

L récepteur de la prolactine : ***u***ne molécule-clé de la reproduction ?

De nombreuses et multiples fonctions ont été attribuées à la prolactine, chez les vertébrés [1, 2]. Elles peuvent être classées en sept catégories : actions associées à l'équilibre de l'eau et des électrolytes ; effets sur la croissance et le développement ; action sur les fonctions de reproduction ; effets métaboliques ; effets sur le comportement ; immunorégulation et action sur l'épiderme et la peau. La prolactine (PRL) exerce ses effets *via* des récepteurs transmembranaires [3] présents en différentes concentrations dans un grand nombre de tissus, et même dans certains tissus où l'action de l'hormone n'est pas connue [4]. A ce jour, peu de gènes soumis à une régulation par la prolactine ont été recensés au regard des nombreuses actions physiologiques qu'exerce l'hormone. L'organe le mieux étudié de ce point de vue est incontestablement la glande mammaire [5].

Transmission du signal prolactine

Les mécanismes de la transmission du signal hormonal sont maintenant partiellement connus. Deux régions de l'hormone sont impliquées dans la liaison au récepteur : la prolactine se fixe séquentiellement à une première molécule de récepteur sur son site 1, puis s'accroche à une seconde molécule sur son site 2, induisant la formation d'un homodimère de récepteur [6]. Cette dimérisation induit un changement de conformation du récepteur et des molécules constitutivement associées, activant très rapidement alors le site catalytique de la tyrosine kinase Jak2 et/ou d'autres protéines non directement associées comme les MAP (*mitogen-*

activated protein) kinases. Cette liaison hormonale entraîne une croissance cellulaire et induit la transcription des gènes des protéines du lait. Nous avons montré que, comme pour les autres récepteurs de cytokines, la région riche en proline (boîte 1) du récepteur et proche de la membrane est indispensable à l'association avec la kinase Jak2 [7]. La phosphorylation des résidus tyrosine est une des étapes critiques de la transmission du signal puisque les protéines ainsi modifiées (récepteur, Jak2...) acquièrent la capacité d'interagir avec d'autres molécules intervenant dans la transmission du signal et contenant des motifs structuraux tels que les domaines SH2 (*Src homology 2*) [8, 9]. Trois membres de la famille des protéines STAT (*signal transducer and activator of transcription*) ont été maintenant identifiés comme des molécules transmettant le signal du récepteur de la prolactine : STAT1, STAT3 et surtout STAT5 [10, 11]. Elles s'associent donc *via* leur domaine SH2 à certaines phosphotyrosines des récepteurs activés et sont alors phosphorylées elles-mêmes par Jak2. Après dissociation du récepteur, elles s'homo- ou s'hétéro-dimérisent et migrent vers le noyau cellulaire où elles vont se fixer sur les éléments spécifiques de l'ADN qui se trouvent au sein des promoteurs des gènes cibles de l'hormone [12].

Chez la souris, le mode d'expression du gène unique du récepteur prolactine (*Prbr*) est complexe : il existe au moins sept transcrits à partir desquels quatre récepteurs sont synthétisés [13]. La structure du gène a récemment été établie [14]. Le gène est organisé en 13 exons : les exons 3 à 7 spécifient le domaine extracellulaire et l'exon 8 le domaine transmembranaire. La région intracellulaire est codée par deux exons : l'exon 9 très court, et l'un des exons 10, 11, 12 ou

13, qui, épissés de façon alternative et mutuellement exclusive, sont à l'origine des quatre formes du récepteur. Actuellement, la signification de l'existence des formes multiples de ce récepteur n'est pas éclaircie. Ces protéines ne diffèrent que dans leur région intracellulaire, suggérant qu'elles pourraient être couplées à différents mécanismes de transmission du signal prolactine. En effet, des expériences de cotransfection ont montré que seul le récepteur long permet d'induire l'expression des gènes des protéines du lait. Par ailleurs, l'expression différentielle des transcrits multiples, selon l'espèce, l'organe ou le stade physiologique, suggère que les différentes formes pourraient être impliquées dans des régulations différentielles du signal hormonal. Une variation de la proportion de chacune des formes du récepteur pourrait moduler l'expression des gènes induits par la prolactine.

L'intérêt suscité par les récentes techniques de recombinaison homologue et les travaux très enrichissants qui en découlent nous ont encouragés à réaliser au laboratoire l'inactivation du gène du récepteur de la prolactine (*Prbr*) [15]. Les phénotypes obtenus sont analysés.

Prolactine et glande mammaire

La plupart des premières portées des jeunes femelles (6 à 8 semaines) hétérozygotes (*Prbr*^{+/-}) meurent 24 heures après la naissance et l'ensemble de la portée a disparu complètement 48 heures après. Les petits sont capables de téter, mais meurent de déshydratation : en effet, l'examen de leur estomac ne révèle que des bulles d'air et un peu de lait, indiquant que les femelles *Prbr*^{+/-} ne peuvent pas allaiter. Ce phénotype disparaît à la seconde gestation où toutes les femelles *Prbr*^{+/-} ont des petits bien portants. L'analyse

TIRÉS À PART

N. Binart.

histologique de la glande mammaire des animaux 48 heures après la naissance des petits montre que les performances d'allaitement sont corrélées au degré de développement de la glande mammaire (figure 1). Les animaux incapables d'allaiter présentent un très faible développement de la glande mammaire alors que ceux dont les petits survivent ont un développement modeste comparé aux animaux

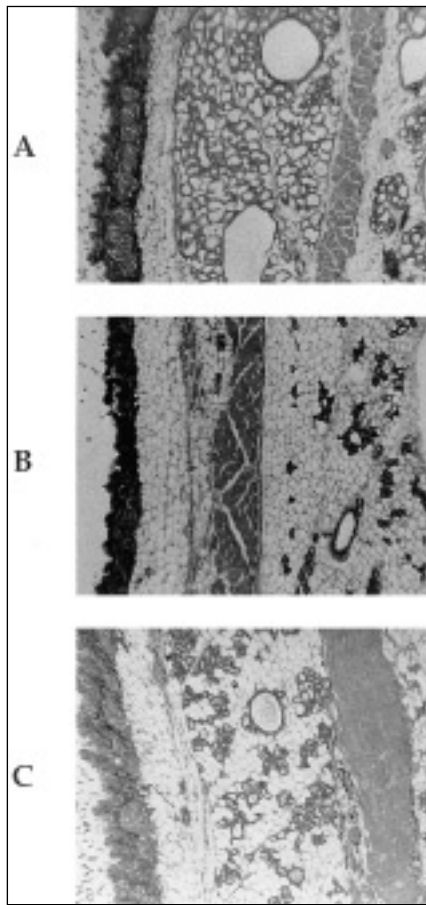


Figure 1. **Histologie des glandes mammaires des femelles F1 $Prhr^{+/+}$ et $Prhr^{+/-}$ 48 heures post-partum.** (A) femelle $Prhr^{+/+}$. (B) femelle $Prhr^{+/-}$ incapable d'allaiter. (C) femelle $Prhr^{+/-}$ montrant une lactation partielle. De gauche à droite, la peau est suivie du tissu adipeux, des cellules épithéliales mammaires et des alvéoles, du muscle et à nouveau de tissu mammaire en A; en B, il y a une absence complète de cellules épithéliales et d'alvéoles mais les canaux sont abondants; en C, l'organisation est la même qu'en A avec un peu moins d'alvéoles.

normaux chez lesquels la glande mammaire est parfaitement développée. Ces observations suggèrent que la prolifération des cellules épithéliales pendant la gestation et la période de post-partum dépendrait d'un seuil d'expression du récepteur qui ne peut être obtenu avec un seul allèle fonctionnel. Ces résultats démontrent que les deux allèles du gène du récepteur de la prolactine sont nécessaires pour une lactation correcte et que ce phénotype chez les animaux hétérozygotes est essentiellement dû au degré de développement de la glande.

Prolactine et fertilité

Les femelles homozygotes ($Prhr^{-/-}$) accouplées avec des mâles $Prhr^{-/-}$ ou $Prhr^{+/+}$ sont stériles. Nos résultats mettent en évidence un certain nombre d'anomalies: peu d'œufs sont fécondés et, juste après la fécondation, des ovocytes au stade vésicule germinale sont relâchés de l'ovaire, aboutissant à des embryons fragmentés. L'ovula-

tion est réduite et les œufs fécondés n'atteignent que rarement le stade blastocyste (19% des cas). Il se produit donc un arrêt du développement immédiatement après la fécondation (figure 2). Afin de tester si le développement anormal des œufs était dû à la perte du récepteur ou à l'environnement dans l'oviducte, des expériences de transplantation ont été réalisées. Des œufs fécondés, provenant de femelles $Prhr^{+/+}$ ou $Prhr^{-/-}$ croisées avec des mâles $Prhr^{+/+}$, au stade une ou deux cellules ont été réimplantés dans des femelles receveuses C57BL/6xCBA, et ont alors produit des embryons normaux et viables. Cette expérience a été renouvelée avec des mâles $Prhr^{-/-}$ pour exclure la contribution paternelle possible du récepteur dans l'embryon: les œufs sont viables, et cela nous permet de conclure que c'est l'environnement de l'œuf dans l'oviducte qui est déficient. En conclusion, l'absence de récepteur de la prolactine chez les femelles $Prhr^{-/-}$ provoque une faible

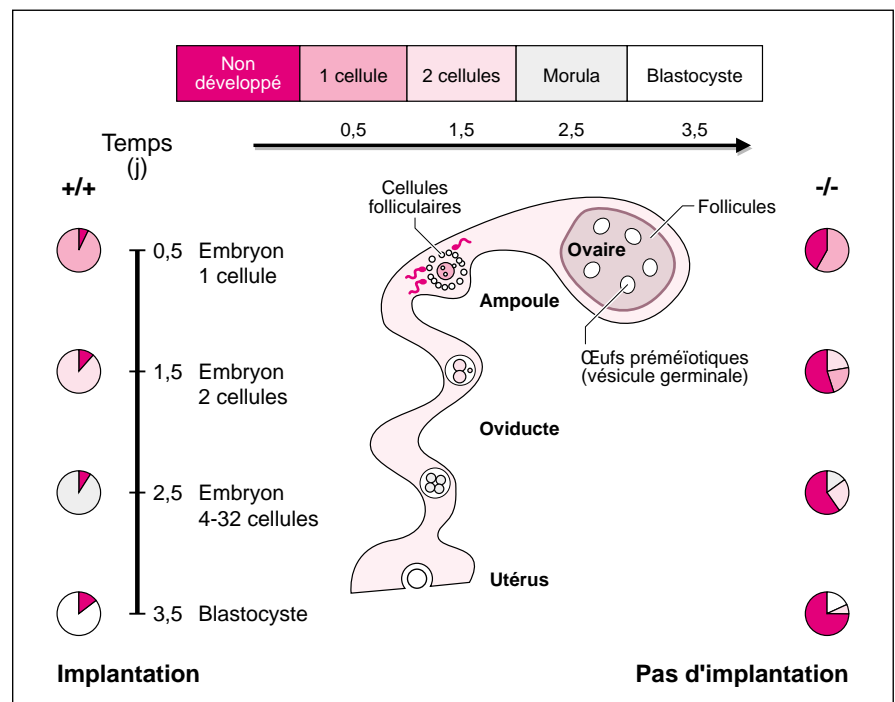


Figure 2. **Développement préimplantatoire des œufs dans des femelles $Prhr^{+/+}$ et $Prhr^{-/-}$ entre 0,5 et 3,5 jours après la fécondation.** À gauche est schématisé le développement normal des œufs chez cinq femelles sauvages entre le stade 1 cellule et blastocyste, à droite apparaît le développement retardé des œufs chez cinq femelles $Prhr^{-/-}$ aux moments correspondants. Les différentes variantes de rouge représentent les stades successifs du développement des œufs. La proportion des œufs à un stade donné est symbolisée dans un disque.

Tableau I

RÉSUMÉ DES DIFFÉRENTS PHÉNOTYPES SUR LA LACTATION
ET LA REPRODUCTION OBSERVÉS
CHEZ LES ANIMAUX $PRLR^{+/-}$ ET $PRLR^{-/-}$

	$Prlr^{+/-}$	$Prlr^{-/-}$
Développement de la glande mammaire	Lactation partielle	Pas de lactation : pas d'alvéole, pas de gestation
Reproduction – femelle	normale	stérilité • pas de pseudogestation • ovulation et maturation des ovocytes réduites • pas d'implantation
– mâle	normale	fertilité retardée

ovulation, une fécondation réduite et un arrêt presque total du développement préimplantatoire de l'œuf, les très rares embryons parvenant au stade blastocyste étant relâchés dans un environnement réfractaire à leur implantation. Tous ces éléments conduisent à une stérilité totale. Les dosages sériques d'œstrogènes chez les animaux $Prlr^{-/-}$ étant anormalement élevés au moment de l'œstrus et au jour 0,5 de la gestation, on ne peut donc pas exclure qu'ils interfèrent avec le développement normal des œufs ; cependant au jour 1,5 ils deviennent normaux suggérant que ces hormones ne seraient pas en cause. L'implantation des blastocystes est impossible car le corps jaune ne reçoit pas les informations de la prolactine hypophysaire et, de ce fait, les signaux qui dépendent de la sécrétion ovarienne de progestérone et d'œstrogènes et qui sont indispensables à l'implantation sont absents. En outre, il est connu que les pics de sécrétion de prolactine sont indispensables à l'induction de la pseudogestation, qui est donc impossible chez les femelles $Prlr^{-/-}$.

L'analyse des mâles homozygotes $Prlr^{-/-}$ indique que, dans environ 30% des cas, la fertilité des animaux est retardée alors que l'histologie du testicule et les dosages sériques de testostérone ne semblent pas être affectés. Dans ce contexte on ne peut pas exclure l'influence du fond génétique, mais des études ultérieures sont indispensables à la compréhension de ce problème.

En conclusion, l'obtention de souris sans récepteur de la prolactine est un modèle d'étude du rôle de cette hormone. Il est probable que la plupart des phénotypes observés sont liés à l'absence de la forme longue du récepteur puisque c'est la forme majoritaire présente dans toutes les cellules impliquées dans la reproduction [3] (Tableau I). Il reste néanmoins un certain nombre d'autres phénotypes à étudier, en particulier les anomalies du comportement maternel des femelles $Prlr^{+/-}$ et certains effets sur le métabolisme. L'ensemble des caractéristiques décrites ici font du récepteur de la prolactine une molécule régulatrice clé de la reproduction. En outre, il existe d'autres aspects que ce modèle va nous permettre d'étudier, en particulier, le rôle immunomodulateur potentiel de la prolactine. Des indications préliminaires ne démontrent pas de défauts majeurs du système lymphoïde. Enfin, la mise en place de l'ossification et l'analyse des différentes cellules osseuses chez les animaux $Prlr^{-/-}$ sont en cours d'étude car des anomalies semblent apparaître au cours du développement alors qu'aucun rôle connu de la prolactine n'a été identifié à ce jour dans ce tissu ■

RÉFÉRENCES

1. Nicoll CS, Bern HA. On the actions of prolactin among the vertebrates: is there a common denominator? In: Wolstenholme G, Knight J, eds. *Lactogenic hormones*. Londres: Churchill Livingstone, 1972: 299-327.

2. Kelly PA, et al. Molecular genetics of prolactin receptors, emphasis on downstream effects. *Endocr Rev* 1997 (sous presse).

3. Kelly P, Djiane J, Boutin J, Edery M. La structure des récepteurs de la prolactine et de l'hormone de croissance est maintenant connue. *Med Sci* 1990; 6: 778-84.

4. Nagano M, Kelly PA. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 1994; 269: 13337-45.

5. Neville MC, Daniel CW. *The mammary gland. Development, regulation, and function*. New York: Plenum Press, 1987.

6. Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, Martial JA. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammal. *Molecular Endocr Rev* 1996; 17: 385-410.

7. Lebrun J, Kelly P. Les mécanismes de la transduction du signal par le récepteur de la prolactine. *Med Sci* 1994; 10: 1018-20.

8. Kahn A. De la membrane au noyau, un couplage direct entre les récepteurs de cytokines et la machinerie transcriptionnelle. *Med Sci* 1994; 10: 202-5.

9. Chardin P. Domaines SH2 et SH3: un nouveau paradigme pour la transmission du signal. *Med Sci* 1994; 10: 709-12.

10. DaSilva L, Rui H, Erwin RA, Zack Howard OM, Kirken RA, Malabarba MG, Hackett RH, Larner AC, Farrar WL. Prolactin recruits STAT1, STAT3 and STAT5 independent of conserved receptor tyrosines TYR402, TYR476, TYR515 and TYR580. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 117: 131-40.

11. Gouilleux F, Wakao H, Mundt M, Groner B. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J* 1994; 13: 4361-9.

12. Goffin V, Kelly PA. Prolactin and growth hormone receptors. *Clin Mol Endocrin* 1996; 45: 247-55.

13. Buck K, Vanek M, Groner B, Ball RK. Multiple forms of prolactin receptor messenger ribonucleic acid are specifically expressed and regulated in murine tissues and the mammary cell line HC11. *Endocrinology* 1992; 130: 1108-14.

14. Ormandy CJ, Binart N, Kelly PA. The prolactin receptor gene: genomic organization reveals alternative promoters usage and generation of isoforms via alternative 3'-exon splicing. 1997 (sous presse).

15. Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 1997 (sous presse).

Nadine Binart

Christopher Ormandy

Paul A. Kelly

Inserm U. 344, Endocrinologie moléculaire, faculté de médecine Necker, 156, rue de Vaugirard, 75015 Paris, France.