

Le contrôle et l'utilisation des gènes des protéines du lait

Louis-Marie Houdebine

L'expression des gènes des protéines du lait est contrôlée par plusieurs facteurs dont la prolactine, les glucocorticoïdes, l'insuline, la progestérone, l'EGF et la matrice extracellulaire. La prolactine est l'inducteur essentiel. Elle dimérise son récepteur qui active la tyrosine kinase JAK2. Le facteur cytoplasmique Stat5 est alors phosphorylé, dimérisé et transféré au noyau où il reconnaît une séquence d'ADN présente dans le promoteur de tous les gènes des protéines essentielles du lait. Le complexe glucocorticoïde-récepteur stimule ces gènes en se liant directement aux séquences consensus GRE dans la région promotrice mais aussi en s'associant au facteur Stat5 activé. Les glucocorticoïdes ralentissent la déphosphorylation du facteur Stat5. Les facteurs C/EBP jouent un rôle majeur dans la croissance et la différenciation des cellules épithéliales mammaires. Le facteur de transcription CBP/P300 est un co-activateur qui ne se lie pas directement au promoteur des gènes des protéines du lait mais s'associe aux facteurs Stat5, C/EBP ainsi qu'au récepteur des glucocorticoïdes. La matrice extracellulaire participe également au contrôle des gènes des protéines du lait en inhibant une tyrosine phosphatase qui déphosphoryle le facteur Stat5. Les promoteurs de plusieurs gènes des protéines du lait sont utilisés pour exprimer des gènes étrangers codant pour des protéines d'intérêt pharmaceutique dans la glande mammaire d'animaux domestiques.

ADRESSE

L.M. Houdebine: Unité de biologie cellulaire et moléculaire, Inra, Domaine Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

m/s n° 2, vol. 16, février 2000

La lactation est une des dernières fonctions biologiques mise en place lors de l'évolution. En effet, la glande mammaire est le dernier organe apparu chez les vertébrés et caracté-

rise la classe des mammifères. La lactation offre au nouveau-né une certaine indépendance vis-à-vis du milieu ambiant. La mère transforme, en effet, les éléments nutritifs en lait et, au besoin, puise dans ses propres

réserves corporelles. L'ébauche de la glande mammaire se forme au cours de la vie foetale. Les cellules mammaires ont la même origine embryologique que la peau. Au cours de la vie foetale, elles s'organisent en un réseau de canaux reliés aux tétons. La croissance des canaux reste très limitée jusqu'à la puberté. Sous l'influence des hormones sexuelles, le réseau de canaux devient plus dense et ceux-ci se terminent par des bourgeons qui contiennent les cellules précurseurs des cellules épithéliales sécrétrices. La croissance de la glande mammaire a lieu pour l'essentiel pendant la gestation et non pendant la vie foetale comme cela est le cas pour la plupart des organes. Sous l'influence durable des œstrogènes, de la progestérone, de la prolactine, des glucocorticoïdes, de l'hormone de croissance et d'une série de facteurs de croissance produits localement, les cellules épithéliales s'accumulent au cours de la gestation et s'organisent en alvéoles. Chacune de ces alvéoles est ouverte sur un canal sécrèteur. Après la parturition, les cellules épithéliales synthétisent les éléments du lait (protéines, lipides, lactose...) qui sont sécrétés dans la lumière des alvéoles avant d'être excrétés par le réseau de canaux qui converge vers le tétou. Le contrôle du développement de la glande mammaire et de la lactation est assuré par les hormones impliquées dans la régulation de la gestation chez la plupart des autres espèces. Pendant la gestation, les stéroïdes ovariens favorisent ainsi la croissance mammaire tout en s'opposant à l'induction de la sécrétion lactée. Après la parturition, la sécrétion lactée est déclenchée par la chute de progestérone qui inhibe la sécrétion de la prolactine par l'hypophyse et la synthèse de lait par les cellules épithéliales. La prolactine joue un rôle essentiel pour la croissance mammaire ainsi que pour l'induction et le maintien de la sécrétion lactée. La prolactine est une des principales hormones responsables du développement de la glande mammaire pendant la gestation. La prolactine n'est toutefois mammogène qu'*in vivo* et elle est incapable de stimuler *in vitro* la division des cellules épithéliales mammaires. La prolactine agit donc *in vitro* via un mécanisme relais qui reste inconnu. Des

travaux récents fondés sur l'utilisation de souris n'ayant plus de récepteur à prolactine fonctionnel ont confirmé ce point [1]. Les effets de la prolactine sur l'expression des gènes des protéines du lait sont modulés positivement par les glucocorticoïdes et *in vitro* par l'insuline, alors que la progestérone, l'EGF (*epidermal growth factor*) et le TGF- β (*transforming growth factor*) ont un effet négatif. La matrice extracellulaire qui est située du côté basal des cellules épithéliales maintient l'organisation des cellules en alvéoles et amplifie l'action des hormones inductrices.

Le mécanisme d'action de la prolactine est pendant longtemps resté totalement incompris. L'isolement des gènes des protéines du lait et du gène du récepteur de la prolactine a conduit ces dernières années à établir un modèle cohérent de l'action de l'hormone. Le récepteur de la prolactine appartient à la famille des récepteurs des cytokines (interféron, érythropoïétine, hormone de croissance, interleukines, etc.) [2].

Cet article se propose de décrire ce que l'on connaît des mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes des protéines du lait au niveau transcriptionnel. Les éléments régulateurs des gènes des protéines du lait sont par ailleurs utilisés pour produire des protéines d'intérêt pharmaceutique dans le lait d'animaux domestiques. Les mêmes techniques peuvent servir à optimiser la composition du lait des animaux destiné à la consommation humaine. Les avancées et les espoirs dans ce domaine seront résumés dans la dernière partie de l'article.

L'activation des gènes des protéines du lait par la prolactine

L'essentiel du mécanisme d'action de la prolactine sur des gènes des protéines du lait est semblable à celui défini pour les interférons (*figure 1*). La prolactine se lie à son récepteur par deux sites indépendants. Une molécule de prolactine se lie ainsi à deux molécules de récepteur. Le récepteur se dimérise et active une tyrosine kinase, JAK2 (Janus kinase 2), qui phosphoryle un facteur de transcription cytoplasmique, Stat5 (*signal transducer and activator of transcription-5*). Celui-ci se dimérise, passe dans le

compartiment nucléaire et se fixe à la séquence d'ADN dont le consensus est TTCNNGAA. Cette séquence a été identifiée dans la région promotrice des gènes des principales protéines du lait: caséines - α_1 , - β , - α_2 , et - κ , α -lactalbumine, β -lactoglobuline, protéine acide du lactosérum (WAP: *whely acidic protein*). Le rôle essentiel de la prolactine dans ces processus a été confirmé avec des modèles de souris dont le gène du récepteur a été inactivé. Ces animaux ont un développement mammaire incomplet et une sécrétion lactée réduite [3].

L'action des cytokines est modulée par différents facteurs, en particulier par une famille récemment décrite de protéines nommées SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) contenant un domaine SH2 (*src homology 2*) central et un motif original en C-terminal appelé la boîte SOCS [3bis]. Les membres de cette famille règlent négativement la transduction du signal des cytokines. Il existe au moins 8 membres de cette famille: CIS (*cytokine inducible SH2 protein*), SOCS1 = JAB (*JAK2 binding protein*) = SS1 (*stat-induced stat inhibitor 1*), SOCS2 = CIS2 = SS2, SOCS3 = CIS3 = SS3, SOCS4 = CIS4, SOCS5 = CIS5, SOCS6 = CIS6 et SOCS7. Deux d'entre eux, SOCS1 et SOCS3 sont impliqués dans la régulation de l'action de la prolactine sur les gènes des protéines du lait [4]. Les variations de la concentration de la protéine SOCS3 au cours du cycle gestation-lactation dans la glande mammaire suggèrent qu'elle pourrait moduler l'action lactogène de la prolactine [5]. La protéine SOCS1 inhibe la kinase JAK2 en interagissant avec son site catalytique tandis que la protéine SOCS3 inhibe la réponse prolactinique sur le gène de la caséine- β en se liant au récepteur de l'hormone. Dans le même temps, la prolactine induit de manière stable les protéines SOCS2 et CIS. La première s'oppose aux effets inhibiteurs de SOCS1. Après une induction initiale du système JAK-Stat5, la prolactine semble donc limiter transitoirement ses propres effets par l'intermédiaire des deux protéines modulatrices SOCS1 et SOCS3. Les effets de ces modulateurs sont eux-mêmes transitoires et la prolactine peut ainsi avoir des effets durables sur les gènes des protéines du lait [6].

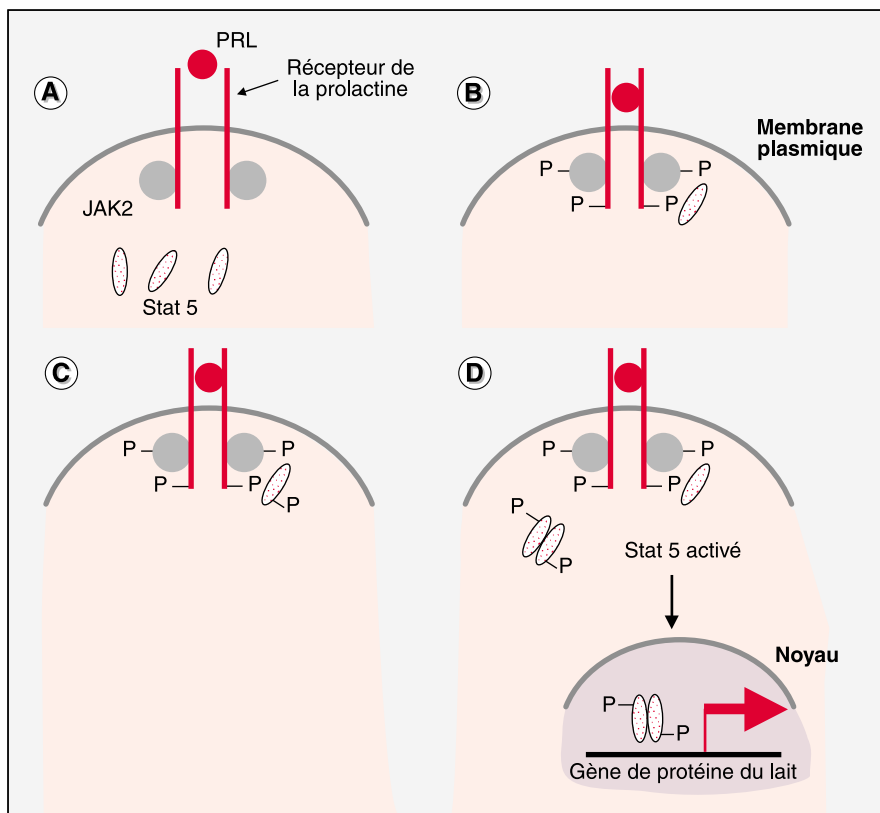


Figure 1. **Les différentes étapes de l'activation des gènes des protéines du lait par la cascade prolactine-JAK2-Stat5.** A. En absence de prolactine, le facteur Stat5 est monomérique, non phosphorylé et inactif. B. La prolactine dimérise son récepteur qui active la tyrosine kinase JAK2 qui elle-même phosphoryle le récepteur. C. La tyrosine kinase JAK2 phosphoryle le facteur Stat5. D. Le facteur Stat5 migre vers le noyau et se lie à une séquence spécifique du promoteur des gènes des protéines du lait qui sont alors activés.

Le facteur Stat5 activé par la prolactine appartient à une famille de 6 facteurs de transcription qui fonctionnent tous selon des mécanismes semblables. L'activation du facteur Stat5 résulte de la phosphorylation de la tyrosine en position 694 [7]. Il s'est avéré ensuite que le facteur Stat5 correspond en réalité à deux protéines différentes Stat5a et Stat5b codées par des gènes distincts qui ont une séquence très voisine sur une majeure partie de leur longueur. Ce fait suggère que les deux facteurs Stat5 doivent exercer des actions distinctes sur différents gènes cibles et comme ils sont présents dans la plupart des cellules animales, leurs fonctions ont toutes les chances d'être multiples [8]. Les facteurs Stat5a et Stat5b se lient à la même séquence d'ADN mais ont une région transactivatrice carboxy-terminale différente qui leur permet de réguler sélectivement leurs gènes cibles [9].

L'inactivation du gène Stat5a de souris par recombinaison homologue se traduit par une nette diminution du développement mammaire et une réduction de l'expression des gènes de l' α -lactalbumine et de la WAP [10]. De manière surprenante l'expression du gène de la caséine- β n'est pas affectée. L'inactivation du gène Stat5b n'a que peu d'effet sur le développement mammaire [11]. Chez ces animaux, l'expression du gène de l' α -lactalbumine est encore affectée mais beaucoup moins que celle du gène de la WAP, tandis que celle du gène de la caséine- β n'est pas altérée. Les animaux porteurs de la double mutation Stat5a-Stat5b sont stériles et les effets sur la lactation n'ont donc pas pu être étudiés. La protéine Stat5a est plus abondante et plus active que la protéine Stat5b chez les animaux normaux allaitants. L'ensemble de ces données suggère que les deux facteurs

Stat5a et Stat5b ont des effets différents sur la croissance mammaire. Leur action sur les gènes de l' α -lactalbumine et de la WAP est par contre à peu près semblable. Ces deux facteurs ne sont pas absolument requis pour activer l'expression des gènes des caséines.

Les facteurs Stat5 sont présents dans de nombreux types cellulaires et ils sont activés par de multiples inducteurs. Leur contribution pour activer certains gènes des protéines du lait est importante mais non suffisante pour expliquer la spécificité mammaire de l'expression de ceux-ci. L'action coordonnée d'autres facteurs formant une combinaison plus spécifique des gènes des protéines du lait est donc nécessaire.

L'action des glucocorticoïdes sur les gènes des protéines du lait

Après leur entrée dans la cellule, les glucocorticoïdes se lient à un récepteur cytoplasmique inactif. Cette liaison entraîne un changement de conformation et la translocation du complexe hormone-récepteur vers le noyau où il stimule ses nombreux gènes cibles en se liant à une région de l'ADN caractérisée par la séquence consensus A/GGA/TCA (N₃)TGTTCT. Cette séquence est appelée GRE (*glucocorticoid responsive element*). Le récepteur des glucocorticoïdes, comme tous les récepteurs des stéroïdes, comprend plusieurs régions distinctes dont l'une lie l'hormone et une autre l'ADN. La région carboxy-terminale contient une région transactivatrice hormone-dépendante responsable de l'activation des gènes cibles.

Les glucocorticoïdes seuls sont incapables d'activer les gènes des protéines du lait mais ils potentialisent l'action de la prolactine. De plus, les glucocorticoïdes agissent de manière différente sur les différents gènes des protéines du lait. Les gènes des caséines ne sont que lentement stimulés par les glucocorticoïdes alors que le gène WAP est induit très rapidement après l'addition de ces stéroïdes [12]. Les gènes des protéines du lait, comme un certain nombre d'autres gènes, ne contiennent que des demi-sites GRE capables cepen-

dant de lier le GR [13, 14]. Il est donc vraisemblable que les glucocorticoïdes n'agissent pas sur les gènes des protéines du lait uniquement par l'intermédiaire des GRE.

Un multimère de la séquence cible du facteur Stat5, placé en amont du promoteur minimum du gène de la thymidine kinase du virus Herpès simplex, est inductible par la prolactine. Cet effet est amplifié par les glucocorticoïdes bien que le promoteur reconstitué ne contiennent pas de GRE. Ce fait suggère que les glucocorticoïdes peuvent agir *via* le facteur Stat5. Le facteur Stat5 et le récepteur des glucocorticoïdes activés coprécipitent après addition d'anticorps spécifiques reconnaissant l'une ou l'autre de ces protéines. Les récepteurs des glucocorticoïdes peuvent donc agir en se liant au facteur Stat5. La région du récepteur des glucocor-

ticoïdes liant l'hormone est indispensable pour amplifier les effets du facteur Stat5 (figure 2), tandis que la région transactivatrice ne l'est pas [15].

Les glucocorticoïdes ralentissent également la déphosphorylation du facteur Stat5 et prolongent ainsi son action [16]. Le mécanisme impliqué n'est pas connu mais il est admis que la prolactine induit l'action d'une phosphatase à tyrosine en même temps qu'elle active la kinase JAK2 [17] ce qui permet une modulation des effets de la prolactine [18]. Il se pourrait donc que les glucocorticoïdes agissent en modulant l'action de cette phosphatase à tyrosine. Enfin, le récepteur des glucocorticoïdes activé est également susceptible de se lier au facteur de la famille C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) [17].

L'action de la progestérone sur les gènes des protéines du lait

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'action inhibitrice de la progestérone sur les gènes des protéines du lait. Une séquence d'ADN capable de fixer le récepteur de la progestérone a été identifiée il y a plus de 15 ans [19]. Cette séquence est différente du GRE qui fixe aussi le récepteur de la progestérone. L'étude de ce mécanisme ne semble pas avoir été poursuivie.

Selon J. Rosen, la progestérone pourrait réduire la phosphorylation du facteur Stat5 et atténuer ainsi les effets de la prolactine [17].

Une publication récente [20] indique que le récepteur de la progestérone activé se fixe sur le facteur Stat5, activé ou non, et entraîne celui-ci dans le noyau. La progestérone amplifie ainsi l'action du facteur Stat5 sur l'expression du gène de la caséine- β . Ce fait est inattendu dans la mesure où la progestérone exerce une action inhibitrice sur les gènes des protéines du lait. Ce mécanisme pourrait être lié aux effets de la progestérone sur la croissance mammaire [21].

L'EGF est capable d'induire la phosphorylation du facteur Stat5 par l'intermédiaire de l'activité tyrosine kinase de son récepteur et la progestérone amplifie cet effet. Ces faits ont été observés dans les cellules tumorales mammaires humaines T47D après transfection avec un vecteur contenant un gène rapporteur et le promoteur du gène de la caséine- β de rat [22]. Cela est difficilement compatible avec le fait que l'EGF et la progestérone sont deux inhibiteurs de l'expression des gènes des protéines du lait. L'état tumoral des cellules utilisées ne rend peut-être pas compte de la situation rencontrée dans le tissu normal. Il est connu que l'EGF et la progestérone favorisent le développement mammaire et que l'inactivation du gène du facteur Stat5a s'accompagne d'une réduction importante du développement mammaire. Le transport du facteur Stat5 vers le noyau induit par la kinase du récepteur de l'EGF et par le récepteur de la progestérone pourrait donc participer au développement mam-

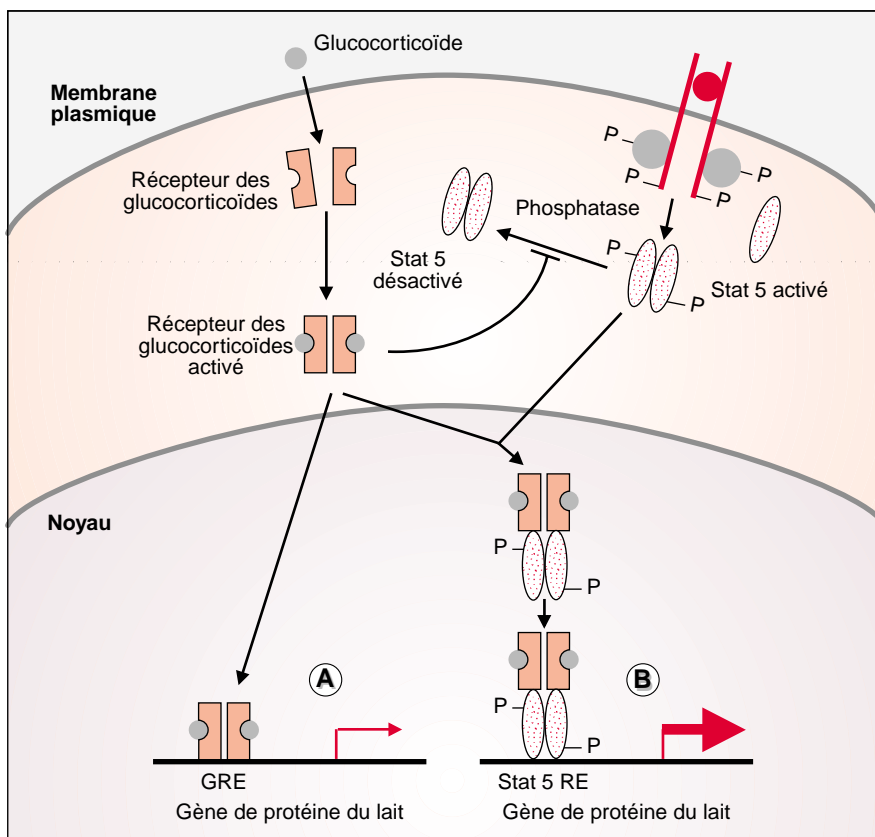


Figure 2. **Les actions des glucocorticoïdes sur les gènes des protéines du lait.** Le complexe hormone-récepteur peut se lier directement sur les sites GRE des gènes des protéines du lait, s'associer avec le facteur Stat5 ou stabiliser le facteur Stat5 sous sa forme phosphorylée via un mécanisme encore inconnu.

maire. Il reste à comprendre comment le facteur Stat5 n'induit pas en même temps l'expression des gènes des protéines du lait.

L'inhibition du facteur Stat5

Plusieurs autres facteurs ont été identifiés comme ayant un effet inhibiteur sur le facteur Stat5. L'EGF atténue les effets inducteurs de la prolactine sur les gènes des protéines du lait, au moins chez la souris. L'EGF diminue en particulier le nombre de récepteurs de la prolactine. Il abaisse également la phosphorylation du facteur Stat5 induite par la prolactine [22]. Cet effet de l'EGF emprunte la cascade ras, raf, MEK (MAPK/ERK Kinase), MAP (*mitogen-activated protein*) kinase.

La protéine anti-oncogène p53 se lie au facteur Stat5 et inhibe ses effets sur les gènes des protéines du lait [4]. Le mécanisme de cette action de la protéine p53 n'est cependant pas connu. Plusieurs lignées mammaires immortalisées par l'antigène T de SV40 sont incapables de synthétiser des protéines du lait. L'antigène T se lie à la protéine p53 mais aucune relation entre l'antigène T de SV40 et le fonctionnement du facteur Stat5 n'a à ce jour été établie [4]. L'antigène T pourrait plutôt inhiber l'action du facteur de transcription CBP/P300 (*CREB - cAMP responsive element binding protein - binding protein/P300*).

La protéine E1a de l'adénovirus qui a un fort pouvoir oncogène se lie dans la région activatrice carboxy-terminale du facteur Stat5 [4] et inhibe ses effets sur les gènes des protéines du lait.

Le mode d'action des facteurs de transcription C/EBP

Les facteurs de transcription C/EBP constituent une famille composée de six membres α , β , γ , δ , ϵ et ζ . Les quatre premières protéines sont codées par des gènes sans intron. Elles forment des homo- ou hétérodimères grâce à un domaine de type *leucine zipper* très conservé entre les différents membres de la famille, et elles se lient à l'ADN sous forme de dimères grâce à leur domaine de liaison à l'ADN en reconnaissant la

même séquence spécifique d'ADN TTNGCAAT. Elles agissent sur la transcription par leur domaine d'activation qui est très variable d'un membre de la famille à l'autre. Le facteur α est souvent impliqué dans la division des cellules et il s'oppose à leur différenciation. Le facteur β existe sous deux formes protéiques différentes nommées LAP (*liver-enriched activator protein*) et LIP (*liver-enriched inhibitor protein*) dérivant du même gène par le choix du codon d'initiation de l'ARNm. La forme LAP stimule l'expression des gènes cibles tandis que la forme LIP agit comme un dominant négatif naturel de la forme LAP.

Au cours de la gestation, la forme LIP est abondante dans la glande mammaire et la forme LAP est rare. A la parturition, cette proportion s'inverse [22]. Il est très vraisemblable que ce phénomène soit une des causes du ralentissement de la croissance mammaire à la parturition et de l'induction des gènes des protéines du lait.

L'inactivation du gène C/EBP- β par recombinaison homologue chez la souris résulte en un développement anormal de la glande mammaire. Ces souris sont incapables d'allaiter leurs souriceaux, leur glande mammaire contient essentiellement des canaux et très peu de cellules épithéliales alvéolaires [23].

La concentration du facteur LIP est très élevée dans un certain nombre de tumeurs mammaires. Cela est particulièrement vrai dans les cellules tumorales qui ont perdu leur dépendance vis-à-vis des stéroïdes ovariens. La concentration de LIP semble donc être un bon marqueur de tumorigénération. Le facteur LIP inhibe les effets de la protéine anti-oncogène Rb (Retinoblastoma) qui elle-même favorise l'activation du facteur LAP [17] (*figure 3*).

Le rôle du facteur CBP/P300

Le facteur de transcription CBP/P300 est un co-activateur qui stimule l'expression des gènes sans se lier à l'ADN mais en s'associant à des facteurs de transcription qui sont fixés à des séquences spécifiques d'ADN. Ce facteur ne comporte donc pas de région connue capable de se fixer à

l'ADN mais il possède un domaine transactivateur [24].

Le facteur CBP/P300 se lie aux facteurs Stat5, C/EBP ainsi qu'au récepteur des glucocorticoïdes. Les promoteurs des gènes de la caséine- β de rat [25] et de vache [26] ainsi que celui du gène de la caséine- α_1 de lapin [27] contiennent les séquences liant les facteurs Stat5 et C/EBP ainsi que le récepteur des glucocorticoïdes. Ces sites sont voisins et forment un bloc dont la structure est conservée. Cet ensemble, qui contient aussi un site capable de fixer le facteur inhibiteur YY1 et chevauche en partie le site Stat5, est qualifié de *milk box*. En se liant aux trois facteurs Stat5, C/EBP et récepteur des glucocorticoïdes, le facteur CBP/P300 forme un ensemble qui constitue l'inducteur essentiel de la transcription des gènes des protéines du lait (*figure 4*). Le facteur CBP/P300 est un transactivateur qui possède de plus une activité histone acétyltransférase propre et est capable de recruter d'autres histone

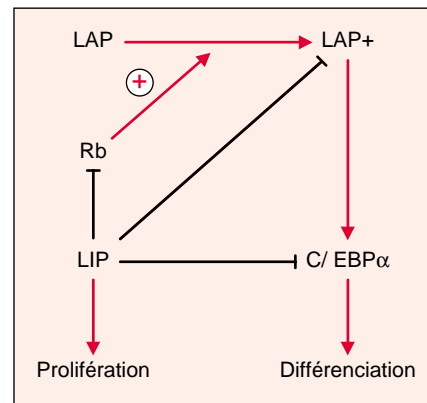


Figure 3. **Les actions des facteurs C/EBP sur la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales mammaires.** La forme LIP du facteur C/EBP- β est abondante pendant la gestation. Elle inhibe la forme activée LAP⁺ du facteur C/EBP- β . LAP et elle s'oppose à l'accumulation du facteur C/EBP- α . À la parturition, le facteur LIP disparaît. La forme LAP⁺ occupe alors le site C/EBP sur l'ADN et participe à l'activation des gènes des protéines du lait. Le facteur LAP⁺ induit le gène C/EBP- α qui est majoritairement présent et lié à l'ADN pendant la lactation. L'anti-oncogène Rb favorise la conversion du facteur LAP en sa forme active LAP⁺. Le LIP inhibe l'action de la protéine Rb.

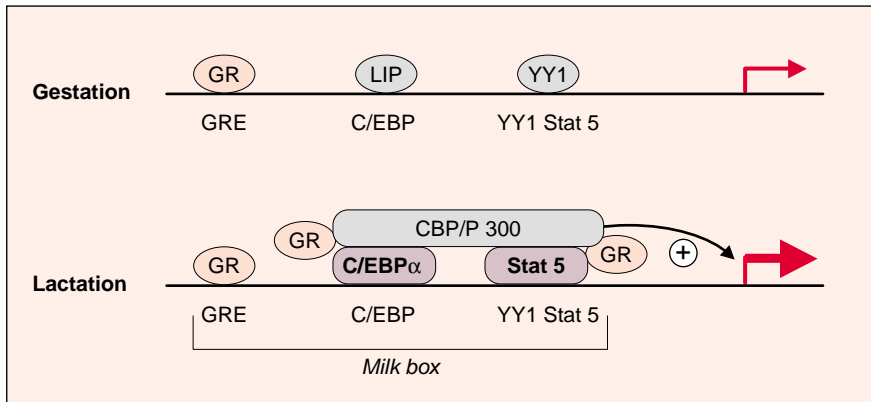


Figure 4. **L'action coordonnée des divers facteurs de transcription pour activer les gènes des protéines du lait.** Plusieurs gènes des protéines du lait contiennent un ensemble de sites voisins liant des facteurs de transcription. Cet ensemble caractéristique des gènes des protéines du lait a été appelé « milk box ». Au cours de la gestation, le facteur LIP occupe le site C/EBP et le facteur YY1 occupe en partie le site Stat5 qui lui est superposé. Pendant la lactation, le site C/EBP est occupé par le facteur C/EBP- α , le site YY1 - Stat5 est occupé par le facteur Stat5, et le récepteur des glucocorticoïdes (GR) est associé aux facteurs Stat5 et C/EBP. Le co-activateur CBP/P300 se lie à l'ensemble des facteurs. Le complexe favorise l'acétylation des histones, maintient la chromatine ouverte et stimule la transcription.

acétyltransférases comme PCAF (P300/CBP associated factor). L'acétylation des histones contribue à maintenir la chromatine sous une forme ouverte capable d'être transcrite. Les facteurs qui attirent la protéine CBP/P300 permettent donc ainsi aux gènes des protéines du lait d'être transcrits [26]. Il est intéressant de noter par ailleurs que le facteur YY1 s'associe avec des facteurs possédant une activité histone désacétylase [28]. Les facteurs Stat5 et YY1 semblent donc être en compétition non seulement pour leur fixation directe à l'ADN mais aussi pour le contrôle du niveau d'acétylation des histones.

L'action des autres facteurs de transcription

Un certain nombre d'autres facteurs impliqués dans la régulation des gènes des protéines du lait ont été identifiés. C'est le cas, notamment, des facteurs NF1, Oct 1, Ets et AP2. Le rôle de ces facteurs n'est pas encore bien établi, notamment parce que certains de ces facteurs existent sous des formes diverses dont les effets spécifiques n'ont pu être que peu étudiés. Le facteur AP2 est impliqué dans le contrôle de l'expression du génome du virus MMTV ainsi que dans celui du gène de la β -1-4 galactosyl transférase

bien exprimés dans la glande mammaire. Le facteur AP2 est donc un candidat sérieux pour participer au contrôle des gènes des protéines du lait. Le facteur NF1 joue un rôle essentiel dans la transcription des gènes des protéines du lait. Il semble qu'une des isoformes de ce facteur pourrait être spécifique des cellules épithéliales mammaires [28].

D'autres facteurs restent bien entendu à identifier. En principe, il paraît raisonnable d'envisager l'intervention de trois catégories de mécanisme. La première comprend les signaux qui sont délivrés par les hormones. La seconde concerne les signaux provenant de la matrice extracellulaire. Il n'est pas certain que les deux premières catégories suffisent à définir la spécificité proprement mammaire de l'expression des gènes des protéines du lait. Une troisième catégorie de facteurs responsables de la spécificité cellulaire de l'expression des gènes des protéines du lait paraît devoir être prise en considération. Le gène de la transferrine est exprimé dans un grand nombre de tissus de l'organisme mais il n'est activé que dans la glande mammaire de quelques espèces seulement et il est induit presque exclusivement par la matrice extracellulaire [29]. Chez ces

espèces, l'évolution a apporté à ce gène les éléments lui conférant une possibilité de s'exprimer dans les cellules mammaires. Une comparaison des promoteurs de ce gène chez différentes espèces pourrait contribuer à identifier les éléments régulateurs spécifiquement mammaires.

La régulation du complexe des gènes des caséines

Les gènes des caséines sont organisés dans le génome sous la forme d'un groupe (*cluster*). L'ordre des gènes est le même chez la souris [30], la vache [31] et l'homme [32] (figure 5). A l'état de transgène, les gènes caséine- α_1 et β sont exprimés de manière variable mais significative. Les gènes caséine- α_2 et κ sont au contraire inactifs. La région intergénique des trois espèces étudiées située entre les gènes caséine- α_1 et β contient des séquences bien conservées et des sites hypersensibles à la DNase I. Il paraît probable que les 4 gènes de caséine soient contrôlés par des éléments concentrés dans la région située entre les gènes caséine- α_1 et β . Cette région pourrait jouer un rôle comparable à celui de la région LCR (*locus control region*) du locus de la globine- β . Cette hypothèse est en cours d'évaluation [33]. En terme pratique, la région LCR du locus caséine, si elle existe, pourrait permettre aux transgènes contenant le promoteur de n'importe lequel des gènes des protéines du lait d'être activement exprimés.

L'action de la matrice extracellulaire

Les cellules épithéliales mammaires isolées sont capables d'accumuler autour d'elles une matrice extracellulaire organisée. Le collagène I flottant permet aux cellules mammaires de stabiliser les éléments de la matrice extracellulaire qu'elles sécrètent. La matrice extracellulaire préformée obtenue à partir des tumeurs EHS (*engelbreth-holm-swarm*) de souris permet de se passer de collagène I.

De tous les éléments que contient la matrice extracellulaire, la laminine joue le rôle essentiel pour organiser les cellules en alvéoles et permettre à la prolactine d'induire les gènes des protéines du lait.

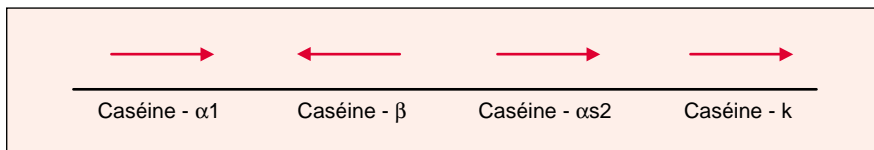


Figure 5. **La structure du locus caséine.** Chez trois espèces, l'organisation du locus est essentiellement la même. Les flèches indiquent l'orientation des gènes. Chez les rongeurs et le lapin, le gène caséine- α_s2 , est dupliqué. Les distances entre les gènes et la taille totale du locus varient selon les espèces. La région intergénique située entre les gènes caséine- α_s1 , et caséine- β est la meilleure candidate pour contenir des séquences LCR capables de contrôler l'expression de l'ensemble des gènes du locus.

Les cellules mammaires isolées ne synthétisent que de très faibles quantités de protéines du lait. La présence de la matrice extracellulaire rend les cellules sensibles aux hormones lactogènes. Un des mécanismes qu'emprunte la matrice extracellulaire consiste à inhiber une phosphatase à tyrosine qui déphosphoryle le facteur Stat5. La matrice extracellulaire agit donc, en partie au moins, *via* le facteur Stat5 [34] (figure 6).

L'utilisation des gènes des protéines du lait

L'idée d'utiliser le lait d'animaux transgéniques comme source de protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutique a été émise dès 1982. Sa réalisation a commencé en 1987 [35]. Ce procédé est maintenant utilisé à l'échelle industrielle. Les premiers médicaments préparés de cette manière devraient être mis sur le marché à partir de l'année 2000 [36]. Les gènes codant pour les protéines d'intérêt sont placés sous contrôle du promoteur d'un des gènes des protéines du lait [37], qui va donc en diriger l'expression. Les protéines potentiellement produites de cette manière sont des facteurs sanguins, des hormones, des anticorps, des enzymes, des protéines de structure, des antigènes vaccinaux, des récepteurs hormonaux, etc.

Certaines imperfections persistent. Les transgènes ne fonctionnent parfois qu'avec une faible efficacité. Ils s'expriment également dans certains cas à un faible niveau en dehors de la glande mammaire, ce qui peut perturber la santé des animaux. Les protéines recombinantes isolées du lait n'ont pas toujours subi toutes les modifications post-traductionnelles qui leur sont

propres et elles sont parfois glycosylées de manière inappropriée. La technique de clonage des animaux par transfert de noyau de cellules somatiques génétiquement modifiées pourrait se substituer à la transgénèse par micro-injection dans le pronoyau [38]. Des améliorations des vecteurs sont également nécessaires pour obtenir régulièrement un haut niveau d'expression des transgènes. La glande mammaire peut de plus être modifiée par transgé-

nèse pour lui permettre d'assurer une meilleure maturation post-traductionnelle des protéines et notamment des glycosylations. Malgré ces imperfections, une nouvelle branche de l'industrie pharmaceutique fondée sur la production de protéines recombinantes dans le lait est en train de naître.

Ces mêmes techniques doivent permettre d'optimiser la composition du lait destiné aux consommateurs humains et animaux. Les gènes codant pour des protéines allergisantes comme la β -lactoglobuline peuvent, en principe, être inactivés. Les allèles des gènes des protéines du lait les plus désirés par l'industrie laitière et les consommateurs pour la préparation de fromages notamment [39] peuvent virtuellement être introduits dans le génome des animaux laitiers par addition ou remplacement. Le lait peut de même être supplémenté par des anticorps ou d'autres molécules protectrices du tractus digestif. Le lait pourrait en principe, grâce à la transgénèse, contenir des antigènes vaccinaux actifs

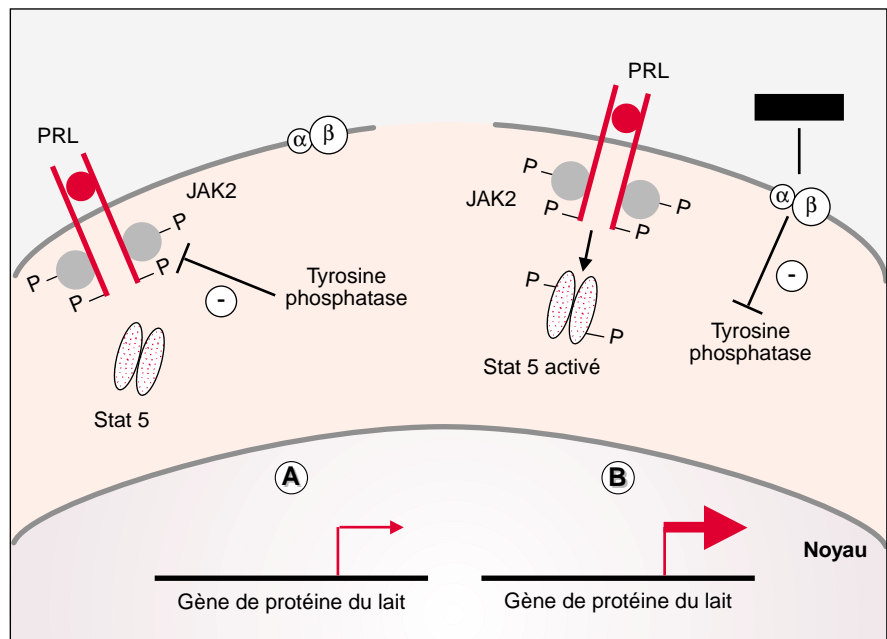


Figure 6. **L'action stimulatrice de la matrice extracellulaire sur l'expression des gènes des protéines du lait.** Le collagène I, composant de la matrice extracellulaire qui n'est pas fonctionnel seul pour les cellules mammaires, n'amplifie pas l'action de la prolactine. Une tyrosine phosphatase déphosphoryle intensément le facteur Stat5 et l'inactive. La laminine de la matrice seule ou complexée au collagène I transmet à la cellule mammaire via un récepteur intégrine un message qui inactive la tyrosine phosphatase. La forme phosphorylée du facteur Stat5 peut alors s'accumuler et activer les gènes des protéines du lait.

par voie orale. Chez les animaux domestiques, la transgénèse pourrait apporter des protéines capables de s'opposer aux infections mammaires.

Ces applications ne pourront toutefois devenir une réalité tangible que lentement étant donné les progrès techniques qu'il reste à faire et le temps nécessaire à la reproduction des animaux domestiques ■

RÉFÉRENCES

1. Briskin C, Kaur S, Chavarría TE, *et al.* Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol* 1999; 210: 96-106.
2. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrinol Rev* 1998; 19: 225-68.
3. Ormandy CJ, Camus A, Barra J, *et al.* Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 1997; 11: 167-78.
- 3bis. Gisselbrecht S. Les protéines de la famille CIS-SOCS: des modulateurs des effets biologiques des cytokines. *Med Sci* 1999; 15: 1259-67.
4. Pfitzner E. Cytokine signalling and the JAK/STAT pathway. *Genet Anal Biomol Eng* 2000 (sous presse).
5. Helman D, Sandowski Y, Cohen Y, *et al.* Cytokine-inducible SH2 protein (CIS3) and JAK2 binding protein (JAB) abolish prolactin receptor-mediated STAT5 signaling. *FEBS Lett* 1998; 441: 287-91.
6. Pezet H, Favre H, Kelly P, Edery M. Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 24497-502.
7. Wakao H, Gouilleux F, Groner B. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J* 1994; 13: 2182-91.
8. Teglund S, McKay C, Schuetz E, *et al.* Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 1998; 93: 841-50.
9. Boucheron C, Dumon S, Santos SC, *et al.* A single amino acid in the DNA binding regions of STAT5a and STAT5b confers distinct DNA binding specificities. *J Biol Chem* 1998; 273: 33936-41.
10. Hennighausen L, Robinson GW, Wagner KU, Liu W. Prolactin signaling in mammary gland development. *J Biol Chem* 1997; 272: 7567-9.
11. Liu X, Gallego MI, Smith GH, Robinson GW, Hennighausen L. Functional rescue of Stat5a-null tissue through the activation of compensating signals including Stat5b. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 795-803.
12. Puissant C, Houdebine LM. Cortisol induces rapid accumulation of whey acid protein mRNA but not of α S1 and β -casein mRNA in rabbit mammary explants. *Cell Biol Int Rep* 1991; 15: 121-9.
13. Lechner J, Welte T, Tomasi JK, *et al.* Promoter-dependent synergy between glucocorticoid receptor and Stat5 in the activation of β -casein gene transcription. *J Biol Chem* 1997; 272: 20954-60.
14. Lechner J, Welte T, Doppler W. Mechanism of interaction between the glucocorticoid receptor and Stat5: role of DNA-binding. *Immunobiology* 1997; 198: 112-23.
15. Cella N, Groner B, Hynes NE. Characterization of Stat5a and Stat5b homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1783-92.
16. Wyszomierski SL, Yeh J, Rosen JM. Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 330-43.
17. Rosen JM. Regulation of milk protein gene expression: Insights from transgenic and knockout mice. *Genet Anal Biomol Eng* 2000 (sous presse).
18. Ali S, Chen Z, Lebrun JJ, *et al.* PTP1D is a positive regulator of the prolactin signal leading to β -casein promoter activation. *EMBO J* 1996; 15: 135-42.
19. Lee CS, Oka T. Progesterone regulation of a pregnancy-specific transcription repressor to beta-casein gene promoter in mouse mammary gland. *Endocrinology* 1992; 131: 2257-62.
20. Richer JK, Lange CA, Manning NG, Owen G, Powell R, Horwitz KB. Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. Progesterone receptors regulate signal transducers and activators of transcription expression and activity. *J Biol Chem* 1998; 273: 31317-26.
21. Lange CA, Richer JK, Horwitz KB. Hypothesis: progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or anti-proliferative signals. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 829-36.
22. Petersen H, Haldosen LA. EGF modulates expression of Stat5 in mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 1998; 243: 347-58.
23. Raught B, Liao WS, Rosen JM. Developmentally and hormonally regulated CCAAT/enhancer-binding protein isoforms influence β -casein gene expression. *Mol Endocrinol* 1998; 9: 1223-32.
24. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 1998; 12: 599-606.
25. Pfitzner E, Jähne R, Wissler M, Stoecklin E, Groner B. p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 1582-93.
26. Myers CA, Schmidhauser C, Mellentin-Michelotti J, *et al.* Characterization of BCE-1, a transcriptional enhancer regulated by prolactin and extracellular matrix and modulated by the state of histone acetylation. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2184-95.
27. Pierre S, Jolivet G, Devinoy E, Houdebine LM. A combination of distal and proximal regions is required for efficient prolactin regulation of transfected rabbit alpha s1-casein chloramphenicol acetyltransferase constructs. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 1720-30.
28. Rosen JM, Zahn C, Kazansky A, Raught B. Composite response elements mediate hormonal and developmental regulation of milk protein gene expression. *Biochem Soc Symp* 1998; 63: 101-13.
29. Puissant C, Bayat-Sarmadi M, Devinoy E, Houdebine LM. Variation of transferrin mRNA concentration in the rabbit mammary gland during the pregnancy-lactation-weaning cycle and in cultured mammary cells. A comparison with the other major milk protein mRNAs. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 522-9.
30. Rijnkels M, Wheeler DA, de Boer HA, Pieper FR. Structure and expression of the mouse casein gene locus. *Mammalian Genome* 1997; 8: 9-15.
31. Rijnkels M, Kooiman PM, de Boer HA, Pieper FR. Organization of the bovine casein gene locus. *Mammalian Genome* 1997; 8: 148-52.
32. Rijnkels M, Meershoek E, de Boer HA, Pieper FR. Physical map and localization of the human casein gene locus. *Mammalian Genome* 1997; 8: 285-6.
33. Rijnkels M, Miller W, Rosen JM. Casein gene locus control region? *Genet Anal Biomol Eng* 2000 (sous presse).
34. Edwards GM, Wilford FH, Liu X, Hennighausen L, Djiane J, Streuli CH. Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 1998; 273: 9495-500.
35. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddell FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7380-4.
36. Wall RJ. Biotechnology for the production of modified and innovative animal products: transgenic livestock bioreactors. *Livest Prod Sci* 1999; 59: 243-55.
37. Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins from transgene animals. *J Biotechnol* 1994; 34: 269-87.

RÉFÉRENCES

38. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, *et al.* Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 278: 2130-3.

39. Mercier JC, Vilotte JL. The modification of milk protein gene composition through transgenesis: progress and problems. In: Houdebine LM, ed. *Transgenic animals. Generation and use.* Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997: 473-82.

TIRÉS À PART

L.M. Houdebine.

Summary

Use and regulation of the milk protein genes

Milk protein gene expression is controlled by prolactin and several factors including, glucocorticoids, insulin, progesterone, EGF and extracellular matrix. Prolactin which plays the essential role dimerizes its receptor. This activates tyrosine kinase JAK2. The cytoplasmic factor Stat5 (Signal Transducers and Activators of Transcription) is then phosphorylated, dimerized, transferred to the nucleus where it recognizes a DNA sequence present in all milk protein genes. The glucocorticoid-receptor complex stimulates milk protein genes by binding to GRE consensus sequences in the promoter region and to the activated and dimerized Stat5 factor. Glu-

corticoids slow down the dephosphorylation of Stat5. The C/EBP factors play a major role in mammary growth and differentiation. The transcription factor CBP/P300 is a coactivator which does not bind directly to milk protein gene promoters. It binds to factors Stat5, C/EBP and glucocorticoid receptors. The extracellular matrix participates to the control of milk protein gene expression by inhibiting a tyrosine phosphatase which dephosphorylates the Stat5 factor. The promoter of several milk protein genes are used to express in the mammary gland of farm animals foreign genes coding for proteins having pharmaceutical properties.