

Régulation transcriptionnelle du gène de la prolactine humaine

Marc Muller
Monique Berwaer
Laure Caccavelli
Isabelle Manfroid
Asuncion Nalda
Hélène Pendeville
Flavia Pernasetti
Cécile van de Weerd
Bernard Peers
Joseph A. Martial

Le gène humain de la prolactine (*hPRL*) est exprimé essentiellement par l'antéhypophyse. L'analyse des éléments régulateurs de la transcription sur plus de 5 000 bases en amont du site de début de transcription a montré l'importance du contrôle par le facteur de transcription Pit-1, spécifique de l'hypophyse, à côté de facteurs ubiquistes. Des hormones modulent l'expression du gène *hPRL*, transmettant leur signal par les voies intracellulaires de l'AMP cyclique et du calcium, relayées au niveau du promoteur proximal (-250/+1) essentiellement par les facteurs de transcription Pit-1 et AP-1. Les récepteurs nucléaires contrôlent aussi en partie la transcription de *hPRL*: le récepteur des œstrogènes l'active en se liant aux éléments de réponse distaux ; les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes et des glucocorticoïdes la répriment en interférant respectivement avec la fonction activatrice de AP-1 et de Pit-1.

ADRESSES

M. Muller : *chercheur qualifié du FNRS*. I. Manfroid : *doctorante*. C. van de Weerd : *doctorante*. B. Peers : *chercheur qualifié du FNRS*. J.A. Martial : *professeur ordinaire*. Laboratoire de biologie moléculaire et de génie génétique, Université de Liège, Institut de chimie B6, B-4000 Sart-Tilman, Belgique. L. Caccavelli : *chargée de recherche*. Inserm U. 430, Laboratoire d'immunopathologie, Hôpital Broussais, 96, rue Didot, 75014 Paris, France. M. Berwaer : *chargée de recherche*. Zeneca Pharmaceuticals, Mereside 8AF25, Alderley Park, Cheshire SK10 4TG, Royaume-Uni. A. Nalda : *chargée de recherche*. Laboratoire d'embryologie moléculaire et expérimentale, Université Paris XI, Centre d'Orsay, Bâtiment 445, 91405 Orsay Cedex, France. H. Pendeville : *doctorante*. Department of biochemistry, St Jude Children's Research Hospital, 332, North Lauderdale, Memphis, TN 38105-2794, États-Unis. F. Pernasetti : *chargée de recherche*. Department of reproductive medicine, 9500 Gilman Dr, University of California, La Jolla, San Diego, CA 92093-0674, États-Unis.

La prolactine (PRL) est une hormone peptidique appartenant à la grande famille des cytokines [1]. L'analyse de sa structure primaire [2] a montré qu'elle dérive d'une protéine ancestrale commune à l'hormone de croissance (GH) et à l'hormone lactogène placentaire (PL). Tout comme ces dernières, la PRL exerce une grande variété de fonctions physiologiques. Son action la plus importante s'exerce sur le développement et la différenciation de la glande mammaire ainsi que sur l'initiation et le maintien de la sécrétion lactée après l'accouchement [3, 4]. La PRL joue en outre un rôle dans la réponse immunitaire [5, 6] en induisant l'expression du récepteur de

l'IL-2 dans les splénocytes et les lymphocytes-T [7, 8] ainsi que la sécrétion de l'IL-2 et de l'interféron- γ chez la souris [9]. Elle intervient aussi dans les fonctions reproductrices, le contrôle de la croissance, l'angiogenèse et la réponse au *stress*. Présente chez tous les vertébrés, la PRL est impliquée dans l'osmorégulation chez les poissons et les oiseaux, la métamorphose des amphibiens et le comportement migratoire des oiseaux [10].

La prolactine humaine est principalement exprimée, à la dixième semaine de vie intra-utérine, dans les cellules somatomammotropes de l'hypophyse antérieure. Son expression est ensuite restreinte principalement aux cellules lactotropes chez l'adulte.

Toutefois, une expression faible a été décrite dans le cerveau [11], le système lymphoïde [12], l'endomètre déidualisé [13] et la glande mammaire [14]. En accord avec ses nombreuses fonctions, l'expression du gène et la sécrétion de la PRL sont réglées par divers neuromédiateurs et facteurs de croissance, tels que la dopamine, le TRH (*thyrotropin releasing hormone*) et l'EGF (*epidermal growth factor*) [15-17], ainsi que par des hormones circulantes comme l'œstradiol, les glucocorticoïdes et les hormones thyroïdiennes [18-20].

Le gène codant pour la prolactine humaine (*hPRL*) a été cloné dans notre laboratoire [21]. Il est localisé sur le chromosome 6 et est composé de cinq exons et quatre introns se répartissant sur une longueur approximative de 10 kb.

hPRL hypophysaire

L'étude de la régulation transcriptionnelle spécifique de l'hypophyse du gène *hPRL* a été effectuée par des expériences de transfection transitoire de cellules en culture et par des études d'interactions ADN-protéines (retard de migration sur gel et empreintes à la Dnase I) [22]. Les analyses fonctionnelles mesuraient l'activité transcriptionnelle d'un plasmide portant la fusion entre différentes parties du promoteur du gène *hPRL* et le gène rapporteur *CAT* (chloramphénicol acétyl transférase). Ces expériences ont permis de caractériser de quatre régions activatrices en amont du gène *hPRL*, le promoteur proximal (-250/+1), les régions distales (-1968/-1064) et (-3474/-2600) et la région superdistale (-5100/-4430), ainsi que deux régions inhibitrices localisées, quant à elles, à (-2600/-1968) et (-4430/-3474). Tous les éléments activateurs fonctionnent de manière spécifique dans les différents tissus, puisque toutes ces constructions sont fortement actives dans des cellules hypophysaires de rat (GH3), alors qu'elles ne sont pas ou peu fonctionnelles dans des cellules HeLa. Par la suite, nous avons analysé la présence de facteurs de transcription interagissant avec ces régions régulatrices. De nombreux sites de liaison pour différents facteurs *trans*, répartis sur plus de 5,6kb en amont du site de début

de la transcription, ont été identifiés (*figure 1*). Parmi ces facteurs transcriptionnels, on trouve notamment Pit-1 (avec plus de 12 sites), la protéine A (ainsi baptisée par notre laboratoire, avec un seul site, mais jouant un rôle capital), le récepteur des œstrogènes, une protéine de la famille AP1 et une protéine de la famille C/EBP. Dans le contexte de l'expression spécifique dans l'hypophyse antérieure, le facteur Pit-1 est particulièrement intéressant, non seulement par le nombre de sites détectés dans le promoteur, mais aussi par le fait qu'il est présent spécifiquement dans cet organe [23]. En outre, l'expression seule de Pit-1 dans des cellules non hypophysaires suffit pour conférer une activité transcriptionnelle importante au promoteur du gène *hPRL* [20]. Pit-1 est donc certainement impliqué dans l'expression spécifique de l'hypophyse du gène *hPRL*. Il possède des sites de liaison spécifiques, non seulement sur les régions régulatrices du gène *Prl*, mais également sur celles des gènes *GH*, *TSH- β* (*thyroid stimulating hormone*) et même sur celles de son propre gène. Il n'est donc pas étonnant que ce facteur soit synthétisé dans les cellules lactotropes

(*Prl+*), somatotropes (*GH+*) et thyrotropes (*TSH+*) [24]. Néanmoins, d'autres facteurs transcriptionnels doivent coopérer avec lui pour restreindre l'expression du gène *Prl* dans les cellules lactotropes. Des travaux récents effectués chez le rat et la souris montrent que les œstrogènes jouent un rôle important [18], et suggèrent que les facteurs Ets-1 [25] et P-OTX [26] seraient impliqués.

Le facteur Pit-1 humain

Pit-1 est un facteur de transcription à homéodomaine appartenant à la sous-famille des protéines POU (nom générique des facteurs apparentés à Pit-1, Oct et Unc). Il comporte un domaine de transactivation dans sa région amino-terminale et un domaine de liaison à l'ADN bipartite (POU spécifique et POU homéo) carboxy-terminal. L'identification du gène codant pour Pit-1 humain [27] a montré que les exons I et II codent pour le domaine transactivateur, alors que le domaine POU est codé, respectivement, par les exons IV (POUs), V et VI (POUh). Dans le but de déterminer des régions de Pit-1 importantes pour son activité, nous avons mis en route un programme de

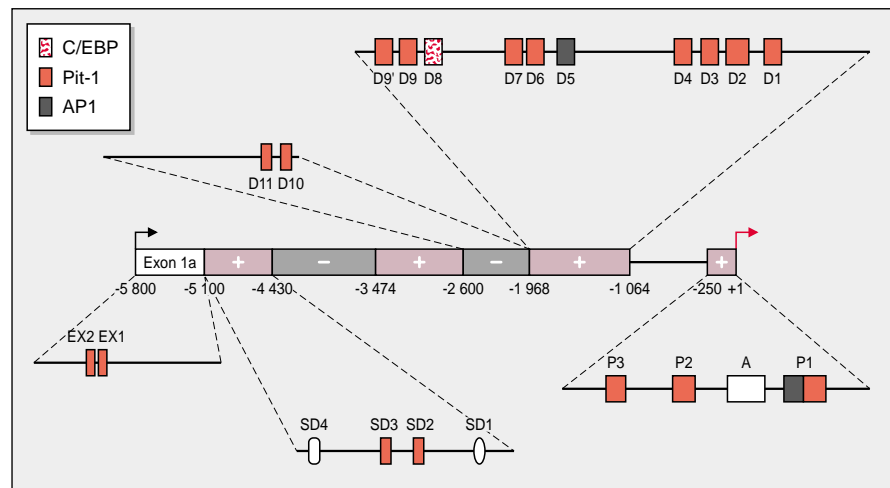


Figure 1. **Séquences dans le promoteur du gène *hPRL* qui interagissent avec des protéines nucléaires.** Les régions activatrices (+) et inhibitrices (-) dans la région en amont du gène de structure *hPRL* sont indiquées avec leurs positions relatives par rapport au site de début de la transcription hypophysaire. Les sites de liaison pour le facteur Pit-1 et C/EBP sont indiqués (P pour proximal, D pour distal, SD pour superdistal et EX pour exon 1a non hypophysaire), ainsi que le site AP1 proximal et le site AP-1 potentiel distal (D5). La séquence «A» est impliquée dans l'induction par l'AMPc, le site SD1 est reconnu par deux protéines ubiquistes, respectivement de type NF-1 et ETS-1. Le site SD4 lie une protéine spécifique des lymphocytes T (Jurkat).

séquençage des exons de *PIT-1* chez des patients atteints de déficience combinée des hormones hypophysaires (CPHD) GH, PRL et TSH, en collaboration avec les Dr. de Zegher et Milner (Leuven, Belgique). Nous avons ainsi identifié un mutant Pit-1 dominant négatif (Arg271Trp) chez un patient et sa mère, tous deux hétérozygotes [28]. Cette position, qui semble procéder d'un point chaud de mutagenèse au sein du gène *PIT-1*, est située sur l'interface de dimérisation du facteur Pit-1. De manière surprenante, la mère présentait des symptômes légers, alors que l'enfant souffrait d'un retard important de la maturation cardiovasculaire, neurologique, respiratoire et osseuse. Ce phénotype aggravé de l'enfant s'explique par une concentration très basse d'hormone thyroïdienne chez la mère et l'enfant pendant la grossesse, due à l'absence de TSH par la mutation de *PIT-1*. Ce cas unique a permis pour la première fois d'estimer les effets d'une absence d'hormones thyroïdiennes chez un embryon humain. De même, nous avons identifié un mutant déficient récessif (Pro239Ser) chez des patients homozygotes issus de trois familles arabes consanguines. Bien que les deux mutations soient situées dans le domaine POUH, les deux mutants lient l'ADN avec la même affinité que la protéine normale, mais sont défectueux dans leur fonction de transactivation. En outre, nous avons montré que le mutant récessif inhibe l'activité du Pit-1 normal de moitié, alors que le mutant dominant l'abolit complètement. Le mécanisme responsable de ce comportement différent des mutants reste inconnu.

Le TRH et l'EGF

Le TRH et l'EGF utilisent des voies de transmission du signal (phospholipase C, Ca^{2+} , MAP-kinases) pour influencer l'activité des facteurs de transcription ubiquistes (AP1) ou spécifiques (Pit-1; facteur hypophysaire).

Des expériences de transfection transitoire, utilisant différents mutants de délétion du promoteur du gène *hPRL* ou des sites de liaison pour des facteurs précis fusionnés en amont d'un gène rapporteur, ont montré

une stimulation de l'expression de *hPRL* par ajout de TRH et d'EGF aux cellules [16]. Cette régulation semble agir au niveau du promoteur proximal (-250/+1), car la délétion progressive des sites Pit-1 ou la mutation de la séquence «A» s'accompagne chaque fois d'une diminution de l'inductibilité. En outre, plusieurs copies de «séquence A» ou de sites liant Pit-1 placées devant un promoteur homologue sont capables de relayer les deux réponses [17]. Il apparaît donc que l'induction du gène *hPRL* par le TRH et l'EGF implique une synergie entre Pit-1 et les facteurs se liant sur la séquence A (figure 2).

La voie principale de transmission du signal TRH passe par une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire [29]. En utilisant des activateurs des canaux à Ca^{2+} , nous avons pu montrer que la régulation par la voie du Ca^{2+} passait également par les sites de liaison proximaux pour Pit-1 [30] et la

«séquence A» [31, 32]. On observe, en outre, le même phénomène de synergie entre les sites Pit-1 et «A».

L'AMP cyclique

La dopamine est considérée comme le facteur hypothalamique le plus important pour la répression de l'expression du gène *hPRL* [15]. Ainsi, le traitement le plus commun des hyperprolactinémies pathologiques est fondé sur la bromocriptine, un agoniste de la dopamine. Elle agit principalement en diminuant l'activité de l'adénylyl cyclase et la concentration en AMP cyclique [33]. Au contraire, le VIP (*vasoactive intestinal peptide*) augmenterait la synthèse de prolactine en stimulant l'adénylyl cyclase [34]. Ces observations ont attiré l'attention sur la voie de transmission impliquant la protéine-kinase A (PKA) dans le contrôle du gène *PRL*. Des études par transfection/expression transi-

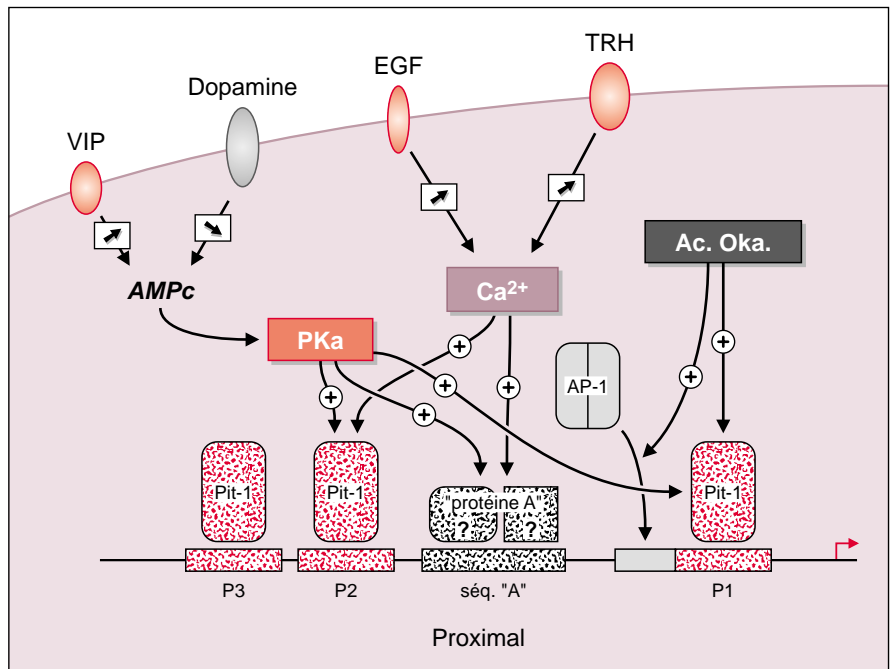


Figure 2. **Représentation schématique des voies de transmission des signaux extracellulaires agissant sur le gène *hPRL*.** Les effecteurs peptidiques principaux sont représentés. Le VIP et la dopamine agissent, respectivement, en augmentant ou en diminuant la concentration en AMPc et influencent l'expression du gène *hPRL* via les sites Pit-1 et «A». EGF et TRH agissent principalement en augmentant la concentration en Ca^{2+} intracellulaire et, dès lors, l'activation par les sites Pit-1 et «A». L'inhibition des protéine-phosphatases par l'acide okadaïque (Ac. Oka.) est associée à une stimulation de l'expression du gène *hPRL* impliquant les sites AP1 et Pit-1 proximaux.

toire ont montré, en effet, que l'AMPC induit la transcription du gène *hPRL* [16]. Une étude plus approfondie, utilisant des mutants de délétion et des mutations ponctuelles de sites de liaison spécifiques du promoteur du gène *hPRL*, a révélé que cette induction agit (figure 2) via les sites Pit-1 proximaux (P1, P2 et P3) et la « séquence A », le tout fonctionnant en synergie [35]. La « séquence A » (-115/-85) lie une protéine ubiquiste, de masse molaire 100 kDa [31]. Par la suite, des études détaillées utilisant des techniques variées (gel retard, *South-Western*, *cross-linking*), ont révélé que cet élément présente une complexité exceptionnelle. Ainsi, nous avons montré que des facteurs des familles ETS, CREB/ATF et POU-homéo (Pit-1) sont capables d'interagir avec cette séquence. La nature exacte du « complexe A », qui se fixe sur la séquence A et dont l'activité est probablement modulée par la PKA, reste encore à définir.

Protéine-phosphatases

Les voies de transmission du signal les plus étudiées font intervenir des protéine-kinases (PKA, PKC, MAP-kinases, calmoduline-kinases) qui modulent l'activité de facteurs de transcription spécifiques. Par ailleurs, les protéine-phosphatases, dont le rôle a été moins étudié, modulent également l'activité du promoteur de la *hPRL* [32, 36]. L'ensemble de ces résultats suggère que la régulation de l'expression du gène de la PRL résulte de l'action concertée des protéine-kinases et -phosphatases. Nous avons évalué l'influence des protéine-phosphatases sur l'expression du gène *hPRL* en utilisant des inhibiteurs spécifiques de ces phosphatases lors d'expériences de transfection/expression transitoires. Nos résultats indiquent que les différentes phosphatases ont des effets spécifiques sur la transcription du gène *hPRL*. L'activité du promoteur proximal de la *hPRL* est stimulée par des inhibiteurs des sérine/thréonine phosphatases PP1 et PP2A, alors qu'elle est réprimée lors de l'inhibition de la PP2B. En outre, les phosphatases PP1 et PP2A potentialisent la stimulation par l'AMPC, tandis que la PP2B influence aussi bien la voie

AMPC que la voie Ca^{2+} , en agissant sur le promoteur proximal. Des expériences de retard de migration sur gel, utilisant des extraits de cellules traitées ou non par différentes molécules, nous ont permis d'étudier des modifications au niveau des complexes protéines-ADN qui se forment sur les différents sites de liaison du fait du traitement. L'inhibition de la PP1 et/ou de la PP2A par l'acide okadaïque ne change pas ou peu la liaison de Pit-1 sur ses sites spécifiques, mais provoque l'apparition d'un nouveau complexe sur le site proximal P1 uniquement. En utilisant des ADN compétiteurs ou des anticorps spécifiques, nous avons montré que ce nouveau complexe correspond au facteur AP-1, comprenant en particulier Jun-D. Des expériences de *Western blots* ont montré que l'apparition de ce complexe est due à l'augmentation de la concentration de Jun-D et de c-Fos dans les cellules lors des traitements. Une analyse détaillée de la séquence du promoteur du gène *hPRL* révèle la présence d'un site consensus pour AP-1, immédiatement adjacent au site Pit-1 proximal sur la séquence P1. Des études de transfection utilisant des mutants

ponctuels du promoteur du gène *hPRL* ont montré que les sites Pit-1 proximal et AP-1 sont tous les deux nécessaires pour l'induction par l'acide okadaïque. L'induction par les inhibiteurs de phosphatases résulterait donc de la liaison du facteur AP-1, après synthèse accrue de Jun-D, agissant en synergie avec Pit-1 lié à son site proximal (figure 2).

Récepteurs nucléaires

Des études effectuées dans notre laboratoire concernant la régulation du gène *hPRL* par les récepteurs nucléaires ont ouvert une dimension nouvelle de complexité (figure 3). Ces récepteurs ont en commun la particularité d'être localisés à l'intérieur de la cellule, au niveau cytoplasmique ou nucléaire. Après liaison de leur hormone correspondante, ils sont capables d'interagir directement avec l'ADN au niveau de leurs gènes cibles pour moduler l'expression de ces derniers. Néanmoins, des mécanismes indépendants de la liaison à l'ADN impliquant des interactions avec d'autres facteurs nucléaires ont été décrits, notamment pour la répression transcriptionnelle.

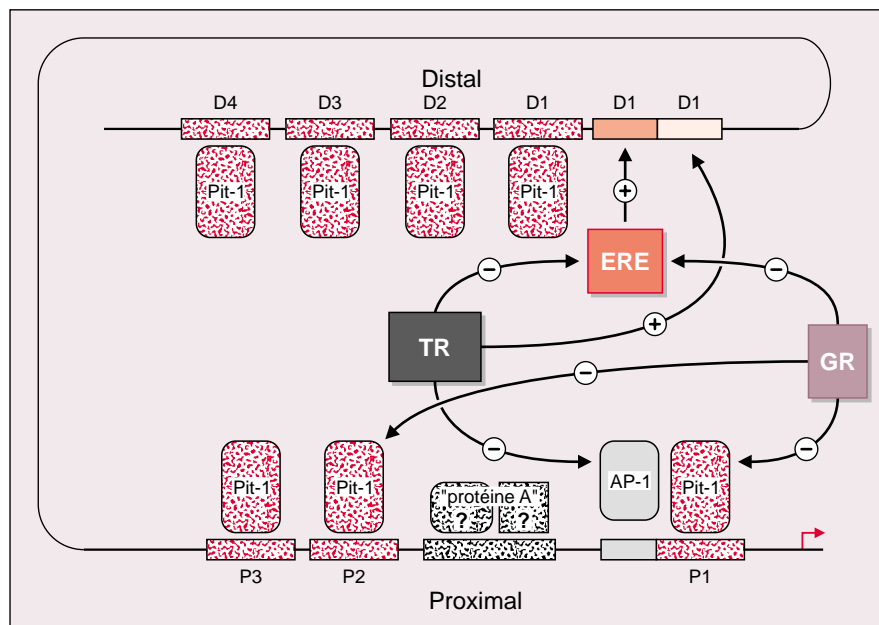


Figure 3. Action des hormones stéroïdes et thyroïdiennes sur la synthèse de la *hPRL*. Les œstrogènes stimulent le gène *hPRL* via l'élément ERE distal. Les glucocorticoïdes répriment la transcription en interférant avec Pit-1 et le récepteur des œstrogènes. Les hormones thyroïdiennes interfèrent avec les fonctions activatrices des facteurs AP-1 et ER.

Œstrogènes

Les œstrogènes (E2) constituent, avec le TRH, un des plus importants stimulateurs physiologiques de la prolactine.

Des études de transfection/expression transitoire dans des cellules hypophysaires (GH3) nous ont permis de localiser l'élément responsable à l'extrémité 3' de l'élément distal. La séquence -1168/-1200, qui de fait, ressemble à un site de liaison pour le récepteur des œstrogènes (ER), est capable de relayer la réponse aux E2 au niveau du promoteur du gène *hPRL* proximal ou d'un promoteur hétérologue. De plus, des expériences de retard de migration sur gel ont montré que cette séquence est capable de lier spécifiquement le ER obtenu par surexpression dans des cellules COS. Une mutation ponctuelle du site abolit la liaison de ER et la réponse aux œstrogènes.

Le fait que ce site liant le ER est proche d'un site de liaison pour Pit-1 suggérerait la possibilité d'une synergie entre ces deux facteurs, comme cela a déjà été démontré dans le cas de la prolactine de rat. La délétion ou la mutation des ces sites Pit-1 distaux n'a pourtant aucune influence sur l'inductibilité par l'hormone, suggérant qu'au niveau du gène *hPRL*, ces deux facteurs agissent de manière indépendante. Une explication possible de ce phénomène serait que le site ERE humain lierait le récepteur avec une forte affinité, au point que cette liaison ne serait pas renforcée par la présence d'un facteur avoisinant.

Nous avons donc identifié un élément ERE à la position -1168/-1200 (*figure 3*) qui serait responsable de l'induction par les œstrogènes, indépendante de Pit-1.

Glucocorticoïdes

Nous avons montré que les glucocorticoïdes inhibent le promoteur du gène *hPRL*. Par des expériences de transfection/expression transitoire, nous avons pu localiser l'élément responsable de cette régulation dans la région proximale du promoteur. Cette séquence est, en outre, capable de relayer la répression sur un promoteur hétérologue. Dans des cellules non hypophysaires, la répression

n'est obtenue qu'après co-transfection d'un vecteur d'expression pour Pit-1, indiquant que ce dernier est nécessaire à la répression.

Par ailleurs, le récepteur des glucocorticoïdes (GR), exprimé en bactérie, ne se lie pas à cet élément. L'expression d'un mutant du GR, incapable de lier l'ADN, nous a permis de montrer que la répression du promoteur du gène *hPRL* ne nécessite pas la liaison du récepteur sur le promoteur. Des expériences d'immuno-précipitation ont alors montré que des anticorps anti-GR ou anti-Pit1 sont capables de co-précipiter, respectivement, GR et Pit-1, suggérant que ces deux facteurs interagissent en solution [19].

Ainsi, la répression du gène *hPRL* par les glucocorticoïdes est relayée par une interaction du GR avec Pit-1, interférant avec les fonctions activatrices de ce dernier (*figure 3*).

Hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes (T3 et T4) contrôlent de nombreux processus dans les organismes supérieurs, incluant la différenciation cellulaire, la croissance et le métabolisme général. Des études de transfection/expression transitoire dans des cellules hypophysaires de rat ont révélé que la T3 inhibe le promoteur du gène *hPRL*, fusionné à un gène rapporteur. Des délétions successives de ce promoteur ont montré la présence de deux séquences régulatrices intervenant dans ce phénomène : un élément fortement inhibiteur proximal (-164/-35) et un élément activateur faible distal (-1207/-1157). Cette activation est relayée par un site de liaison pour le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR) situé dans le voisinage de l'élément ERE décrit plus haut.

L'élément répresseur proximal est capable de relayer l'inhibition exercée par la T3 sur un promoteur hétérologue (thymidine kinase), alors que des études de retard de migration sur gel indiquent que le récepteur T3 (TR) ne se lie pas sur cette séquence. Des expériences ultérieures ont montré que, en fait, la T3 abolissait l'effet activateur du facteur de transcription AP-1 lorsque ce dernier est lié à son site proximal (-62/-56). De façon complé-

taire, nous avons montré que la mutation de ce site AP1 abolit complètement la répression du promoteur du gène *hPRL*. Il apparaît donc que l'inhibition de la transcription du gène *hPRL* par la T3 a lieu par une interférence du récepteur TR avec les fonctions activatrices du facteur AP1 [20].

Influence réciproque

La régulation du gène *hPRL* apparaît encore plus complexe si on tient compte des effets combinés des différentes hormones (*figure 3*). En présence d'œstrogènes, les glucocorticoïdes répriment la transcription, non seulement *via* le promoteur proximal (*voir* plus haut), mais aussi en abolissant l'effet inducteur des œstrogènes au niveau distal. Cette dernière interférence s'opère de nouveau sans liaison directe du GR sur l'ADN, probablement par un mécanisme de titration d'un co-facteur activateur commun aux deux récepteurs (*squelching*).

L'administration combinée d'œstrogènes et de T3 a pour résultat une activation additive si on considère l'élément distal séparément. En revanche, sur le promoteur du gène *hPRL* complet (-2627/+1), la T3 est capable de bloquer, du moins en partie, l'induction par les œstrogènes. Le mécanisme de ce blocage n'est pas encore compris.

En revanche, les inhibitions par les glucocorticoïdes et la T3 semblent fonctionner indépendamment l'une de l'autre.

hPRL non hypophysaire

Le gène *hPRL* est exprimé non seulement par l'hypophyse, mais aussi par différentes cellules du système lymphoïde (lymphocytes circulants et thymocytes entre autres), par les cellules déciduales de l'utérus et par les cellules du myomètre.

Les lymphocytes humains, ainsi que différentes lignées cellulaires lymphoïdes humaines, transcrivent le gène *PRL* et sécrètent la PRL, identique à celle sécrétée par l'hypophyse [12, 37]. On suppose qu'elle agirait comme facteur de croissance et de différenciation physiologique pour les cellules hématopoïétiques (*m/s n° 4, vol. 14, p. 514*). Cependant, les

ARN messagers non hypophysaires du gène *hPRL* possèdent une séquence additionnelle de 150 nucléotides à leur extrémité 5' par rapport au transcrit hypophysaire [38]. Il s'agit d'une séquence additionnelle non traduite comprenant les 41 nucléotides présents immédiatement en amont du site de début de la transcription hypophysaire (incluant la boîte TATA) et 93 nucléotides supplémentaires (exon la) se trouvant à 5,8 kb en amont du site de début de la transcription hypophysaire.

La région de 3 000 pb précédant l'exon la peut diriger l'expression d'un gène rapporteur dans des lignées lymphocytaires T et B ainsi que dans des lignées primaires de cellules endométriales décidualisées qui synthétisent la PRL [40]. Dans le but de mieux comprendre la régulation par le promoteur non-hypophysaire, une série de mutants de délétion 5' de cette région fusionnés au gène rapporteur *luciférase* (*Luc*) a été testée par expression transitoire dans la lignée lymphocytaire T Jurkat T6 [40]. Une région comprise entre -453 à +35, par rapport au site de début de la transcription de l'exon la peut diriger l'expression du gène rapporteur *Luc* dans les cellules Jurkat à un niveau comparable à celui du promoteur TK. Dans des cellules hypophysaires, le promoteur alternatif ne présente aucune activité, tout comme le promoteur hypophysaire (-250/+14) ne montre aucune activité dans les cellules Jurkat. Dans les cellules HeLa, aucun des deux promoteurs n'est actif. Le promoteur non hypophysaire présente donc une activité lymphocytaire spécifique. Une étude plus poussée d'une série de mutants de délétion 5' et 3' nous a permis d'identifier la région comprise entre -375 et -212 comme un amplificateur lymphocytaire, capable d'activer la transcription d'un promoteur hétérologue spécifiquement dans les cellules Jurkat.

Des expériences de protection contre la digestion par la DNase I ont révélé trois séquences protégées par des protéines présentes dans les extraits de cellules Jurkat (FP0, FP1 et FP3). Ces séquences sont aussi protégées par des protéines présentes dans des extraits de cellules non lymphocytaires, mais la séquence protégée FP1

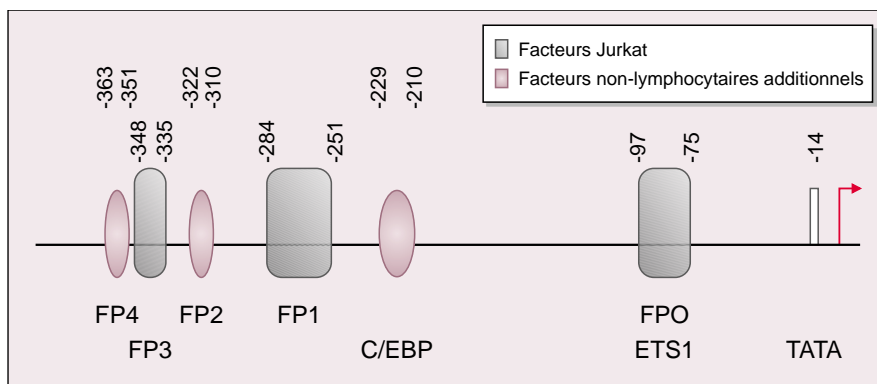


Figure 4. **Facteurs interagissant avec le promoteur du gène *hPRL* lymphocytaire.** Les facteurs de transcription spécifiques des lymphocytes et ubiquistes sont représentés et leur identité, quand elle est connue, est indiquée.

est beaucoup plus grande et au moins deux sites d'interaction supplémentaires sont observés (FP2 et FP4) avec ces extraits (figure 4). Il reste à déterminer si la spécificité lymphocytaire provient d'une activation par des facteurs spécifiques liant FP0, FP1 ou FP3, ou d'une répression spécifique dans les cellules non lymphocytaires au niveau des sites FP2 ou FP4. Notons que l'amplificateur lymphocytaire défini par les expériences de transfection couvre les sites FP1, FP2 et FP3. Bien qu'une étude décrive l'expression de Pit-1 dans les tissus lymphoïdes [41], l'activité du promoteur alternatif est indépendante de Pit-1 [39]. Aucune séquence consensus Pit-1 n'a été identifiée dans le promoteur non hypophysaire.

Le contrôle du promoteur non hypophysaire serait donc différent du contrôle hypophysaire et indépendant de Pit-1.

Conclusion et perspectives

La compréhension des phénomènes moléculaires contrôlant la transcription du gène de la prolactine humaine est l'objet de recherches dans notre laboratoire depuis de nombreuses années. Nous avons identifié et caractérisé de nombreux sites d'interaction pour des facteurs de transcription, sur une région de plus de 6 000 paires de bases en amont de la séquence

codante du gène (figure 1). Nos études ont établi le rôle primordial joué par le facteur hypophysaire Pit-1 dans l'expression spécifique de l'hypophyse de la *hPRL*. Dans ce tissu, la régulation par les principaux facteurs extracellulaires physiologiques (la dopamine comme répresseur et la TRH, le VIP et l'EGF comme activateurs) et par leurs seconds messagers (AMPc, Ca²⁺, protéine-kinases et phosphatases) s'est avérée agir principalement sur la région proximale du promoteur (figure 2). Nos études concernant les effets des récepteurs nucléaires (notamment le récepteur des œstrogènes, figure 3) ont encore renforcé l'image d'un réseau complexe de voies de transmission aboutissant au promoteur du gène *hPRL*. Dans ce réseau, Pit-1 apparaît comme l'intégrateur central de signaux divers dans l'hypophyse, puisqu'il semble être toujours impliqué, soit directement, soit indirectement, avec d'autres facteurs ubiquistes (API, CREB, ETS, ER).

Ces études fondamentales devraient servir de base pour la conception et le développement rationnel de traitements médicaux pour les patients souffrant d'un déséquilibre prolactinique. Dans ce même contexte, l'expression extra-hypophysaire de la *hPRL*, indépendante de Pit-1, pourrait reprendre de l'importance. Les premières études décrites ici, concernant surtout des lignées lymphocytaires, méritent certainement d'être poursuivies et étendues ■

RÉFÉRENCES

1. 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 mammals. *Endocr Rev* 1996; 17: 385-410.
2. Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, Martial JA. Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem* 1981; 256: 4007-16.
3. Nicoll CS. Physiological actions of prolactin. In: Knobil E, Sawyer WH, eds. *Handbook of Physiology*, vol. 4. Washington DC: American Physiological Society, 1974; 4: 253-92.
4. Flint DJ, Gardner M. Evidence that growth hormone stimulates milk synthesis by direct action on the mammary gland and that prolactin exerts effects on milk secretion by maintenance of mammary deoxyribonucleic acid content and tight junction status. *Endocrinology* 1994; 135: 1119-24.
5. Gala RR. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198: 513-27.
6. Koller M, Kotzmann H, Clodi M, Riedl M, Luger A. Effect of elevated serum prolactin concentrations on the immunophenotype of human lymphocytes, mitogen-induced proliferation and phagocytic activity of polymorphonuclear cells. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 662-6.
7. Mukherjee P, Mastro AM, Hymer WC. Prolactin induction of interleukin-2 receptors on rat splenic lymphocytes. *Endocrinology* 1990; 126: 88-94.
8. Gala RR, Shevach EM. Influence of prolactin and growth hormone on the activation of dwarf mice lymphocytes *in vivo*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 204: 224-30.
9. Berton E, Meltzer WMS, Holaday JW. Suppression of macrophage activation and T-lymphocytes function in hypoprolactinemic mice. *Science* 1988; 239: 401-4.
10. de Vlaming VL. Actions of prolactin among vertebrates. In: Knobil E, Sawyer WH, eds. *Hormones and evolution*. New York: Academic Press, 1979: 561-642.
11. Emanuele NV, Jurgens JK, Halloran MM, Tentler JJ, Lawrence AM, Kelley MR. The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternative spliced prolactin messenger RNA. *J Endocrinol* 1992; 136: 271-6.
12. Pellegrini I, Lebrun JJ, Kelly PA. Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1023-31.
13. Wu WX, Brooks J, Millar MR, Ledger WL, Saunders PTK, Glasier AF, McNeilly AS. Localization of the sites of synthesis and action of prolactin by immunocytochemistry and *in situ* hybridization within the utero-placental unit. *J Mol Endocrinol* 1991; 7: 241-7.
14. Steinmetz RW, Grant AL, Malven PV. Transcription of the prolactin gene in milk secretory cells of the rat mammary gland. *J Endocrinol* 1993; 136: 271-6.
15. Elsholtz HP, Lew AM, Albert PR, Sundmark VC. Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine. Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 22919-25.
16. Berwaer M, Monget P, Peers B, Mathy-Hartert M, Bellefroid E, Davis JR, Belayew A, Martial JA. Multihormonal regulation of the human prolactin gene expression from 5 000 bp of its upstream sequence. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 80: 53-64.
17. Berwaer M, Peers B, Nalda AM, Monget P, Davis JR, Belayew A, Martial JA. Thyrotropin-releasing hormone and epidermal growth factor induce human prolactin expression *via* identical multiple cis elements. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 92: 1-7.
18. Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS, Rosenfeld MG. Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 674-81.
19. Nalda AM, Martial JA, Muller M. The glucocorticoid receptor inhibits the human prolactin gene transcription by interference with Pit-1 activity. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 164: 129-37.
20. Pernasetti F, Caccavelli L, Van de Weerd C, Martial JA, Muller M. Thyroid hormone inhibits the human prolactin gene promoter by interfering with activating protein-1 and estrogen stimulations. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 986-96.
21. Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, Martial JA. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J* 1984; 3: 429-37.
22. Peers B, Voz ML, Monget P, Mathy-Hartert M, Berwaer M, Belayew A, Martial JA. Regulatory elements controlling pituitary-specific expression of the human prolactin gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4690-700.
23. He X, Treacy MN, Simmons DM, Ingraham HA, Swanson LW, Rosenfeld MG. Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature* 1989; 340: 35-41.
24. Theill LE, Karin M. Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. *Endocr Rev* 1993; 14: 670-89.
25. Bradford AP, Wasylyk C, Wasylyk B, Gutierrez-Hartmann A. Interaction of Ets-1 and the POU-homeodomain protein GHF-1/Pit-1 reconstitutes pituitary-specific gene expression. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1065-74.
26. Szeto DP, Ryan AK, O'Connell SM, Rosenfeld MG. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7706-10.
27. Ohta K, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Ohta T, Tohma T, Jinno Y, Endo F, Matsuda I. Characterization of the gene encoding human pituitary-specific transcription factor, Pit-1. *Gene* 1992; 122: 387-8.
28. de Zegher F, Pernasetti F, Vanhole C, Devlieger H, Van den Berghe G, Martial JA. The prenatal role of thyroid hormone evidenced by fetomaternal Pit-1 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3127-30.
29. Laverriere JN, Richard JL, Buisson N, Martial JA, Tixier-Vidal A, Gourdji D. Thyroliberin and dihydropyridines modulate prolactin gene expression through interacting pathways in GH3 cells. *Neuroendocrinology* 1989; 50: 693-701.
30. Hoggard N, Davis JR, Berwaer M, Monget P, Peers B, Belayew A, Martial JA. Pit-1 binding sequences permit calcium regulation of human prolactin gene expression. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1748-54.
31. Peers B, Nalda AM, Monget P, Voz ML, Belayew A, Martial JA. Binding of a 100-kDa ubiquitous factor to the human prolactin promoter is required for its basal and hormone-regulated activity. *Eur J Biochem* 1992; 210: 53-8.
32. Wera S, Belayew A, Martial JA. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, enhances transcription of a receptor gene containing sequence A of the human prolactin promoter. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 965-71.
33. De Camilli P, Macconi D, Spada A. Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin-secreting pituitary adenomas. *Nature* 1979; 278: 252-4.
34. Onali P, Eva C, Olivias MC, et al. In GH3 cells, acetylcholine and VIP antagonistically modulate adenylate cyclase, cyclic AMP content and PRL secretion. *Mol Pharmacol* 1983; 24: 189-94.
35. Peers B, Monget P, Nalda MA, Voz ML, Berwaer M, Belayew A, Martial JA. Transcriptional induction of the human prolactin gene by cAMP requires two cis-acting elements and at least the pituitary-specific factor Pit-1. *J Biol Chem* 1991; 266: 18127-34.
36. Wera S, Belayew A, Martial JA. Rapamycin, FK506 and cyclosporin A inhibit human prolactin gene expression. *FEBS Lett* 1995; 358: 158-60.
37. Sabharwal P, Glaser R, Lafuse W, Varma S, Liu Q, Arkins S, Kooijman R, Kutz L, Kelley KW, Malarkey WB. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7713-6.
38. DiMattia GE, Gellersen B, Duckworth ML, Friesen HG. Human prolactin gene expression. The use of an alternative noncoding exon in decidua and the IM-9-P3 lymphoblast cell line. *J Biol Chem* 1990; 265: 16412-21.
39. Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, DiMattia GE. Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 356-73.
40. Berwaer M, Martial JA, Davis JR. Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 635-42.
41. Delhase M, Vergani P, Malur A, Hooghe-Peters EL, Hooghe RJ. The transcription factor Pit-1/GHF-1 is expressed in hemopoietic and lymphoid tissues. *Eur J Immunol* 1993; 23: 951-5.

Summary

Transcriptional regulation of the human prolactin gene

The human prolactin gene is mainly expressed in the anterior pituitary under the control of the transcription factor Pit-1. Positive and negative regulatory elements have been identified in the 5'-flanking region of the *hPRL* gene. Binding sites for the cell-specific factor Pit-1 and for ubiquitous factors were identified in a more than 5 000 base pair long upstream region. In addition, prolactin expression is modulated by extracellular factors such as dopamine, thyrotropine releasing hormone, thyroid hormone and steroids. Factors acting through signal transduction pathways (cAMP, Ca²⁺) regulate *hPRL* expression mainly via the proximal promoter (-250/+1). Protein-kinases and -phosphatases modulate the activation function of transcription factors Pit-1, AP1 and other, binding to their respective sites on the promoter. The estrogen receptor activates *hPRL* expression by binding to a distal response element, while glucocorticoid and thyroid hormone receptors repress *hPRL* gene transcription by interfering with the activating function of, respectively, Pit-1 and AP1. In extrapituitary cells, transcription of the *hPRL* gene is initiated at an alternative, far upstream, site and *hPRL* expression is controlled by a lymphocyte-specific element. Binding sites for cell-specific and ubiquitous factors were detected in this region.

Alsace-France, 25-28 septembre / September 25-28

Cascades de prolifération et proto-oncogènes Proliferation cascades and protooncogenes



Hormones et Régulation Cellulaire XXIII^e Symposium Européen du Mont S^o-Odile

Hormones and Cell Regulation XXIIIrd European Symposium of Mont S^o-Odile

INSCRIPTION ET SOUMISSION DES RÉSUMÉS
REGISTRATION AND SUBMISSION OF ABSTRACTS
DATE LIMITE : 15 JUIN 98 / DEADLINE: JUNE 15, 98

INFORMATION ET INSCRIPTION INFORMATION AND INSCRIPTION

Jacques E. Dumont, Symposium S^o-Odile
IRIB-PH, ULB, Faculté de Médecine, Campus Erasme (CP 601)
Rouge de Louvain 808, B - 1078 Bruxelles, Belgique
Fax : (33) 32 1 555 46 55 - E-mail : jedumont@ulb.ac.be

98
1998

Récepteurs et cascades prolifératives
Receptors and proliferative cascades

Protéines kinases
Protein kinases

Facteurs de transcription
Transcription factors

Cyclines CDK, Rb
CDK, Rb cyclins

AVEC L'AIDE DE
SUPPORTED BY

INSERM
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ
ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE

COMITÉ SCIENTIFIQUE / SCIENTIFIC COMMITTEE

E.P. Cleeves (France) F. Hofmann (Allemagne)
J.E. Dumont (Belgique) K.F. Irvine (Royaume-Uni)
S. Gammeltoft (Danemark) M. Parker (Royaume-Uni)
B. Groner (Allemagne) L.A. Pines (Italie)
J. Hicoque (France)

COMITÉ D'ORGANISATION / ORGANISING COMMITTEE

Président / Chairman: S. Gammeltoft (Danemark)
J.E. Dumont (Belgique) B. Groner (Allemagne)
L.A. Pines (Italie)

ORGANISATEURS LOCAUX / LOCAL ORGANISERS

M.-F. Bader (France) F. Hader (France)

CONFÉRENCIERS CONFIRMÉS / CONFIRMED LECTURERS

D.R. Alexander (Royaume-Uni) G. Kremer (France)
B. Anas (Italie) H. Lind (Royaume-Uni)
K. Anderson (Royaume-Uni) J.R. Nevins (États-Unis)
J. Bartek (Danemark) E. Nigg (Suisse)
R. Bernards (États-Unis) I. Krenske (Suisse)
J.L. Bos (Pays-Bas) P. Otsu (Japon)
P. Chambon (France) G. Thomas (Suisse)
G.F. Cozzata (Italie) A. Ulivis (Allemagne)
B. Groner (Allemagne) E. Gubits (Allemagne)
E. Gubits (Allemagne) K. Hata (Italie)
K. Hata (Italie) P.A. Kelly (France)
P.A. Kelly (France)

CONFÉRENCES JACQUES MONOD 1998

INTERACTIONS ENTRE LES PARASITES ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE : Protection ou pathologie ?

AUSOIS (France) - 14-18 septembre 1998

Président : WILSON R. Alan
University of York, Department of Biology, P.O. Box 373, UK-York YO1 5YW, United Kingdom
Phone - Téléphone : + 44 1904 432 830 - Fax - Télécopie : + 44 1904 432 884
E-mail - Courtier électronique : raw3@york.ac.uk

Conférenciers : Barrel-Netto M., Behr C., Buzoni-Gatel D., Capron A., Correa-Oliveira R., Dessein A., Dobbelaere D., Druilhe P., Dubremetz J.-F., Finkelmann F., Grau G., Grecis R., Grimaud J.-A., Gross U., Hill A., Hoffman S., Hontebeyrie M., Kaslow D., Langhorne J., Louis J., Maizels R., Miller H., Milon G., Nutman T., Puijalon O., Riley E., Scott P., Sher A., Wilson R.A.

TIRÉS À PART

M. Muller.

m/s n° 5, vol. 14, mai 98