka*-, *inpp5kb*- or *inpp5ka*- and *inpp5kb*-specific morpholinos (MOs) in embryos (Osborn et al., 2017; Wiessner et al., 2017), or on a zebrafish line carrying an *inpp5ka* nonsense allele (p.Gln440*, resulting in a C-terminal 12 amino acids deletion, a probable hypomorph allele) (Yousaf et al., 2018). Injections of *inpp5ka* or *inpp5ka* and *inpp5kb* MOs in fertilized oocytes led to a phenotype that closely resembles the human presentation, including myopathy, reduced mobility, lens disorganization, microphtalmia, reduced growth, and microcephaly. In contrast, *inpp5kb* MOs alone showed only a very mild phenotype. Histologically, sparser and disorganized myofibers, altered sarcomere assembly, and reduced synaptic formation were observed in skeletal muscle of *inpp5k* knockdown embryos. In *inpp5k* morphants, the lens cortex was disorganized and cell nuclei were present in the center of the lens nucleus, a phenotype reminiscent of congenital cataracts in man. The p. Gln440* zebrafish line displayed a very similar lens phenotype, while the skeletal muscle phenotype was much less severe than observed in MOs-injected embryos (Yousaf et al., 2018).

9.2. Insulin signaling and insulin resistance

As already mentioned above, according to Ijuin and collaborators, *INPP5K* is localized at the cytosolic side of the ER membrane in non-stimulated conditions, directly interacting with ER luminal GRP78 (Ijuin and Takenawa, 2012b, 2015a, 2015b, 2015c and 2016). Following insulin stimulation, the *INPP5K*-GRP78 complex migrates to the plasma membrane, where activated PAK1 competitively binds to *INPP5K* in place of GRP78, linking *INPP5K* to the complex of proteins associated with the insulin receptor. Binding of *INPP5K* to this complex through activated PAK1 leads to PtdIns(3,4,5)P3 dephosphorylation, decreased AKT2, p70 S6 kinase and Glycogen Synthase activation, GLUT4 translocation, membrane ruffle formation and results in insulin signaling inactivation. Inversely, decreasing *INPP5K* expression in cells or in *INPP5K* gene-modified *Pps^{Brdm1/+}* heterozygous mice resulted in an increased insulin signaling and sensitivity in muscle cells and, in *Pps^{Brdm1/+}* mice, a reduced diet-induced obesity (Ijuin and Takenawa, 2003, 2008; Xiong et al., 2009). Finally, *INPP5K* expression was increased in skeletal muscles isolated from high fat diet-fed mice and diabetic/obese db/db mice, as compared to wild-type mice, linking *INPP5K* to these diseases (Ijuin et al., 2015a). In this context, it is noteworthy that culture medium supplementation with a synthetic peptide containing the amino acids sequence of the PAK1 kinase domain which interacts with *INPP5K* increased insulin signaling in muscle cell lines, probably by interfering with the formation of the *INPP5K*-PAK1 complex (Ijuin and Takenawa, 2015).

9.3. ER stress, the unfolded protein response (UPR) and insulin resistance

The UPR is triggered essentially in response to ER defects in N-linked glycosylation and disulfide bond formation, leading to accumulation of unfolded/misfolded proteins in the ER lumen (i.e. ER stress). ER stress can be secondary to intracellular alterations (e.g., calcium or redox imbalances, glucose deprivation), microenvironmental conditions (e.g., hypoglycemia, hypoxia, acidosis, viral infection), high-fat diet/obesity, a variety of natural compounds (e.g., thapsigargin, tunicamycin), and several prescription drugs. Physiological processes like a vigorous protein production and secretion (e.g. immunoglobulins in plasma cells, digestive enzymes in exocrine pancreas and intestine) or muscle cell contraction during intense/prolonged exercise also trigger the UPR. The GRP78 molecular chaperone, one of the *INPP5K* interacting proteins (see above), plays a central role in the UPR by binding to and inactivating 3 stress sensors present in the ER membrane: IRE1 α , ATF6 and PERK. Briefly, accumulation of unfolded/misfolded proteins in the ER lumen displaces the GRP78 chaperone from these sensors to exposed hydrophobic residues on abnormally folded proteins. Activation of these 3 sensors results *in fine* in a decreased protein translation, increased production of molecular chaperones involved in protein folding, degradation of unfolded proteins by the proteasome and cell cycle arrest. If the UPR is prolonged or failed, cellular apoptosis occurs. Ijuin and colleagues showed that UPR activation lead to an increased expression of *INPP5K* mRNA and protein in C2C12 muscle cells and this contributed, as explained above, to decreased insulin signaling, i.e. insulin resistance. (Ijuin et al., 2016). XBP1 transcription factor was involved in this increased expression. Increased skeletal muscle *INPP5K* expression was also observed in diet-induced and genetic models of obesity in mice where the UPR is chronically activated, suggesting a link between high-fat diet, obesity, the UPR (including XBP1), *INPP5K* expression and insulin resistance.

9.4. ER structural integrity

Dong and collaborators elegantly demonstrated that *INPP5K* interacts with the N-terminus of ARL6IP1 at the cytosolic side of the ER membrane (Dong et al., 2018). Both proteins are enriched in highly motile, elongating peripheral ER tubules, relative to perinuclear ER sheets, and were absent from the nuclear membrane. Interestingly, knock-down of *INPP5K* or ARL6IP1 resulted in a similar

decrease in ER tubules and expansion of ER sheets at the cell periphery. Both the INPP5K SKICH domain and 5-phosphatase activity were shown to be essential to keep a normal ER structure. Yet, using GFP-PH PLC δ 1 as a fluorescent probe to monitor PtdIns(4,5)P $_2$ levels, no change in the localization and/or level of the fluorescent signal was detected in INPP5K knock-down cells (Dong et al., 2018). Defects in ER architecture and lower abundance of peripheral ER tubules were also observed in *C. elegans* neurons and human glioblastoma cell lines when INPP5K (or CIL-1, its *C. elegans* orthologue) was silenced (Dong et al., 2018; Ramos et al., 2020). Importantly, three CIL-1 mutations (I39T, Y261C, and I327T) corresponding to INPP5K mutations found in human muscular dystrophic patients did not rescue the ER morphology phenotype when expressed in *C. elegans* CIL-1-deficient neurons, on the contrary to the wild type CIL-1 protein (Dong et al., 2018).

9.5. Myoblasts differentiation and control of the IGF-II autocrine regulatory loop

Expression of INPP5K mRNA and protein increased during C2C12 cell differentiation into myotubes. In addition, MyoD, a transcription factor essential for myoblast specification during embryogenesis and in adults, induced INPP5K mRNA expression in these cells, partly via cis-acting elements in the INPP5K promoter (Xiong et al., 2011; Ijuin and Takenawa, 2012a). C2C12 cell differentiation into myotubes was decreased when INPP5K was overexpressed and, inversely, endogenous INPP5K silencing was associated with increased myotubes formation. A model was proposed by Ijuin and colleagues where INPP5K controls the IGF-II autocrine regulatory loop and thus myoblast differentiation (Ijuin and Takenawa, 2012a). Indeed, during myoblast differentiation, IGF-II up-regulates its own gene expression through the PI3kinase/PtdIns(3,4,5)P $_3$ /AKT/mTOR signaling pathway, leading to IGF-II production and secretion in the extracellular space. Secreted IGF-II binds to IGF-1 receptor on myoblasts and initiate an autocrine/paracrine loop that plays a major role during differentiation (Ren et al., 2008; Duan et al., 2010; Jiao et al., 2013, and references therein). In the proposed model, INPP5K dephosphorylates PtdIns(3,4,5)P $_3$ in the IGF-II signaling pathway, leading to decreased AKT/mTOR phosphorylation and IGF-II mRNA and protein production, acting thus as a brake on this positive autocrine loop. This mechanism could explain why INPP5K overexpression in C2C12 cells decreased myoblast differentiation and why decreased endogenous INPP5K expression in these cells and in INPP5K gene-modified *Pps^{Brdm1/+}* heterozygous mice led to significantly increased differentiation into myotubes and quadriceps muscle weight compared to controls (Ijuin et al., 2008, 2012a).

9.6. Cytoskeleton organization, cell adhesion and migration

Following cell stimulation by growth factors like Epidermal Growth factor (EGF) or integrin activation during cell adhesion, INPP5K translocates from the ER to the plasma membrane and co-localized with submembranous actin and membrane ruffles (Gurung et al., 2003; Ijuin and Takenawa, 2003; Davies et al., 2015; Ramos et al., 2019b). In these conditions, decreasing INPP5K expression in cancer cell lines had no impact on cell proliferation or survival, but resulted in increased PtdIns(4,5)P $_2$ levels and decreased cell migration (Davies et al., 2015; Ramos et al., 2019b). By contrast, INPP5K overexpression suppressed growth factor-induced PtdIns(3,4,5)P $_3$ /AKT signaling and cell growth, and reduced the recruitment of PI(4,5)P $_2$ -binding proteins to the plasma membrane, lamellipodia formation and Talin incorporation into focal adhesions (Davies et al., 2015).

9.7. Renal osmoregulation

Transgenic mice ubiquitously overexpressing tagged mouse INPP5K protein presented defects in water metabolism characterized by a reduced plasma osmolality at baseline, a delayed urinary water excretion following a water load, and an increased acute response to vasopressin. These defects were associated with the expression of the *Inpp5k* transgene in renal collecting ducts and with alterations in the arginine vasopressin/aquaporin-2 signalling pathway in this tubular segment. Analysis in a mouse collecting duct mCCD cell line revealed that INPP5K overexpression lead to increased expression of the arginine vasopressin receptor type 2 and increased cAMP response to arginine vasopressin, providing a basis for increased aquaporin-2 expression and plasma membrane localization with increased osmotically-induced water transport. Altogether, these results indicated that INPP5K is important for the control of the arginine vasopressin/aquaporin-2 signalling pathway and water transport in kidney collecting ducts.

10. INPP5K association with other biological processes and human diseases

As mentioned above, *INPP5K* mRNA expression was found either increased or decreased in cancer, depending on the cancer cell type, but the exact consequence on cancer physiopathology remains unclear. By contrast, Ramos and colleagues recently showed that INPP5K depletion in the U-87 MG glioblastoma cell line resulted in increased viability and decreased apoptosis, and that these cells generated significantly larger tumors when injected in SCID mice, compared with controls (Ramos et al., 2020).

Association studies also revealed links between the *INPP5K* gene and autophagy (Zirin et al., 2015), Parkinson (Nazeri et al., 2015; Zhu et al., 2018; Liu et al., 2019) and Alzheimer diseases (Rahman et al., 2020).

11. Conclusion, questions and future directions

In 2017, mutations in INPP5K have been detected in patients with a rare form of autosomal recessive congenital muscular dystrophy. All causative *INPP5K* alleles detected so far result in decreased catalytic activity or altered subcellular localization of the protein. Muscle pathology is largely non-specific in patients as in *inpp5k* knockdown zebrafish, a model used to mimic the human

disease. Unfortunately, the pathogenic mechanism of this muscle disease remains totally unknown. In particular, no difference in AKT phosphorylation was detected between patients and control fibroblasts in response to IGF-II stimulation, even though numerous cellular studies seemed to point this growth factor (or insulin)/PI3kinase/PtdIns(3,4,5)P3/AKT axis as a good candidate for the pathogenic mechanism of this disease. The precise intracellular localization of INPP5K in muscle cells will probably give some ideas about the mechanism of action of INPP5K in this cell type and the physiopathology of this muscular dystrophy. Precisions about the human phenotype are also needed: why do patients with the same INPP5K mutation have so variable penetrance of muscular dystrophy and intellectual disability? Are INPP5K patients also insulin hypersensitive, like INPP5K gene-modified *Pps^{Brdm1/+}* heterozygous mice? Conversely, do these INPP5K heterozygous mice have muscle histological alterations similar to INPP5K patients or INPP5K-depleted zebrafish?

More generally, in light of the information in this review, it will be important to discover the specific physiological and functional relevance, if any, of human 42.7 and 36 kDa as well as mouse 51, 42 and 36 kDa INPP5K proteins, to further analyze the interaction of INPP5K with MAD2L1BP and the transfer of this complex into the nucleus, as well as the physiological and functional role of INPP5K in this specific subcellular compartment, in relation with nuclear PtdIns(4,5)P2 levels. In the same line of thought, the impact of INPP5K inactivation on ER functional integrity, beside structural integrity (e.g. protein and lipid syntheses, protein glycosylation, calcium signaling, ...) and on ER phosphoinositide levels should also be investigated. Finally, Ijuin and colleagues reported that INPP5K gene-modified *Pps^{Brdm1/Brdm1}* homozygous mice died early during embryonic life of unknown causes (Ijuin et al., 2008). We have generated *Inpp5k* floxed and then *Inpp5k^{Δ/Δ}* mice and we could confirm that the latter mice died during embryonic life, as *Pps^{Brdm1/Brdm1}* mice. Our floxed mice as well as those recently generated by McCabe (McCabe et al., 2019) will certainly help to answer to most of the above questions and will probably allow discovering the exact INPP5K function during eye development and in lens cortex, neurons and brain as well as skeletal muscle. The analysis of INPP5K floxed mice will probably reveal a wider phenotype than in INPP5K patients, with alterations involving more biological processes and organs, given that human INPP5K mutations do not completely abolish the 5-phosphatase catalytic activity or function.

Altogether, the analysis of this original phosphoinositide 5-phosphatase will certainly give some surprising and interesting results about its role and its PtdIns(4,5)P2 and PtdIns(3,4,5)P3 substrates in physiology and physiopathology in many organs, cells and subcellular localizations.

Declaration of competing interest

The authors disclose no potential conflicts of interest. All authors approved the final manuscript.

Acknowledgments

C-AVC and BM are supported by a FRIA grant from the belgian FNRS. CD is a research associate of the belgian FNRS.

References

- Blackstone, C., O'Kane, C.J., Reid, E., 2011. Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 31–42.
- Blero, D., Payraastre, B., Schurmans, S., Erneux, C., 2007. Phosphoinositide phosphatases in a network of signaling reactions. *Pflug Arch. Eur. J. Phys.* 455, 31–44.
- Davies, E.M., Kong, A.M., Tan, A., Gurung, R., Sriratanana, A., Bukczynska, P.E., Ooms, L.M., McLean, C.A., Tiganis, T., Mitchell, C.A., 2015. Differential SKIP expression in PTEN-deficient glioblastoma regulates cellular proliferation and migration. *Oncogene* 34, 3711–3727.
- Dong, R., Zhu, T., Benedetti, L., Gowrishankar, S., Deng, H., Cai, Y., Wang, X., Shen, K., De Camilli, P., 2018. The inositol 5-phosphatase INPP5K participates in the fine control of ER organization. *J. Cell Biol.* 217, 3577–3592.
- Duan, C., Ren, H., Gao, S., 2010. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 344–351.
- Falkenburger, B.H., Jensen, J.B., Dickson, E.J., Suh, B.-C., Hille, B., 2010. Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *J. Physiol.* 588 (17), 3179–3185.
- Flaig, T.W., Salzmann-Sullivan, M., Su, L.J., Zhang, Z., Joshi, M., Gijon, M.A., Kim, J., Arcardi, J.J., Van Bokhoven, A., Lucia, M.S., La Rosa, F.G., Schlaepfer, I.R., 2017. Lipid catabolism inhibition sensitizes prostate cancer cells to antiandrogen blockade. *Oncotarget* 8, 56051–56065.
- Gao, L., Ye, M., Lu, X., Huang, D., 2017. Hybrid method based on information gain and support vector machine for gene selection in cancer classification. *Dev. Reprod. Biol.* 15, 389–395.
- Grabon, A., Bankaitis, V.A., McDermott, M.I., 2019. The interface between phosphatidylinositol transfer protein function and phosphoinositide signaling in higher eukaryotes. *J. Lipid Res.* 60, 242–268.
- Gurung, R., Tan, A., Ooms, L.M., McGrath, M.J., Huysmans, R.D., Munday, A.D., Prescott, M., Whisstock, J.C., Mitchell, C.A., 2003. Identification of a novel domain in two mammalian inositol polyphosphate 5-phosphatases that mediates membrane ruffle localization. The inositol 5-phosphatase skip localizes to the endoplasmic reticulum and translocates to membrane ruffles following epidermal growth factor stimulation. *J. Biol. Chem.* 278, 11376–11385.
- Hedberg Oldfors, C., Dios, D.G., Linder, A., Visuttijai, K., Samuelson, E., Karlsson, S., Nilsson, S., Behboudi, A., 2015. Analysis of an independent tumor suppressor locus telomeric to *Tp53* suggested *Inpp5k* and *Myo1c* as novel tumor suppressor gene candidates in this region. *BMC Genet.* 16, 80. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0238-4>.
- Hung, C.S., Lin, Y.L., Wu, C.I., Huang, C.J., Ting, L.P., 2009. Suppression of hepatitis B viral gene expression by phosphoinositide 5-phosphatase SKIP. *Cell Microbiol.* 11, 37–50.
- Ijuin, T., Mochizuki, Y., Fukami, K., Funaki, M., Asano, T., Takenawa, T., 2000. Identification and characterization of a novel inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 275, 10870–10875.
- Ijuin, T., Takenawa, T., 2003. SKIP negatively regulates insulin-induced GLUT4 translocation and membrane ruffle formation. *Mol. Cell Biol.* 23, 1209–1220.
- Ijuin, T., Yu, Y.E., Mizutani, K., Pao, A., Tateya, S., Tamori, Y., Bradley, A., Takenawa, T., 2008. Increased insulin action in SKIP heterozygous knockout mice. *Mol. Cell Biol.* 28, 5184–5195.
- Ijuin, T., Takenawa, T., 2012a. Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) 5-phosphatase skeletal muscle- and kidney-enriched inositol polyphosphate phosphatase (SKIP) in myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 287, 31330–31341.
- Ijuin, T., Takenawa, T., 2012b. Regulation of insulin signaling by the phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate phosphatase SKIP through the scaffolding function of Pak1. *Mol. Cell Biol.* 32, 3570–3584.

- Ijuin, T., Hosooka, T., Takenawa, T., 2015a. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate phosphatase SKIP links endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle to insulin resistance. *Mol. Cell Biol.* 36, 108–118.
- Ijuin, T., Takenawa, T., 2015. Improvement of insulin signaling in myoblast cells by an addition of SKIP-binding peptide within Pak1 kinase domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 41–46.
- Ijuin, T., Hatano, N., Hosooka, T., Takenawa, T., 2015c. Regulation of insulin signaling in skeletal muscle by PIP3 phosphatase, SKIP, and endoplasmic reticulum molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 3192–3201.
- Ijuin, T., Hatano, N., Takenawa, T., 2016. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) binds directly to PIP3 phosphatase SKIP and determines its localization. *Gene Cell.* 21, 457–465.
- Jiao, S., Ren, H., Li, Y., Zhou, J., Duan, C., Lu, L., 2013. Differential regulation of IGF-I and IGF-II gene expression in skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 373, 107–113.
- Jones, J., Otu, H., Spentzos, D., Kolia, S., Inan, M., Beecken, W.D., Fellbaum, C., Gu, X., Joseph, M., Pantuck, A.J., Jonas, D., Libermann, T.A., 2005. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clin. Canc. Res.* 11, 5730–5739.
- Liu, G., Zhao, Y., Sun, J.Y., Sun, B.L., 2019. Parkinson's disease risk variant rs1109303 regulates the expression of INPP5K and CRK in human brain. *Neurosci. Bull.* 35, 365–368.
- McCabe, C.V., Codner, G.F., Allan, A.J., Caulder, A., Christou, S., Loeffler, J., Mackenzie, M., Malzer, E., Mianné, J., Pike, F.J., Hutchison, M., Stewart, M.E., Gates, H., Wells, S., Sanderson, N.D., Teboul, L., 2019. Application of Long-Read Sequencing for Robust Identification of Correct Alleles in Genome Edited Animals. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/838193>.
- Nazeri, A., Roostaie, T., Sadaghiani, S., Chakravarty, M.M., Eberly, S., Lang, A.E., Voineskos, A.N., 2015. Genome-wide variant by serum urate interaction in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 78, 731–741.
- Nizon, M., Küry, S., Péron, Y., Besnard, T., Quinquis, D., Boisseau, P., Marsaud, T., Magot, A., Mussini, J.M., Mayrargue, E., Barbarot, S., Béziau, S., Isidor, B., 2018. ARL6IP1 mutation causes congenital insensitivity to pain, acromutilation and spastic paraplegia. *Clin. Genet.* 93, 169–172.
- Novarino, G., Fenstermaker, A.G., Zaki, M.S., Hofee, M., Silhavy, J.L., Heiberg, A.D., Abdelateef, M., Rosti, B., Scott, E., Mansour, L., Masri, A., Kayserili, H., Al-Aama, J.Y., Abdel-Salam, G.M.H., Karminjad, A., Kara, M., Kara, B., Bozorgmehr, B., Ben-Omran, T., Mojahedi, F., El Din Mahmoud, I.G., Boustam, N., Bouhouche, A., Benomar, A., Hanein, S., Raymond, S., Forlani, S., Mascaro, M., Selim, L., Shehata, N., Al-Allawi, N., Bindu, P.S., Azam, M., Gunel, M., Caglayan, A., Bilguvar, K., Tolun, A., Issa, M.Y., Schroth, J., Spencer, E.G., Rosti, R.O., Akizu, N., Vaux, K.K., Johansen, A., Koh, A.A., Megahed, H., Durr, A., Brice, A., Stevanin, G., Gabriel, S.B., Ideker, T., Gleeson, J.G., 2014. Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science* 343, 506–511.
- Osborn, D.P.S., Pond, H.L., Mazaheri, N., Dejardin, J., Munn, C.J., Mushref, K., Cauley, E.S., Moroni, I., Pasanisi, M.B., Sellars, E.A., Hill, R.S., Partlow, J.N., Willaert, R.K., Bharj, J., Alamiri, R.A., Galehdari, H., Shariati, G., Maroofian, R., Mora, M., Swan, L.E., Voit, T., Conti, F.J., Jamshidi, Y., Manzini, M.C., 2017. Mutations in INPP5K cause a form of congenital muscular dystrophy overlapping Marinesco-Sjögren syndrome and dystroglycanopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 100, 537–545.
- Pernot, E., Terryn, S., Cheong, S.C., Markadiou, N., Janas, S., Blockmans, M., Jacoby, M., Pouillon, V., Gayral, S., Rossier, B.C., Beauwens, R., Erneux, C., Devuyst, O., Schurmans, S., 2011. The inositol Inpp5k 5-phosphatase affects osmoregulation through the vasopressin-aquaporin 2 pathway in the collecting system. *Pflügers Archiv* 462, 871–883.
- Rahman, P., Huysmans, R.D., Wiradajaja, F., Gurung, R., Ooms, L.M., Sheffield, D.A., Dyson, J.M., Layton, M.J., Sriratanana, A., Takada, H., Tiganis, T., Mitchell, C.A., 2011. Silencer of death domains (SODD) inhibits skeletal muscle and kidney enriched inositol 5-phosphatase (SKIP) and regulates phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling to the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 286, 29758–29770.
- Rahman, M.R., Islam, T., Zaman, T., Shahjahan, M., Karim, M.R., Huq, F., Quinn, J.M.W., Holsinger, R.M.D., Gov, E., Moni, M.A., 2020. Identification of biomarkers and pathways to identify novel therapeutic targets in Alzheimer's disease: insights from a systems biomedicine perspective. *Genomics* 112, 1290–1299.
- Ramos, A.R., Elong Edimo, W., Erneux, C., 2018. Phosphoinositide 5-phosphatase activities control cell motility in glioblastoma: two phosphoinositides PI(4,5)P2 and PI(3,4)P2 are involved. *Adv. Biol. Regul.* 67, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.bior.2017.09.001>.
- Ramos, A.R., Ghosh, S., Erneux, C., 2019a. The impact of phosphoinositide 5-phosphatases on phosphoinositides in cell function and human disease. *J. Lipid Res.* 60, 276–286.
- Ramos, A.R., Ghosh, S., Dedobbeleer, M., Robe, P.A., Rogister, B., Erneux, C., 2019b. Lipid phosphatases SKIP and SHIP2 regulate fibronectin-dependent cell migration in glioblastoma. *FEBS J.* 286, 1120–1135.
- Ramos, A.R., Ghosh, S., Suhel, T., Chevalier, C., Obeng, E.O., Faflek, B., Krejci, P., Beck, B., Erneux, C., 2020. Phosphoinositide 5-phosphatases SKIP and SHIP2 in ruffles, the endoplasmic reticulum and the nucleus: an update. *Adv. Biol. Regul.* 75, 100660. <https://doi.org/10.1016/j.bior.2019.100660>.
- Ren, H., Yin, P., Duan, C.J., 2008. IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *Cell Biol.* 182, 979–991.
- Rual, J.F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Bertiz, G.F., Gibbons, F.D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D.S., Zhang, L.V., Wong, S.L., Franklin, G., Li, S., Albala, J.S., Lim, J., Fraughton, C., Llamosas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R.S., Vandenhaute, J., Zoghbi, H.Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M.E., Hill, D.E., Roth, F.P., Vidal, M., 2005. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437, 1173–1178.
- Schmid, C., Wise, H.M., Mitchell, C.A., Nussbaum, R., Woscholski, R., 2004. Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation. *FEBS Lett.* 576, 9–13.
- Wiessner, M., Roos, A., Munn, C.J., Viswanathan, R., Whyte, T., Cox, D., Schoser, B., Sewry, C., Roper, H., Phadke, R., Marini Bettolo, C., Barresi, R., Charlton, R., Bönnemann, C.G., Abath Neto, O., Reed, U.C., Zanoteli, E., Araújo Martins Moreno, C., Erd-Wagner, B., Stucka, R., De Goede, C., Borges da Silva, T., Hathazi, D., Dell'Aica, M., Zahedi, R.P., Thiele, S., Müller, J., Kingston, H., Müller, S., Curtis, E., Walter, M.C., Strom, T.M., Straub, V., Bushby, K., Muntoni, F., Swan, L.E., Lochmüller, H., Senderek, J., 2017. Mutations in INPP5K, encoding a phosphoinositide 5-phosphatase, cause congenital muscular dystrophy with cataracts and mild cognitive impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 100, 523–536.
- Wiradajaja, F., Ooms, L.M., Whisstock, J.C., McColl, B., Helfenbaum, L., Sambrook, J.F., Gething, M.J., Mitchell, C.A., 2001. The yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase Inp54p localizes to the endoplasmic reticulum via a C-terminal hydrophobic anchoring tail: regulation of secretion from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 276, 7643–7653.
- Xiong, Q., Deng, C.Y., Chai, J., Jiang, S.W., Xiong, Y.Z., Li, F.E., Zheng, R., 2009. Knockdown of endogenous SKIP gene enhanced insulin-induced glycogen synthesis signaling in differentiating C2C12 myoblasts. *BMB Rep* 42, 119–124.
- Xiong, Q., Chai, J., Zhang, P.P., Wu, J., Jiang, S.W., Zheng, R., Deng, C.Y., 2011. MyoD control of SKIP expression during pig skeletal muscle development. *Mol. Biol. Rep.* 38, 267–274.
- Xiong, Q., Chai, J., Deng, C., Jiang, S., Liu, Y., Huang, T., Suo, X., Zhang, N., Li, X., Yang, Q., Chen, M., Zheng, R., 2012. Characterization of porcine SKIP gene in skeletal muscle development: polymorphisms, association analysis, expression and regulation of cell growth in C2C12 cells. *Meat Sci.* 92, 490–497.
- Yamamoto, Y., Yoshida, A., Miyazaki, N., Iwasaki, K., Sakisaka, T., 2014. ARL6IP1 has the ability to shape the mammalian ER membrane in a reticulon-like fashion. *Biochem. J.* 458, 69–79.
- Yang, Y., Wang, G., Huang, X., Du, Z., 2015. Crystallographic and modelling studies suggest that the SKICH domains from different protein families share a common Ig-like fold but harbour substantial structural variations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33, 1385–1398.
- Yousaf, S., Sheikh, S.A., Riazuddin, S., Waryah, A.M., Ahmed, Z.M., 2018. INPP5K variant causes autosomal recessive congenital cataract in a Pakistani family. *Clin. Genet.* 93, 682–686.
- Zhu, W., Luo, X., Adnan, A., Yu, P., Zhang, S., Huo, Z., Xu, Q., Pang, H., 2018. Association analysis of NUCKS1 and INPP5K polymorphism with Parkinson's disease. *Genes Genet. Syst.* 93, 59–64.
- Zirin, J., Nieuwenhuis, J., Samsonova, A., Tao, R., Perri-mon, N., 2015. Regulators of autophagosome formation in *Drosophila* muscles. *PLoS Genet.* 11, e1005006.

Références

1. Alcàzar-Romàn, A. R. & Wente, S. R. Inositol polyphosphates: A new frontier for regulating gene expression. *Chromosoma* **117**, 1–13 (2008).
2. York, J. D. Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 552–559 (2006).
3. Irvine, R. F. Inositide evolution - towards turtle domination? *J. Physiol.* **566**, 295–300 (2005).
4. Okkenhaug, K., Turner, M. & Gold, M. R. *PI3K signalling*. (2015). doi:10.3389/978-2-88919-419-3
5. Abel, K., A, R. & B, S. metabolism Year 2001 Travelling Fellowships. *J. Cell Sci.* 2207–2208
6. Ju, S., Shaltiel, G., Shamir, A., Agam, G. & Greenberg, M. L. Human 1-D-myo-inositol-3-phosphate synthase is functional in yeast. *J. Biol. Chem.* **279**, 21759–21765 (2004).
7. Kim, J., Han, S. & Kim, H. Phytic acid and myo-inositol support adipocyte differentiation and improve insulin sensitivity in 3 T3-L1 cells. *Nutr. Res.* **34**, (2014).
8. Croze, M. L. & Soulage, C. O. Biochimie Potential role and therapeutic interests of myo - inositol in metabolic diseases. *Biochimie* **95**, 1811–1827 (2013).
9. Holub, B. J. METABOLISM AND FUNCTION OF myo-INOSITOL AND. (1986).
10. Gillasp, G. E. & Perera, I. Y. Biosynthesis and possible functions of inositol pyrophosphates in plants. (2015). doi:10.3389/fpls.2015.00067
11. Blind, R. D. Structural analyses of inositol phosphate second messengers bound to signaling effector proteins. *Adv. Biol. Regul.* **75**, 100667 (2020).
12. Ma, Y. & Lieber, M. R. Binding of Inositol Hexakisphosphate (IP6) to Ku but Not to DNA-PKc. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.C200030200
13. Steger, D. J., Haswell, E. S., Miller, A. L., Wente, S. R. & Erin, K. Regulation of Chromatin Remodeling by Inositol Polyphosphates. **299**, 114–116 (2006).
14. Alcazar-Roman, A., Tran, E., Guo, S. & Wente, S. Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nat. Cell Biol.* **8**, 711–716 (2006).
15. J. KEVIN FOSKETT, CARL WHITE, KING-HO CHEUNG, A. D.-O. D. M. Inositol Trisphosphate Receptor Ca²⁺ Release Channels. 593–658 (2007). doi:10.1152/physrev.00035.2006.
16. Mangino, G., Mise-omata, S. & Acuto, O. CD28 as a Molecular Amplifier Extending TCR Ligation and Signaling Capabilities. **15**, 935–945 (2001).
17. Sugawara, H., Kurosaki, M., Takata, M. & Kurosaki, T. Genetic evidence for involvement of type 1 , type 2 and type 3 inositol 1 , 4 , 5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. **16**, 3078–3088 (1997).
18. Clark, J., Anderson, K. E., Juvin, V. & Smith, T. S. Quantification of PtdInsP 3 molecular species in cells and tissues by mass spectrometry. *Nat Methods* **8**, 267–272 (2011).
19. Simonsen, A., Wurmser, A. E., Emr, S. D. & Stenmark, H. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 485–492 (2001).
20. Marcus, A. J., Ullman, H. L. & Safier, L. B. Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *J. Lipid Res.* **10**, 108–114 (1969).
21. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657 (2006).

22. De Craene, J. O., Bertazzi, D. L., Bär, S. & Friant, S. Phosphoinositides, major actors in membrane trafficking and lipid signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
23. Kielkowska, A. *et al.* A new approach to measuring phosphoinositides in cells by mass spectrometry Advances in Biological Regulation A new approach to measuring phosphoinositides in cells by mass spectrometry q. *Adv. Biol. Regul.* (2013). doi:10.1016/j.jbior.2013.09.001
24. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657 (2006).
25. Ooms, L. M. *et al.* The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem J* **419**, 29–49 (2009).
26. Jost, M., Simpson, F., Kavran, J. M., Lemmon, M. A. & Schmid, S. L. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr. Biol.* **8**, 1399–1404 (1998).
27. Limon, J. J. & Fruman, D. A. Akt and mTOR in B cell activation and differentiation. *Front. Immunol.* **3**, 1–12 (2012).
28. Idevall-Hagren, O. & De Camilli, P. Detection and manipulation of phosphoinositides. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 736–745 (2015).
29. Bunce, M. W., Bergendahl, K. & Anderson, R. A. Nuclear PI(4,5)P₂: A new place for an old signal. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 560–569 (2006).
30. Wang, J. *et al.* Growth of B Cell Receptor Microclusters Is Regulated by PIP₂ and PIP₃ Equilibrium and Dock2 Recruitment and Activation. *Cell Rep.* **21**, 2541–2557 (2017).
31. Tuosto, L., Capuano, C., Muscolini, M., Santoni, A. & Galandrini, R. The multifaceted role of PIP₂ in leukocyte biology. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 4461–4474 (2015).
32. Ishihara, H. *et al.* Type I Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinases CLONING OF THE THIRD ISOFORM AND DELETION / SUBSTITUTION ANALYSIS OF MEMBERS OF THIS. **273**, 8741–8748 (1998).
33. Tuosto, L., Capuano, C., Muscolini, M., Santoni, A. & Galandrini, R. The multifaceted role of PIP₂ in leukocyte biology. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 4461–4474 (2015).
34. Katan, M. & Shamshad, C. Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate: diverse functions at the plasma membrane. **0**, 1–19 (2020).
35. Antonescu, C. N., Aguet, F., Danuser, G. & Schmid, S. L. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2588–2600 (2011).
36. Liu, J., Sun, Y., Drubin, D. G. & Oster, G. F. The mechanochemistry of endocytosis. *PLoS Biol.* **7**, (2009).
37. Gad, H. *et al.* Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron* **27**, 301–312 (2000).
38. Yonezawa, N., Nishida, E., Iida, K., Yahara, I. & Sakai, H. Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **265**, 8382–8386 (1990).
39. Mao, Y. S. & Yin, H. L. Regulation of the actin cytoskeleton by phosphatidylinositol 4-phosphate 5 kinases. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **455**, 5–18 (2007).

40. Racz, B. & Weinberg, R. J. Spatial organization of cofilin in dendritic spines. *Neuroscience* **138**, 447–456 (2006).
41. Wu, Z. *et al.* PIPKI γ Regulates Focal Adhesion Dynamics and Colon Cancer Cell Invasion. **6**, (2011).
42. Hille, B., Dickson, E. J., Kruse, M., Vivas, O. & Suh, B. Phosphoinositides regulate ion channels. **1851**, 844–856 (2015).
43. Eric Senning, Marcus Collins, Anastasiia, Carmen, Ufret-Vicenty, and S. G. Regulation of TRPV1 Ion Channel by Phosphoinositide. **289**, 10999–11006 (2014).
44. Rando, O. J., Zhao, K., Janmey, P. & Crabtree, G. R. Phosphatidylinositol-dependent actin filament binding by the SWI/SNF-like BAF chromatin remodeling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2824–2829 (2002).
45. Shilatifard, A. Transcriptional elongation control by RNA polymerase II: a new frontier. *Biochim. Biophys. Acta* **1677**, 79–86 (2004).
46. Watt, S. A., Kular, G., Fleming, I. N., Downes, C. P. & Lucocq, J. M. Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C δ 1. *Biochem. J.* **363**, 657–66 (2002).
47. Shah, Z. H. *et al.* Nuclear phosphoinositides and their impact on nuclear functions. *FEBS J.* **280**, 6295–6310 (2013).
48. Ramadani, F. *et al.* The PI3K Isoforms p110 α and p110 δ are Essential for Pre-B Cell Receptor Signaling and B Cell Development. **3**, 1–25 (2013).
49. Ana V. Miletic, Amy N. Anzelon-Mills, David M. Mills, S. A. O., Irene M. Pedersen, Dong-Mi Shin, Jeffrey V. Ravetch, S. B. & Herbert C. Morse, 4 and Robert C. Rickert1. Coordinate suppression of B cell lymphoma by PTEN and SHIP phosphatases. **207**, 2407–2420 (2010).
50. Vivanco, I. & Sawyers, C. L. THE PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE–AKT PATHWAY IN HUMAN CANCER. (2014). doi:10.1038/nrc839
51. Isharat Yusuf, Xiaocui Zhu, Michael G. Kharas, J. C. and D. A. F. Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase-dependent inactivation of FOXO transcription factors Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase – dependent inactivation of FOXO transcription factors. (2004). doi:10.1182/blood-2003-09-3071
52. Milne, C. D. & Paige, C. J. IL-7: A key regulator of B lymphopoiesis. *Semin. Immunol.* **18**, 20–30 (2006).
53. Clark, M. R., Mandal, M., Ochiai, K. & Singh, H. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 69–80 (2014).
54. Aiba, Y., Kameyama, M., Yamazaki, T., Tedder, T. F. & Kurosaki, T. Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase. **111**, 1497–1503 (2008).
55. Herzog, S., Reth, M. & Jumaa, H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 195–205 (2009).
56. Calamito, M. *et al.* Akt1 and Akt2 promote peripheral B-cell maturation and survival. *Blood* **115**, 4043–4050 (2010).
57. Calleja, V. *et al.* Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its

- activation in vivo. *PLoS Biol.* **5**, 780–791 (2007).
58. Bayascas, J. R. & Alessi, D. R. Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol. Cell* **18**, 143–145 (2005).
 59. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
 60. Dengler, H. S. *et al.* Distinct roles for Foxo1 at multiple stages of B cell differentiation. *Nat Immunol.* **9**, 1388–1398 (2008).
 61. Lin, Y. C. *et al.* A global network of transcription factors, involving E2A, EBF1 and Foxo1, that orchestrates B cell fate. *Nat. Immunol.* **11**, 635–643 (2010).
 62. Amin, R. H. & Schlissel, M. S. Foxo1 directly regulates the transcription of recombination-activating genes during B cell development. *Nat. Immunol.* **9**, 613–622 (2008).
 63. Wang, Z. & Cole, P. A. Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases. *Methods Enzymol.* **548**, 1–21 (2014).
 64. Fine, E. *et al.* Dietary Carbohydrate restriction as the first approach in diabetes management . Critical review and evidence base Dietary carbohydrate restriction as the first approach in diabetes management : Critical review and evidence base. (2014). doi:10.1016/j.nut.2014.06.011
 65. Facchinetti, V. *et al.* The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* **27**, 1932–1943 (2008).
 66. Benjamin, D., Schmidlin, M., Min, L., Gross, B. & Moroni, C. BRF1 protein turnover and mRNA decay activity are regulated by protein kinase B at the same phosphorylation sites. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 9497–507 (2006).
 67. Li, J. *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science (80-.).* **275**, 1943–1947 (1997).
 68. Pulido, R. PTEN: A yin-yang master regulator protein in health and disease. *Methods* **77–78**, 3–10 (2015).
 69. Getahun, A., Cambier, J. C. & Yarkoni, Y. Molecular underpinning of B-cell anergy. *Immunol. Rev.* **237**, 249–263 (2010).
 70. Shojaee, S. *et al.* PTEN opposes negative selection and enables oncogenic transformation of pre-B cells. **22**, (2016).
 71. Suzuki, A. *et al.* Critical Roles of Pten in B Cell Homeostasis and Immunoglobulin Class Switch Recombination. *J. Exp. Med.* **197**, 657–667 (2003).
 72. Wu, X. N. *et al.* Defective PTEN regulation contributes to B cell hyperresponsiveness in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **6**, (2014).
 73. Luo, W. *et al.* The AKT kinase signaling network is rewired by PTEN to control proximal BCR signaling in germinal center B cells. *Nat. Immunol.* **20**, (2019).
 74. Setz, C. S. *et al.* Pten controls B-cell responsiveness and germinal center reaction by regulating the expression of IgD BCR. 1–17 (2019). doi:10.15252/embj.2018100249
 75. Astle, M. V, Horan, K. a, Ooms, L. M. & Mitchell, C. a. The inositol polyphosphate 5-phosphatases: traffic controllers, waistline watchers and tumour suppressors? *Biochem. Soc. Symp.* **181**, 161–81 (2007).

76. Whisstock, J. C. *et al.* The inositol polyphosphate 5-phosphatases and the apurinic/apyrimidinic base excision repair endonucleases share a common mechanism for catalysis. *J. Biol. Chem.* **275**, 37055–37061 (2000).
77. Ramos, A. R., Ghosh, S. & Erneux, C. The impact of phosphoinositide 5-phosphatases on phosphoinositides in cell function and human disease. **60**, (2019).
78. Areschoug, T., Linse, S., Stålhammar-Carlemalm, M., Hedén, L. O. & Lindahl, G. A proline-rich region with a highly periodic sequence in streptococcal β protein adopts the polyproline II structure and is exposed on the bacterial surface. *J. Bacteriol.* **184**, 6376–6383 (2002).
79. Waksman, G., Shoelson, S. E., Pant, N., Cowburn, D. & Kuriyan, J. Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: Crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell* **72**, 779–790 (1993).
80. Peck, J., Douglas, G., Wu, C. H. & Burbelo, P. D. Human RhoGAP domain-containing proteins : structure , function and evolutionary relationships. **528**, 27–34 (2002).
81. Schou, K. B., Morthorst, S. K., Christensen, S. T. & Pedersen, L. B. Identification of conserved, centrosome-targeting ASH domains in TRAPP II complex subunits and TRAPPC8. *Cilia* **3**, 6 (2014).
82. Gao, J., Liao, J. & Yang, G. Y. CAAX-box protein, prenylation process and carcinogenesis. *Am. J. Transl. Res.* **1**, 312–325 (2009).
83. Sayou, C. *et al.* A SAM oligomerization domain shapes the genomic binding landscape of the LEAFY transcription factor. (2016). doi:10.1038/pj.2016.37
84. Gurung, R. *et al.* Identification of a novel domain in two mammalian inositol-polyphosphate 5-phosphatases that mediates membrane ruffle localization: The inositol 5-phosphatase SKIP localizes to the endoplasmic reticulum and translocates to membrane ruffles following epide. *J. Biol. Chem.* **278**, 11376–11385 (2003).
85. Trésaugues, L. *et al.* Structural basis for phosphoinositide substrate recognition, catalysis, and membrane interactions in human inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Structure* **22**, 744–755 (2014).
86. Mills, S. J., Silvander, C., Cozier, G. & Tre, L. Crystal Structures of Type-II Inositol Polyphosphate 5 - Phosphatase INPP5B with Synthetic Inositol Polyphosphate Surrogates Reveal New Mechanistic Insights for the Inositol 5 - Phosphatase Family. (2016). doi:10.1021/acs.biochem.5b00838
87. Bielas, S. L. *et al.* Mutations in the inositol polyphosphate-5-phosphatase E gene link phosphatidyl inositol signaling to the ciliopathies. **41**, 1032–1036 (2010).
88. Billcliff, P. G. & Lowe, M. Inositol lipid phosphatases in membrane trafficking and human disease. *Biochem. J.* **461**, 159–75 (2014).
89. Mitchell, C. A. *et al.* Inositol Polyphosphate 5-Phosphatases: Lipid Phosphatases With Flair. *IUBMB Life (International Union Biochem. Mol. Biol. Life)* **53**, 25–36 (2002).
90. Mitchell CA, Gurung R, Kong AM, Dyson JM, Tan A, O. L. Inositol polyphosphate 5-phosphatases: lipid phosphatases with flair. *IUBMB Life* **53**, 25–36 (2002).
91. Pedersen, I. M. *et al.* Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNF α -dependent growth of B cell lymphomas. 288–295 (2009). doi:10.1002/emmm.200900028
92. Erneux, C., Govaerts, C., Communi, D. & Pesesse, X. The diversity and possible functions of the

- inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1436**, 185–199 (1998).
93. Singh, S. P. *et al.* Cell lines generated from a chronic lymphocytic leukemia mouse model exhibit constitutive Btk and Akt signaling. *Oncotarget* **8**, 71981–71995 (2017).
 94. Singh, S. P. *et al.* Overexpression of SH2-Containing Inositol Phosphatase Contributes to Chronic Lymphocytic Leukemia Survival. (2019). doi:10.4049/jimmunol.1900153
 95. Ijuin, T. *et al.* Identification and characterization of a novel inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J. Biol. Chem.* **275**, 10870–10875 (2000).
 96. Pernot, E. *et al.* The inositol Inpp5k 5-phosphatase affects osmoregulation through the vasopressin-aquaporin 2 pathway in the collecting system. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **462**, 871–883 (2011).
 97. Schmid, A. C., Wise, H. M., Mitchell, C. A., Nussbaum, R. & Woscholski, R. Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation. *FEBS Lett.* **576**, 9–13 (2004).
 98. Rahman, P. *et al.* Silencer of death domains (SODD) inhibits skeletal muscle and kidney enriched inositol 5-phosphatase (SKIP) and regulates phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling to the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **286**, 29758–29770 (2011).
 99. Ijuin, T., Hatano, N., Hosooka, T. & Takenawa, T. Regulation of insulin signaling in skeletal muscle by PIP3 phosphatase, SKIP, and endoplasmic reticulum molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 3192–3201 (2015).
 100. Dong, R. *et al.* The inositol 5-phosphatase INPP5K participates in the fine control of ER organization. *J. Cell Biol.* **217**, 3577–3592 (2018).
 101. Yang, Y., Wang, G., Huang, X. & Du, Z. Expression, purification and crystallization of the SKICH domain of human TAX1BP1. *Acta Crystallogr. Sect. F Structural Biol. Commun.* **70**, 619–623 (2014).
 102. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195–201 (2006).
 103. Takeshi Ijuin, Tetsuya Hosooka, T. T. Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Phosphatase SKIP Links Endoplasmic Reticulum Stress in Skeletal Muscle to Insulin Resistance. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 108–118 (2016).
 104. Hung, C. S., Lin, Y. L., Wu, C. I., Huang, C. J. & Ting, L. P. Suppression of hepatitis B viral gene expression by phosphoinositide 5-phosphatase SKIP. *Cell. Microbiol.* **11**, 37–50 (2009).
 105. Ijuin, T., Hatano, N. & Takenawa, T. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) binds directly to PIP₃ phosphatase SKIP and determines its localization. *Genes to Cells* **78**, n/a-n/a (2016).
 106. Ijuin, T., Hosooka, T. & Takenawa, T. A PIP₃ phosphatase SKIP links endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle to insulin resistance. *Mol. Cell. Biol.* MCB.00921-15 (2015). doi:10.1128/MCB.00921-15
 107. Ijuin, T. & Takenawa, T. Regulation of Insulin Signaling by the Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate Phosphatase SKIP through the Scaffolding Function of Pak1. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3570–3584 (2012).
 108. Ijuin, T. & Takenawa, T. SKIP Negatively Regulates Insulin-Induced GLUT4 Translocation and Membrane Ruffle Formation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1209–1220 (2003).

109. Ijuin, T. *et al.* Increased insulin action in SKIP heterozygous knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5184–95 (2008).
110. Yamanaka, R. *et al.* Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients. *Oncogene* **25**, 5994–6002 (2006).
111. Davies, E. M. *et al.* Differential SKIP expression in PTEN-deficient glioblastoma regulates cellular proliferation and migration. *Oncogene* **0**, 1–17 (2014).
112. Xiong, Q. *et al.* MyoD control of SKIP expression during pig skeletal muscle development. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 267–274 (2011).
113. Ijuin, T. & Takenawa, T. Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) 5-phosphatase skeletal muscle- and kidney-enriched inositol polyphosphate phosphatase (SKIP) in myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **287**, 31330–31341 (2012).
114. Ren, H., Yin, P. & Duan, C. IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *J. Cell Biol.* **182**, 979–991 (2008).
115. Prince, S. N., Foulstone, E. J., Zaccheo, O. J., Williams, C. & Hassan, A. B. Functional evaluation of novel soluble insulin-like growth factor (IGF)-II-specific ligand traps based on modified domain 11 of the human IGF2 receptor. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 607–17 (2007).
116. Yamamoto, Y., Yoshida, A., Miyazaki, N., Iwasaki, K. & Sakisaka, T. Arl6IP1 has the ability to shape the mammalian ER membrane in a reticulon-like fashion. **79**, 69–79 (2014).
117. Osborn, D. P. S. *et al.* Mutations in INPP5K Cause a Form of Congenital Muscular Dystrophy Overlapping Marinesco-Sjögren Syndrome and Dystroglycanopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **100**, 537–545 (2017).
118. Yousaf, S., Sheikh, S. A., Riazuddin, S., Waryah, A. M. & Ahmed, Z. M. INPP5K variant causes autosomal recessive congenital cataract in a Pakistani family. *Clin. Genet.* **93**, 682–686 (2018).
119. Wiessner, M. *et al.* Mutations in INPP5K, Encoding a Phosphoinositide 5-Phosphatase, Cause Congenital Muscular Dystrophy with Cataracts and Mild Cognitive Impairment. *Am. J. Hum. Genet.* **100**, 523–536 (2017).
120. Mcgrath, M. J., Mclean, C. A. & Mitchell, C. A. Defective lysosome reformation during autophagy causes skeletal muscle disease. (2020).
121. Cornelis, R. S. *et al.* Evidence for a gene on 17p13.3, distal to TP53, as a target for allele loss in breast tumors without p53 mutations. *Cancer Res.* **54**, 4200–4206 (1994).
122. Hedberg Oldfors, C. *et al.* Analysis of an independent tumor suppressor locus telomeric to Tp53 suggested Inpp5k and Myo1c as novel tumor suppressor gene candidates in this region. *BMC Genet.* **16**, 1–13 (2015).
123. Nazeri, A. *et al.* Genome-wide variant by serum urate interaction in Parkinson’s disease. *Ann. Neurol.* **78**, 731–741 (2015).
124. Morrison, S. J. & Spradling, A. C. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell* **132**, 598–611 (2008).
125. Shafat, M. S., Gnaneswaran, B., Bowles, K. M. & Rushworth, S. A. The bone marrow microenvironment – Home of the leukemic blasts. *Blood Rev.* **31**, 277–286 (2017).
126. Morrison, S. J. & Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327–334 (2014).

127. Zon, L. I. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature* **453**, 306–313 (2008).
128. Muller-Sieburg, C. E., Sieburg, H. B., Bernitz, J. M. & Cattarossi, G. Stem cell heterogeneity: Implications for aging and regenerative medicine. *Blood* **119**, 3900–3907 (2012).
129. Yamamoto, R. *et al.* Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* **154**, 1112–1126 (2013).
130. Adolfsson, J. *et al.* Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: A revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295–306 (2005).
131. Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661–672 (1997).
132. Inlay, M. A. *et al.* Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. *Genes Dev.* **23**, 2376–2381 (2009).
133. Aurrand-Lions, M. & Mancini, S. J. C. Murine bone marrow niches from hematopoietic stem cells to B cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–18 (2018).
134. Richard R. Hardy, C. E. C. Resolution and Characterization of Pro-B and Pre-Pro-B Cell Stages in Normal Mouse Bone Marrow. *J. Exp. Med.* **173**, (1991).
135. Ma, Q. *et al.* Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 9448–9453 (1998).
136. Busslinger, M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 55–79 (2004).
137. Hirokawa, S., Sato, H., Kato, I. & Kudo, A. EBF-regulating Pax5 transcription is enhanced by STAT5 in the early stage of B cells. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1824–1829 (2003).
138. O’Riordan, M. & Grosschedl, R. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* **11**, 21–31 (1999).
139. Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G. & Busslinger, M. Commitment to the [B-lymphoid] lineage depends on the [TF-Pax 5]. *J. Immunol.* **195**, 766–772 (1999).
140. Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M. & Busslinger, M. Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* **17**, 781–793 (2002).
141. McManus, S. *et al.* The transcription factor Pax5 regulates its target genes by recruiting chromatin-modifying proteins in committed B cells. *EMBO J.* **30**, 2388–2404 (2011).
142. Nutt, S. L., Morrison, A. M., Dörfler, P., Rolink, A. & Busslinger, M. Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO J.* **17**, 2319–2333 (1998).
143. Hesslein, D. G. T. *et al.* Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5’ IgH V gene segments. *Genes Dev.* **17**, 37–42 (2003).
144. Samitas, K., Lötvall, J. & Bossios, A. B Cells: From early development to regulating allergic diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* **58**, 209–225 (2010).
145. Chowdhury, D. & Sen, R. Transient IL-7 / IL-7R Signaling Provides a Mechanism for Feedback Inhibition of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangements. **18**, 229–241 (2003).

146. Ebert, A. *et al.* Article The Distal V H Gene Cluster of the Igh Locus Contains Distinct Regulatory Elements with Pax5 Transcription Factor-Dependent Activity in Pro-B Cells. *Immunity* **34**, 175–187 (2011).
147. Cooper, A. B. *et al.* A unique function for cyclin D3 in early B cell development. **7**, 489–497 (2006).
148. Lin, W. & Desiderio, S. Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein RAG-2. **91**, 2733–2737 (1994).
149. Bankovich, A. J., Davis, M. M. & Garcia, K. C. Structural Insight into Pre-B Cell Receptor Function. **291**, (2012).
150. Karasuyama, B. H. & Melchers, F. The Proteins Encoded by the VpreB and X5 Pre-B Cell-specific Genes Can Associate with Each Other and with IA Heavy Chain. **172**, (1990).
151. Verkoczy, L. *et al.* Basal B Cell Receptor-Directed Phosphatidylinositol 3-Kinase Selection 1. (2015). doi:10.4049/jimmunol.178.10.6332
152. Johnson, K., Hashimshony, T., Sawai, C. M., Pongubala, J. M. R. & Skok, J. A. Regulation of Immunoglobulin Light-Chain Recombination by the Transcription Factor IRF-4 and the Attenuation of Interleukin-7 Signaling. *Immunity* **5**, 335–345 (2008).
153. Lu, R., Medina, K. L. & Lancki, D. W. IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development Runqng. *Genes Dev.* 1703–1708 (2003). doi:10.1101/gad.1104803.GENES
154. Sun, A. *et al.* V H replacement in primary immunoglobulin repertoire diversification. (2015). doi:10.1073/pnas.1418001112
155. Kumar, R. *et al.* Antibody repertoire diversification through VH gene replacement in mice cloned from an IgA plasma cell. (2014). doi:10.1073/pnas.1417988112
156. Kelsoe, G. Heavy-chain receptor editing unbound. **112**, 2297–2298 (2015).
157. Freedden-jeffrey, B. U. *et al.* Lymphopenia in Interleukin (IL)-7 Gene-deleted Mice Identifies IL-7 as a Nonredundant Cytokine. **181**, (1995).
158. Peschon, B. J. J. *et al.* Early Lymphocyte Expansion Is Severely Impaired in Interleukin 7 Receptor-deficient Mice. **180**, 6–11 (1994).
159. Zehentmeier, S. & Pereira, J. P. Cell circuits and niches controlling B cell development. *Immunol. Rev.* **289**, 142–157 (2019).
160. Mcelroy, C. A. *et al.* Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. **109**, (2012).
161. Tamarit, B. *et al.* Membrane Microdomains and Cytoskeleton Organization Shape and Regulate the IL-7 Receptor Signalingosome in Human. **288**, 8691–8701 (2013).
162. Ceredig, R. & Rolink, A. G. The key role of IL-7 in lymphopoiesis. *Semin. Immunol.* **24**, 159–164 (2012).
163. Corfe, S. A. & Paige, C. J. The many roles of IL-7 in B cell development; Mediator of survival, proliferation and differentiation. *Semin. Immunol.* **24**, 198–208 (2012).
164. Goetz, C. A., Harmon, I. R., O’Neil, J. J., Burchill, M. A. & Farrar, M. A. STAT5 Activation Underlies IL7 Receptor-Dependent B Cell Development. *J. Immunol.* **172**, 4770–4778 (2004).

165. Yasuda, T. *et al.* Erk Kinases Link Pre-B Cell Receptor Signaling to Transcriptional Events Required for Early B Cell Expansion. *Immunity* **28**, 499–508 (2008).
166. Ochiai, K. *et al.* A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nat. Immunol.* **13**, 300–307 (2012).
167. Walker, S. R., Nelson, E. A. & Frank, D. A. STAT5 represses BCL6 expression by binding to a regulatory region frequently mutated in lymphomas. *Oncogene* **26**, 224–233 (2007).
168. Bouchard, C. *et al.* Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J.* **18**, 5321–5333 (1999).
169. Jiang, Q. *et al.* Distinct Regions of the Interleukin-7 Receptor Regulate Different Bcl2 Family Members. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6501–6513 (2004).
170. Malin, S. *et al.* Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. *Nat. Immunol.* **11**, 171–179 (2010).
171. Essafi, A. *et al.* Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. *Oncogene* **24**, 2317–2329 (2005).
172. Baracho, G. V. *et al.* PDK1 regulates B cell differentiation and homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9573–9578 (2014).
173. Johnson, K. *et al.* IL-7 Functionally Segregates the Pro-B Cell Stage by Regulating Transcription of Recombination Mediators across Cell Cycle. *J. Immunol.* **188**, 6084–6092 (2012).
174. Hewitt, S. L. *et al.* RAG1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat. Immunol.* **10**, 655–664 (2009).
175. Zhuang, Y., Soriano, P. & Weintraub, H. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* **79**, 875–884 (1994).
176. Zhuang, Y., Jackson, A., Pan, L., Shen, K. & Dai, M. Regulation of E2A gene expression in B-lymphocyte development. *Mol. Immunol.* **40**, 1165–1177 (2004).
177. Bain, G. *et al.* E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* **79**, 885–892 (1994).
178. Smith, E. M. K., Gisler, R. & Sigvardsson, M. Cloning and Characterization of a Promoter Flanking the Early B Cell Factor (EBF) Gene Indicates Roles for E-Proteins and Autoregulation in the Control of EBF Expression. *J. Immunol.* **169**, 261–270 (2002).
179. Vaidya, H. J., Briones Leon, A. & Blackburn, C. C. FOXP1 in thymus organogenesis and development. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1826–1837 (2016).
180. Roessler, S. *et al.* Distinct Promoters Mediate the Regulation of Ebf1 Gene Expression by Interleukin-7 and Pax5. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 579–594 (2007).
181. Kikuchi, K., Kasai, H., Watanabe, A., Lai, A. Y. & Kondo, M. IL-7 Specifies B Cell Fate at the Common Lymphoid Progenitor to Pre-ProB Transition Stage by Maintaining Early B Cell Factor Expression. *J. Immunol.* **181**, 383–392 (2008).
182. Fuxa, M. & Busslinger, M. Reporter Gene Insertions Reveal a Strictly B Lymphoid-Specific Expression Pattern of Pax5 in Support of Its B Cell Identity Function. *J. Immunol.* **178**, 3031–3037 (2007).
183. Schaniel, C., Gottar, M., Roosnek, E., Melchers, F. & Rolink, A. G. Extensive in vivo self-renewal, long-term reconstitution capacity, and hematopoietic multipotency of Pax5-deficient

- precursor B-cell clones. *Blood* **99**, 2760–2766 (2002).
184. Pridans, C. *et al.* Identification of Pax5 Target Genes in Early B Cell Differentiation. *J. Immunol.* **180**, 1719–1728 (2008).
 185. Emelyanov, A. V., Kovac, C. R., Sepulveda, M. A. & Birshtein, B. K. The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 11156–11164 (2002).
 186. Sciammas, R. *et al.* Graded Expression of Interferon Regulatory Factor-4 Coordinates Isotype Switching with Plasma Cell Differentiation. *Immunity* **25**, 225–236 (2006).
 187. Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T. C. & Calame, K. Blimp-1-Dependent Repression of Pax-5 Is Required for Differentiation of B Cells to Immunoglobulin M-Secreting Plasma Cells. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4771–4780 (2002).
 188. Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A. & Busslinger, M. Pax5: The guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* **8**, 463–470 (2007).
 189. Somasundaram, R., Prasad, M. A. J., Ungerback, J. & Sigvardsson, M. Transcription factor networks in B-cell differentiation link development to acute lymphoid leukemia. *Blood* **126**, 144–152 (2015).
 190. Loghavi, S., Kutok, J. L. & Jorgensen, J. L. B-acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **144**, 393–410 (2015).
 191. Woo, J. S., Alberti, M. O. & Tirado, C. A. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: A genetic update. *Exp. Hematol. Oncol.* **3**, (2014).
 192. Kharas, M. G. & Fruman, D. A. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: Mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res.* **65**, 2047–2053 (2005).
 193. Ilaria, R. L. & Van Etten, R. A. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J. Biol. Chem.* **271**, 31704–31710 (1996).
 194. Carlesso, N., Frank, D. A. & Griffin, J. D. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J. Exp. Med.* **183**, 811–820 (1996).
 195. Heltemes-Harris, L. M. *et al.* Ebf1 or Pax5 haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* **208**, 1135–1149 (2011).
 196. Barata, J. T., Durum, S. K. & Seddon, B. Flip the coin : IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nat. Immunol.* **20**, (2019).
 197. Cotres, M., Wong, E., Koipally, J. & Georgopoulos, K. Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 167–171 (1999).
 198. Nutt, S. L., Urbánek, P., Relink, A. & Busslinger, M. Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: Difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev.* **11**, 476–491 (1997).
 199. Patton, D. T., Plumb, A. W. & Abraham, N. The Survival and Differentiation of Pro-B and Pre-B Cells in the Bone Marrow Is Dependent on IL-7R α Tyr 449. *J. Immunol.* **193**, 3446–3455 (2014).
 200. Pelanda, R. & Torres, R. M. Central B-Cell tolerance: Where selection begins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–16 (2012).

201. Ijuin, T., Hatano, N. & Takenawa, T. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) binds directly to PIP 3 phosphatase SKIP and determines its localization. *Genes to Cells* **21**, 457–465 (2016).
202. Tamarit, B. *et al.* Membrane microdomains and cytoskeleton organization shape and regulate the IL-7 receptor signalosome in human CD4 T-cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 8691–8701 (2013).
203. Mcelroy, C. a, Dohm, J. a & Walsh, S. T. R. Structural and Biophysical Studies of the Human IL-7/IL-7R α Complex. *Cancer* **17**, 54–65 (2010).
204. Liu, G. J. *et al.* Pax5 loss imposes a reversible differentiation block in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev.* **28**, 1337–1350 (2014).
205. Shah, S. *et al.* A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **45**, 1226–1231 (2013).
206. Martín-Lorenzo, A. *et al.* Infection exposure is a causal factor in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia as a result of Pax5-inherited susceptibility. *Cancer Discov.* **5**, 1328–1343 (2015).
207. Katerndahl, C. D. S. *et al.* Antagonism of B cell enhancer networks by STAT5 drives leukemia and poor patient survival. *Nat. Immunol.* **18**, 694–704 (2017).
208. Dang, J. *et al.* PAX5 is a tumor suppressor in mouse mutagenesis models of acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **125**, 3609–3617 (2015).

