

Université de Montréal

**RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE INHIBITRICE
DU GÈNE DE LA PROLACTINE DE RAT**

par

Dominic Devost

Département de Médecine

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae

Doctor (Ph.D.) en sciences biomédicales

Février 1999

© Dominic Devost, 1999



W
4
U58
2001
v. 012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette Thèse intitulée :

**RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE INHIBITRICE
DU GÈNE DE LA PROLACTINE DE RAT**

présenté par :

Dominic Devost

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. André Lacroix, Président rapporteur

Dr. Jean-Marie Boutin, Membre du jury

Dr. Sylvie Mader, Membre du jury

Dr. Hans H. Zingg, Examineur externe

Thèse acceptée le :

SOMMAIRE

La prolactine (PRL) est une hormone de l'hypophyse antérieure produite et sécrétée par les lactotrope. La régulation de la synthèse et de la sécrétion de la PRL est sous l'influence répressive de la dopamine hypothalamique. L'hormone exerce également un contrôle sur la fonction lactotrope en modulant l'activité des neurones dopaminergiques via une boucle d'autorégulation dite "courte". Cependant, on ne reconnaît, encore, aucune action régulatrice directe de la PRL au niveau des lactotrope. Pourtant, la présence de récepteurs de la PRL à la surface des lactotrope est un indice favorable à l'existence d'une telle boucle d'autorégulation "extra-courte". Malgré de nombreuses publications sur ce sujet controversé, aucune étude n'a abordé l'action de la PRL sur la transcription de son propre gène. Cette question fait l'objet du manuscrit présenté au cinquième chapitre.

Pour ce faire, des cellules somatomammotrope de rat, GC (qui ont la capacité d'activer le gène de la PRL sans pour autant sécréter l'hormone) ont été transfectées de façon transitoire avec une construction plasmidique contenant 3000 pb de la région 5'-régulatrice du gène de la PRL de rat insérée en amont du gène rapporteur de la luciférase. De plus, les cellules ont été co-transfectées avec un vecteur d'expression du récepteur de la PRL afin de sensibiliser les GC à une action potentielle de l'hormone. Les cellules ainsi traitées ont été incubées 48 heures en absence ou en présence de PRL ovine (oPRL). Les résultats montrent que la PRL réprime de façon importante l'activité de son promoteur. Cette inhibition est spécifique au gène de la PRL et n'est pas reproduite dans des lignées cellulaires contrôles de foie et de glande mammaire, deux tissus cibles de l'action de la PRL. L'utilisation de mutants délétionnels du promoteur indique que l'action répressive de la PRL s'exerce sur les deux sous-régions régulatrices. Enfin, l'action inhibitrice de la PRL fut reconfirmée avec une lignée cellulaire de rat sécrétant cette hormone, les cellules GH3, par immunoneutralisation. L'ensemble de ces résultats suggère que la PRL pourrait exercer un contrôle important sur l'expression de son propre gène *in vivo*.

COUP-TFII (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription FactorII) est un récepteur nucléaire orphelin connu surtout comme répresseur de la transcription. Le clonage de son ADNc à partir d'une banque d'hypophyse de rattes traitées aux

oestrogènes suggère un rôle possible du récepteur nucléaire dans le contrôle de l'expression du gène de la PRL au niveau hypophysaire. Le chapitre 6 rend compte des résultats d'expériences basées sur cette dernière hypothèse.

Des expériences de transfections transitoires sur la lignée somatomammotrope GC montrent que COUP-TFII inhibe fortement et spécifiquement l'activité du promoteur du gène de la PRL. L'utilisation de mutants délétionnels du promoteur indique que la répression exercée par COUP-TFII implique seulement l'enhancer distal. Des études de footprinting et de mutagenèse sur l'enhancer ont permis d'isoler un fragment d'ADN de 26 pb responsable de près de 90% de l'activité basale associée à l'enhancer ainsi que de la majeure partie de l'action répressive de COUP-TFII. Des études d'EMSA utilisant des extraits nucléaires de cellules GC montrent que COUP-TFII fixe ce fragment de façon spécifique. De plus, ce même élément est le site d'action du récepteur orphelin NGFI-B dont l'effet stimulateur sur l'activité du promoteur peut être antagonisé par COUP-TFII. En effet, d'autres études d'EMSA indiquent que COUP-TFII déplace la liaison de NGFI-B sur son élément de réponse. Enfin, la détection de plusieurs protéines, de masses moléculaires distinctes, pouvant lier le fragment de 26 pb suggère que cet élément est un carrefour important de régulation du promoteur. L'ensemble des résultats permet de postuler que COUP-TFII est un régulateur puissant de l'expression du gène de la PRL et exerce son action en déplaçant la liaison d'un récepteur nucléaire stimulateur, de la famille des récepteurs NGFI-B. L'action des deux récepteurs s'exerce sur un nouvel et important élément fonctionnel de l'enhancer qui est crucial à l'activité optimale du gène de la PRL de rat.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xiv
PREMIÈRE PARTIE: REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	16
CHAPITRE 1: GÉNÉRALITÉS SUR LA PROLACTINE.....	17
1.1 Historique.....	18
1.2 Structure de la prolactine.....	18
1.3 Sites de production.....	20
1.4 Régulation de la production et de la sécrétion de la PRL hypophysaire...	22
1.4.1 Généralité.....	22
1.4.2 PIFs.....	25
1.4.3 PRFs.....	26
1.4.4 Facteurs autocrines/paracrines.....	27
1.4.5 Effets des interactions physiques entre lactotropes.....	28
1.4.6 Action intracrine de la PRL dans les lactotropes.....	29
1.4.7 Conclusion.....	29
1.5 Récepteurs de la PRL et voies de signalisation intracellulaires.....	30
1.6 Rôles biologiques de la PRL.....	31
1.6.1 Lactation.....	33
1.6.2 Reproduction.....	33
1.6.3 Immunomodulation.....	34
CHAPITRE 2: L'ONTOGÉNIE DE L'HYPOPHYSE ANTÉRIEURE.....	36
2.1 Origine anatomique.....	37
2.2 Séquence d'apparition des différentes lignées endocriniennes	

de l'antérophypophyse:.....	37
2.3 Facteurs moléculaires impliqués dans l'ontogénie de l'hypophyse antérieure.....	38
2.3.1 Ptx1/P-OTX:.....	38
2.3.2 RPX.....	38
2.3.3 Les facteurs LIM: LH2, P-LIM-3/Lhx3 et Lhx4:.....	40
2.3.4 Prop-1.....	40
2.3.5 Pit-1/GHF-1.....	41
2.3.6 Les récepteur des estrogènes.....	45
2.3.7 Le récepteur de la GHRH (GHRH-R) et le facteur CREB (cAMP response element binding protein).....	47
2.3.8 TEF (thyrotroph embryonic factor).....	48
2.3.9 SF-1 (Steroidogenic Factor 1).....	48
2.3.10 NGFI-A (Egr-1, Krox-24, zif/268).....	49
2.3.11 Le récepteur RXR γ	50
2.3.12 NeuroD1/ β 2.....	50
2.3.13 Zn-15.....	51
2.4 Conclusion.....	51

CHAPITRE 3: LA RÉGION RÉGULATRICE DU GÈNE DE LA PRL DE RAT.....

3.1 Introduction.....	56
3.2 Structure du gène et description superficielle de la région régulatrice localisée en 5' du gène.....	56
3.3 Effets de la méthylation sur l'activité du gène.....	59
3.4 Le promoteur proximal.....	59
3.5 Enhanceur distal.....	69
3.6 Conclusion.....	71

CHAPITRE 4: LA FAMILLE DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES ORPHELINS COUP-TF.....

4.1	Généralité sur les récepteurs nucléaires.....	74
4.2	La famille COUP-TF.....	74
4.2.1	Introduction.....	74
4.2.2	Structure des éléments de réponse COUP-TF.....	77
4.2.3	Mécanismes d'action de COUP-TF.....	77
4.2.3.1	Compétition pour l'élément de réponse.....	78
4.2.3.2	Hétérodimérisation avec le récepteur RXR.....	78
4.2.3.3	Répression active.....	79
4.2.3.4	Transrépression.....	80
4.2.3.5	Transactivation.....	81
4.2.4	Expression tissulaire de COUP-TF.....	82
4.2.5	Rôles physiologiques proposés de COUP-TF.....	83
4.3	Conclusion.....	86

DEUXIÈME PARTIE: PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

ET DISCUSSION.....	88
---------------------------	-----------

CHAPITRE 5: AUTOREGULATION OF THE RAT PROLACTIN

GENE IN LACTOTROPHS.....	89
---------------------------------	-----------

Abstract.....	90
Introduction.....	90
Materials and methods.....	91
Results.....	92
Discussion.....	94
Acknowledgements.....	98
References.....	98

CHAPITRE 6: REGULATION OF THE RAT PROLACTIN GENE

TRANSCRIPTION BY THE ORPHAN RECEPTORS

COUP-TFII AND NUR77 ON A NEWLY DEFINED

SITE OF THE DISTAL ENHANCER.....	101
---	------------

Abstract.....	102
Introduction.....	104
Materials and methods.....	109
Results.....	116
Discussion.....	123
Legends.....	129
References.....	136
CHAPITRE 7: DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	156
7.1 Autorégulation du gène de la PRL de rat au niveau de la transcription...	157
7.2 COUP-TFII est un régulateur puissant de la transcription du gène de la PRL de rat dans les lactotropes.....	163
7.3 Conclusion finale.....	170
BIBLIOGRAPHIE.....	172

LISTE DES FIGURES

Première Partie: Revue de la Littérature

Figure 1.	Schéma des réseaux neuronaux et vasculaires de l'hypophyse.....	24
Figure 2.	Schéma de la signalisation intracellulaire induite par la liaison de la prolactine à ses récepteurs de formes longues et courtes.....	32
Figure 3.	Représentation d'un modèle du développement des différentes cellules endocriniennes de l'hypophyse antérieure et des quelques facteurs transcriptionnels impliqués.....	53
Figure 4.	Cartographie des éléments- <i>cis</i> retrouvés dans la partie 5'-régulatrice du gène de la prolactine de rat.....	57

Deuxième Partie: Présentation des Manuscrits et Discussion

CHAPITRE 5:

Figure 1.	Comparison of the expression of the prolactin receptor between the Nb2 cells and the pituitary cell lines GC and GH3.....	93
Figure 2.	Influence of the type of PRL receptor cotransfected in GC cells on the regulation of the 3kb-PRL reporter by oPRL.....	94
Figure 3.	Evaluation of the expression of the two types of PRLR expression vectors after cotransfection.....	95
Figure 4.	Effect of endogenous rPRL and exogenous oPRL on the expression of the rPRL promoter in GH3 cells in the presence of anti-rGH or anti rPRL antisera.....	96
Figure 5.	Cellular and gene specificity of the effect of oPRL on the rPRL gene promoter.....	96
Figure 6.	Effect of oPRL on deletional mutants of the rPRL promoter in GC cells.....	97

CHAPITRE 6:

Figure 1.	Schematic representation of the 5'-regulatory region of the rat PRL gene....	146
Figure 2.	Effect of COUP-TFII on various pituitary gene promoters in GC cells.....	147
Figure 3.	Gross mapping of the repressive effect of COUP-TFII on PRL promoter gene activity.....	148
Figure 4.	Footprinting analysis using recombinant COUP-TFII revealed 2 protected regions on the distal enhancer.....	149

Figure 5.	Effect of mutations made along the distal enhancer between -1769 and -1699 on the repressive action of COUP-TFII.....	150
Figure 6.	Binding of nuclear proteins to the -1731 to -1706 DNA fragment COUPRE probe.....	151
Figure 7.	COUP-TFII has an antagonistic effect on stimulation of PRL promoter activity by Nur77 but not by estrogen. The COUPRE DNA fragment (-1731 to -1706) is a Nur77 responsive element.....	152
Figure 8.	Binding of a Nur77-related factor, present in GC nuclear extracts, on COUPRE is revealed when COUP-TFII is titrated by an excess of DR-1 responsive element.....	153
Figure 9.	Direct binding competition on the -1731 to -1706 COUPRE DNA probe between COUP-TFII and Nur77 <i>in vitro</i>	154
Figure 10.	South-Western analysis shows the multiplicity of nuclear proteins from GC cells that binds to the COUPRE oligonucleotide probe.....	155

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACTH	Adrenocorticotropie hormone
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
COUP-TF	Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor
DBD	DNA-binding domain
DR	Direct repeat
E2	Estradiol
EMSA	Electrophoresis mobility shift assay
ER	Estrogen receptor
FSH	Follicle stimulating hormone
GH	Growth hormone
IRF-1	Interferon regulatory factor-1
JAK-2	Janus family of protein tyrosine kinase-2
KDa	Kilo Dalton
KO	(gene) Knock-out
LBD	Ligand-binding domain
LH	Luteinizing hormone
MAPK	Mitogen-associated protein kinase

N-CoR	Nuclear receptor corepressor
pb	paire de base
PIF	Prolactin-inhibitory factor
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PMA	Esters de phorbol
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRF	Prolactin-releasing factor
PRL	Prolactine
PRLR	Récepteur de la prolactine
RAR	Retinoic acid receptor
RXR	Retinoid X receptor
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	Sérine
SMRT	Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SNC	Système nerveux central
STAT-5	Signal transducers and activators of transcription-5
T3	Triiodothyronine
Thr	Thréonine
TR	Thyroid hormone receptor
TRH	Thyrotropin-releasing hormone
TSH	Thyroid-stimulating hormone

Tyr	Tyrosine
VDR	Vitamin D receptor

Acides nucléiques

A	Adénine
C	Cytosine
G	Guanine
T	Thymine

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier, d'abord, le docteur Jean-Marie Boutin qui a été plus qu'un directeur de thèse mais, également, un complice dans mes élans d'enthousiasmes débordants et un ami. Peu de personnes savent tirer le meilleur des gens et de les amener à aller plus loin, à se surpasser...c'est ce que Jean-Marie a fait avec moi et, pour cela, je lui suis grandement reconnaissant. Je souhaite, et espère, que nos chemins se croiseront encore pour de nombreuses années.

Viennent ensuite les membres et amies du laboratoire Nutrition et cancer/Endocrinologie moléculaire: Sylvie Oble, Mélanie Dieudé, Nina N'Diaye, Julie Guimon et Nathalie Chow lan. Je garderai un souvenir d'elles comme étant les plus charmantes collègues de travail qui m'a été donné de côtoyer sans oublier, bien sûr, l'incontournable Irène Rémillard, une secrétaire unique par son professionnalisme et sa grande bonté de coeur. J'ai également une pensée pour le docteur Pangala Bhat, témoin de mes péripéties quotidiennes et qui a toujours été de bon conseil.

Un merci sincère à toute l'équipe du centre de recherche et plus particulièrement à ceux du laboratoire d'en face (croissance cellulaire) ainsi qu'à monsieur Régis Tremblay, coordinateur technique. Je laisse des amis dont je garde un excellent souvenir.

Enfin, c'est grâce aux encouragements continus, au support quotidien, à la patience infinie et son courage indéfectible dont elle a su toujours garder, même dans les moments les plus difficiles, que ma dernière pensée lui est dédiée, à ma femme, Guylaine Grenon. Cette thèse de doctorat lui est dédiée.

À ma femme,

PREMIÈRE PARTIE

REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1

GÉNÉRALITÉS SUR LA PROLACTINE

1.1) Historique sur la prolactine:

La prolactine (PRL) est l'hormone de l'hypophyse antérieure pour laquelle on connaît le plus d'activités biologiques: plus de 85 dans le règne des vertébrés. Dernièrement, cette liste a été majorée à plus de 300 activités biologiques (1). L'isolation et la caractérisation d'un tel facteur aux actions pléiotropiques se sont étalées sur une période de 50 ans. Les premières évidences de l'existence de la PRL remontent aux années 1920 alors qu'on a montré qu'un extrait hypophysaire provoquait la lactation chez une lapine pseudogestante (2). Il fut également remarqué qu'un extrait d'hypophyse antérieure stimulait la sécrétion lactée du "crop sac" chez le pigeon (3); ce phénomène biologique est à la base du dosage classique de la PRL bioactive. La PRL fut isolée pour la première fois, exempte d'hormone de croissance (GH), d'hypophyses humaines congelées en 1971 (4). En même temps, son dosage quantitatif par radioimmunoessai fut développé par Friesen (5). En 1977, Shome et Parlow (6) publient la séquence des 199 acides aminés constituant la chaîne polypeptidique de la PRL. Enfin, c'est au début des années 80 que l'ADNc ainsi que le gène de la PRL ont été clonés et séquencés (7,8).

1.2) Structure de la prolactine:

La PRL "standard" est une protéine formée d'une seule chaîne polypeptidique de 23 KDa contenant 3 ponts disulfures, principalement produite par les cellules lactotropes de l'hypophyse antérieure. En plus de ces ponts disulfures, la PRL possède des sites de N-glycosylation (et chez certaines espèces des sites de O-glycosylation) ainsi que trois sites de phosphorylation (43). Un modèle proposé de la structure tridimensionnelle de la PRL, basé sur des études de cristallographie aux rayons-X de la GH, prédit qu'elle est composée de quatre hélices regroupées en structures anti-parallèles (44). Cette propriété structurale est retrouvée dans plusieurs facteurs hématopoïétiques tels l'interféron, plusieurs interleukines et le facteur neurotrophique ciliaire. Cette conservation de structure est le reflet d'une structure primaire bien conservée puisque les séquences de la PRL de mouton, de boeuf, de porc et de l'homme sont identiques à près de 70% (45). La structure primaire et l'activité de la PRL se superposent de façon importante à celle de

l'hormone de croissance (GH) ainsi qu'à celle de l'hormone placentaire hPL, suggérant une évolution à partir d'un précurseur commun (45). En plus des formes de PRL obtenues par épissage alternatif du message, la majorité des variantes de la PRL standard décrites sont des produits de modifications post-traductionnelles résultant en des PRL de tailles différentes aux propriétés chimiques diverses. Malgré cette diversité, peu de ces molécules partagent les activités biologiques de la PRL de 23 KDa (46). Les PRL de grandes tailles sont formées par l'agrégation ou la polymérisation de molécules de PRL et par la formation d'un complexe PRL-immunoglobulines. Les PRL de petites tailles sont le résultat de digestions protéolytiques aux sites de production ou au niveau des tissus cibles (47). Deux de ces formes attirent l'attention: les formes de 22 KDa et de 16 KDa. La PRL de 22 KDa est obtenue par digestion à la kallikréine, une enzyme abondante dans les lactotropes. La production de cette forme dépend du sexe, des oestrogènes et de la dopamine; l'abondance prépondérante de cette hormone chez la femelle plutôt que chez le mâle suggère un rôle important de la PRL dans le système reproducteur féminin (48). Quant à la forme de 16 KDa, elle a l'intéressante propriété d'être anti-angiogénique. Elle est produite en deux étapes: d'abord une coupure par une protéase de la classe de la cathepsine D qui génère une PRL composée de deux chaînes polypeptidiques de 16 et de 8 KDa reliées par un pont disulfure, suivie de la réduction de ce dernier libérant alors les deux chaînes (47). La PRL de 16 KDa exerce son action en inhibant la croissance basale et stimulée par le FGF et le VEGF des cellules endothéliales des capillaires (49, 50).

Enfin, la PRL peut-être glycosylée ou phosphorylée. Le taux et la nature de la glycosylation de l'hormone varient d'une espèce à l'autre et cette modification semble peu modulée (51). Le rôle de la glycosylation n'est pas fixé puisque aucune activité biologique spécifique n'a encore été associée à ces formes; la glycosylation tendrait à diminuer la bioactivité de la PRL. La PRL peut-être mono ou di-phosphorylée sur des sérines et/ou des thréonines amenant une distribution de charges différentes sur la molécule. Contrairement à la glycosylation, la phosphorylation est modulée par le cycle menstruel et la gestation (52). L'équipe d'Ameae Walker a remarqué qu'une des formes de PRL phosphorylée (isoforme 2) réprime, par un mécanisme autocrine/paracrine, la sécrétion de la PRL de forme native dans la lignée cellulaire somatomammotrope GH3 (53).

1.3) Sites de production:

La principale source de PRL sérique provient de l'hypophyse antérieure et plus précisément d'un groupe de cellules spécialisées: les cellules lactotropes. Ces cellules acidophiles représentent entre 20 à 50% du nombre total de cellules hypophysaires. Sur la base de critères morphologiques, les lactotropes sont regroupées en deux grands groupes: les lactotropes aux cytoplasmes densément granulaires qui tiendraient le rôle de cellules de réserve et les lactotropes peu granulaires retrouvés souvent dans les prolactinomes (54). Les premières sont ovoïdes et contiennent un réticulum endoplasmique très développé ainsi qu'un appareil de Golgi proéminent et contiennent, en plus, un grand nombre de granules de sécrétion mesurant 400 à 700 nm. Ces cellules représentent les lactotropes matures retrouvées chez l'adulte (55). Les lactotropes peu granulaires, quant à elles, sont de petites cellules de forme polyédrique contenant un réticulum important, un Golgi bien développé et de petites particules de sécrétion de 200-350 nm (56). Ce sont des cellules dites intermédiaires qui apparaissent plus tard. On retrouve également, durant le développement, de petites cellules contenant de très petits granules; ce sont les lactotropes dites immatures (55). L'âge et le sexe influencent grandement la nature et le nombre des lactotropes dans l'hypophyse. La présence des estrogènes et de la dopamine exerce également, sur ces cellules, des changements significatifs. En effet, outre ces effets sur la production de la PRL et sur la prolifération des cellules lactotropes, les estrogènes augmentent le nombre de cellules matures au détriment des cellules intermédiaires et immatures (55). Au contraire, la bromocriptine, un agoniste de la dopamine, réprime la croissance des cellules matures au profit des cellules des deux autres types (55).

Il existe également un groupe de cellules hypophysaires pouvant sécréter à la fois la PRL et la GH, les somatomammotropes, qui possèdent la propriété de s'inter-converter en lactotrope ou en sommatotrope selon le stimulus (57). Ce sont de petites cellules de formes irrégulières contenant de très petits granules (58). Elles sont présentes dès la naissance et représentent chez le rat adulte près du tiers de toutes les cellules produisant la GH et/ou la PRL (59). Le rôle précis que tiennent ces cellules reste à éclaircir. Il a été rapporté que ces cellules peuvent s'interconvertir en sommatotropes ou en lactotropes et les

sommatomammotropes peuvent, donc, représenter des cellules en stade de transition. D'autres croient plutôt qu'elles sont les cellules souches des lactotropes et des sommatotropes (60). Enfin, les sommatomammotropes pourraient représenter une lignée endocrinienne en soi (55).

Les lactotropes représentent un groupe de cellules hétérogènes. L'hétérogénéité des lactotropes s'étend à différents niveaux: la sécrétion sécrétion basale, les activités électriques et les réponses aux sécrétagogues (47). L'étude des caractéristiques des lignées clonales, isolées de tumeurs hypophysaires, est très instructive à cet égard (61). La lignée clonale GH3 provient d'une tumeur à PRL et à GH obtenue par irradiation aux rayons X d'une rate Wistar-Furth (62). Ces cellules GH3 sont, en fait, une population hétérogène de quatre lignées différentes: des sommatotropes, des lactotropes, des sommatomammotropes et des cellules non-sécrétrices. La grande plasticité phénotypique de cette lignée peut être modulée par des traitements hormonaux: après 6 jours de culture en présence d'estrogène, les GH3 deviennent toutes des lactotropes mais un traitement au cortisol résulte, plutôt, en une population égale de sommatotropes et de sommatomammotropes (63).

Les études sur la régulation transcriptionnelle du gène de la PRL sont basées sur l'analyse d'une population générale de cellules transfectées avec un gène rapporteur, souvent la luciférase, dont l'activité est modulée par la région 5' régulatrice du gène de la PRL. Ces données nous portent à penser que toutes les cellules d'une même population se comportent de la même façon. Dernièrement, la mesure individuelle de l'activité luciférase, prise sur chaque cellule d'une lignée clonale de GH3 transfectées de façon stable avec une construction constituée du gène luciférase dont l'expression est modulée par les 5000 premières pb de la région régulatrice du gène de la PRL humaine, montre une grande hétérogénéité d'activité de base et de réponses aux stimulés (64). Une autre démonstration de cette hétérogénéité a également été identifiée, deux ans plus tôt, par l'équipe du Dr Stephen Frawley en micro-injectant, cette fois, le promoteur de la PRL de rat dans des cellules hypophysaires. En plus d'observer une activité basale variable d'une cellule à l'autre, il a également remarqué qu'elle variait d'un jour à l'autre et que la réponse à la dopamine et à l'EGF en faisait tout autant (65). Les lactotropes et les

somatomammotropes représentent, donc, un groupe de cellules possédant des propriétés dynamiques et hétérogènes donnant à l'hypophyse une flexibilité suffisante afin de répondre à tous les besoins en prolactine.

L'hypophyse n'est pas le seul tissu capable de produire et sécréter de la PRL. En effet, des rats hypophysectomisés pouvaient vivre de 6 à 8 mois (66). L'équipe d'Eva Nagy et d'Istvan Berczi a analysé plus en détail ce phénomène sur des rates Fischer 344 hypophysectomisées (67). Malgré l'ablation de l'hypophyse, le sérum de ces rats contenait de 10 à 20% d'activité lactogénique qui pouvait être grandement abaissée par l'injection d'anticorps anti-PRL de rat, amenant une réduction de l'espérance de vie à 8 semaines. Cependant, 7 semaines après l'opération, la prolactinémie de ces rats s'est mise à augmenter pour atteindre 50% des niveaux normaux. L'ensemble des résultats suggère que la PRL extrahypophysaire contribue de façon non négligeable à la prolactinémie et que cette PRL peut compenser en partie la déficience en PRL hypophysaire. La production extrahypophysaires de PRL est étendue à plusieurs tissus: les cellules neuronales du cerveau, les glandes lacrymales, le thymus et les nodules lymphoïdes, le tissu mammaire, les lymphocytes de la rate et les cellules lymphoïdes de la moelle osseuse, les fibroblastes de la peau, le myomètre et les cellules stromales de la décidua (47). La PRL est retrouvée dans à peu près tous les liquides corporels: le liquide cérébraux-spinal, les larmes, le lait, l'urine, le liquide folliculaire et amniotique et, bien sûr, le sérum (47).

1.4) Régulation de la production et la sécrétion de la PRL hypophysaire:

1.4.1) Généralités:

Chez les vertébrés, l'hypophyse est composée de trois lobes distincts: le lobe antérieur ou adénohypophyse, le lobe postérieur ou neural et le lobe intermédiaire dont la présence est évidente dans l'hypophyse de rat, l'hypophyse fœtale humaine et celle de la femme enceinte mais peu visible chez l'adulte. La glande est reliée à l'éminence médiane hypothalamique par la tige hypophysaire. L'hypophyse est une glande irriguée par deux systèmes portes vasculaires: un système dit "long" reliant l'hypothalamus à

l'adénohypophyse ainsi qu'un système porte court prenant naissance au lobe neural et jetant ses vaisseaux afférents dans l'hypophyse antérieure (352). La figure 1 montre un schéma simplifié de l'organe ainsi que des afférences neuronales hypothalamiques influençant les fonctions de la glande.

L'hypophyse antérieure se compose de cinq types de cellules endocriniennes: les corticotropes produisant et sécrétant l'ACTH, les gonadotropes pour la LH et la FSH, les thyrotropes pour la TSH, les sommatotropes pour la GH et les lactotropes pour la PRL. À l'exception des lactotropes, la sécrétion hormonale des autres lignées cellulaires est sous le contrôle prédominant de facteurs de relâche hypothalamiques spécifiques pour chacune d'elles. Récemment, une étude de Villalobos *et al.* semble remettre en cause le dogme "un facteur de relâche spécifique pour chaque hormone" grâce à l'utilisation de techniques ultrasensibles permettant la mesure de paramètres physiologiques prise sur chaque cellules individuelles (353). Les données suggèrent que chaque type cellulaire ne forme pas une population homogène mais est plutôt constitué d'un ensemble de sous-populations de cellules sécrétant la même hormone mais pouvant être stimulées soit par leur facteur de relâche, qui leur est associé, ou par tous les autres facteurs. L'hétérogénéité de la réponse aux facteurs de relâche est la plus grande pour les lactotropes. Cependant, et à la différence des autres types cellulaires, la régulation de l'activité endocrinienne des lactotropes est fondée, principalement, sur la répression tonique par les noyaux dopaminergiques.

Les taux de PRL sériques sont moins de 20 ng/ml chez la femme et inférieurs à 15 ng/ml chez l'homme et suivent un cycle circadien avec un pic de sécrétion durant la nuit et un nadir à la mi-journée (45); ce cycle ne suit pas une courbe lisse mais est plutôt constitué d'environ 14 pics pulsatils rythmés aux heures et demies (354). Ces taux varient également selon l'âge de l'individu, certains états physiologiques et stimuli externes. Par exemple, chez le fœtus et la femme enceinte, on observe une hausse parallèle très importante de la prolactinémie qui, après la naissance (ou post partum), chute dramatiquement mais reste soutenue chez la mère durant l'allaitement grâce à la stimulation des seins (355). La prolactinémie peut également être influencée par le stress et l'exercice, les repas, la stimulation vaginocervicale, la consommation d'agents neuroleptiques et le

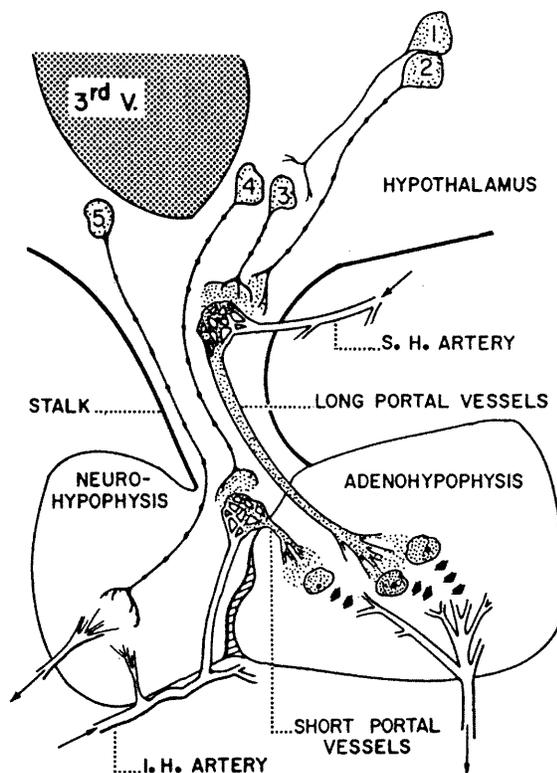


Figure 1: Schéma des réseaux neuronaux et vasculaires de l'hypophyse. Les cellules 1 et 2 sont des neurones monoaminergiques. Les cellules 3 et 4 sont des neurones qui sécrètent les facteurs de relâche hypothalamiques. La cellule 5 est un neurone peptidergique responsable de la sécrétion des hormones neurohypophysaires (figure tirée de la référence 352).

sommeil (355). Un désordre hyperprolactinémique peut être une conséquence de la présence d'un adénome lactotrope (30). La modulation des taux de PRL produite par les lactotrope est la résultante de l'action des PIFs (Prolactin inhibitory factor) et des PRFs (Prolactin releasing factor). Les paragraphes qui suivent élaboreront sur ces facteurs.

1.4.2) PIF:

Le retrait du tissu hypophysaire de son influence hypothalamique, en le transplantant dans la capsule rénale ou en provoquant une lésion hypothalamique ou, même encore, en sectionnant la tige pituitaire, mène systématiquement à une élévation de la prolactinémie. De ces observations, il a été conclu qu'un facteur hypothalamique appliquait une inhibition sur la sécrétion tonique de la PRL que l'on a appelé PIF (356 et 357). Depuis, la dopamine s'est révélée être ce PIF (358). D'autres PIFs ont été caractérisés mais la dopamine reste le plus important. Cette catécholamine exerce une influence majeure sur la production et la sécrétion de la PRL par les lactotrope (358).

La dopamine est synthétisée et acheminée vers les lactotrope via deux voies neuronales: les neurones tubéroinfundibulaires (TIDA) déversant la catécholamine dans le système porte long de l'éminence médiane et les neurones tubérohypophysaires dont les ramifications axonales terminent leur course dans les lobes postérieures et intermédiaires; ces deux voies n'agissent pas forcément en tandem et peuvent être différemment activées (359). La dopamine exerce une répression à la fois sur la transcription du gène de la PRL et sur la sécrétion de l'hormone via des récepteurs D2 couplés à l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase (228). On suspecte, également, que la catécholamine pourrait agir, aux niveaux des lysosomes, sur la dégradation de la PRL, car la présence d'inhibiteurs de l'activité des enzymes lysosomales, antagonisent l'action répressive de la dopamine sur la sécrétion de la PRL (360). Par ailleurs, à faible concentration, la dopamine stimulerait la sécrétion de la PRL via des récepteurs dopaminergiques différents (361, 362).

La PRL exerce un rétro-contrôle sur sa sécrétion en stimulant la synthèse et la sécrétion de la dopamine des neurones TIDA (363). La découverte, par

immunocytochimie et RT-PCR, de récepteurs pour la PRL sur les neurones TIDA suggère une action directe de la PRL sur ces neurones (364). Une désensibilisation de l'action de la PRL sur les neurones TIDA pourrait expliquer le maintien de l'hyperprolactinémie pendant la lactation chez le rat (365).

Il existe également d'autres PIFs. Le GABA (γ -Aminobutyric acid) exerce une inhibition de la sécrétion de la PRL directement au niveau des lactotropes ou indirectement en stimulant les neurones TIDA dopaminergiques (366). La somatostatine, en présence d'estradiol, inhibe directement la sécrétion des lactotropes (367). Le GAP (Gonadotropin-releasing hormone-associated peptide) est reconnu pour réprimer la stimulation de la sécrétion de la PRL pendant le stress et la lactation (368). Enfin, deux hormones périphériques, les glucocorticoïdes et l'hormone thyroïdienne T3 répriment l'expression du gène de la PRL (369, 370). Cependant, on a également rapporté des effets stimulateurs de la T3 (370).

1.4.3) PRFs:

Il n'existe encore aucun facteur de relâche officiellement reconnu pour la PRL malgré la découverte d'une pléthore de molécules capables de stimuler la sécrétion des lactotropes. Parmi les plus puissantes on retrouve la TRH, le VIP, ocytocine, la sérotonine, la substance P, l'EGF, la neurotensine, l'arginine-vasopressine, le PACAP38 (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide 38) et la galanine (359, 371, 372). On retrouve également des PRFs sécrétés par le lobe postérieur (373), la pars tuberalis (374) et le lobe intermédiaire (375).

Suite à la caractérisation du ligand d'un récepteur orphelin à 7 passages transmembranaires exprimé préférentiellement dans l'hypophyse, une équipe japonaise a découvert ce qui pourrait être un véritable facteur de relâche lactotrope (376). Le facteur PrRP (prolactin-releasing peptide) est un peptide de 31 acides aminés retrouvé majoritairement dans l'hypothalamus et stimulant spécifiquement la sécrétion de la PRL à des niveaux comparables à la TRH (376). Cette découverte prometteuse ouvre de

nouvelles possibilités pour une thérapie plus ciblée de l'hyperprolactinémie.

La prolactinémie est très influencée par les estrogènes notamment durant la grossesse et le cycle œstrien (359). Chez le rat, trois mécanismes permettent d'expliquer l'action des estrogènes: 1) une action directe sur les lactotropes en stimulant la transcription du gène, la synthèse, l'emmagasinage et la sécrétion de la PRL en plus de stimuler l'activité mitotique des cellules (377); 2) l'action des estrogènes sur l'hypothalamus varie selon la durée d'exposition à l'hormone: une exposition à court terme entraîne une hausse de l'expression et de la sécrétion de la dopamine des neurones TIDA mais une chute dramatique de la sécrétion de la catécholamine survient pendant une exposition prolongée (378, 379); 3) les estrogènes stimulent l'action des PRFs (comme le TRH) et répriment celle de la dopamine sur les lactotropes (380, 81).

1.4.4) Facteurs autocrines/paracrines:

En plus d'être sous le contrôle de facteurs endocriniens et neuroendocriniens, les lactotropes produisent et sécrètent plusieurs facteurs à action autocrine ou paracrine. Le TGF- β 1 inhibe la sécrétion de la PRL et la prolifération des lactotropes via une voie autocrine/paracrine (382). Cette voie de régulation de l'activité lactotrope semble importante puisque dans l'hypophyse, le récepteur pour le TGF- β 1 est majoritairement exprimé aux niveaux des lactotropes (383). Les estrogènes antagonisent l'action du TGF- β 1 en réprimant sa sécrétion ainsi qu'en bloquant l'expression de son récepteur (383). La galanine est un autre facteur autocrine/paracrine, induit massivement par les estrogènes, qui stimule, la sécrétion de la PRL (372).

L'article présenté au chapitre cinq appuie l'hypothèse que la PRL, elle-même, pourrait agir comme un facteur autocrine/paracrine sur les lactotropes. La forte concentration de PRL dans le système porte ainsi que l'expression du récepteur de la PRL à la surface des lactotropes sont deux indices qui supportent cette hypothèse. Krown *et al.* ont montré qu'une isoforme de la PRL, sécrétée par la lignée somatomammotrope GH3, agissait comme un facteur de croissance autocrine (384). Le manuscrit, présenté dans ces

pages, rappelle aux lecteurs les évidences expérimentales publiées montrant, dans des modèles d'organes isolés, de cellules isolées ou de lignées cellulaires établies, que la PRL, via une boucle d'autorégulation, réprimait sa propre sécrétion. Cependant, aucune étude n'a regardé l'action de la PRL au niveau de la transcription de son propre gène. Le manuscrit présente les premières évidences expérimentales que la PRL peut réprimer spécifiquement l'activité transcriptionnelle de son propre gène.

1.4.5) Effets des interactions physiques entre lactotropes:

Les lactotropes ne sont pas des entités isolées dans l'hypophyse mais forment, plutôt, des contacts entre cellules dont on commence à saisir le rôle et l'importance. D'ailleurs, par microscopie, on a observé des contacts de type "Gap Junction" presque uniquement entre lactotropes (386). Rappelons que les "Gap Junctions" permettent aux cellules, en contact, d'échanger de petites molécules entre-elles. En utilisant un test fonctionnel de diffusion d'un agent fluorescent de bas poids moléculaire dans un morceau de glande hypophysaire, Morand *et al.* ont montré que le fluorochrome diffusait surtout entre lactotropes (387). Une étude plus poussée révèle, cependant, que les "Gap Junctions" ne s'établissent pas directement entre lactotropes, mais plutôt, via le contact de cellules folliculostellaires (387). L'abondance marquée des "Gap Junctions" sur les lactotropes suggère que de tels contacts pourraient être importants dans la régulation des fonctions paracrines de ces cellules.

D'autre part, des études sur des dispersions de cellules montrent que le niveau de la sécrétion basale de PRL dépend de la densité cellulaire (388, 389). La réponse des lactotropes à certaines hormones (T3, glucocorticoïdes, 17 β -estradiol) et à la dopamine dépend également de la confluence des cellules (388, 390,391). Ces études reposent sur l'observation de phénomènes globaux et généralisés produits par l'ensemble des cellules sans considérer les événements particuliers liés à chaque cellule individuellement.

L'équipe du Dr Stephen Frawley s'est penchée sur les interactions intimes qu'entretiennent les lactotropes avec les cellules avoisinantes. Grâce à la technique de la

micro-injection d'ADN et de l'analyse en temps réel de l'activité luciférase mesurée sur chaque cellule individuellement, à l'aide d'une caméra vidéo digitale, Frawley a montré que l'activité du promoteur du gène de la PRL dans les lactotropes dépend uniquement de la nature des cellules associées aux lactotropes et non au nombre de ces cellules (392). Précisément, il a observé que l'activité du promoteur chutait lorsqu'une cellule lactotrope en fixait une autre, comparativement à l'activité observée sur des cellules isolées ou associées à des cellules non-lactotropes. En utilisant le même genre d'approche expérimentale, les mêmes effets inhibiteurs ont été obtenus sur le flux de calcium intracellulaire, flux associé à la sécrétion basale de la PRL (393).

1.4.6) Action intracrine de la PRL dans les lactotropes:

Dans des conditions normales de culture, la lignée lactotrope 235-1 possède des récepteurs de la PRL exclusivement retrouvés dans le compartiment intracellulaire (394). Krown *et al.* ont montré que l'interférence de la synthèse de la PRL dans les 235-1, à l'aide d'un oligonucléotide anti-sens contre le transcript de l'hormone, bloquait l'effet mitogénique de la PRL (394). Cette observation nous portent à penser que la PRL pourrait exercer une action intracrine.

1.4.7) Conclusion:

La régulation de l'activité lactotrope est d'une grande complexité faisant intervenir des signaux endocriniens, neuroendocriniens, des facteurs paracrines/autocrines ainsi que l'action subtile des interactions cellules-cellules. L'hétérogénéité intrinsèque des lactotropes contribue à cette complexité. Enfin, la localisation géographique des lactotropes dans la glande est un paramètre supplémentaire dont il faut tenir compte. En effet, les cellules situées dans la périphérie de la glande répondent mieux à la TRH qu'à la dopamine et inversement pour les cellules de la région centrale (395).

1.5) Récepteurs de la PRL et voies de signalisation intracellulaires:

C'est par la voie endocrinienne classique que la PRL hypophysaire exerce ses actions sur les tissus-cibles. La présence de PRL extra-hypophysaire suggère une action plus directe de l'hormone au niveau périphérique via des voies paracrines ou autocrines qui sont aussi empruntées par les facteurs de croissance, neurotransmetteurs et immunomodulateurs. Cela signifie que la PRL peut exercer ses actions directement sans une mobilisation des taux sériques de l'hormone. L'action autocrine/paracrine de la PRL s'illustre dans certains tissus où l'hormone et son récepteur sont tous deux co-localisés (337, 339)

Le récepteur de la PRL (PRLR) est constitué d'une chaîne polypeptidique traversant une seule fois la membrane plasmique (340). Les récepteurs sont formés d'une structure tripartite: un domaine extracellulaire, siège de la fixation du ligand et constitué d'un domaine CRH (Cytokine Receptor Homology) lui-même subdivisé en deux sous-domaines (341), un domaine transmembranaire de 24 acides aminés et un domaine cytoplasmique, médiateur des événements précoces de la signalisation. Aucune activité kinase intrinsèque n'est associée au dernier domaine (1). La protéine est classée parmi les récepteurs de la superfamille des récepteurs des cytokines de classe 1 dont fait partie les récepteurs de certaines interleukines, du G-CSF et du GM-CSF, du LIF, de l'Oncostatine M, de l'érythropoïétine, de la thrombopoïétine, la gp130 et de la leptine (341). Plusieurs isoformes du récepteur existent, produits de l'épissage alternatif du transcrit. Ces isoformes possèdent un domaine extracellulaire commun mais diffèrent par la nature et la taille de leur domaine cytoplasmique (340). Chez le rat, on retrouve trois formes: une forme courte de 291, une forme intermédiaire de 393 (retrouvée uniquement dans une lignée cellulaire lymphoïde pré-T de rat: la lignée Nb2) et une forme longue de 591 acides aminés (340). Les principales activités biologiques de la PRL seraient associées uniquement aux formes longues et "Nb2"; pour sa part, la forme courte semble inactive (342). Le récepteur est présent dans presque tous les tissus et est même retrouvé dans le lait maternel sous des formes membranaires et solubles (1). Plus particulièrement, certaines études montrent l'expression du récepteur dans l'hypophyse antérieure (343, 344, 345). Morel *et al.* ont dosé quantitativement la présence de récepteurs dans les

différents types cellulaires composant l'hypophyse antérieure par immunohistochimie et ont pu ainsi établir l'ordre d'expression suivant: sommatotropes > lactotropes > thyrotropes ~ corticotropes > gonadotropes (344).

Le plus récent modèle des événements moléculaires animant le récepteur suite à son activation repose sur une stoechiométrie d'une molécule de PRL pour deux molécules de récepteur (1). Cette dimérisation du récepteur mène à l'activation de la protéine tyrosine-kinase JAK-2, déjà pré-associée au récepteur, par un mécanisme de trans-phosphorylation (346-347). Le récepteur se transforme alors en substrat de JAK-2 et est phosphorylé sur plusieurs de ses tyrosines dont la Tyr580, reconnue pour être essentielle aux fonctions du récepteur (348). Ces tyrosines phosphorylées attirent le facteur de transcription STAT 5 qui s'associe alors au complexe "récepteur-JAK-2" et est alors lui-même phosphorylé par JAK-2 (349). Il se produit alors une dissociation entre STAT 5 et le complexe "récepteur-JAK-2" qui culmine en une dimérisation de deux molécules de STAT 5 activées (1). C'est sous cette forme que STAT 5 pénètre dans le noyau et active la transcription des gènes dont leur promoteur contient la séquence consensus TTCnnnGAA (350, 351).

Cette description simplifiée de la voie de signalisation de la PRL n'est pas représentative de la complexité du phénomène puisque l'hormone peut mobiliser plusieurs autres voies que celle décrite plus haut (1). La figure 2, tirée d'une revue récente par Bole-Feysot *et al.* (1), schématise toutes les voies de signalisation du PRLR connues à date.

1.6) Rôles biologiques de la PRL:

Étant donné l'étendue du spectre d'actions de la PRL, la description, même sommaire, de toutes les activités biologiques associées à l'hormone ne pourrait être contenue dans une seule thèse de doctorat. Alors, pour des raisons de concision et de pertinence, je ne ferai qu'un survol très rapide de ses trois principales actions retrouvées chez les mammifères, soit: la lactation, la reproduction et l'immunomodulation. Récemment, l'inactivation des gènes de la PRL, du récepteur membranaire et de STAT-5a permis de jeter un regard neuf sur l'importance que tient la PRL dans ces fonctions.

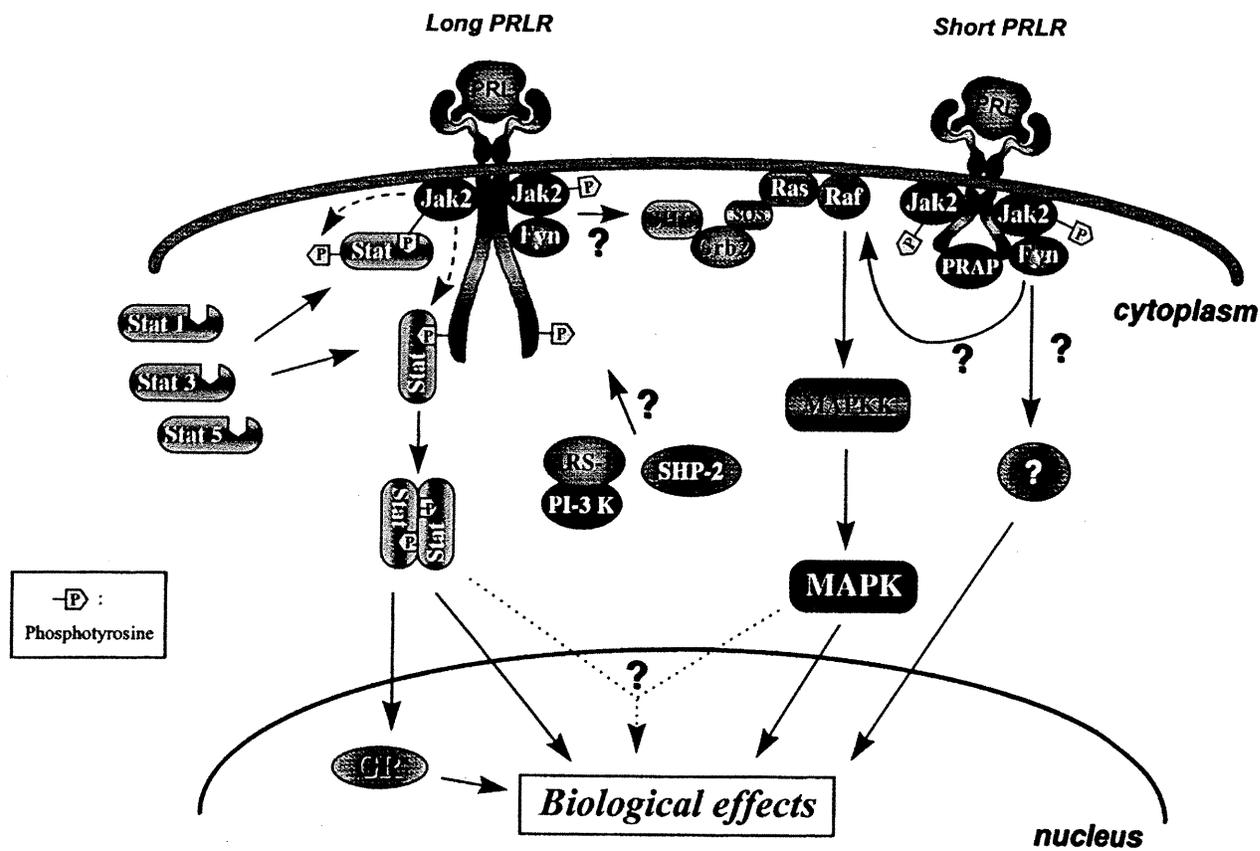


Figure 2: Schéma de la signalisation intracellulaire induite par la liaison de la prolactine à ses récepteurs de formes longues et courtes (figure tirée de la référence 1).

1.6.1) La lactation:

De toutes les activités de la PRL, la mammogénèse et la lactation sont, de loin, les plus étudiées. La gestation installe un milieu hormonal propice au développement du tissu mammaire en vue de la lactation. Les ovaires et l'unité fœto-placentaire sécrètent de larges quantités de stéroïdes, d'estrogènes et de progestérone qui synergisent leurs actions avec la PRL hypophysaire afin de promouvoir la mammogénèse (9). En plus de la PRL, l'hormone placentaire lactogène, la GH, l'insuline et le cortisol contribuent également à cette mammogénèse (10). Deux phénomènes se produisent alors: la multiplication des cellules épithéliales et la formation de structures lobulo-alvéolaires où, dans le dernier cas, la formation de ces structures dépend directement de la PRL (11).

L'importance du rôle que tient la PRL dans la mammogénèse a été vérifiée par l'inactivation du gène chez la souris (12). L'étude montre que les glandes mammaires des femelles mutantes présentent un arbre ductal normal mais que ses arborescences ne possèdent aucune formations lobulaires normalement présentes chez la souris normale adulte et vierge (12). De plus, l'inactivation du gène du récepteur de la PRL (PRLR) appuie ces dernières données (14). En effet, les souris homozygotes et hétérozygotes souffrent, toutes deux, d'une incapacité d'enclencher la fonction lactogénique suite au développement incomplet du tissu mammaire. Un effet similaire est obtenu par l'inactivation de STAT 5a (15).

Si le cocktail hormonal nécessaire à l'établissement et au maintien de la lactation est différent d'une espèce à l'autre, la PRL reste le dénominateur commun dans tous les cas et est l'hormone clef responsable de la synthèse des protéines du lait (16), du lactose (17) et des lipides composant le lait (18).

1.6.2) Reproduction:

La PRL agit sur la fonction de reproduction d'une manière indirecte centrale et d'une manière directe périphérique. Une des conséquences de l'hyperprolactinémie est

une diminution, et même parfois une inhibition, de la sécrétion pulsatile de GnRH (gonadotropin releasing hormone) associée à une réduction de la fréquence des pulsations de LH (luteotropin hormone) à l'origine de l'inhibition de la fonction ovarienne ou testiculaire (19). Au niveau périphérique, la PRL joue un rôle important dans la maturation folliculaire, facilite la maturation ovocytaire et est indispensable au bon fonctionnement du corps jaune (19). De plus, le PRLR est retrouvé dans les testicules, la prostate, les glandes séminales et l'ovaire (1). L'hyperprolactinémie bouleverse la maturation folliculaire en inhibant la synthèse des estrogènes (20) et en diminuant le nombre de récepteurs de la LH (21). En clinique, l'hyperprolactinémie est associée à l'aménorrhée et à la galactorrhée (22).

Les souris femelles homozygotes pour l'inactivation du gène de la PRL sont infertiles et ont des cycles œstriens irréguliers (12). Histologiquement, aucune anomalie apparente des structures ovariennes et génitales n'est observée. Chez ces souris, le protocole d'implantation du blastocyte n'est pas observé. Un phénotype similaire est observé chez les souris homozygotes pour l'inactivation du gène du PRLR (14).

Chez le mâle, la PRL stimule les fonctions testiculaires. Dans les cellules de Leydig, la PRL voit au maintien de la morphologie cellulaire (23), augmente le nombre de récepteurs à la LH (24) et stimule la stéroïdogénèse ainsi que la production d'androgène (25-27). Dans les cellules de Sertoli, la PRL augmente le nombre de récepteurs à la FSH (28). La PRL agit également sur les cellules germinales et les spermatozoïdes (23 et 29). L'hyperprolactinémie peut entraîner une chute de la libido et même l'impuissance (30). Dans un modèle de souris transgénique surexprimant le gène de la PRL, on remarque une hyperplasie prostatique très importante (31). L'inactivation du gène de la PRL, chez la souris, conduit à une chute des taux de LH et perturbe la croissance des glandes accessoires sexuelles tout en maintenant des taux de testostérone plasmatique normaux; ces souris sont normalement fertiles (13). On note un retard de fertilité chez les souris knockout du gène PRLR (14).

1.6.3) Immunomodulation:

Des études cliniques récentes ont montré que des patients atteints de dysfonctions immunitaires telles le SLE (systemic lupus erythematosus) (32), la sclérose en plaque (33), l'arthrite rhumatoïde (34), le SIDA (35) et le rejet de greffe (36) ont une prolactinémie élevée. Des modèles d'animaux hypoprolactinémiques, dont les souris naines DW/J et Snell (voir plus bas), ont des réponses immunitaires affaiblies (37, 38, 39, 40). L'injection de PRL rétablit l'immunocompétence de ces animaux. De plus, le PRLR est exprimé de façon ubiquiste par les cellules du système immunitaire et certaines sous-populations de lymphocytes synthétisent et sécrètent de la PRL biologiquement active ou des molécules apparentées (41). La lignée lymphoïde pré-T, Nb2, répond mitogéniquement à des concentrations très faibles de PRL (39). L'un des gènes stimulés par la PRL, dans les Nb2, est celui de l'IRF-1(41). À titre indicatif, le facteur de transcription IRF-1 est une molécule clef dans les processus de différenciation et de maturation des cellules-B et T et est impliqué dans diverses fonctions des macrophages (41). Cependant, un son de cloche discordant provient de l'inactivation du gène de la PRL qui jette un doute sur les actions immunitaires de l'hormone (12).

CHAPITRE 2

L'ONTOGÉNIE DE L'HYPOPHYSE ANTÉRIEURE

2.1) Origine anatomique:

La complexité de la structure du promoteur du gène de la PRL, et des facteurs "trans" le modulant est intimement liée à la nature des nombreux événements moléculaires survenant lors du développement hypophysaire. Le modèle classique du développement de l'hypophyse repose sur le principe que l'hypophyse postérieure (lobe neural) et antérieure originent de structures tissulaires différentes. D'une part, le lobe neural prend naissance du plancher du diencephale qui, en croissant, devient l'infundibulum. Cette dernière structure rentre en contact avec la poche de Rathke ce qui l'amènera à devenir l'hypophyse postérieure chapeauté de la tige pituitaire. La poche de Rathke, une ébauche de l'hypophyse antérieure, est un diverticule du plafond du stomodaeum (épithélium oral) qui dérive vers le plancher du diencephale. Les cellules de la face antérieure de la poche vont proliférer pour former le lobe antérieure proprement-dit. Les cellules de la face postérieure, pour leur part, formeront le lobe intermédiaire. Le système vasculaire porte origine, quant à lui, des vaisseaux diencephaliques (68).

L'origine anatomique de l'hypophyse antérieure est, cependant, remise en question. En effet, on croyait que le lobe antérieur germait de l'ectoderme oral, mais des études chez l'embryon de poulet et de souris ainsi que chez l'amphibien montrent que l'adénohypophyse proviendrait plutôt de la partie ventrale de la crête neurale suggérant une origine neurale du lobe (68, 69, 70, 71).

2.2) Séquence d'apparition des différentes lignées endocriniennes de l'antéropophysse:

De façon simplifiée, l'hypophyse antérieure adulte peut-être décrite comme une glande composée de 5 types de cellules pouvant être distinguées par l'hormone qu'elles sécrètent. Au jour embryonnaire e11.5, la sous-unité α GSU est la première protéine produite suivie de la POMC (de l'hypophyse antérieure) à e12, de la TSH à e14, de la GH et la PRL à e15.5, la LH à e16.5 et la FSH au jour e17.5 (72-74).

2.3) Facteurs moléculaires impliqués dans l'ontogénie de l'hypophyse antérieure:

La compréhension du développement hypophysaire au niveau moléculaire connaît un essor important depuis les trois dernières années avec la découverte d'un grand nombre de facteurs transcriptionnels et de différenciation reconnus pour être impliqués dans ce processus. Ces facteurs, spécifiques à l'hypophyse ou non, mèneront au développement de l'antérohypophyse de la lignée souche originelle à l'apparition des lactotropes et à l'expression du gène de la prolactine.

2.3.1) Ptx1/P-OTX:

Le plus précoce des facteurs connus est Ptx ou P-OTX découvert par Szeto *et al.* (77) par l'approche de double-hybride chez la levure en utilisant la partie N-terminale du facteur Pit-1 comme appât moléculaire. Cette protéine à homéodomaine apparaît au jour e7, d'abord au niveau du stomodaeum pour ensuite envahir toutes les cellules de l'hypophyse antérieure et intermédiaire (75). D'ailleurs, Ptx1 active la transcription de tous les gènes des hormones hypophysaires (81). Cette activation transcriptionnelle nécessite la liaison de ce facteur à l'élément consensus TAATCC (82). *In vitro*, Ptx1 active les gènes en synergie avec d'autres facteurs: Ptx1 et Pit-1 pour le gène de la PRL (77), avec NeuroD1 pour le gène de la POMC et avec le récepteur nucléaire orphelin SF1 pour le gène de la sous-unité beta de la LH; Ptx1, seul, est suffisant pour stimuler les autres gènes gonadotropes (75). Le site d'action du facteur Ptx1 sur le gène de la PRL de rat est situé au niveau de l'enhanceur distal à -1686 jusqu'à -1707 (77) mais également retrouvé au niveau du promoteur proximal où Ptx1 stimule également son activité (81). Ptx1 serait un régulateur en amont des événements précoces de la cascade d'activation des gènes hypophysaires. En effet, l'inactivation du gène de Ptx1, dans un modèle de cellules hypophysaires, montre une chute dramatique de l'expression du gène de LHX3/Lim3, gène relié à l'organogenèse hypophysaire (voir plus bas) (81).

2.3.2) RPX:

À 8.5 jours du développement embryonnaire de la souris, on note l'expression du facteur RPX (pour Rathke's Pouch homeobX). Son site de liaison à l'ADN ressemble à celui du gène "paired" responsable de la segmentation chez la Drosophile (78). Si au début de son expression, RPX est présent surtout au niveau de la plaque préchordale et de l'endoderme mitoyen antérieur, plus tard, le facteur envahira l'ectoderme de la plaque neurale pour enfin voir son expression se limiter à la poche de Rathke (76). RPX est présent dans les cellules précurseurs des différentes lignées hypophysaires. Son expression s'éteint au jour e14.5 dès l'apparition des cellules somatotropes, lactotropes et thyrotropes (76). L'explication de cette extinction vient des modèles de souris "Ames" et "Snell". En effet, chez les souris "Ames" dont le gène Prop-1 (voir plus bas) est invalide, l'expression de RPX persiste au delà du jour e15.5 (79, 80). Par contre, chez la souris "Snell" où le gène de Pit-1 est défectueux, RPX est absent (80). Ceci suggère que Prop-1 réprime l'expression de RPX. Aucun rôle n'a encore été attribué à RPX si ce n'est son interaction avec le gène de Prop-1.

2.3.3) Les facteurs LIM: LH2, P-LIM-3/Lhx3 et Lhx4:

Le facteur de transcription P-Lim (aussi appelé LIM-3 ou Lhx3) fut découvert simultanément par trois équipes indépendantes (83, 84, 85). La protéine contient deux domaines LIM caractérisés par une région riche en cystéines avoisinant deux structures coordonnant le zinc. L'expression de P-Lim, dans la poche de Rathke, débute au jour e9.0-9.5 (83, 84, 85, 88). Du jour e15.5 et pour toute la vie durant, l'expression du facteur est soutenue à une plus faible intensité (76). P-Lim active en synergie avec Pit-1 les gènes de PRL, TSH β et le gène Pit-1 lui-même (84). P-Lim active également le gène de la GSU α sans l'aide, toutefois, du facteur Pit-1. Cette dernière activation peut être réprimée par un autre facteur LIM, LH2, présent dans les gonadotropes et thyrotropes (86). LH2 peut, cependant, activer le promoteur de la sous-unité α (GSU α) dans un système d'expression hétérologue (86). Les souris dont on a inactivé les deux allèles du gène P-Lim ont des poches de Rathke mais leur développement en lobes antérieures et intermédiaires est interrompu (87).

Lhx4 est un autre facteur à homeodomaine LIM, proche parent du facteur P-Lim. Lhx4 est exprimé dans l'hypophyse en développement: au jour e9.5 les deux facteurs LIM (Lhx3 et 4) sont co-exprimés partout dans la poche de Rathke mais dès e12.5, Lhx4 concentre son expression dans la partie antérieure de la poche, futur adénohypophyse, pendant que Lhx3 maintient son omniprésence dans la poche (88). Chez l'adulte, Lhx3 est exprimé plus fortement que Lhx4 aux niveaux des hypophyses antérieures et intermédiaires (88). La liaison des deux facteurs LIM au développement hypophysaire fut mise en évidence par l'équipe de Westphal à l'aide d'un modèle de souris dont les deux gènes sont inactivés (88). Ce modèle a permis de segmenter l'organogénèse de l'hypophyse antérieure en trois étapes où les deux facteurs LIM sont impliqués: suite à la formation d'une poche de Rathke rudimentaire, Lhx3 ou Lhx4 amènera la poche à son développement définitif; la différenciation de la poche en hypophyse antérieure nécessite seulement Lhx3; enfin, l'apparition des différentes lignées endocriniennes demande la présence simultanée des deux facteurs, en plus bien sûr, de plusieurs autres.

2.3.4) Prop-1:

Le gène Prop-1 (Prophet of Pit-1) fut découvert par clonage positionnel sur le chromosome 11 de souris naine "Ames" (89). Le facteur Prop-1 est une protéine hypophyse-spécifique contenant, tout comme RPX, un domaine *paired*. Son expression débute au jour e10.5 dans la partie dorsale de l'hypophyse antérieure et est maximale au jour e12.0 dans la région caudomédiane là où sera exprimé Pit-1 à partir de e13.5. Ensuite, sa présence se limitera aux somatotropes, thyrotropes et lactotropes et à partir du jour e14.5, son expression périclitera pour être totalement absente chez l'adulte (89). Les homodimères Prop-1 lient une séquence d'ADN propre aux facteurs de la classe *Paired* c'est-à-dire un palindrome TAAT séparé de 2 à 3 nucléotides (89). Fait intéressant, des études de transfection dans les cellules HeLa utilisant un polymère d'éléments de réponse de Prop-1 en face d'un promoteur minimal ainsi que des études d'EMSA montrent que RPX s'associe pour former un complexe hétérodimérique avec Prop-1 et réprime l'activité du promoteur synthétique stimulée par Prop-1(89). Ces résultats suggèrent un rôle au facteur RPX comme modulateur de l'expression du gène de Prop-1 d'autant plus que cette

hypothèse pourrait expliquer la séquence d'expression des deux facteurs dans l'hypophyse. La découverte du gène responsable du phénotype des souris Ames (Prop-1) caractérisé par une hypoplasie de l'hypophyse antérieure combinée à une disparition presque complète des thyrotropes, somatotropes et lactotropes (cellules Pit-1-dépendantes) ainsi qu'à une réduction des gonadotropes. Ces événements reliés à l'absence du facteur Pit-1, nous portent à croire que Prop-1 amène l'expression de Pit-1 dans l'hypophyse en développement. La présence d'éléments de réponse fonctionnels au facteur Prop-1, dans le gène de Pit-1, supporte cette hypothèse (89).

L'importance clinique du gène de Prop-1 est soulignée par la découverte de son homologue humain dont plusieurs mutations sont responsables de la déficience combinée en hormones hypophysaires (90). Cette pathologie ressemble étrangement au phénotype des souris Ames. La réduction des gonadotropines chez ces patients suggèrent que Prop-1 pourrait être lié à l'émergence de la fonction gonadotrope de l'hypophyse (90).

2.3.5) Pit-1/GHF-1:

Pit-1 est le premier facteur hypophysaire caractérisé et de loin le plus étudié (91). La protéine a été isolée simultanément par deux équipes (92, 94). La première a microséquéncé le facteur purifié par chromatographie d'affinité utilisant l'élément de réponse de Pit-1, élément de réponse déduit par des expériences de footprinting, et la séquence partielle de la protéine ainsi obtenue a permis de cloner l'ADNc à partir d'une banque hypophysaire (92). Pour sa part, l'équipe de Rosenfeld s'est servie du même élément de réponse pour repêcher directement Pit-1 à partir d'une banque d'expression (93, 94). Le facteur est exprimé spécifiquement dans les cellules thyrotropes, sommatotropes, lactotropes et les mammosomatotropes (92, 94).

La structure de Pit-1 est composée d'un domaine N-terminal impliqué dans le processus d'activation transcriptionnel ainsi que d'un domaine POU responsable de la liaison du facteur à l'ADN (109). Les facteurs de transcription qui possèdent un domaine POU ont la propriété remarquable de fixer l'ADN en monomères ou en dimères et ,dans ce

sens, peuvent adopter plusieurs configurations (108). Le domaine POU de Pit-1 est une structure composée de deux sous-domaines: le domaine POU-spécifique (POUs) et POU-homéodomaine (POU-HD). Le domaine POU-HD est une région de 60 acides aminés situé dans la queue C-terminale de la protéine et possédant une grande homologie de séquence avec les membres de la famille de gènes impliqués dans le développement, les facteurs à homéodomaine (92, 94). La structure suggérée du domaine POU-HD prend la forme d'un motif hélice-courbe-hélice (helix-turn-helix). Le domaine POU-HD est nécessaire et suffisant à une liaison de faible affinité et de spécificité de Pit-1 à l'ADN (109). Pour sa part, le domaine POU s'étend sur 75 acides aminés et il est nécessaire afin d'établir une liaison à haute affinité et de spécificité; il contient également l'interface de dimérisation (110). Les deux sous-domaines sont espacés d'une séquence non-conservée de 15 acides aminés. Dernièrement, la structure tri-dimensionnelle du domaine POU de Pit-1 a été déduite du patron de diffraction aux rayons X obtenu d'un co-cristal d'un dimère de Pit-1 fixé à son élément de réponse (108). Les détails structuraux mis en évidence dans cette étude ne seront pas discutés mais soulignons que l'interface de dimérisation s'est révélée être le site principal où sont retrouvées la majorité des mutations associées à la déficience combinée en hormones hypophysaires (108).

Le domaine POU permet au facteur Pit-1 d'activer les gènes de la TSH β , de la GH et de la PRL en plus de son propre gène (voir plus bas). Pit-1 peut lier des éléments de réponse complexes dont la séquence consensus peut-être définie par la formule: (A/T)(A/T)TATNCAT (108). Cette plasticité retrouvée dans la séquence de l'élément de réponse suggère que Pit-1 peut lier l'ADN suivant plusieurs configurations en s'associant ou non à d'autres facteurs. En effet, on retrouve des dimères de Pit-1 sur plusieurs sites mais dans certain cas, comme pour élément Prl-1D (voir plus bas), Pit-1 lie en solitaire (110). Pit-1 peut activer plusieurs gènes en synergie avec P-Lim et Ptx1 mais, également, il peut interagir avec les récepteurs de l'hormone thyroïdienne (TR) (111) et des œstrogènes (112) ainsi qu'avec d'autres facteurs transcriptionnels tels que C/EBP α (113), Zn15 (114), Ets-1 (115), c-Jun (116), GATA-2 (117) et Oct-1 (95). Ajoutons que la synergie entre Pit-1 et les récepteurs TR et ER est dépendante de la concentration en leur hormone respective (111, 112). Il est suggéré que ces interactions qu'entretient Pit-1 avec d'autres facteurs permettent ainsi une économie de facteurs de transcription dans

l'activation sélective des gènes-cibles. Selon les travaux du Dr Fred Schaufele, l'activation transcriptionnelle induite par l'hétérodimérisation de Pit-1 et des récepteurs ER et TR nécessite à la fois le domaine AF-1, situé en N-terminal de Pit-1 et le domaine AF-2 des récepteurs ER/TR (119, 120). En fait, Schaufele va plus loin et propose que le co-répresseur RIP-140 (Receptor Interacting Protein 140) annule la synergie fonctionnelle de l'hétérodimère en interférant sur la liaison d'un co-activateur puissant au site AF-2.

Le gène de Pit-1 ne génère pas un produit unique puisque chez le rat, le facteur est représenté par deux formes majeures possédant des masses moléculaires de 31 et 33 KDa suite à l'utilisation alternative de sites d'initiation de la transcription (95). Plusieurs variantes de Pit-1 obtenues par épissage alternatif sont également observées (96). Notamment, l'isoforme Pit-1 β contient une insertion de 26 acides aminés dans la partie N-terminale du domaine de transactivation résultant en une réponse partielle sur le gène de la GH et à une perte sur ceux de la PRL et de Pit-1 (96). Une seconde forme naturelle de Pit-1, appelée Pit-1T, ressemble à Pit-1 β mais l'insertion est limitée à 14 acides aminés. Elle est spécifiquement exprimée dans les thyrotropes et stimule l'activité du promoteur TSH β dans des cellules exprimant la forme sauvage de Pit-1 (97). On retrouve également une forme de Pit-1 rendue inactive par la perte de la partie codante correspondant à l'exon 4, exon codant pour le sous-domaine POU s (98).

L'hétérogénéité du facteur Pit-1 se traduit également par des modifications post-traductionnelles dont il est la cible. Deux sites majeurs de phosphorylation, la sérine 114 et la thréonine 220 ainsi qu'un site secondaire, la thréonine 219, sont phosphorylés suite à l'activation des voies PKA et PKC (105, 106, 107). Sur le promoteur du gène de la PRL, la phosphorylation de Pit-1 entraîne une diminution de l'affinité du facteur pour les sites pit-1 1P, 1D, 2D et 4D (voir gène de PRL) mais stimule la dimérisation de Pit-1 sur le site 3D (105). Cependant, une étude a montré que la stimulation par l'AMPc de l'activité du promoteur du gène de la PRL est facilitée par Pit-1 mais que la phosphorylation de ce dernier, qui peut-être induite par le traitement à l'AMPc, n'est pas requise (106).

La différenciation des cellules hypophysaires embryonnaires en thyrotropes (Pit-1-dépendante), sommatotropes et lactotropes requiert Pit-1. Pit-1 est présent dans

l'hypophyse au jour e13.5-14 chez la souris devançant l'expression de la GH et la PRL mais suivant celle de la TSH produite par un groupe de cellules situées dans la pointe de l'organe en développement (99). Cependant, ces thyrotropes, Pit-1 indépendantes, sont transitoires et l'expression de la TSH sera relayée par un autre groupe de cellules retrouvées dans la partie caudo-médiane de l'hypophyse. Le niveau d'expression du facteur Pit-1 sera maintenu durant la vie l'adulte (76). Toutefois, la présence simultanée du messager et de la protéine dans l'hypophyse en développement n'est pas toujours suivie car l'expression protéique du facteur reste confinée aux cellules cible malgré une présence ubiquiste du transcript (100).

La caractérisation du promoteur et de l'enhanceur du gène de Pit-1 nous en apprend d'avantage sur la régulation fine de l'expression du facteur. Les 210 premières paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription permettent une expression tissu-spécifique du gène et contiennent deux sites consensus CRE (cyclic AMP response element), responsables de la stimulation du gène par le dibutyryl cAMP, ainsi que deux éléments de réponse Pit-1 (101). Il est suggéré que ces sites Pit-1 permettent une expression soutenue du facteur dans l'hypophyse adulte par un mécanisme d'auto-régulation positive. Ce fragment de promoteur ne contient pas les éléments qu'ils faut pour initier l'expression.

Une région supplémentaire de 390 pb située à plus de 10 Kb en amont du site d'initiation de la transcription permet l'expression hypophysaire du gène de Pit-1 dans un modèle de souris transgénique (102). Cette région contient des éléments de réponse Pit-1, un nouvel élément cis tissu-spécifique, un élément de réponse atypique à la vitamine D ainsi qu'un élément de réponse à la vitamine A dont son activation par l'acide rétinoïque est dépendante de Pit-1 (102). *In vivo*, l'acide rétinoïque induit l'expression du messager de Pit-1 dans les lactotropes et les somatotropes (103). Cette interaction observée entre un facteur de transcription tissu-spécifique et un récepteur nucléaire ubiquiste permettrait un ciblage plus spécifique de l'action du morphogène durant l'organogénèse. L'expression *in vivo* de plusieurs mutants délétionnels couvrant les premières 14 Kb en amont du site d'initiation de la transcription a révélé un deuxième enhanceur d'une longueur d'environ de 2 Kb situé entre -3 et -5 Kb (104). L'équipe du Dr Rosenfeld a montré que les deux

enhanceurs ont des actions dissociables: la structure activatrice située à -5 Kb est responsable de l'initiation de l'expression du gène pendant que la structure distale, quant à elle, voit au maintien de l'activité basale du gène afin de maintenir l'état de différenciation des cellules dépendante de Pit-1 (104).

Des preuves génétiques montrent l'importance de Pit-1 comme facteur-clef dans le développement de l'hypophyse antérieure. En effet, deux souches de souris naines, les souris Jackson (dw^J/dw^J) et Snell (dw/dw), ont en commun le locus dw muté (121). Ces mutations interrompent le cours normal du développement de l'hypophyse antérieure résultant en une glande dépourvue des cellules thyrotropes, sommatotropes et lactotropes et de leur hormone associée. L'analyse du génome de ces souris montrent que les mutations responsables de leur état sont co-localisées sur le gène de *pit-1* (121). La nature de la mutation retrouvée sur le locus dw^J correspond à une insertion ou une inversion d'un fragment d'ADN d'environ 4 Kb dans le gène de *pit-1* (121). Pour les souris Snell, l'analyse du ADNc et du gène de *pit-1* révèle une mutation ponctuelle dans le domaine POU-HD rendant inapte la protéine à lier son élément de réponse. Chez les deux souris, l'expression du messager et de la protéine est minimale ou absente. Ces nouvelles données appuient l'idée que Pit-1 est doublement utile à l'activation des gènes ainsi qu'à la prolifération et/ou la survie des trois lignées cellulaires.

Des mutations responsables de déficiences combinées en hormones hypophysaires ont été retrouvées dans le gène de Pit-1 humain. Certains de ces patients atteints par cette déficience ont un gène de Pit-1 muté au niveau de la partie codante qui affecte la liaison à l'ADN (122, 123), son activité de transactivation (124) ou même son interaction avec le récepteur de l'acide rétinoïque (109). Cependant, aucun lien n'a encore pu être établi entre le développement des adénomes hypophysaires et un gène de Pit-1 muté (125, 126).

2.3.6) Les récepteurs des estrogènes:

Les estrogènes affectent les fonctions hypophysaires soit directement ou indirectement via l'hypothalamus. Au niveau hypophysaire, le récepteur aux estrogènes

(récepteur α) est détecté au jour e17 et, chez l'adulte, le messager et la protéine sont tous deux très fortement exprimés dans les gonadotropes, corticotropes et les lactotropes (127, 128). Le patron d'expression hypophysaire du récepteur aux estrogènes β est similaire à l'isoforme α mais ils sont rarement co-localisés dans les mêmes cellules (129). Ces récepteurs médient sûrement l'action des estrogènes sur la différenciation terminale ainsi que sur la prolifération des lactotropes au cours du développement. L'établissement d'une corrélation entre l'expression du ER et celle du gène de la PRL chez l'embryon et l'observation d'un accroissement du nombre de cellules lactotropes durant la période post-natale sont des données qui confirment l'importance des estrogènes dans l'ontogénie lactotrope (130, 131, 132). De plus, les estrogènes sont liés au développement des prolactinomes (133). Par l'intermédiaire de leur récepteur, les estrogènes activent la transcription du gène de la PRL en agissant au niveau du promoteur distal (voir plus bas) (134 à 136). Cette activation implique une coopération fonctionnelle avec Pit-1 (100, 112). Les travaux du Dr Mark Seyfred, qui seront décrits plus en détails dans la prochaine section, ont montré que les estrogènes favorisaient l'interaction physique et fonctionnelle entre les parties proximales et distales du promoteur du gène de la PRL (137-139).

L'action des estrogènes sur les gonadotropines est bien connue. La régulation de leur synthèse et leur sécrétion est médiée par le GnRH hypothalamique, les peptides et les stéroïdes sexuels. Durant la phase de proœstrus, le pic d'estrogènes peut induire la transcription du gène de la LH β (140) mais, chez l'animal, un traitement chronique à l'hormone amène plutôt une répression des trois gènes (LH β , FSH β et GSU α) (141). Cette inhibition causée par les estrogènes pourrait prendre sa source d'une sécrétion atténuée de la GnRH ou encore d'une réponse altérée de l'hypophyse à la GnRH (142-143).

L'inactivation du gène du récepteur ER- α de la souris a fourni des éléments nouveaux sur le rôle que tiennent les estrogènes et leur récepteur dans l'ontogénie hypophysaire (144). Ces souris présentent, en gros, un développement sexuel prénatal normal et survivent jusqu'à l'âge adulte mais sont (les souris des deux sexes) infertiles. Au niveau hypophysaire, ces souris ont des taux faibles de messager de la PRL ainsi qu'une réduction du nombre de lactotropes. Pour leur part, les messagers des gonadotropines

sont élevés appuyant la thèse de l'effet inhibiteur des estrogènes sur la transcription des gènes de ces hormones. La présence des lactotropes chez ces souris indique que le ER- α exerce une influence sur la prolifération des cellules sans toutefois être impliqué dans leur différenciation (144).

2.3.7) Le récepteur de la GHRH (GHRH-R) et le facteur CREB (cAMP response element binding protein):

L'expression et la sécrétion de la GH par les sommatotropes est sous le contrôle, entre autres, du facteur de relâche hypothalamique GHRH. Le récepteur du GHRH est une protéine contenant 7 passages transmembranaires qui est le propre des récepteurs couplés aux protéines G. La fixation du ligand entraîne la stimulation des protéines Gas qui, à leur tour, activent l'adénylate cyclase productrice d'AMP cyclique (AMPC). Souvent, cette élévation en AMPC mène à la phosphorylation et l'activation du facteur transcriptionnel CREB par l'intermédiaire de la protéine kinase A (145). Un des gènes cibles du facteur CREB est celui de Pit-1 impliqué, comme on le sait, dans l'expression du gène de la GH (101); cette voie pourrait être celle empruntée par le GHRH afin de stimuler l'expression de la GH (146). Il a été montré, à son tour, que l'expression du GHRH-R est sous le contrôle de Pit-1 (147). La séquence de la partie régulatrice du gène du GHRH-R humain contient plusieurs sites Pit-1 et l'activité de ce promoteur est augmentée en présence du facteur *in vitro* (148).

La prolifération des cellules pré-sommatotropes est stimulée par l'augmentation intracellulaire de l'AMPC elle-même induite par le GHRH (149). Cette observation laisse entendre que le GHRH pourrait jouer un rôle dans le développement des cellules à GH. Une autre souche de souris naines, la lignée *little*, se caractérise par une sous-expression de la GH accompagné d'une hypoplasie de l'antéhypophyse. Des analyses génétiques ont montré que le gène du GHRH-R est contigu au locus *little* (146, 150). Le phénotype de ces souris est lié à une mutation inactivatrice dans le domaine extracellulaire du récepteur. Le développement hypophysaire des embryons de souris *little* est normal mais on observe une atrophie de la glande chez l'adulte caractérisée par une absence de cellules

somatotropes de la partie médiane de l'hypophyse; les sommatotropes de la zone latérale ne sont pas affectées (150). Il appert que la croissance des sommatotropes est sous le contrôle de facteurs distincts selon la localisation géographique des cellules.

Enfin, terminons en soulignant qu'un modèle de souris transgénique, possédant un gène CREB déféctueux, est caractérisé par un nanisme et une absence sélective des cellules sommatotropes (les autres lignées endocriniennes ne sont pas affectées) (151).

2.3.8) TEF (thyrotroph embryonic factor):

Durant le développement hypophysaire, une première lignée de cellules thyotropes voit le jour à e12.5 au niveau de la pointe antérieure de la glande dont l'expression du gène de la TSH β précède celle de Pit-1. Ces cellules disparaissent durant la période néo-natale. Une deuxième lignée thyotropes, permanente celle-là, apparaît au jour e15.5 dont leur différenciation est dépendante de Pit-1 (71). TEF, un facteur potentiellement responsable de l'expression de la TSH β des cellules de la pointe antérieure a été cloné à partir d'une librairie d'expression hypophysaire en utilisant un fragment d'ADN contenant l'élément de réponse Pit-1 1P du gène de la PRL (152). *In vitro*, ce facteur active le promoteur de la TSH β et plus timidement ceux de la GH et la PRL; il serait étonnant que cette stimulation observée sur ces deux derniers promoteurs puisse avoir un intérêt physiologique puisque la co-transfection de Pit-1 et TEF n'amène aucun gain d'activité comparé à la transfection de Pit-1 seul (152). Si l'implication de ce facteur dans le développement n'est pas prouvée, son expression coïncide, cependant, avec l'apparition des thyotropes de la pointe antérieure.

2.3.9) SF-1(Steroidogenic Factor 1):

SF-1 est un récepteur nucléaire orphelin (récepteur sans ligand connu) jouant un rôle clef dans plusieurs fonctions de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et est essentiel lors de la détermination sexuelle (153). Dans l'hypophyse antérieure, SF-1 est

exprimé spécifiquement dans les gonadotropes (154). Ce facteur interagit avec les promoteurs des gènes $GSU\alpha$ et $LH\beta$ (155). Le rôle que tient SF-1 dans l'ontogénie hypophysaire fut révélé par un modèle de souris déficient (knockout) en SF-1 (156). Chez ces souris, la LH et la FSH sont indétectables malgré un taux suffisant de GnRH dans l'hypothalamus de ces souris ainsi qu'un déversement normal du facteur de relâche dans l'éminence médiane. De plus, il y a absence complète du noyau hypothalamique ventro-médial. Fait étonnant, la présence de GnRH exogène stimule l'expression des gonadotropines suggérant que les gonadotropes ne sont pas totalement éradiquées et que SF-1 n'est pas essentiel à la production de ces hormones (157).

2.3.10 NGFI-A (Egr-1, Krox-24, zif/268):

NGFI-A est une phosphoprotéine à doigt de zinc qui est immédiatement mobilisée suite à une stimulation par le sérum (158). Cette protéine fait partie d'une famille de facteur de transcription reconnaissant une séquence riche en GC (159). L'expression de NGFI-A au cours du développement est très étendue et couvre plusieurs tissus (160). Au niveau hypophysaire, ce facteur est exprimé très fortement dans le lobe neural au jour e14.5 mais, progressivement, cette expression disparaît dans le lobe neural et se précise dans les lobes antérieur et intermédiaire (161). Dans l'hypophyse adulte, on retrouve NGFI-A dans les cellules à LH/FSH, TSH et GH mais est absent dans les corticotropes et les lactotropes (161).

Deux études sur l'inactivation du gène de NGFI-A documentent son rôle dans l'ontogénie hypophysaire (161, 162). Outre certains changements phénotypiques associés à ces souris comme l'infertilité et une réduction de taille, on remarque une perte d'expression de la $LH\beta$ (161, 162) et une diminution de la GH (161). Précisément, l'absence de la $LH\beta$ est imputable à une perte d'expression de son gène puisque on note la présence d'autres hormones, incluant la $FSH\beta$. D'ailleurs, un site consensus pour NGFI-A est retrouvé dans le promoteur de la $LH\beta$. La surexpression de NGFI-A dans une lignée gonadotropes ($\alpha T3$) entraîne une augmentation de l'activité du promoteur de $LH\beta$ et

synergise son action avec SF-1 lorsqu'ils sont co-exprimés dans un modèle hétérologue (162). De plus, l'inactivation du gène de NGFI-A perturbe le développement des sommatotropes (161). La déficience en NGFI-A touche un nombre important de cellules à GH en modifiant l'ultrastructure qui les édifie (161). En conclusion, le facteur NGFI-A joue un rôle important, mais à différents niveaux, sur l'activité des sommatotropes et des gonadotropes ainsi que sur leur développement.

2.3.11) Le récepteur RXR γ :

La distribution des trois transcrits RAR (retinoic-acid receptor), durant le développement embryonnaire de la souris, montre que RAR α est d'expression ubiquiste mais celle des deux autres isoformes (β et γ) est plus finement régulée (163). Pour leur part, les deux premières isoformes du récepteur RXR (retinoic acid X récepteur) semblent suivre, en gros, un patron d'expression embryonnaire tout aussi général que RAR α (164). À l'inverse, l'isoforme γ limite son expression qu'à certains tissus dont l'hypophyse (164) et plus précisément, chez l'adulte, au niveau des thyrotropes (165). Des études d'immunohistochimie, de western blot et de EMSA montrent que l'isoforme γ est exprimée de façon prédominante dans les thyrotropes et que l'état d'hypothyroïdie stimule la présence de son messager (165). Ces résultats suggèrent que RXR γ serait impliqué dans la modulation de certains gènes thyrotropes et possiblement dans l'ontogénie des cellules à TSH.

2.3.12) NeuroD1/ β 2:

La caractérisation du promoteur du gène du POMC révèle qu'il peut-être découpé en trois domaines fonctionnels: distaux, centraux et proximaux qui sont suffisants pour permettre une expression spécifique du gène dans les corticotropes (166). Les domaines distaux et centraux contiennent, entre autres, des éléments E (CAnnTG), qui sont reconnus par les facteurs HLH (Helix-Loop-Helix). Des études de EMSA montrent que ces

éléments lient des protéines retrouvées seulement dans les extraits de corticotropes (167). Des études plus poussées ont révélé que ce complexe protéine-ADN contenait un facteur bHLH, NeuroD1/ β 2 (168). Des northern blots et des essais EMSA prouvent que NeuroD1 est préférentiellement exprimé dans les cellules corticotropes de l'hypophyse (168). En transfection transitoire dans un système hétérologue, NeuroD1 seul, n'arrive pas à stimuler l'activité du promoteur de la POMC mais y parvient lorsqu'un autre facteur bHLH, le facteur Pan1 par exemple, est co-exprimé (168). De plus, le facteur à boîte homéo Ptx1 décrit plus haut, stimule d'avantage le promoteur lorsque NeuroD1 et Pan1 sont tous deux présents (168). Le rôle de NeuroD1 dans le développement des corticotropes n'est pas démontré mais son association fonctionnelle avec les facteurs à boîte homéo nous portent à croire que cette protéine de la famille bHLH pourrait être impliquée dans ce processus.

2.3.13) Zn-15:

La comparaison des séquences du promoteur de la GH chez différentes espèces a permis de mettre en lumière un élément qui, lorsque muté, entraîne une chute dramatique de l'activité du promoteur *in vitro* et *in vivo* (114). Une approche de clonage par expression, en utilisant une sonde constituée de cet élément de réponse, a permis d'isoler le facteur Zn-15 d'une banque de cellules GC (somatomammotropes) (114). Ce facteur possède 3 doigts de zinc anormalement espacés et synergise avec Pit-1 pour activer le promoteur du gène de la GH *in vitro*. Contrairement à Pit-1, Zn-15 n'est pas l'apanage exclusif de l'hypophyse puisque le northern blot révèle que son expression s'étend à la rate et au coeur. L'importance de ce facteur dans l'ontogénie de l'hypophyse n'est pas documentée même si certaines revues, sur le sujet, le laisseraient croire (75, 169).

2.4) Conclusion:

Malgré les progrès importants réalisés, notamment, sur l'isolation et la caractérisation de plusieurs facteurs de transcription, la compréhension détaillée de la

cascade d'événements tissulaires et moléculaires de l'ontogénie de l'hypophyse antérieure reste fragmentaire. De plus, l'ensemble des travaux publiés dans ce domaine ne semble pas faire consensus, surtout, en ce qui concerne l'ordre d'apparition des différentes cellules et de leur origine (exemples:72-73, 75, 109, 170-171, 172). La figure 3 présente un modèle du développement des différentes lignées endocriniennes et quelques facteurs transcriptionnels impliqués.

Sans contredit, le facteur Pit-1 est un pilier important dans le développement hypophysaire qui peut-être séparé en deux temps: l'apparition des cellules indépendantes de Pit-1 et celles qui en dépendent. Son importance se manifeste dans les phénotypes des différents modèles de souris naines. Il est un modulateur central de l'expression transcriptionnelle de plusieurs gènes en interagissant avec d'autres facteurs.

La participation des tissus environnant l'hypophyse antérieure, tels que l'hypothalamus, doit être considérée afin d'avoir une vue intégrée du phénomène développemental. La mise en place de glandes hypophysaires en développement sous des capsules rénales, permettant ainsi d'isoler ainsi le tissu de toutes influences hypothalamiques, a permis d'observer plusieurs alterations de la sécrétion hormonale (173). De plus, l'inactivation du gène codant pour le facteur T/ebp (Thyroid-specific enhancer-binding protein), qui est normalement exprimé dans l'hypothalamus en développement, entraîne l'absence complète du tissu hypophysaire chez ces souris (174). Le rôle que prend le récepteur au GHRH dans l'ontogénie des cellules sommatotropes n'est qu'un autre exemple de l'influence de l'hypothalamus (146, 150).

En fait, l'ontogénie de l'hypophyse antérieure peut se définir comme une suite d'interactions tissulaires et moléculaires complexes faisant intervenir, entre autres, des facteurs à boîte homéo, à domaines LIM et POU, des récepteurs nucléaires orphelins ou non, des facteurs d'expression circonscrites ou ubiquistes, des cytokines telles le LIF (Leukemia inhibitory factor) (175, 176) et des facteurs de relâche hypothalamiques.

Deux approches très élégantes aideront à définir, avec détails, la séquence moléculaire responsable de l'ontogénie des 5 lignées endocriniennes. D'une part, il est

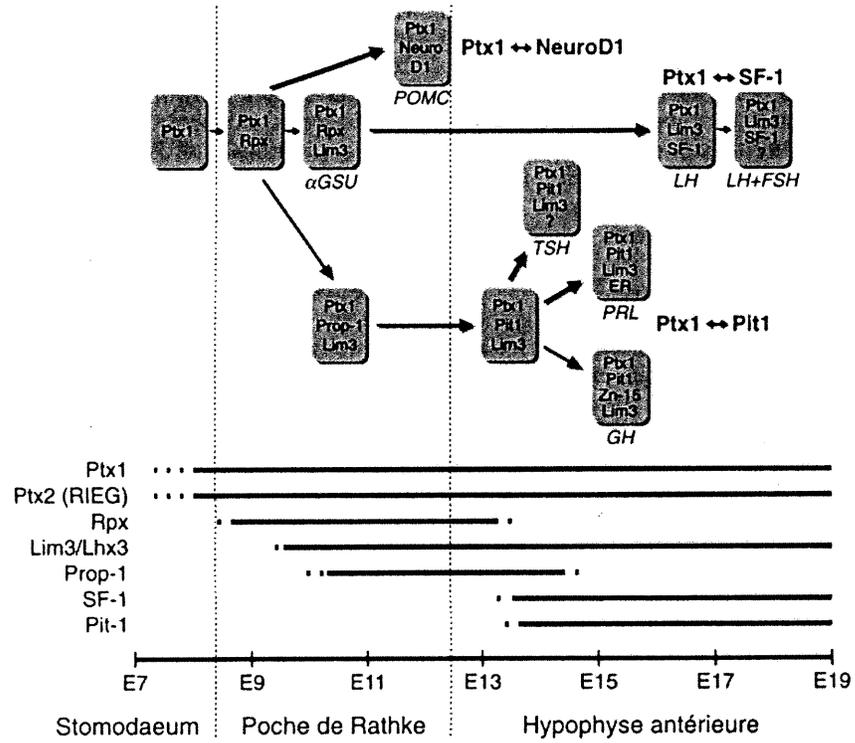


Figure 3: Représentation d'un modèle du développement des différentes cellules endocriniennes de l'hypophyse antérieure et des quelques facteurs transcriptionnels impliqués (figure tirée de la référence 75).

possible d'éliminer sélectivement un type de cellule hypophysaire en introduisant un transgène toxique dans les souris et vérifier l'effet de cette ablation sur le développement de la glande (171). Ce transgène produit une toxine protéique (la toxine de la diphtérie) dont la sélectivité d'expression est conduite par le promoteur d'un gène hypophysaire dont on veut éliminer les cellules qui l'expriment (171). L'autre approche consiste à immortaliser sélectivement une lignée cellulaire à l'aide d'un transgène oncogénique, également sous l'influence d'un promoteur hypophysaire, et les tumeurs, ainsi obtenues, servent à établir des lignées cellulaires clonales (177). Ces cellules représentent, donc, différentes étapes du développement de la glande suite à l'expression du transgène. L'analyse des différents marqueurs exprimés dans ces cellules permet de reconstituer une partie de la séquence des événements moléculaires de l'ontogénie de l'hypophyse antérieure.

CHAPITRE 3

LA RÉGION RÉGULATRICE DU GÈNE DE LA PRL DE RAT

3.1) Introduction:

L'expression du gène de la PRL de rat est circonscrite aux cellules lactotropes et sommatomammotropes. Les mécanismes impliqués dans cette spécificité tissulaire sont inconnus. La publication des séquences complètes du promoteur et de l'enhanceur du gène a ouvert la voie à la caractérisation de plusieurs éléments fonctionnels qui ont permis de jeter les premières bases d'un modèle d'expression génique. La figure 4 trace les contours des deux principaux éléments de régulation.

3.2) Structure du gène et description superficielle de la région régulatrice localisée en 5' du gène:

Le gène de la PRL est présent en une seule copie sur le chromosome 17 (178). Le gène s'étend sur près de 10 Kb et il est composé de 5 exons (179). La partie 5' non traduite du messager, caractérisée par le test de protection à la nucléase S1, s'étend sur 54 nucléotides en amont du premier codon méthionine (180). L'initiation de la transcription prend naissance à la position -22 à -27 où se trouve la boîte TATAAA (180, 197). Les premiers travaux publiés sur la caractérisation de la partie 5' responsable du contrôle de la transcription et de l'expression tissulaire, ont été réalisés par l'équipe du Dr Rosenfeld (181). En gros, cette partie 5' contient deux régions régulatrices séparées d'environ 1000 pb: le promoteur proximal s'étendant de -422 pb à +33 pb et l'enhanceur de 300 pb situé entre -1.83 Kb et -1.53 Kb (181-186). Le promoteur proximal confère une activité tissu-spécifique lorsque lié à un gène rapporteur et introduit dans des lignées cellulaires d'hypophyse de rat (193). L'utilisation de mutants délétionnels de l'enhancer distal, lié au promoteur proximal, dans le même genre de lignée cellulaire, a permis de fragmenter l'enhancer en deux sous-domaines soit: un fragment de 106 pb situé entre -1769 à -1663 et un autre compris entre -1697 à -1530 pb (181). Ces deux sous-domaines n'ont aucune activité en soit mais, lorsque réunis, stimulent fortement l'expression du gène dans les lactotropes et les sommatomammotropes et cela sans aucune contrainte de position et d'orientation relative (181). La contribution de l'enhanceur à l'activité basale du gène varie beaucoup d'une étude à l'autre et peut passer d'une stimulation de 100 fois à presque rien

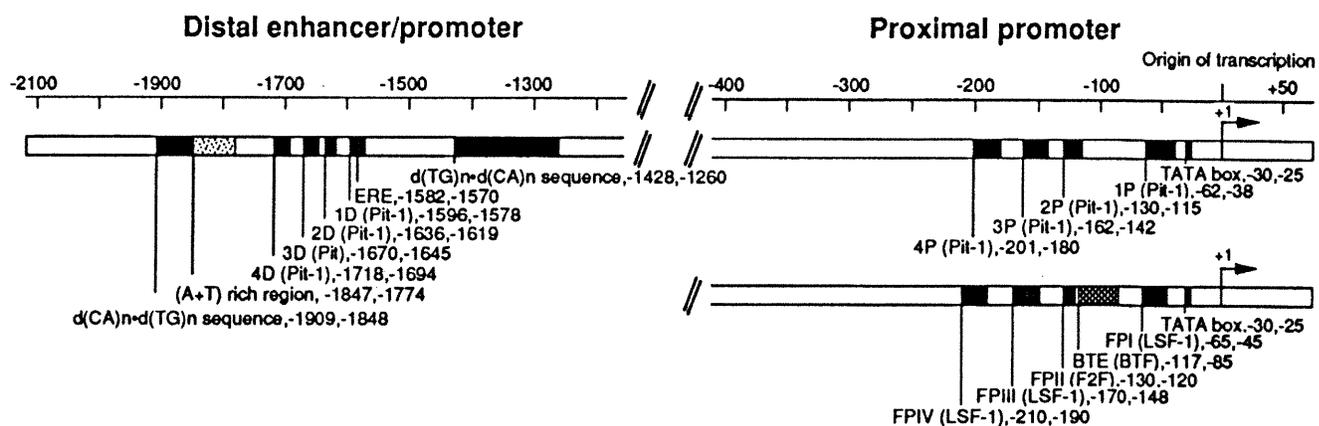


Figure 4. Cartographie des éléments-*cis* retrouvés dans la partie 5'-régulatrice du gène de la prolactine de rat (figure tirée de la référence 190).

(181, 187, 193, 208). Les raisons de ces différences ne sont pas clairement établies mais la nature du gène rapporteur utilisé n'est pas en cause (208). *In vitro*, l'activité de l'enhanceur est négligeable dans des cellules non-hypophysaires HeLa et la lignée fibroblastique 208F (193).

Des études *in vivo* à l'aide de souris possédant différents transgènes de la partie 5' liées à un gène rapporteur montrent que le promoteur et l'enhanceur sont nécessaires à l'expression optimale du gène rapporteur dans les cellules lactotropes suggérant une synergie fonctionnelle des deux régions (188). *In vivo*, le contexte génique de l'enhanceur est important pour l'exclusivité d'expression du gène dans les lactotropes; en absence des régions bordant l'enhanceur, on remarque une expression thyrotropique de la PRL (188).

Il a été mentionné plus tôt que les estrogènes stimulent la transcription du gène de la PRL. Un élément de réponse aux estrogènes est retrouvé dans l'enhanceur (voir plus bas) (136). C'est en cherchant comment un élément de réponse, situé si loin du site d'initiation de la transcription, influence le taux de production de messagers que Mark Seyfred a trouvé des évidences d'une interaction concrète entre les régions proximales et distales. Cette interaction fut révélée en utilisant la partie 5' régulatrice en face du gène rapporteur Tn5, le tout, contenu dans un vecteur BPV (bovine papillomavirus vector) créant ainsi, lorsqu'introduit dans une cellule, un minichromosome. Cette construction fut introduite dans une lignée sommatomammotrope (GH3). La présence d'estrogènes ou d'antiestrogènes rend la région distale hypersensible aux nucléases donc libre de toutes structures nucléosomales, mais cette hypersensibilité touche également la région proximale (137). Cette hypersensibilité aux nucléases de la région distale est retrouvée spécifiquement dans les cellules à PRL (189). L'interaction physique entre les deux régions fut reconfirmée à l'aide d'essais de ligation nucléaire (138-139). Ces tests sont basés sur le principe que deux sites de restrictions de même nature et éloignés l'un de l'autre seront plus enclin d'être reliés ensemble, par la ligase, s'ils sont physiquement rapprochés. En utilisant la même construction que décrite plus haut, la présence d'estrogènes favorisent la liaison, par la ligase, des deux régions régulatrices appuyant l'idée que ces régions se juxtaposent (138). Il en va de même pour le gène endogène (138-139). Une telle structure favoriserait l'interaction entre facteurs de transcription des

parties proximales et distales favorisant l'installation d'un complexe de préinitiation plus stable menant à une stimulation accrue de l'initiation de la transcription par la polymérase à ARN de type 2.

3.3) Effets de la méthylation sur l'activité du gène:

Avant de décrire plus en profondeur chacune des régions de régulation du gène et des facteurs transcriptionnels qui leurs sont associés, terminons ces généralités en décrivant le rôle de la méthylation sur la modulation de l'activité du gène. En effet, plusieurs travaux montrent que la méthylation des dinucléotides CpG dans les régions promotrices est reliée à l'inactivation de ces dernières. Il existe une quinzaine de CpG dans la partie 5' du gène de la PRL mais seulement 4 sont retrouvés dans les régions régulatrices. L'augmentation de l'activité du gène de la PRL de rat pendant la grossesse et la lactation, coïncide avec une perte de CpG méthylés (190).

Un tel lien est également retrouvé dans différentes lignées cellulaires produisant de la PRL. Chez les lignées produisant le plus d'hormone, on remarque que leurs cellules possèdent un gène hypométhylé (191). Inversement, une lignée pauvre en PRL voit son gène hyperméthylé; leur phénotype peut être renversé par un traitement au 5-azacytidine, un inhibiteur de l'activité méthyltransférase sur l'ADN (192). Dans tous les cas, l'expression du facteur Pit-1 est équivalente. Des études de transfections transitoires utilisant un promoteur du gène de PRL méthylé *in vitro*, montrent qu'une méthylation accrue des CpG nuit à l'activité du gène (192). L'effet de cette méthylation varie, également, selon la position des CpG sur le gène (193). Le mécanisme d'action de cette répression n'a pas encore été clairement établi mais des essais de compétition *in vivo* suggéraient que la méthylation bloquerait la liaison de facteurs transcriptionnels sur leur élément de réponse (192).

3.4) Le promoteur proximal:

Des études de protection à la DNase (DNase 1 footprint analysis), utilisant des extraits nucléaires de cellules sommatomammotropes, révèlent la présence de 4 régions protégées dans l'enhancer distal (1D à 4D) et autant dans le promoteur (1P à 4P) (194). Aucune région protégée n'est observée avec des extraits de fibroblastes. Ces zones de protection peuvent être spécifiquement compétitionnées par un excès d'oligonucléotides, correspondant aux différents éléments de réponse nouvellement trouvés, suggérant que ces éléments fixent tous le même facteur de transcription (193). Ces éléments de réponse sont, en fait, des sites d'action du facteur Pit-1 (94) aussi appelé GHF-1 et PUF-1 (prolactin upstream factor -1) (195).

Une autre cartographie du promoteur proximal fut réalisée par l'équipe du Dr Richard Maurer en utilisant une approche de balayage par ajout d'oligomères (linker-scanning technique) (208, 209). Cette technique est basée sur le principe suivant: modifier la structure d'un site de restriction endogène du promoteur en le coupant avec l'enzyme correspondant et y fixer, par ligation, un oligomère contenant un site de restriction unique qui permet, après coupure, de rejoindre les deux fragments du promoteur. On peut insérer autant de mutations circonscrites qu'il y a de sites de restriction dans la région étudiée et créer, ainsi, une carte détaillée des éléments de réponses du promoteur. De cette manière, les mêmes éléments Pit-1 ont été cartographiés (1P à 4P) en plus d'un cinquième site situé entre -97 à -84 dont la séquence ressemble au consensus d'un site CRE (cAMP response elements). La mutation séquentielle ou combinée de ces sites montre qu'ils synergisent leur action sur l'activité basale du promoteur ou sur l'induction de l'expression par l'AMPc et le PMA (209). La mutation des cinq sites abolit complètement l'activité du promoteur suggérant qu'aucun autre site de régulation occupe l'espace situé au delà des 200 premiers nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Cependant, des études de "footprinting" à la DNase sur ces différents mutants du promoteur n'ont pas permis de démontrer une interaction physique mutuelle entre les facteurs *trans* pouvant expliquer cette synergie fonctionnelle.

D'autres études de "footprinting" et de mutagénèses réalisées par l'équipe du Dr Gutierrez-Hartmann ont permis de mettre en évidence la grande complexité structurale et fonctionnelle du promoteur proximal. En effet, 4 régions protégées sont retrouvées dans

les premières 210 pb et nommées FP-I à FP-IV (FP pour footprint) (210). Les sites FP-I, FP-III et FP-IV se superposent respectivement aux sites Pit-1 P1, P3 et P4 caractérisés par Rosenfeld. Ces trois éléments sont séparés, les uns des autres, par un nombre de tour complet de l'hélice d'ADN, évoquant l'idée que ces facteurs fixent l'ADN sur la même face favorisant, ainsi, leur interaction mutuelle et permettre une expression optimale du promoteur. Cette hypothèse fut étayée à l'aide de mutants dont les sites FP ont été disposés alternativement sur la face opposée de l'hélice d'ADN; il a été observé une diminution de la transcription *in vitro* (211). FP-I, FP-III et FP-IV fixent, en plus de Pit-1, un autre facteur spécifique à l'hypophyse et isolé à partir d'extraits de cellules sommatomammotropes (les lignées GC et GH3), nommé LSF-1 (lactotroph-specific factor- 1) (210). Lors d'études de transcription *in vitro*, LSF-1 active préférentiellement le gène de la PRL et très peu celui de la GH (212) mais stimule celui de la TSH β et fixe également son promoteur (213). La structure primaire du facteur LSF-1 n'est toujours pas connue.

De plus, les travaux du Dr Gutierrez-Hartmann ont permis de caractériser deux autres sites de régulation (212). À l'aide de mutants de délétion du promoteur proximal, un élément responsable de l'activité basale, nommé BTE (Basal Transcription Element), est délimité entre -112 et -85. Des essais EMSA montrent que ce site BTE est le siège d'un facteur transcriptionnel, BTF (Basic Transcription Factor) qui ne semble pas spécifique à l'hypophyse. BTE est contigu à FP-II, lui-même situé entre -120 et -130 et qui est caractérisé comme un site répresseur de l'activité du gène dans les cellules non hypophysaires. Par la même approche expérimentale, FP-II fixe un facteur appelé F2F qui, tout comme BTF, n'est pas spécifique à l'hypophyse. Des transfections transitoires utilisant un gène rapporteur dont l'expression est dirigée par le promoteur du gène de la PRL, montrent que le site BTE est responsable de la faible activité du gène de la PRL dans des lignées non hypophysaires. Des constructions contenant le site FP-II muté ou amputé amènent une élévation de l'expression non hypophysaire. Par contre, dans les cellules hypophysaires, la répression causée par FP-II est noyée par la stimulation qu'exercent les sites LSF-1. L'effet inhibiteur de FP-II s'exprime seulement si l'élément de réponse reste dans son contexte c'est-à-dire situé tout près du site BTE. L'ensemble des données nous permettent de postuler que l'absence d'expression du gène de la PRL de rat dans les tissus

non hypophysaires pourrait être la résultante d'une interférence de l'activité de BTF par F2F.

Vu le nombre important de sites Pit-1 retrouvés sur toute la partie 5' régulatrice du gène de la PRL et le rôle crucial que ce facteur tient dans le développement des lactotropes, il n'est pas surprenant qu'autant de publications lui soient consacrées. Les paragraphes qui suivent élaboreront sur le rôle spécifique que tient Pit-1 sur l'activité du promoteur proximal ainsi que sur les mécanismes d'action d'hormones et de facteurs de croissance modulant l'expression de cette même région.

Le mécanisme par lequel Pit-1 active la transcription du gène de la PRL reste obscure. Pit-1 est surtout vu comme un facteur stimulant indirectement la transcription soit en incurvant la structure de l'ADN (196), en interagissant avec d'autres facteurs, récepteurs nucléaires ou co-activateurs/répresseurs. Peu d'études documentent l'action "directe" de Pit-1 sur la transcription (197). Utilisant les premières 170 pb en amont du site d'initiation de la transcription fixées à une surface solide, des essais de transcription *in vitro* montrent que Pit-1 est requis, durant la formation du complexe de pré-initiation, afin d'activer la transcription.

L'expression de Pit-1, seul, ne peut expliquer l'activation sélective du gène de la PRL dans les lactotropes. Plusieurs équipes tentent d'isoler des facteurs activateurs spécifiques aux lactotropes, cependant, l'hétérodimérisation de Pit-1 avec d'autres facteurs ou récepteurs nucléaires, d'expression générale ou spécifique, pourrait expliquer, en partie, le confinement de l'expression du gène.

Les facteurs P-LIM et PTX-1, exprimés durant le développement de l'hypophyse, stimulent fortement les régions proximales et distales régulatrices du gène de la PRL, lors d'expériences de transfection transitoire si, et seulement si, Pit-1 est co-exprimé (77, 84). L'importance physiologique de ces interactions fonctionnelles reste à déterminer.

Pit-1 peut s'associer également à un autre facteur à domaine POU, d'expression plus étendue, Oct-1 (95). Ce dernier peut fixer l'élément de réponse Pit-1 à haute affinité,

Pit-1 1P (198). Le même genre d'expérience de co-transfection, utilisant toute la région régulatrice ou seulement l'élément 1P, montrent que Oct-1 et Pit-1 s'associent physiquement en solution, ou fixés à l'ADN, et synergisent leur action afin de stimuler l'expression du gène (95). Cette action concertée des deux facteurs serait importante durant l'ontogénie de la glande hypophysaire.

Lorsque des cellules GH3 ont été transplantées à des rats femelles Wistar-Furth on a observé une chute dramatique de l'expression du gène de la PRL. En effet, suite à leur passage *in vivo*, les cellules GH3 voient leur expression du gène de la PRL chuter de 95% comparativement aux gènes de la GH et de l'IGF-1 où il y a respectivement peu de changement et une élévation de 4 fois du nombre de messagers (199). La chute de l'expression de la PRL origine d'une inhibition de la transcription, telle que démontrée par transfection transitoire. Soixante-douze heures après la remise en culture des GH3, l'expression de la PRL s'est rétablie. L'expression du messageur et de la protéine du facteur Pit-1 n'est, cependant, pas affectée par ce passage *in vivo*. Par contre, l'analyse western blot présente de nouvelles protéines, de plus bas poids moléculaires, réagissant avec l'anti-Pit-1. Des études de EMSA montrent, par ailleurs, une perte de liaison de protéines sur la sonde Pit 1P durant le passage. La répression du gène de la PRL conjuguée à cette perte de liaison pourrait être reliée à l'apparition d'une de ces isoformes de Pit-1 (199). La caractérisation du messageur de cette isoforme, par RT-PCR, montre un messageur tronqué de 170 pb et présent seulement lors du passage *in vivo* mais disparaît graduellement suite au passage *ex-vivo* des GH3 coïncidant avec le regain d'expression de la PRL (200). Cette délétion correspond au retrait de l'exon 4 codant pour une partie du domaine POU. L'expression de cette isoforme dans les cellules GH3 entraîne une perte d'activité du promoteur complet (200). Le ou les facteurs responsables de l'expression de cette isoforme *in vivo* sont inconnus.

Il a été fait mention plus haut que plusieurs hormones et facteurs de croissance peuvent moduler l'expression de la PRL dans les lactotropes. Le promoteur proximal semble être le lieu privilégié de l'action de ces hormones.

La famille des protéines "Ets" sont des facteurs de transcription caractérisés, entre

autre, par un domaine de liaison à l'ADN unique et très bien conservé (201). Ils stimulent la transcription de gènes cibles suite à leur activation par la voie Ras-MAPK (201). Les facteurs Ets médient la voie de l'IGF-1. L'IGF-1 (insulin-like growth factor 1) stimule l'expression du message de la PRL et active le promoteur de la PRL en transfection transitoire (202). Les cellules GH3 expriment le message du gène de l'IGF-1 et on retrouve des taux élevés d'IGF-1 circulant chez les rats arborant des tumeurs dérivées de la transplantation de cellules GH3 (203 et 204). Le site d'action de l'IGF-1 est situé au niveau du promoteur proximal entre -101 et -76, une région contenant deux éléments *cis* Ets. L'expression d'un facteur Ets-1 dominant négatif inhibe l'action de l'IGF-1 sur ses éléments. Cette répression peut être reproduite par l'utilisation de MAPK et de Ras dominants négatifs.

La co-expression des facteurs Ets-1 et Pit-1 amène une activation optimale de l'activité du gène de la PRL dans un système hétérologue en présence d'IGF-1 (202). L'action combinée des deux facteurs, sur le promoteur proximal du gène de la PRL, nécessite une interaction physique directe (115). Cette interaction prend place sur un site composite (Ets-Pit-1) au niveau de l'élément FP-IV (214). De tels sites ne sont pas retrouvés sur le gène de la GH malgré la présence de sites Ets-1 et Pit-1 distincts suggérant que l'interaction Ets-1/Pit-1 pourrait être impliquée dans la spécificité de l'expression de la prolactine dans les lactotopes (115). De plus, Pit-1 β peut lier Ets-1, même en solution, afin de former un complexe inerte. Ces faits nous portent à croire que l'isoforme inactive de Pit-1 pourrait agir comme un dominant négatif physiologique sur l'expression du gène de la PRL en réprimant l'action du facteur Ets-1 (115).

L'insuline n'est pas en reste puisque des concentrations physiologiques de cette hormone stimulent également la transcription du gène de la PRL (205). Le site d'action de l'insuline est situé entre -106 à -87 (206). Des expériences de EMSA sur cet élément dévoilent la présence d'une protéine qui, lorsque les cellules sont incubées en présence d'insuline, fixe d'avantage cet ADN (206). Cette protéine, GABP, est un facteur transcriptionnel de la famille Ets et sa régulation est probablement médiée par les MAPK (207). Cependant, aucune étude ne documente l'intervention de Pit-1 intervient dans l'action de l'insuline.

La répression du gène par le facteur de transcription cJun est également médiée par la voie Ras/MapK. En effet, l'expression transitoire de cJun dans les cellules GH4 entraîne une chute de l'activité basale du gène de la PRL (219). Cette répression nécessite le site du promoteur proximal, FP-II. cJun nuit à la stimulation de l'activité du gène par Ras et les esters de phorbols (219). Cette inhibition est spécifique aux cellules hypophysaires car on remarque, plutôt, des effets opposés du proto-oncogène dans les cellules HeLa (219). L'absence de site consensus AP-1 sur le promoteur indiquerait que l'action de cJun serait indépendante de la liaison à l'ADN et pourrait agir par protéines interposées, probablement au site FP-II.

La voie de signalisation médiée par le proto-oncogène p21 Ras n'est pas la seule à acheminer le signal stimulateur d'hormones et de facteurs de croissance vers le promoteur proximal. L'EGF en est un exemple.

L'EGF est reconnu pour son action mitogénique sur les cellules. Cependant, le facteur de croissance agit différemment sur les cellules sommatomammotropes GH3 en stimulant l'activité de gènes spécifiques, comme celui de la PRL, en motivant les cellules à se différencier et à arrêter leur croissance (215-216). L'EGF stimule rapidement la transcription du gène de la PRL (215-216). Un site probable d'action de l'EGF sur le promoteur proximal est circonscrit entre les nucléotides -78 à -35 (217) ou plus largement entre -125 et -54 au site FP-II/BTE (220). L'utilisation d'un dominant négatif de Ras dans un modèle de cellules somatomammotropes GH4 ne nuit en rien à l'effet stimulateur de l'EGF sur l'activité du gène *in vitro* pas plus qu'un dominant négatif de MAPK; ce résultat suggère que la voie Ras/MAPK n'est pas impliquée dans l'action de l'EGF sur le gène de la PRL (218). Par une approche similaire, il a été montré que l'action de l'EGF est indépendante de c-Ets-1 et GHF-1. Selon les travaux du Dr Gutierrez-Hartmann, il appert que les voies EGF et Ras ne sont pas totalement indépendantes mais s'antagoniseraient (220). Le médiateur nucléaire de l'EGF sur le gène de la PRL reste inconnu.

Les facteurs de croissance de la famille FGF (fibroblast growth factor) sont des joueurs importants dans la croissance et la différenciation cellulaire et sont impliqués dans la progression tumorale de plusieurs tissus dont l'hypophyse (221-224). FGF-4 active

spécifiquement la transcription du gène de la PRL (224). Cette stimulation nécessite la participation d'un facteur transcriptionnel de la famille Ets et s'exerce sur le promoteur proximal aux niveaux de deux sites Ets (à -212 et à -96) (225). Précisément, le site -212, est un site composite Ets/GHF-1 (FP-IV), connu comme le siège de l'action de la voie Ras (214). Cependant, la signalisation intra-cellulaire, induite par le FGF, est indépendante de la voie Ras/Raf (225). De plus, la surexpression combinée des facteurs Ets-1 et GHF-1, dans le modèle cellulaire GH4, réprime la stimulation par le FGF (225). L'ensemble de ces données suggèrent que le FGF utilise un ensemble de facteurs nucléaires différents (donc un facteur Ets différent) que celui employé par la voie Ras mais tous deux convergent leur action sur le même élément de réponse (225).

Les seconds messagers, mobilisés par le TRH et la dopamine, exercent également leurs actions sur les structures régulatrices du gène de la PRL. Les esters de phorbols, l'activité de l'adénylate cyclase, le métabolisme des phosphatidylinositols et les taux de calcium intracellulaires sont reconnus comme des agents stimulant la transcription du gène de la PRL (190) tout comme certains agonistes comme la forskoline et les analogues de l'AMPc (226, 230).

La dopamine réprime la transcription du gène de la PRL à l'aide de récepteurs D₂ qui, lorsque activés, abaissent les niveaux d'AMP cyclique (AMPc) via les protéines G_i (190). La surexpression de la PKA, dans un modèle de cellules GH3 co-exprimant le récepteur D₂ ainsi que le promoteur du gène de la PRL, empêche la répression du gène de la PRL par un agoniste de dopamine, le quinpirole (227). Ces données présentent la PKA comme le médiateur de l'action de l'AMPc. Pourtant, aucun site consensus CRE (cAMP response element) n'est retrouvé dans la séquence du promoteur proximal du gène de la PRL (230) hormis celui suggéré par Maurer (209).

Utilisant un modèle de cellules GH4 exprimant de façon stable le récepteur D₂, l'équipe du Dr Harry Elsholtz a montré qu'un seul site Pit-1 (n'importe lequel) pouvait conférer l'inhibition par la dopamine (228). La même équipe a également montré que la dopamine réprimait l'activité du promoteur du gène Pit-1 (228). Dans un modèle cellulaire hétérologue, l'inhibition par la dopamine de l'activité du promoteur est totalement

dépendante de la présence de Pit-1 (229). La partie N-terminale de Pit-1 (le siège de la transactivation) est le domaine médiant l'action de la dopamine (229). Dans les prolactinomes, une corrélation importante semble lier les taux des messagers du récepteur D₂ et de Pit-1 (126). Il apparaît, donc, que l'action répressive de la dopamine, sur le gène de la PRL, nécessite Pit-1.

Pour sa part, l'équipe du Dr Gutierrez-Hartmann a voulu cartographier les sites d'action de l'AMPc sur le promoteur proximal du gène de la PRL (230). Aucune des mutations touchant les quatre sites FP (FP-I à FP-IV) pas plus que celle affectant le site BTE n'abolissent l'effet de la forskoline, un agoniste de l'AMPc. La stimulation du gène de la PRL par l'AMPc ne peut être reproduite dans des modèles cellulaires non hypophysaires malgré l'utilisation d'un promoteur délesté du site FP-II afin de favoriser l'expression ubiquiste du gène (230). Le semblant de site CRE situé entre -100 et -85, rapporté dans les travaux du Dr Maurer (209), serait impliqué, en partie, dans la réponse à l'AMPc (208). Isolé de son contexte génique, ce site est inactif mais, lorsque oligomérisé, il peut être fortement activé par l'AMPc dans les cellules hypophysaires et les fibroblastes (232). D'autres travaux montrent que la délétion successive des 4 sites Pit-1 rend le promoteur proximal insensible à l'AMPc ainsi qu'au TRH et au PMA (208). En conclusion, le ou les sites spécifiquement destinés à la réponse à l'AMPc, sur le promoteur proximal, ne sont encore pas clairement identifiés.

Le facteur CREB (cAMP Reponse Element Binding protein) est un médiateur important de la voie cAMP/PKA (231). Des résultats négatifs ont été obtenus suite à des tests de protection à la DNase 1, sur le promoteur, en utilisant la protéine CREB purifiée (230) et en EMSA avec le semblant de site CRE caractérisé par Maurer (232). Par conséquent, il serait raisonnable de croire que la réponse à l'AMPc sur le gène de la PRL ne requiert pas le facteur CREB. Pourtant, dans une lignée de cellules gliales, l'expression d'une protéine CREB, constitutivement active, stimule le promoteur et la co-transfection de Pit-1 rehausse d'avantage cet effet (233). Cependant, l'importance physiologique d'un tel phénomène reste à démontrer.

L'ensemble des données appuient l'hypothèse que Pit-1 pourrait servir d'effecteur

de la voie dopamine/cAMP. Le mécanisme par lequel Pit-1 médie la voie cAMP/PKA reste encore à définir mais on sait que la phosphorylation du facteur n'est pas en cause. En effet, la mutation des sites de phosphorylation ne nuit en rien à la stimulation du promoteur proximal par l'AMPc dans un modèle hétérologue (106).

Fait intéressant, une protéine de fusion GAL 4-Pit-1 n'est pas un transducteur de la stimulation, par l'AMPc, d'une construction GAL 4-luciférase dans les cellules GH3 (106). La co-expression, dans les cellules HeLa, de la PKA et de Pit-1 résulte en une stimulation synergique du promoteur proximal ou du site FP-1 seul (234). Ces résultats suggèrent que Pit-1 est nécessaire, mais pas suffisant, à la signalisation de l'AMPc.

La TRH est le premier peptide découvert possédant la capacité d'activer la transcription du gène de la PRL (190). L'action du TRH passe par un récepteur membranaire spécifique lié aux protéines $G_{\alpha q/\alpha 11}$ (236) qui sont connues pour activer la cascade phospholipase C/phosphatidylinositol et une mobilisation du calcium intracellulaire (190). Plusieurs preuves expérimentales montrent clairement que la PKC n'est pas impliquée dans ce mécanisme (235-236). Cependant, les esters de phorbols sont connus pour stimuler fortement la transcription du gène de la PRL suggérant un rôle de la PKC (186, 208, 217). Aucun site précis de l'action des esters de phorbols, sur le promoteur, n'a été clairement délimité mais on sait qu'il serait situé dans le promoteur proximal et pourrait impliquer des sites Pit-1 (186, 208, 217).

Le Ca^{2+} stimule spécifiquement et fortement l'accumulation du messager de la PRL dans les cellules lactotropes en culture via une augmentation de la transcription (237). Une augmentation de l'activité du promoteur est remarquée lorsque les cellules sont en présence du stimulateur du canal au calcium de type L, le BAY K 8644 (238). Une répression du promoteur est obtenue avec l'inhibiteur du même canal, la nimodipine (238). Plusieurs études appuient la thèse que le Ca^{2+} médierait l'action de la TRH (190). Par exemple, les cellules GH3 préincubées avec le chélateur du calcium, l'EGTA, deviennent insensibles au TRH mais l'ajout du Ca^{2+} et du TRH stimule fortement l'accumulation du messager de la PRL (239). L'utilisation d'agents inhibant les flux calcium intracellulaire et

de la nimodipine, sur les GH3, permet de conclure que la stimulation de la transcription du gène de la PRL par la TRH est animée par les flux de Ca^{2+} et non par le calcium intracellulaire stagnant (235).

Les travaux du Dr Maurer, sur la cartographie du promoteur du gène de la PRL de rat, montrent que les sites Pit-1 servent de points de mire à la régulation transcriptionnelle par le TPA (esters de phorbols), le TRH et l'AMPc (186, 208). Notamment, le rôle du site 1P dans la voie TRH/Calcium a été décrit (235). Des mutants de délétion du promoteur proximal ont permis de caractériser les sites 1P et 3P comme sièges de l'action du calcium et de la TRH (235). Une construction simple, contenant deux sites 1P en amont d'un promoteur minimal, possède la capacité d'être activée par le calcium et le TRH. Cette stimulation nécessite la fixation du facteur Pit-1 à l'ADN (235).

Le calcium pourrait stimuler la transcription via l'activation d'une protéine kinase dépendante du Ca^{2+} . Dans les cellules GH3 traitées au TRH, l'activité de la protéine kinase dépendante du Ca^{2+} /calmoduline de type II (CaMKII) est augmentée (240). L'inhibiteur des CaM Kinases, le KN-62, réprime l'effet stimulateur du TRH sur le promoteur dans les GH3 (241). De toutes les CaM kinases testées, la CaMK II est celle qui stimule le plus la transcription du gène (241). Les régions proximales et distales du promoteur sont impliquées et la mutation systématique de chaque site Pit-1 abolit l'action de la CaMK II (241). Cependant, la CaM Kinase II ne peut activer la transcription d'un promoteur constitué seulement de sites Pit-1 oligomérisés (241).

3.5) Enhanceur distal:

J'ai discuté brièvement du promoteur distal et de son rôle dans la restriction tissulaire de l'expression du gène de la PRL (181, 188, 193). Contrairement au promoteur proximal, peu d'études ont été consacrées à la caractérisation de l'enhanceur. On sait, cependant, que cette structure contient 4 sites Pit-1 (1D à 4D) ainsi que des sites d'action de certains agents et hormones dont l'EGF, l'AMPc, la TRH mais pas les esters de

phorbols (186). Ces sites restent encore mal définis. Outre ceux de Pit-1, l'élément de réponse aux estrogènes est le mieux caractérisé (134-136).

Les estrogènes sont, comme je l'ai déjà mentionné, de puissants stimulateurs de la transcription du gène de la PRL et influencent grandement la structure conformationnelle du promoteur *in vivo* (137-139). De plus, les estrogènes synergisent leur action avec Pit-1 sur l'activité de l'enhanceur (100, 112). Les estrogènes rehaussent également les réponses au TRH et à l'AMPc associées à l'élément distal (186). La séquence de l'enhanceur contient deux éléments de réponse atypiques aux estrogènes (136). À titre indicatif, un élément de réponse standard, comme celui du gène de la vitellogénine A2, est composé de deux hexanucléotides AGGTCA espacés de 3 pb avec un arrangement palindromique. Le premier des deux sites est situé à -1582 pb et il est bien conservé sauf pour deux bases discordantes dans l'hexanucléotide en 5' et une seule en 3'. La validation d'un tel site fut obtenue suite à des études de footprinting à l'exonucléase III (134), à des tests de liaison à l'ADN biotiné (135) et aux EMSA en utilisant des sondes de différentes tailles de l'enhanceur (134). La stimulation de la transcription, par les estrogènes, est complètement abolie lorsque ce site est inactivé par mutation ou par délétion (242). Cet élément de réponse fonctionne de façon indépendante du reste de l'enhanceur puisque, s'il est accolé directement au promoteur proximal, il confère une réponse aux estrogènes équivalente à l'enhanceur entier (135). De plus, la réponse aux estrogènes nécessite le domaine de liaison à l'ADN du récepteur nucléaire (135). L'ensemble de ces observations prouve que ce site contient l'activité stimulatrice des estrogènes sur la transcription du gène.

Le deuxième site, situé plus en amont à -1722, contient une partie 5' parfaitement conservée près d'un élément 3' fortement divergent du consensus (136). Ce site possède une affinité dix fois supérieure pour le récepteur aux estrogènes que celui en aval (136). Malgré cette grande affinité de liaison *in vitro*, rien n'indique que ce site pourrait être un autre siège de l'action des estrogènes. Ces mêmes études de liaison soutiennent, par ailleurs, que le récepteur aux estrogènes fixe le site sans être homodimérisé (136).

D'autres séquences, de natures différentes, truffent le promoteur distal. Ainsi,

deux régions de 58 et 178 pb bordent l'enhanceur. Ces régions sont constituées de séquences répétées en purine et en pyrimidine. Ces séquences sont reconnues pour réprimer la transcription du gène de la PRL ou d'un promoteur hétérologue (193, 243). Ces zones de séquences répétées sont dynamiques et peuvent prendre une structure d'ADN de forme Z, stabilisée par une superhélicité négative (244). Ces structures sont recrées *in vitro* par traitement du promoteur à la topoisomérase I et cette conversion en ADN Z (ou plutôt en ADN non-B) s'étale vers la région fonctionnelle de l'enhanceur (244). De plus, une autre région, riche en AT, est située immédiatement en aval de la séquence de 58 pb. *In vitro*, les deux brins d'ADN de cette région peuvent se désapparier et former de l'ADN simple brin (244). Le rôle précis de ces structures reste à être documenté mais leur action répressive sur la transcription pourrait indiquer que ces séquences répétées interféreraient avec l'action des éléments de réponse stimulateurs de l'enhanceur.

3.6) Conclusion:

La région 5' régulatrice du gène de la PRL est une structure à la fois simple et complexe où la simplicité de sa structure bipartite contraste avec la pléthore d'éléments de réponse et de facteurs de transcription qu'elle contient et dont la grande majorité reste encore à préciser, surtout en ce qui concerne l'enhanceur distal. La très grande conservation de la séquence du promoteur et de l'enhanceur (près de 90 %) entre le rat et l'humain (244) suggère la possibilité qu'il existerait de nouveaux sites de régulation transcriptionnelle.

À la recherche de nouveaux facteurs transcriptionnels hypophysaires, le Dr Jean-Marie Boutin a repêché dans une banque d'ADNc, provenant de cellules hypophysaires de rats traités aux estrogènes, COUP-TF II et ear II, deux récepteurs nucléaires orphelins d'expression ubiquiste et surtout connus comme des éléments *trans* répresseurs de la transcription des gènes et de la différenciation cellulaires. L'expression de tels récepteurs, dans l'hypophyse, nous portent à penser que COUP-TFII et ear II peuvent influencer l'activité du promoteur du gène de la PRL. Le chapitre six contient un manuscrit qui

résume les travaux sur COUP-TF II et qui décrit ce dernier comme un modulateur spécifique de l'expression du gène de la PRL dans les cellules somatomammotropes. Le chapitre qui suit, fait le résumé des connaissances sur COUP-TF.

CHAPITRE 4

LA FAMILLE DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES ORPHELINS COUP-TF

4.1) Généralités sur les récepteurs nucléaires:

La superfamille des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens/acide rétinoïque représente un grand nombre de protéines médiant l'action de plusieurs hormones telles: les glucocorticoïdes, les estrogènes, la progestérone, l'hormone thyroïdienne, les isomères de l'acide rétinoïque, la vitamine D et certaines prostaglandines/ leucotriènes. Tous ces récepteurs nucléaires possèdent une structure primaire très bien conservée et peuvent être segmentés en trois grands domaines: un domaine central de liaison à l'ADN, constitué de deux motifs en doigt de zinc, bordé d'un domaine N-terminal peu conservé et d'un domaine C-terminal contenant, entre autre, le site de liaison du ligand (245-246). De plus, le domaine C-terminal contient un sous-domaine de transactivation induit par le ligand ainsi que l'interface de dimérisation (245-246). Le domaine N-terminal, aussi variable dans sa longueur que sa composition, est le lieu d'interactions avec d'autres facteurs de transcription et possède des activités de transactivation (245-246). Malgré l'étendue de cette famille, ces récepteurs ne reconnaissent seulement que deux types de séquences: AGAACA ou GRE (glucocorticoid response element) et AGGTCA ou ERE (estrogen response element). L'organisation de ces éléments entre-eux et le contexte dans lequel ils sont placés, déterminent la spécificité de liaison des récepteurs (247-248) grâce à l'intervention de trois acides aminés, qu'ils contiennent, au niveau du premier doigt de zinc et dénommé la boîte P (249-251).

La liste des récepteurs décrite plus haut est incomplète puisque le clonage d'autres facteurs du genre, basé sur la grande homologie de séquence qu'ils partagent, a permis de caractériser plusieurs récepteurs aux ligands inconnus; ces récepteurs sont dits orphelins et représentent la grande majorité des molécules de cette superfamille (252). Parmi ces récepteurs orphelins se trouve la famille des récepteurs COUP-TF (253).

4.2) La famille COUP-TF:

4.2.1) Introduction:

COUP-TF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor) est le

mieux caractérisé des récepteurs orphelins. Ce facteur fut d'abord identifié comme un complexe homodimérique fixant un élément de réponse, composé de deux demi-sites AGGTCA organisés en répétition directe ("direct repeat"), dans le promoteur du gène de l'ovalbumine de poulet (254-256). Cette séquence est essentielle pour la transcription *in vitro* du promoteur (254-255). Le facteur fut purifié par chromatographie d'affinité à partir d'extraits de cellules HeLa et de tissus d'oviductes de poulet (254, 257, 258). Un anti-sérum développé contre le facteur purifié a permis d'isoler un clone provenant d'une banque d'expression de cellules HeLa et dénommé COUP-TF I (256). Au même moment, une autre équipe clone également COUP-TF I en utilisant son homologie avec erba humain et fut nommé EAR-3 (259). En utilisant la même stratégie, COUP-TF II/ARP-I fut cloné par homologie de séquence avec COUP-TF I (260, 261). Ces deux gènes ont une homologie globale de 87% avec une identité en séquence d'acides aminés de 98 et 97% aux niveaux des domaines de liaison à l'ADN et des domaines de liaison du ligand respectivement (253). Basés sur la séquence de leur boîte P, les deux facteurs COUP-TF sont classés dans la sous-famille des récepteurs nucléaires ER/TR qui reconnaissent la séquence répétée Pu-GGTCA (253). Respectivement, les gènes pour COUP-TF I/EAR-3 et COUP-TF II/ARP-I sont localisés sur les chromosomes humains 5 (259) et 15 (261).

Les facteurs COUP-TF peuvent également être classés selon leur masse moléculaire en deux groupes: les récepteurs de bas poids moléculaire situés entre 43 à 48 KDa dont font partie les COUP-TF I et II et ceux de haut poids moléculaire entre 66 et 74 KDa (260).

Le récepteur nucléaire EAR-2 possède une grande homologie de séquence d'acide aminé de 83 et de 70% avec les domaines de liaison à l'ADN et au ligand de COUP-TF I respectivement (259). Malgré cette ressemblance, les avis sont partagés quant à l'admission de EAR-2 dans la famille COUP-TF (253, 262, 263). Deux articles de revue par Mangelsdorf *et al.* classifient les membres de la famille COUP-TF en COUP α (COUP-TF-I/EAR-3), COUP β (COUP-TFII/ARP-I) et COUP γ (EAR-2) (264, 317). Cette nomenclature est raisonnable puisque le récepteur RXR α ayant la plus forte homologie avec COUP-TF I, après EAR-2, possède une homologie de séquence plus près des autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires que de EAR-2 (253). De

plus, plusieurs activités biologiques sont partagées entre COUP-TF et EAR-2 (exemples: 265-269). Cependant, les connaissances sur EAR-2 sont beaucoup moins étoffées si elles sont comparées à celles sur COUP-TF I/II. Il existe également d'autres membres de la famille COUP-TF retrouvés exclusivement chez les vertébrés inférieurs (253, 264).

La comparaison des séquences inter-espèces montre une très grande conservation de la structure depuis les métazoaires primitifs jusqu'à l'homme (253). À preuve, COUP-TF est fortement homologue au produit du gène *Seven-up* de la drosophile (93% d'identité dans le domaine de liaison à l'ADN) qui joue un rôle clef dans la différenciation des cellules photoréceptrices (270). La structure du gène de COUP-TF est unique parmi les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires se distinguant par la co-localisation de ses deux doigts de zinc sur le même exon suggérant que le gène de COUP-TF pourrait être un gène ancestral du point de vue évolutif (271).

La comparaison des séquences nous en dit encore plus. En effet, la structure primaire du domaine de liaison à l'ADN des différentes isoformes de COUP-TF est identique chez une même espèce (272) suggérant que les récepteurs partagent un élément de réponse similaire, voir identique. De plus, la séquence du domaine de liaison du ligand est virtuellement identique à 99.6% chez tous les vertébrés (272). Cette donnée nous portent à penser que le domaine de liaison au ligand est essentiel aux activités biologiques de COUP-TF. Power *et al.* ont testé près de 150 composés susceptibles d'être des ligands potentiels de COUP-TF mais aucun d'eux n'a réussi à activer un récepteur COUP-TF chimérique où le domaine de liaison à l'ADN a été remplacé pour celui du récepteur à la progestérone (273).

On remarque une grande divergence structurelle du domaine N-terminal des différentes isoformes de COUP-TF suggérant une spécificité d'action (256, 259-261). Une analyse plus poussée de la structure du domaine montre la présence de régions riches en proline et glutamine qui calquent les domaines d'activation des facteurs de transcription CTF/NF-1 (proline riche) et de SP1 (glutamine riche) (253). De plus, des sites consensus de phosphorylation pour la kinase dirigée par la proline (3 dans le domaine N-terminal et 2 dans le domaine C-terminal) et pour la kinase A (2 dans le domaine de liaison à l'ADN)

sont présents et conservés pour COUP-TF I et II (260).

4.2.2) Structures des éléments de réponse COUP-TF:

Le site original de fixation de COUP-TF sur le gène de l'ovalbumine est composé de deux demi-sites répétées imparfaits GTGTCAAAGGTCA (254-255). Des tests d'interférence à la méthylation indiquent que les guanosines des deux demi-sites sont importants pour la liaison du facteur à l'ADN (274-275). De tous les sites naturels connus pour fixer COUP-TF, la séquence répétée AGGTCA dont les demi-sites sont espacés d'un nucléotide (ou DR1 pour direct repeat 1) représente le consensus et est retrouvée dans les promoteurs des gènes pour l'apolipoprotéine CIII, A1 et VLDLII chez différentes espèces (276-277), les gènes de la lactoferrine (278), de OCT4 (279) et du promoteur viral MMTV chez la souris (280). Cependant, COUP-TF peut également lier l'ADN sur le DR0 du gène de l'ocytocine (281), le DR2 du gène de l'actine III B (282), le DR6 du gène de l'insuline (275), le DR7 de l'arrestine (283), le DR9 du HIV-LTR (284), et même du DR24 du gène du récepteur aux estrogènes (285). Le facteur peut même fixer des demi-sites répétés inversés dont les espacements s'étalent sur 8 et 14 nucléotides retrouvés dans le promoteur du gène de l'acyl-coA déshydrogénase (286).

Cooney *et al.* ont effectué une analyse systématique de l'affinité de COUP-TF pour différents éléments de réponse synthétiques par EMSA (287). Les résultats montrent que l'affinité de COUP-TF pour les séquences AGGTCA répétées dépend de l'espacement des demi-sites: DR1>DR6>DR4>DR8>DR0>DR11. Bien que COUP-TF peut fixer des séquences inversées, et même palindromiques, l'affinité du récepteur reste la plus grande pour le DR1(287) et s'y accole en dimère (255). COUP-TF peut même lier, en dimère, des sites monomériques avec une grande affinité (288, 289). Cette propriété singulière de reconnaître autant de séquences nous portent à penser que COUP-TF doit posséder une structure suffisamment flexible afin d'adopter la conformation voulue pour fixer tous ces éléments (253).

4.2.3) Mécanismes d'action de COUP-TF:

L'ensemble des données sur les récepteurs de la famille COUP-TF permet de définir 5 mécanismes d'action:

4.2.3.1) Compétition pour l'élément de réponse:

Il a été mentionné, plus haut, que COUP-TF fixe un grand nombre de sites sur l'ADN dont plusieurs sont partagés avec ceux des récepteurs pour l'hormone thyroïdienne, la vitamine D et l'acide rétinoïque. Ainsi, COUP-TF peut interférer directement sur l'action des trois hormones en fixant leur élément de réponse (308-309). De la même façon, COUP-TF antagonise la liaison des récepteurs RXR, PPAR (proliferator-activated receptor), SF1, HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4), ainsi que le récepteur de l'hormone estrogène (266, 308-315, 316). Il perturbera, ainsi, l'action des hormones liant les récepteurs RXR, PPAR et ER.

4.2.3.2) Hétérodimérisation avec le récepteur RXR:

Le récepteur RXR forme des complexes hétérodimériques avec RAR, TR, VDR, PPAR ainsi qu'avec certains récepteurs orphelins (317). Les hétérodimères formés entre les quatre premiers récepteurs, décrit plus haut, et RXR, ont beaucoup plus d'affinité pour leur élément de réponse respectif que leur version homodimérique (317). Ainsi, le récepteur RXR augmente le potentiel de transactivation de ce groupe de récepteurs (317). RXR permet aux récepteurs orphelins, tels LXR, NGFI-B et FXR, une réponse à l'acide 9-cis rétinoïque, le ligand de RXR (317).

En solution, COUP-TF ne forme pas de complexe stable avec RXR mais hétérodimérise facilement avec ce dernier sur l'ADN pour former ainsi un complexe inactif (287, 309, 310). En titrant ainsi le récepteur RXR, COUP-TF diminue indirectement l'affinité des récepteurs TR, VDR, RAR et PPAR pour leur élément de réponse et, par conséquent, réprime leur activité de transactivation (308, 309). Une sur-expression de

RXR vient contrecarrer l'effet de COUP-TF (308).

COUP-TF peut former des hétérodimères directement avec TR et RAR sur l'ADN (318) ou en solution (319) afin de réprimer leur action; cependant, ces hétérodimérisations ne sont pas toujours systématiquement observées (308). De plus, COUP-TF peut interférer avec l'action du récepteur aux estrogènes en formant un hétérodimère, avec lui, en solution (289).

4.2.3.3) Répression active:

En plus de réprimer l'activation des récepteurs par leur ligand, COUP-TF inhibe également l'activité basale des gènes (exemple: 308); on parle alors de répression active. Il a été montré que COUP-TF interagit avec le facteur de transcription général TFIIB *in vitro* (320-321, 267). Cette interaction maintiendrait TFIIB sous une forme inactive bloquant ainsi le mécanisme de la transcription (322). Des tests fonctionnels appuient cette hypothèse mais, indiquent en plus, que cette répression nécessite la fixation de COUP-TF sur son élément de réponse car cette inhibition n'est pas observée avec des promoteurs dépourvus de tels sites, rejetant l'hypothèse d'une action non-spécifique (quelching effect) de COUP-TF sur la machinerie transcriptionnelle (308, 323).

À l'instar des récepteurs TR et RAR, COUP-TF possède un domaine de répression active dans sa partie C-terminale, siège du domaine de liaison du ligand (LBD) (308, 323). Leng *et al.* ont remarqué qu'une construction chimérique composée du domaine de liaison du ligand de COUP-TF I fusionné au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (DBD GAL4) peut réprimer l'activité basale d'un promoteur TK/GAL4 (323). L'analyse de mutants délétionnels de la partie LBD a permis de circonscrire le domaine de répression aux derniers 25 acides aminés du domaine (323). Pour sa part, la cartographie du domaine de répression active de COUP-TF II, réalisée par Achatz *et al.*, montre plutôt un domaine beaucoup plus large englobant presque toute la région du LBD (262). Les différences remarquées entre les deux récepteurs sont surprenantes compte tenu de leur très grande similarité structurale. Fait remarquable dans les deux cas, le domaine de

répression de COUP-TF n'englobe pas la région "hinge", région contenant l'interface d'interaction avec les co-répresseurs et responsable de la répression active des récepteurs RAR et TR en l'absence de leur ligand (324).

COUP-TF peut réprimer l'activité de transactivation de plusieurs transactivateurs (323). Il serait surprenant que COUP-TF puisse interférer directement avec l'activité de tous ces transactivateurs. En fait, il serait plus raisonnable de croire que COUP-TF fixerait, plutôt, un facteur commun pour tous ces transactivateurs comme, par exemple, les co-répresseurs SMRT et N-CoR (324, 325). Deux équipes ont démontré que de telles interactions entre COUP-TF et les co-répresseurs SMRT et N-CoR existaient et étaient impliquées dans le processus de la répression active (326, 327).

4.2.3.4) Transrépression:

COUP-TF peut donc former des hétérodimères avec les récepteurs RAR, TR et RXR. Ces interactions seraient médiées par les interfaces de dimérisation situées sur chaque domaine LBD des deux récepteurs (328). En fait, le LBD de COUP-TF est nécessaire et suffisant pour fixer les récepteurs RAR, TR et RXR associés à leur élément de réponse correspondant et réprimer l'activité transcriptionnelle basale ou activée d'un promoteur (323, 326). COUP-TF peut, donc, réprimer l'activité transcriptionnelle en liant "indirectement" l'ADN. Ce mécanisme de répression transcriptionnelle où COUP-TF, pour agir, doit établir des interactions protéine-protéine avec des récepteurs nucléaires, eux-mêmes, associés à leur élément de réponse est appelé transrépression.

La cartographie de l'activité de transrépression de COUP-TF, établie par deux équipes, ne fait pas consensus (323, 326). Leng *et al.* ont fixé la région de transrépression de COUP-TF I aux 15 derniers acides aminés du LBD (323). Une étude plus détaillée sur COUP-TF II, par l'équipe de Paulweber, montre un domaine de transrépression étalé sur presque tout le LBD, incluant l'interface de dimérisation, et un deuxième domaine couvrant le DBD (326). Cette dernière donnée est intéressante, car, si la transrépression ne nécessite pas la liaison directe de COUP-TF II à l'ADN, son domaine de liaison à l'ADN,

lui, est crucial pour cette activité (326).

Le mécanisme précis de la transrépression n'est pas connu. On croit, cependant, que COUP-TF pourrait neutraliser le domaine d'activation du récepteur nucléaire avec lequel il hétérodimérise ou, encore, réduire l'affinité du récepteur pour son ligand. La capacité de COUP-TF à réprimer directement la transcription nous porte à penser, qu'il est possible, qu'à la suite de sa liaison sur un récepteur nucléaire, COUP-TF va agir directement ou indirectement sur la machinerie transcriptionnelle .

4.2.3.5) Transactivation:

Les rôles physiologiques de COUP-TF ne sont pas encore clairement définis mais l'action répressive du facteur, sur la transcription, ne fait aucun doute (253) même si, à l'origine, COUP-TF fut isolé et caractérisé comme un activateur de la transcription du gène de l'ovalbumine de poulet (254, 255). Depuis, il a été montré que COUP-TF stimulait l'activité de quelques gènes: transferrine (313), protéine de liaison des acides gras (329), MMTV (330), HNF1 (331), ornithine transcarbamylase (332) et l'activité basale du LTR du HIV-1 (305). COUP-TF peut potentialiser l'action des facteurs HNF-1 et -3 sur le gène d'un cytochrome P-450 (268). Il peut également servir comme facteur accessoire pour l'activation de certains gènes par les glucocorticoïdes (334) et les estrogènes (285). L'activation de la transcription, par COUP-TF, peut également être stimulée par la dopamine (305) et le sérum (288). Dans certains cas, sur le même gène, COUP-TF peut se comporter à la fois comme un activateur ou un répresseur selon la séquence étudiée (334, 335), la présence d'autres récepteurs nucléaires (283) et le contexte cellulaire (334).

Le mécanisme de cette transactivation, induite par COUP-TF, n'est pas connu. Cependant, les premières bribes d'explication viennent du travail combiné de deux laboratoires canadiens (336). À l'aide d'un système de clonage par double-hybride chez la levure, Marcus *et al.* ont repêché une protéine interagissant avec COUP-TF II *in vitro* (336). Cette protéine est, en fait, un ligand pour la tyrosine kinase p56^{lck} et est dénommé ORCA. ORCA agit comme un co-activateur de COUP-TF en donnant, à ce dernier, la

capacité d'activer la transcription des gènes (336). Le mécanisme par lequel ORCA stimule l'activité de transactivation de COUP-TF n'est pas encore documenté.

4.2.4) Expression tissulaire de COUP-TF:

Le patron d'expression de COUP-TF, au cours du développement, a été étudié chez plusieurs espèces dont la souris, le poulet, le poisson-zèbre, la grenouille et la drosophile (272). Il faut noter que chez toutes les espèces étudiées, COUP-TF est exprimé, en gros, dans les mêmes tissus et tout particulièrement dans certaines zones bien définies du système nerveux central. Chez la souris, les patrons d'expression de COUP-TF I et II ne sont parfaitement superposables mais on note plutôt, et contrairement à COUP-TF II, une forte expression de COUP-TF I dans le SNC (Système Nerveux Central) et une présence moins marquée dans les organes internes (253, 263).

Chez la souris, cette expression débute au jour 7.5 pc (post-coitus), est maximale au 15 ième jour pour ensuite péricliter avant la naissance (290). Si COUP-TF s'exprime de façon généralisée dans l'organisme en développement, on note cependant des points chauds d'expression, et plus particulièrement dans le cerveau où, à mesure que le développement progresse, les patrons d'expression de COUP-TF I et II se chevauchent sans être, toutefois, parfaitement superposables (290). Chez l'animal adulte, l'expression ubiquiste (261) de COUP-TF est beaucoup moins intense (291). Dans le cerveau de la souris, on retrouve COUP-TF I surtout dans les parties rostrales et caudales et COUP-TF II occupe plutôt la portion médiane (291).

Plusieurs preuves expérimentales appuient l'hypothèse que COUP-TF serait impliqué dans le développement du tissu neural, hypothèse étayée par l'expression importante du facteur dans le cerveau. Premièrement, l'acide rétinoïque induit la différenciation neuronale de la lignée cellulaire P19 ainsi qu'une induction parallèle de l'expression de COUP-TF (292). Le promoteur du gène de l'arrestine possède un élément de réponse du type DR7, très bien conservé, qui peut lier COUP-TF I et II (283). La transfection d'une lignée cellulaire hétérologue avec le promoteur de l'arrestine, en face du

gène CAT, montre que COUP-TF I/II peut antagoniser l'expression de l'arrestine, stimulée par l'acide rétinoïque, en présence des récepteurs pour la vitamine (283). En absence des récepteurs RAR, COUP-TF stimule alors l'activité de l'arrestine dans le même modèle *in vitro*. Des études d'hybridation *in situ* montrent une relation entre l'expression de COUP-TF et celle de l'arrestine dans la rétine en formation (283). Durant le développement cérébral de la grenouille et du poisson, la voie de l'acide rétinoïque et de COUP-TF sont intimement intriquées (253).

Les premières deux cents paires de bases de la région 5' régulatrice du gène de COUP-TF II, de souris, supportent l'activité basale du gène ainsi que l'induction par l'AMPc et l'acide rétinoïque (293). De fait, on trouve un élément de réponse pour l'AMPc (CRE) ainsi qu'un site atypique pour l'acide rétinoïque (appelé HRE) (293). La mutation de ces sites montre que le CRE est responsable de l'induction par l'AMPc mais pas le HRE suggérant une action indirecte de l'acide rétinoïque (293).

L'acide rétinoïque n'est pas le seul morphogène influençant l'expression de COUP-TF. Sonic hedgehog (Shh) est un morphogène sécrété durant le développement embryonnaire, impliqué dans la formation du patron dorso-ventral du tube neural (294). Il est bien connu que Shh induit la différenciation des neurones-moteur, événement relié à l'apparition de marqueurs sélectifs dont COUP-TFII (295). Krishnan *et al.* ont démontré que la présence de Shh stimulait l'expression du transcript de COUP-TF II dans les cellules P19 (296, 297). *In vitro*, Shh augmente l'activité du gène CAT, commandé par un fragment de 1.6 Kb du promoteur de COUP-TF II, introduit dans le même modèle cellulaire (296). Un élément de réponse atypique de Shh a été recensé entre -1343 à -1267 (296).

4.2.5) Rôles physiologiques proposés de COUP-TF:

Il faut reconnaître la grande étendue d'action des récepteurs de la famille COUP-TF sur l'activité transcriptionnelle des gènes soit en les réprimant, les activant ou même en interférant avec les signaux hormonaux influençant l'expression de ces mêmes gènes.

Cependant, on commence à peine à réaliser toute l'importance que prennent ces facteurs dans l'organisation du vivant et de son développement.

Ainsi, la présence hâtive de COUP-TF durant le développement et les interactions qu'entretient COUP-TF avec deux morphogènes, supportent l'hypothèse que ces récepteurs orphelins ont un rôle à jouer dans l'organogénèse, surtout au niveau du tissu nerveux. Par exemple, l'hormone thyroïdienne affecte le développement des cellules de Purkinje et stimule l'expression du gène PCP-2 (Purkinje cell protein-2) de façon transitoire pendant la deuxième et la troisième semaines *post-partum* chez le rat et la souris (298). Le gène PCP-2 n'est pas stimulé pendant la vie fœtale malgré la présence, à la fois, d'un taux suffisant de T3 dans le cerveau ainsi que des récepteurs pour l'hormone thyroïdienne (298). Anderson *et al.* ont observé que COUP-TF fixait le TRE, responsable de l'action de la T3, sur le gène PCP-2 et que la sur-expression de COUP-TF perturbait la stimulation du gène PCP-2 par l'hormone thyroïdienne *in vitro* (298). L'hypothèse soulevée par les auteurs veut que COUP-TF modulerait le développement des cellules de Purkinje en retardant l'action de la T3 sur ces cellules. Cette hypothèse est étayée par des études d'immunohistochimie, sur des coupes de cerveaux collectés à différents moments du développement, qui montrent une relation inverse entre la présence de COUP-TF dans les cellules de Purkinje et leur réponse à l'hormone T3 (298).

COUP-TF influence, également, le processus de différenciation d'autres tissus. Des niveaux très élevés d'expression de COUP-TF II sont retrouvés dans les muscles squelettiques et cardiaques (261). Il a été observé que COUP-TF II s'immisçait dans le mécanisme de la myogénèse en antagonisant l'action des gènes de la famille MyoD, facteurs myogéniques impliqués dans les différentes étapes de la différenciation du tissu musculaire (299), en réprimant directement leur expression (300).

Le facteur PEBP2 α B joue un rôle clef dans la différenciation granulocytaire de la lignée myéloïde 32Dc13 par le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) (301). Récemment, Ahn *et al.* ont montré une chute de l'expression de EAR-2 dans les cellules 32Dc13 traitées par le G-CSF, mais, la présence de EAR-2 exogène renversait la différenciation de ces cellules, probablement, en interagissant directement avec PEBP2 α B,

entraînant ainsi l'inactivation de ce dernier (302). On peut tirer de tout ceci qu'il existe un équilibre, entre l'expression de facteurs pro-différenciateurs et les membres de la COUP-TF, qui est déterminant dans la bonne marche de l'ontogénie de plusieurs tissus.

Ce même équilibre peut être rompu dans certaines pathologies. La résistance à l'acide rétinoïque, de lignées cellulaires de cancer du poumon humain, était reliée soit à une baisse d'expression de COUP-TF ou d'une hausse de celle du récepteur *nur77* (303). La transfection stable de telles lignées, par COUP-TF, pouvait renverser le phénotype de ces cellules et ainsi voir leur croissance régulée par l'acide rétinoïque (303).

J'ai déjà fait mention que la structure primaire de COUP-TF contient des sites consensus de phosphorylation, par différentes kinases, soulevant l'idée que ces récepteurs pourraient médier des voies de signalisation hormonales. En effet, des concentrations physiologiques de dopamine activent COUP-TF dans un modèle de cellules CV1 transfectées d'un vecteur d'expression de COUP-TF, où son domaine de liaison à l'ADN a été échangé pour celui du récepteur à la progestérone (PR) afin d'éviter toutes interférences avec le COUP-TF endogène; précisons que les CV1 sont dépourvues en PR et répondent naturellement à la dopamine (273). La liaison directe du neurotransmetteur sur COUP-TF n'est pas en cause dans cette activation qui serait due, plutôt, à la phosphorylation du récepteur nucléaire car cette même stimulation pouvait être simulée par un traitement au 8-Br-AMPC ou à l'acide okadaïque (273). L'utilisation d'un tel récepteur synthétique ne nous permet pas de conclure sur l'importance physiologique d'une telle activation de COUP-TF par la dopamine. Utilisant un modèle expérimental similaire, le même genre d'activation, par la dopamine, peut être reproduite sur plusieurs récepteurs stéroïdiens (304). Plus récemment, une équipe française a démontré que, dans certaines lignées cellulaires neuronales, la présence de dopamine stimulait l'activité du promoteur du HIV-1 seulement en présence d'une sur-expression de COUP-TF (305).

Si l'expression ectopique de *svp* et de COUP-TF, chez la *Drosophile* et le *Xénope*, perturbait le développement du système visuel et l'organisation développementale respectivement (253), l'étude des fonctions biologiques de COUP-TF chez la souris a été abordée par l'inactivation du gène par recombinaison homologue (306).

Les souris homozygotes, pour l'inactivation du gène de COUP-TF I, meurent entre 8 à 36 heures après leur naissance (306). La cause de leur mort vient d'une incapacité à se nourrir. L'analyse plus poussée du phénotype montre que le développement de certains nerfs craniens tels les IX (glossopharyngé) et X (vague) est gravement perturbé ce qui résulte en des troubles moteurs et sensoriels expliquant cette inabilité qu'ont ces souris à se nourrir. Certaines anomalies du développement osseux sont également observées. Malgré la très grande homologie de structure que partagent COUP-TF I et II, les phénotypes observés chez ces souris prouvent que ces récepteurs tiennent des rôles différents et ne peuvent être substitués.

Les souris homozygotes pour l'inactivation du gène de COUP-TF II ne survivent pas après le jour e10; cette létalité embryonnaire n'est pas encore expliquée mais il apparaît clairement que COUP-TF II semble jouer un rôle déterminant dès les premiers jours du développement (253).

4.3) Conclusion:

Les récepteurs nucléaires de la famille COUP-TF sont des molécules qui fascinent par leur expression étendue, dans le temps et l'espace, par la plasticité de leur domaine de liaison à l'ADN ainsi que par leur très grande conservation de structure au cours de l'évolution. La question à savoir si COUP-TF possède ou non un ou plusieurs ligands reste encore sans réponse. La très grande conservation du domaine de liaison du ligand est un indice en faveur de l'existence d'un ligand pour COUP-TF. La caractérisation d'un tel ligand pourra ajouter de nouvelles données sur le mécanisme par lequel COUP-TF régule l'activité transcriptionnelle de très nombreux gènes et peut-être, ainsi, mieux saisir la nature contradictoire des effets de ces récepteurs sur l'expression de ces mêmes gènes. Un indice vient de la découverte récente de ligands potentiels pour le récepteur orphelin HNF-4 (307). Il a été remarqué que HNF-4 α active, ou réprime, la transcription du gène de l'apo CIII *in vitro* selon le type d'acyl-Coa gras fixé au récepteur (307).

Le chapitre six contient un manuscrit d'article qui présente COUP-TF II comme un

nouveau facteur réprimant spécifiquement l'activité du gène de la PRL de rat dans les somatomammotropes.

DEUXIÈME PARTIE

PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

ET DISCUSSION

CHAPITRE 5

Autoregulation of the rat prolactin gene in lactotrophs

Dominic Devost, Jean-Marie Boutin

Molecular and Cellular Endocrinology 158 (1999) 99-109

Autoregulation of the rat prolactin gene in lactotrophs

Dominic Devost, Jean-Marie Boutin *

Laboratory of Molecular Endocrinology, Centre de Recherche, Hôtel-Dieu du CHUM, University of Montreal, 3840 St-Urbain, Montréal, Québec, Canada H2W 1T8

Received 19 May 1999; accepted 30 August 1999

Abstract

The autoregulation of prolactin (PRL) secretion in the rat has been demonstrated at both the hypothalamus and the pituitary levels. Studies on the direct negative feedback effect of PRL in the lactotrophs have concentrated on the acute effect on PRL secretion which does not involve change in PRL synthesis. In this study, we have developed a cotransfection assay in somatolactotrophs where we examine the effect of PRL on the transcription of its own gene. We found that oPRL, at physiological concentrations, exerts a strong and specific inhibition of the rPRL gene transcription in PRL-deficient GC cells. This effect is mediated by both the intermediate and the long forms of PRL receptor. The inhibition was also reproduced in GH₃ cells, which secretes PRL, by adding exogenous oPRL in the presence of anti-rat PRL antiserum to neutralize endogenous rPRL. Cellular specificity was demonstrated by testing this regulation in non-pituitary cell types where no modulation of the PRL promoter reporter gene could be elicited by PRL, even with cotransfection with the Pit-1 expression vector. Finally, deletions of the rPRL promoter indicate that the full inhibitory effect of PRL requires the same regulatory domains (proximal and distal) that have been described for the other PRL gene regulators. These results strongly suggest the existence of the extra-short loop regulation of the rat PRL at the transcriptional level. © 1999 Published by Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Prolactin; Autoregulation; Transcription; Rat somatolactotrophs

1. Introduction

Prolactin (PRL) is unique among anterior pituitary hormones in that its secretion is not controlled via the long loop feedback of an end organ product. The observation that high serum levels of PRL inhibit PRL production has been linked to feedback sites in both the hypothalamus and the pituitary (Ben-Jonathan et al., 1989). There is compelling evidence that PRL acts at the hypothalamic level by a short loop mechanism to modulate its own release. It has been clearly shown that PRL increases synthesis, turnover and release of dopamine by the tuberoinfundibular neurons (Ben-Jonathan et al., 1989). On the other hand, there are good reasons to suspect direct action of PRL on pituitary cells. Indeed, PRL receptors have been detected on rat anterior pituitary cells (Frantz et al., 1975; Chiu et al., 1992; Meister et al., 1992) and more specifically

on rat lactotrophs themselves (Giss and Walker, 1985; Morel et al., 1994). Evidence for this extra-short loop has been difficult to obtain for technical reasons, the major one being the fact that it is difficult to measure the effect of exogenous PRL in the presence of the endogenous hormone secreted by lactotrophs. In spite of these problems, many investigators were able to demonstrate convincingly this autocrine effect (Herbert et al., 1979; Melmed et al., 1980; Zacur et al., 1982; Kadowaki et al., 1984; Hosojima and Wyche, 1985; Frawley and Clark, 1986; Bentley and Wallis, 1987; Ho et al., 1989). All these studies were related to the acute effect of PRL occurring during the first 2 h after the addition of PRL. This effect seems to result from a transient decrease in release or an increase in uptake of PRL without effect at the synthesis level (Herbert et al., 1979; Melmed et al., 1980; Kadowaki et al., 1984; Hosojima and Wyche, 1985). However none of these studies addressed the question of the autoregulation on transcription and synthesis of PRL. Here we report that PRL causes a strong inhibition of its gene transcription. This autoregulation is cell- and promoter- specific.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

Rat pituitary GH₃ and GC cell lines were grown on poly-D-lysine pre-treated plastic dishes in Ham's F-10 and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM +) containing 4.5 g/l glucose (Gibco-BRL), respectively. Those media were supplemented with 12.5% horse serum (HS) (Hyclone) and 2.5% fetal bovine serum (FBS) (P.A. Biologicals). Human hepatoma (HepG2) cell line was grown on non-treated plastic dishes in DMEM + supplemented with 10% FBS. The rat lymphoma Nb₂ cell line was grown, in suspension, in RPMI 1640 medium (Gibco-BRL) supplemented with 10% FBS, 5% HS and 0.1 mM β -mercaptoethanol. Mouse mammary epithelial cell line HC11 was grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and 5 μ g/ml of bovine insulin (Sigma). COS-7 were grown in DMEM + supplemented with 10% FBS. Antibiotics were added at standard concentrations in all cell media.

2.2. Plasmids

RSV long terminal repeat, rat prolactin and rat growth hormone gene promoter/luciferase constructs have been described (Nelson et al., 1988). The long and intermediate (Nb2) forms of rat prolactin receptor were subcloned from the original Bluescript plasmids (Boutin et al., 1988; Shirota et al., 1990; Ali et al., 1991) in the expression vector R-EXP (Naar et al., 1991) by excising receptor genes with *Kpn1/Xba1* restriction enzymes. The β -casein construct (pSVOCAT) was obtained from Dr P. Poyet (Rosen et al., 1989). The 2.8 KDa promoter fragment was excised by *XbaI* digestion, blunted and subcloned into the firefly luciferase reporter plasmid pSV2-luc (de Wet et al., 1987). The long form of the rat PRLR, tagged with the octapeptide FLAG and cloned in the pcDNA3 vector (Invitrogen), was a generous gift from Dr M. Edery (Berlanga et al., 1997). To obtain the Flag construct of the intermediate form of PRLR in pcDNA3, we excised the long form with *EcoR1/Xba1* from this vector, subcloned it into pBlue-script, exchanged its *NcoI/XbaI* fragment with the equivalent fragment of the intermediate form and cloned it back in the pcDNA3 vector. The CMV/Pit-1 (Ingraham et al., 1990) and the RSV-DEX (Giguere et al., 1986) expression vectors were used in certain transfection studies as indicated.

2.3. Transfection studies

For all experiments, cells were plated the day before transfection on 60 mm poly-D-lysine (Sigma) pre-treated plastic dishes. 2.5 μ g of luciferase reporter constructs and 1 μ g of each expression vector plasmids

were used for DEAE-Dextran mediated transfection while 1.5 μ g of luciferase promoter constructs and 0.5 μ g of each expression vector plasmid were used for calcium-phosphate transfection technique. 1 μ g of a RSV β -galactosidase construct, used as an internal reference plasmid, was cotransfected to insure consistency of transfections and to eliminate potential effects of added reagents on cell proliferation.

One million GC cells were transiently transfected by DEAE-Dextran method as described (Naar et al., 1991). The DEAE-Dextran-DNA complex was incubated with the cells for 1–2 h at 37°C. The cells were then washed once with serum-free medium and DMEM + supplemented with 5–10% HS was added. Horse PRL is 30 times less active than bovine PRL contained in FBS, as assessed by the Nb2 assay (Butnev et al., 1996). Therefore, PRL activity contained in horse serum is negligible for our purpose. Immediately after, ovine PRL (oPRL) (NIDDK-oPRL-19, AFP-9221A) at 100 ng/ml or its vehicle (0.03 M NaHCO₃) was added and cells were incubated for 48 h at 37°C and 5% CO₂ with medium and PRL changes 24 h post-transfection. Cells were harvested and luciferase activity measured using a BioOrbit 1250 luminometer. Transient transfection experiments with GH₃ cells were done essentially as described for GC cells with some modifications: two million cells were used per petri dish, cells were washed three times with serum free-medium before transfection and transfection time was reduced to 15 min. Since GH₃ are PRL-secreting cells, effect of exogenous oPRL on PRL gene transcription is possible only by neutralizing the endogenous PRL by specific PRL antibody. To do so, rabbit anti-rat PRL antibody (NIDDK-anti-rPRL-IC5, AFP425-10-91) was added immediately after transfection at a final concentration of 1/300. This antibody is highly specific for the rat PRL and cross-reactivities with ovine PRL (0.1%) or horse PRL (0.001%) are negligible. The 1/300 concentration was chosen according to the titration of the antibody for its effectiveness in neutralizing rPRL effect. An anti-rat growth hormone antibody (NIDDK, anti-rGH-IC-1, AFP4115) was used in control dishes.

Transient transfections of HC11 and HepG2 cells were done by the calcium-phosphate technique as described, using 0.5×10^6 cells (Boutin et al., 1988). The Pit-1 expression vector was cotransfected in these cells to allow good expression of the 3kb-PRL reporter gene. All the steps following these transfections were exactly the same as the ones described for GC cells. In all transfection experiments where the expression of the β -casein promoter was studied, dexamethasone (1 μ M) and bovine insulin (5 μ g/ml) were added to the cell culture during the 48 h incubation period following transfection. Moreover, the glucocorticoid receptor expression vector (RSV-DEX) was also cotransfected in GC and HepG2 cells to optimize the expression of the β -casein promoter.

Confluent COS-7 were washed once with DMEM + and then incubated in 7 ml/10 cm dish of DMEM + containing 10 µg of plasmid, 160 µl of DEAE-Dextran (10 mg/ml) and 80 µl of a 10 mM chloroquine solution for 1.5 h at 37°C. Then, cells were exposed to a 1.5 min DMSO shock treatment and, after washing, the transfected cells were incubated for 48 h in their appropriate medium, at 37°C and under 5% CO₂.

2.4. Binding assays

Specific binding of iodinated oPRL on cell microsomes was measured as previously described (Boutin et al., 1988).

2.5. RT-PCR

Total RNA from cell culture was prepared according to the method of Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987). Unless otherwise indicated, RT-PCR was done essentially according to the following procedure. A bulk amount of RNA (30 µg) from GC transfected cells were first treated with 7.5 units of RNase-free RQ1 DNase (Promega) in 1X RT buffer (Gibco-BRL) in 100 µl final volume for 60 min at 37°C. This step eliminated artefactual amplification from plasmidic or genomic DNA. DNase was inactivated by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation of treated RNA. The RNA pellet was resuspended in 66 µl of DEPC-treated water and then 6 µl of 50 µM hexanucleotide random primers were added and the mixture incubated at 70°C for 10 min. Reverse transcription was carried out by adding RT buffer (1X final), 0.125 mM (final concentration) of each deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 10 mM DTT (final concentration) and 1200 units of M-MLV reverse transcriptase (RT) (Gibco-BRL) in a 120 µl final volume. After a 60 min incubation at 37°C, the enzyme was heat-inactivated. A negative control was carried out without RT. These cDNAs were then used as templates in PCR reactions to determine the presence of PRL receptor mRNA or of β-actin mRNA, used as an internal PCR control. This was done by amplifying the entire extracellular domain of the receptor using two oligonucleotides corresponding to that region: RL8: 5'-GGGGGGTACCTGAAGAAAAC-3' and RL4: 5'-CGGTGAGCTCCTTCAAGGTGAAG-3'. A β-actin DNA fragment corresponding to 641 base pairs was amplified using two oligonucleotides: Actin-S: 5'-GTGGGCGACGAGGCCAG-3' and Actin-AS: 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3'.

In eppendorf tubes, the cDNA produced was serially diluted and 20 µl of those cDNA solutions was aliquoted in PCR tubes. In another eppendorf tube, a master mix composed of PCR reaction buffer (Gibco-BRL), MgCl₂, dNTP, [α -³²P]dCTP (specific activity:

3000 Ci/mmol, Amersham) and TAQ DNA polymerase (Gibco-BRL) was prepared and then split in two new eppendorf tubes containing either oligonucleotides RL4/RL8 for receptor detection or oligonucleotides Actin-S/AS for internal control amplification. 30 µl of those second master mixes were added to the corresponding PCR reaction tubes. The final concentration of each component corresponded to an 1X reaction buffer: 1 mM MgCl₂, 56 µM of each dNTP, 0.5 µCi [α -³²P]dCTP and 1.25 unit of TAQ polymerase. The PCR reaction was done in a double-block thermocycler (Ericomp) by adjusting the parameters for each cycle as followed: 10 s at 94°C, 10 s at 50°C and 30 s at 72°C. The group of tubes for PRLR amplification was placed in one PCR block for 25 cycles and the β-actin control tubes were put in the other PCR block for 12 cycles. The PCR products were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis, autoradiography and quantification on a PhosphoImager apparatus (Molecular Dynamics).

2.6. Immunodetection of FLAG-PRL receptors expressed in COS-7 cells by Western blotting

At the end of the 48 h incubation period, transfected COS-7 cells were washed twice with ice-cold PBS (phosphate-buffered saline) and harvested for receptor solubilisation for 1 h at 4°C in 1 ml/10 cm dish of lysate buffer (10 mM TRIS pH 7.4/5 mM EDTA/150 mM NaCl/1% triton X-100/1mM PMSF/5 mg/ml aprotinin/1 mg/ml pepstatin/2 mg/ml leupeptin) with continuous gentle mixing. The lysate was clarified by centrifugation and protein content was assayed with the BCA protein assay kit (Pierce) using bovine serum albumin as standard. SDS-PAGE loading buffer (Laemmli buffer containing 0.14 M β-mercaptoethanol) was added to the protein sample and boiled for 5 min before loading on a 7.5% SDS-PAGE. After migration, the proteins were electrophoretically transferred overnight onto a nitrocellulose filter (Hybond C, Amersham) at 4°C and 40 mA. The receptor was immunodetected using the M2 anti-FLAG monoclonal antibody (Sigma) according to the manufacturer's recommendations.

3. Results

We have developed a system based on transient transfection of rPRL promoter-luciferase reporter genes in GC cells. The choice of this cell line was based on its similarity with the somatolactotrophs GH₃ except for the absence of PRL secretion. This is due to the specific degradation of PRL mRNA without affecting the transcription of its gene (Billis et al., 1992). With this system we circumvent completely the problem of endogenous rPRL and can examine the effect of exogenous PRL on rPRL gene transcription. We first looked

at the effect of oPRL on GC cells transfected with the 3kb-PRL reporter construct but no variation of luciferase activity was observed (data not shown). We suspected that GC cells did not express the rPRL receptor (PRLR) and to test this, we used the sensitive RT-PCR technique to detect the presence of endogenous PRLR mRNA. As shown in Fig. 1, there was a strong expression of this mRNA in control Nb2 cells, as expected, but no PRLR mRNA was detected in GC as well as in GH₃ cells. This last result contrasts with the findings of Krown et al. (1992) who demonstrated the presence of prolactin receptor by immunofluorescence on GH₃ cells. This discrepancy can probably be explained by the loss of PRLR expression after a high number of passages of the cells or by the use of a different subtype of GH₃ cells.

Consequently, we tested the effect of oPRL on GC cells cotransfected with the 3kb-PRL reporter construct and an RSV expression vector driving the gene encoding the long and the intermediate forms of the PRLR (Fig. 2). oPRL, at a concentration of 100 ng/ml, caused an inhibition of 50% of luciferase activity with the long form and of 80% with the intermediate form of the PRLR. Fig. 2B illustrates the effect of increasing amounts of ovine prolactin in the incubation medium on the PRL promoter activity. These curves clearly indicate that physiological concentrations of oPRL cause potent negative regulation of the rPRL gene promoter for both forms of receptor. The ED₅₀ in the presence of the intermediate PRLR form was 4 ng per ml while the ED₅₀ with the long form was 19 ng per ml. This difference in sensitivity corresponds to the reported higher affinity of oPRL binding to the intermediate receptor compared with the binding to the long receptor form (Ali et al., 1991). However, the maximum inhibition observed with the intermediate PRLR form was consistently greater, even in the presence of saturating concentrations of oPRL. The differences of PRL gene promoter activity between the GC cells transfected with expression vectors encoding the two types of PRLR could be due to variations of their

expression after transfection. For this reason, we studied the levels of expression of these PRLR forms in transfected GC cells. We first measured the PRLR mRNAs by a semi-quantitative RT-PCR analysis (Fig. 3A). Both forms were well expressed in cells transfected with their respective cDNAs while no mRNA was detected in cells transfected with the control cDNA. At the protein level, we evaluated the expression of tagged receptors with the Flag epitope in COS-7 cells since the expression of transfected PRLRs in GC cells was very low and their detection impossible by binding studies and with currently available antibodies (data not shown). Tagged PRLRs displayed identical functional properties when compared to the native receptors in transfection studies (results not shown). As illustrated in Fig. 3B with an anti-Flag immunoblot, the intermediate form was clearly more abundant than the long form. These experiments indicate that the prolactin receptor was not overexpressed in our transfection assay and that part of the difference in activity found between the intermediate and the long forms of PRLR is probably due to the amount of receptors expressed after transfection.

In order to see if the inhibition effect could be observed in PRL-secreting pituitary cells, we tested the prolactin gene expression in GH₃ cells. Since these cells secrete large amounts of prolactin in the medium, we neutralized this endogenous rat prolactin with a specific antibody and tested the effect of oPRL which is not recognized by this antibody. As shown in Fig. 4, incubation of the anti-rPRL antibody caused an increase of about twofold of the 3kb-PRL promoter activity compared to cells that have been incubated with the control anti-rat GH antibody. Moreover, in the presence of the anti-rPRL antibody, addition of oPRL decreased the luciferase activity twofold, back to its original value. Addition of antibodies had no significant effect on the expression of the β -galactosidase internal reference plasmid.

Cell-specificity was also studied in two non-pituitary cell types (HC11 and HepG2 cells) cotransfected with

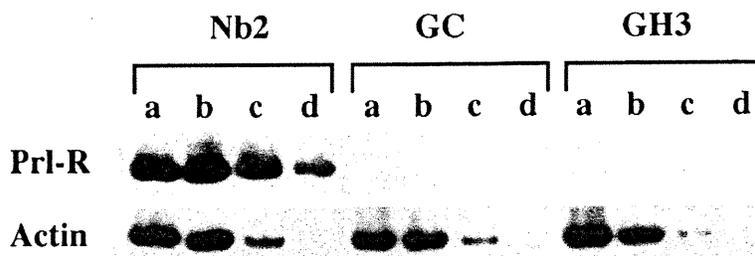


Fig. 1. Comparison of the expression of the Prolactin receptor between the Nb2 cells and the pituitary cell lines GC and GH₃. Total RNA was extracted from the rat cell lines and reversed transcribed. The cDNA was submitted to serial dilutions (a, 1/1; b, 1/5; c, 1/25; d, 1/125) and used for PCR reactions with primer pairs corresponding to the β -actin and the rat PRL receptor (extracellular domain) genes in the presence of α -P³²-dCTP for 25 cycles (actin) and 40 cycles (PRLR). A sample of each reaction was loaded on a polyacrylamide gel and the gels were exposed for 3 h at -80°C .

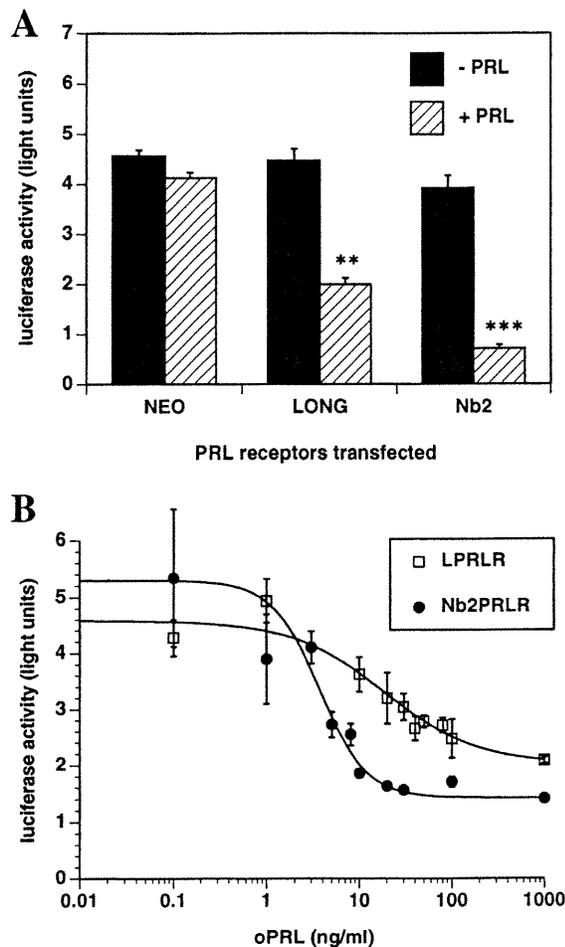


Fig. 2. Influence of the type of PRL receptor cotransfected in GC cells on the regulation of the 3kb-PRL reporter by oPRL. (A) After cotransfection of the 3kb-PRL luciferase reporter gene with an RSV expression vector driving the gene encoding neomycin resistance (NEO) as control or the gene encoding one of the two types of PRLR (long or intermediate (Nb2)), the cells were incubated for 48 h with vehicle (-PRL) or with 100 ng/ml of prolactin (+PRL) and luciferase activity was measured. Results are the means of triplicate determinations, and error bars represent SEM. Statistical significance of the effect of PRL was determined by one-way analysis of variance: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Similar results were obtained in five experiments of similar design. (B) Dose-response experiment for the effect of oPRL on the rPRL gene promoter (3kb-PRL) in GC cells cotransfected with either the long (LPRLR) or the intermediate (Nb2PRLR) PRLR expression vectors as described in A. The curves were fitted and the ED50s were evaluated according to the sigmoid logistic equation. Results are the means of triplicate determinations, and error bars represent SEM. Similar results were obtained in three experiments of similar design.

the 3kb-PRL reporter construct and the intermediate PRLR expression vector. A Pit-1 expression vector was also cotransfected in these cell lines to obtain good basal luciferase activity. As illustrated in Fig. 5, there was no change of prolactin gene expression in the presence of oPRL in the non-pituitary cell types while there was a very significant decrease of luciferase activity in the GC cells. Promoter-specificity was also tested

by similar cotransfection studies with the rGH promoter/reporter construct in GC cells and with the β -casein gene promoter/reporter construct in all 3 cell types. In opposition to the inhibition of the prolactin gene expression by oPRL observed in GC cells, there was a significant increase of the growth hormone promoter activity in GC cells and a strong activation of the β -casein/promoter construct in all cell types (Fig. 5). The results in the non-pituitary cells confirm the expression of the rPRLR after transfection in these cells since the activation of transcription by PRL was not observed in cells transfected with a control cDNA (results not shown). Moreover, these positive gene regulations by PRL indicate that the negative autoregulation is quite specific for the prolactin gene.

Finally, we established a gross mapping of the prolactin promoter regions that are potentially involved in this inhibition. We did cotransfections of the intermediate PRLR expression vector with reporter constructs containing gradual deletions of the major regulatory distal and proximal regions of the prolactin gene promoter. Results in Fig. 6 demonstrate that both the distal and the proximal regions are necessary for the inhibition caused by oPRL. Moreover, no sequence outside these two regions seems to contain a *cis*-active element for prolactin action.

4. Discussion

Demonstration of the autoregulation of PRL secretion by a direct ultrashort-loop negative feedback at the pituitary level has been difficult. Several reasons can be invoked to explain conflicting results that occurred mainly in early reports: (1) While most of these studies are conducted on complete pituitary glands or a mix population of pituitary cells, the inhibitory effects of PRL may be transient and exerted on only a relatively small fraction of the cell population secreting PRL (Frawley and Clark, 1986). (2) In all these studies, endogenous PRL, secreted by lactotroph cells, is present and can hide the effects of added exogenous PRL. Moreover, fetal bovine serum (FBS), used in cell culture, contains significant amounts of PRL which can have the same effect (Biswas and Vonderhaar, 1987; Lesueur et al., 1991). To avoid this problem, we used a PRL-deficient pituitary cell line (GC) and horse serum, which has a very low lactogenic activity when compared to FBS (Butnev et al., 1996). (3) PRL receptors may be disrupted during the process of cell dispersion, or lost in tumor cell line or during extended culture (Bentley and Wallis, 1987). Moreover, Krown et al. (1994) demonstrated the presence of PRLR primarily in the Golgi complex of the 235-1 lactotroph cell line and showed that treatment with interleukin-1 caused the PRLRs to move to the cell surface and allowed the

autocrine effect of endogenous PRL to be revealed. The cell lines used in our study were clearly devoid of significant PRLR gene expression and the autoregulation was restored by transfecting PRLR expression vectors. (4) Several technical reasons can also explain inconsistent results. For example, Kadowaki et al. (1984) showed that 96% of up to 2 $\mu\text{g/ml}$ added PRL is absorbed to plastic petri dishes not coated with polylysine. (5) Finally, the group of Walker (Greenan et al., 1989; Ho et al., 1989; Krown et al., 1992; Ho et al., 1993; Wang and Walker, 1993) showed that rat PRL is secreted under several isoforms that vary with cell types (normal or tumoral) and physiological conditions (like pregnancy). These various forms are the results of different degrees of phosphorylation and can cause different autocrine effects on PRL secretion and paradoxical effects on growth of somatotrophs. So it is possible that, depending on the preparation of PRL used, the autocrine effect is observed or not.

Our results demonstrate that PRL has a strong inhibitory effect on the transcription of its own gene both

in the PRL-deficient GC and the PRL-producing GH₃ cell lines. This is the first direct evidence of a negative transcriptional effect of PRL. Decrease of mRNA levels by PRL has been described for the gonadotropin hormone-releasing hormone in a neuronal cell line (Milenkovic et al., 1994) and for the 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (Albarracin et al., 1994) and the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase (Martel et al., 1994) in corpus luteum, but the transcriptional action of PRL has not been shown for these genes.

This transcriptional autoregulation of PRL seems to differ from the acute autoregulation of PRL release that has been described by others (Herbert et al., 1979; Melmed et al., 1980; Zacur et al., 1982; Kadowaki et al., 1984; Hosojima and Wyche, 1985; Frawley and Clark, 1986; Bentley and Wallis, 1987; Ho et al., 1989). Indeed, this acute regulation occurs in the first 2 h after addition of PRL and appears to be transient. A time-course experiment with our cotransfection system in GC cells revealed that a significant inhibition of the

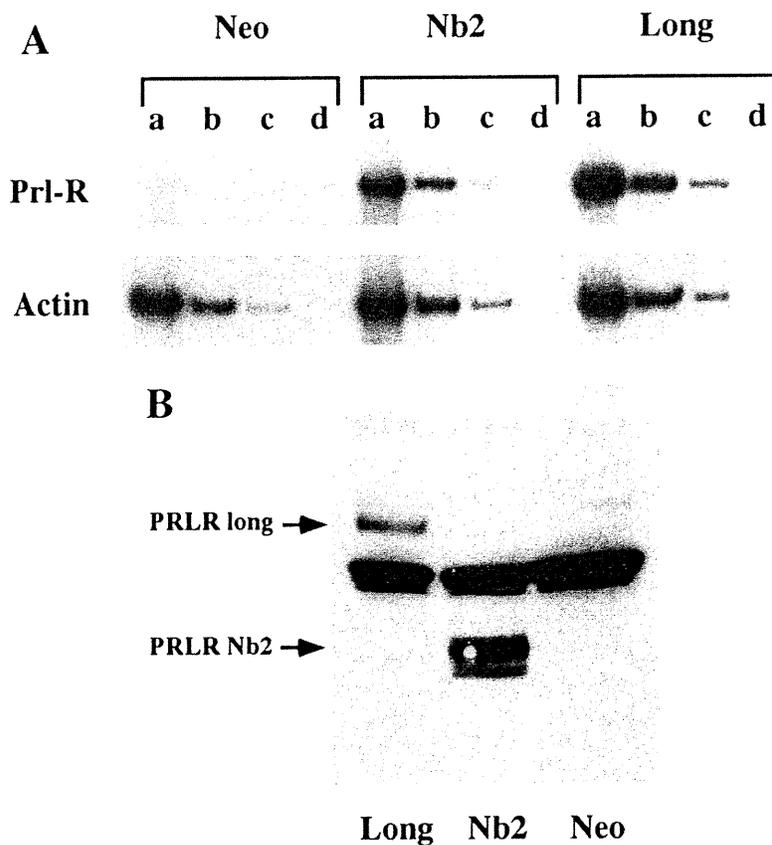


Fig. 3. Evaluation of the expression of the two types of PRLR expression vectors after cotransfection. (A) RT-PCR experiment showing mRNA expression of PRLR present in transfected GC cells. All details are given in the materials and methods section. GC cells were transfected with RSV expression vectors driving the genes coding for the intermediate (Nb2) and long forms of PRLR, or for neomycin (Neo) as control. cDNA dilutions were: a, 1/3; b, 1/9; c, 1/27 for receptor detection and d, 1/1 for negative control (without RT). After drying, the gels were exposed on a PhosphoImager to allow quantification of the labeled cDNA. (B) Western blot analysis of the FLAG-PRLR expression in COS-7 cells transfected using 50 μg of cell lysate per lane. The Long, Nb2 and Neo lanes refer to Cos-7 cells transfected with the expression vectors coding for the Flag-long and Flag-intermediate forms of rPRLR and Neomycin, respectively. Technical details are given in the materials and methods section.

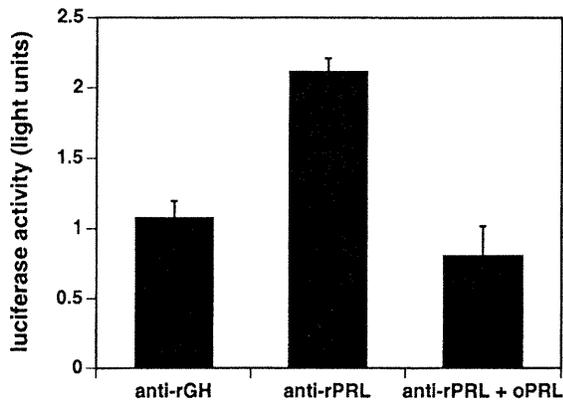


Fig. 4. Effect of endogenous rPRL and exogenous oPRL on the expression of the rPRL promoter in GH₃ cells in the presence of anti-rGH or anti rPRL antisera. GH₃ cells were cotransfected with the 3kb-PRL reporter gene and the RSV expression vector driving the gene encoding for the intermediate PRLR. Cells were subsequently incubated for 48 h with either the anti-rGH (as control) or the anti-rPRL antisera in the presence of vehicle or 100 ng/ml oPRL. Results are the means of triplicate determinations, and error bars represent SEM. Similar results were obtained in four experiments of similar design. One-way ANOVA: anti-rPRL versus anti-rGH and anti-rPRL + oPRL versus anti-rPRL + vehicle, $P < 0.005$.

3kb-PRL promoter activity appears only 6 h after addition of oPRL (data not shown). Moreover, our results contrast with the findings of Ho et al. (1989) who showed that GH₃ cells secrete only the rPRL isoform 2 which is unable to cause the acute negative regulation of PRL release. In our experiments, the inhibitory effect of endogenous rPRL produced by GH₃ cells was revealed and reversed by the addition of

neutralizing anti-rPRL antibody, indicating a different requirement of rPRL isoform for the transcriptional PRL gene inhibition or a difference in the GH₃ cell line used in our studies. The undetectable level of endogenous rPRLR gene expression by PCR in our GH₃ cells contrasts also with the demonstration of the receptor on 40-50% of their GH₃ cells by indirect immunofluorescence (Krown et al., 1992) and supports the last hypothesis. Boockfor et al. (Boockfor et al., 1985; Boockfor and Schwarz, 1986) showed that the GH₃ cell line is, in fact, a heterogeneous population of hormone secretors comprising at least four phenotypes whose proportion is highly dependent on cell culture conditions.

A recent study by Abraham et al. (1996) addressing the effect of the cellular microenvironment on PRL gene expression at the single cell level, with isolated lactotrophs from lactating rats, revealed that PRL secretors were the only pituitary cells exerting an inhibitory paracrine effect on gene expression by their lactotroph neighbors. The authors speculated that the lactotroph-derived paracrine inhibitor of PRL gene expression was PRL itself. Our study is in complete agreement with these results and strongly suggests that PRL is this autocrine factor. The physiological relevance of this extra-short loop regulation of the rat PRL at the transcriptional level is difficult to assess. Indeed, there is a dissociation between PRL gene transcription, mRNA storage and hormone release, as quantified within individual lactotrophs, suggesting the existence of control mechanisms besides transcription to regulate the rate of PRL secretion (Castano et al., 1997).

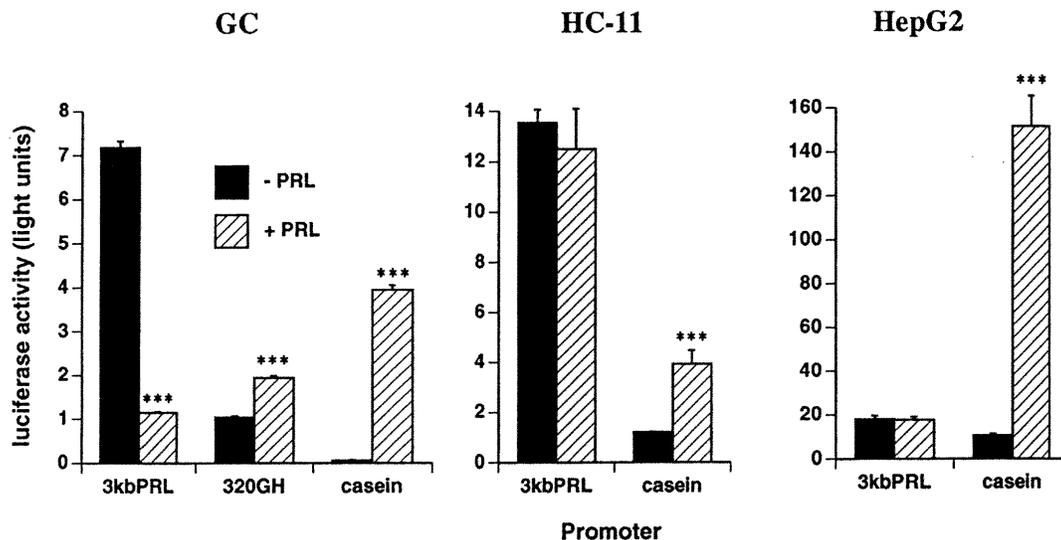


Fig. 5. Cellular and gene specificity of the effect of oPRL on the rPRL gene promoter. GC pituitary cell line and HepG2 and HC11 non-pituitary cell lines were cotransfected with a luciferase reporter gene, as indicated, and the intermediate PRLR expression vector. 3kbPRL, 320GH and casein refer to the cells that have been transfected with the PRL, GH and β -casein promoter reporter genes respectively. After transfection, cells were incubated with vehicle (-PRL) or exogenous oPRL (+PRL) for 48 h and luciferase activity was measured. Results are the means of triplicate determinations, and error bars represent SEM. Statistical significance of the effect of PRL was determined by one-way analysis of variance: *** $P < 0.005$. Similar results were obtained in two experiments of similar design.

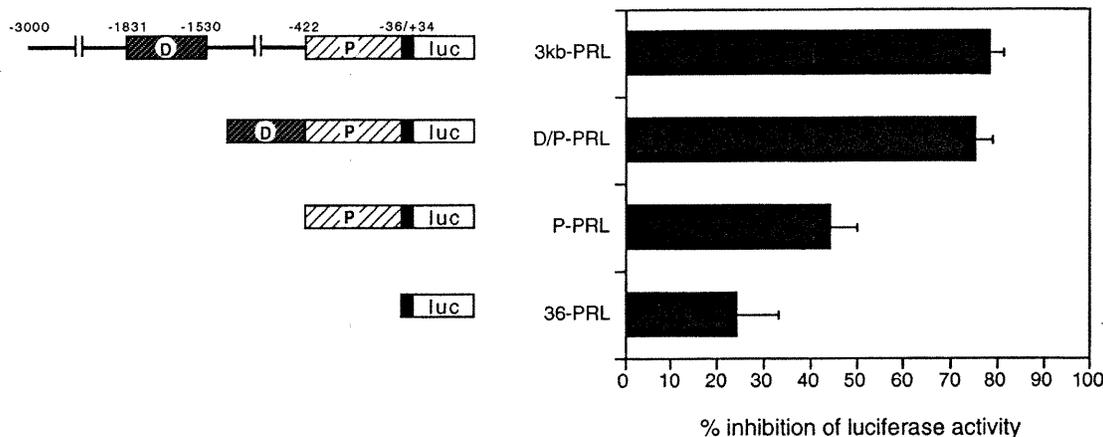


Fig. 6. Effect of oPRL on deletional mutants of the rPRL promoter in GC cells. GC cells were cotransfected with the intermediate PRLR expression vector and a luciferase reporter gene driven by various deletional mutants of the rPRL promoter as depicted schematically on the left. The D and P boxes represent the distal and the proximal regulatory regions respectively. Each contains four Pit-1 binding sites. The small black box represents the PRL minimal promoter containing the TATA box. The Luc box is the luciferase reporter gene. The superposed numbers indicate the location of these regions in the 5'-flanking sequence of the rPRL gene. The bar graph gives the percent inhibition of luciferase activity for these various mutant promoters in cells incubated with 100 ng/ml of oPRL compared to cells incubated with vehicle. Results are the means of triplicate determinations, and error bars represent SEM of the inhibition. Statistical significance of the effect of PRL was determined by one-way analysis of variance: $P < 0.005$ for all mutants except for 36-PRL ($P > 0.05$). Similar results were obtained in four experiments of similar design.

Our cotransfection system in GC cells allowed us to study the PRL receptor requirement for this negative autoregulation. The results indicate that this action of PRL is mediated through PRLR expressed by the cells. Moreover, the autoregulation observed was more potent in the presence of the intermediate form compared to the long form of the rat PRLR. This result is similar to the one obtained by others who studied the activation of the β -casein promoter/CAT construct in CHO cells (Ali et al., 1992) or the activation of the interferon-regulatory factor-1 (IRF-1) promoter/CAT construct in FDC-P1 and BaF3 cells (O'Neal and Yu, 1994), transfected with the various forms of the rat PRLR. The concentrations causing half-maximal stimulation for the intermediate and long forms of the PRLR were similar to the ED50 calculated for our PRL gene inhibition and denote an increased sensitivity to PRL in cells transfected for the intermediate PRLR cDNA. The difference between the ED50 of the two forms of PRLR is consistent with the reported increased affinity of the intermediate receptor for PRL (Ali et al., 1991). The intermediate PRLR is identical to the long form of the PRLR except for a deletion of 198 amino acids in the cytoplasmic domain (Ali et al., 1991).

PRL-induced activation of genes encoding for several milk proteins (Burdon et al., 1994; Gouilleux et al., 1994), the α 2-macroglobulin (Dajee et al., 1996), the IRF-1 (Stevens et al., 1995), and the Na⁺/taurocholate cotransporter (Ganguly et al., 1997), has been shown to be mediated by the JAK-STAT signaling pathway which involves interactions with specific intracellular regions of the PRLR. The cytoplasmic membrane-proximal proline-rich region (Box1) of the PRLR is critical

for binding the tyrosine kinase JAK2 which is phosphorylated after activation by PRL (Lebrun et al., 1995a,b). Moreover, carboxy-terminal tyrosine residues of the PRLR appear to be involved in the interaction with STAT1 and STAT5 which are phosphorylated by JAK2 (Lebrun et al., 1995a,b; Wang et al., 1997). However, the down regulation of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase mRNA by PRL does not appear to be mediated by the JAK-STAT system but depends on de novo synthesis of protein (Zhong et al., 1997). The delay that we observed for the transcriptional autoregulation of PRL also suggests that this inhibition is not directly mediated by the JAK-STAT pathway. Use of mutant receptors will be necessary to map the precise regions involved in signal transduction of PRL with these functional assays and to reveal any different requirement for gene activation and inhibition by PRL.

The negative autoregulation effect of PRL was specific for the PRL gene since there was a clear PRL-dependent activation of both the growth hormone and β -casein promoters in the same conditions of transfection in GC cells. The fact that the somatotrophs present the highest concentration of PRLR in the rat pituitary (Morel et al., 1994), suggests that PRL can have an important paracrine role on GH secretion in these cells.

Another striking aspect of our data was the cellular specificity of the autoregulation of PRL on its own gene. Indeed, the PRL gene inhibition was observed only in the somatolactotrophs GC and GH₃ but not in the non-pituitary cell lines HepG2 and HC11, where, in contrast, the β -casein gene was strongly activated by PRL. This last observation demonstrates that an inadequate expression of the transfected rPRLR cannot ac-

count for the lack of PRL gene inhibition in these cells. Further work would be necessary to see if this autoregulation is limited to the somatolactotrophs and does not occur in the other pituitary cell types. However the present results suggest that a pituitary-specific transcription factor is involved in this inhibitory effect. The POU/homeodomain factor Pit-1 would be a good candidate for such a function since it is expressed mainly in the pituitary and appears to be an essential transacting factor for PRL, GH and TSH gene expression (Simmons et al., 1990). Pit-1 binds to four AT-rich motifs in both the distal and the proximal regulatory regions of the rat PRL gene which have been implicated in the activation by cAMP, TRH, EGF, and phorbol esters (TPA) (Iverson et al., 1990; Keech et al., 1992). Pit-1 is the point of convergence of different pathways and interacts with members of many classes of transcription factors. Regulation of Pit-1 activity does not appear to involve modification of Pit-1 itself but regulation of the recruited co-repressor and co-activator complexes associated with it (Xu et al., 1998).

Since PRL gene inhibition by PRL requires the same two regulatory domains of its 5'-flanking regions where the Pit-1 response elements are located, it is possible that PRL modifies these co-regulators complexes or the activity of the transcription factors interacting with Pit-1 to cause inhibition of the PRL gene. However, PRL did not have any effect in non-pituitary cell types where a Pit-1 expression vector was transfected to get good activity of the 3kb-PRL reporter gene. Although overexpression of Pit-1 in these cells could mask any effect of PRL, further studies are required to determine the response elements of the pituitary genes required for the PRL actions and to reveal the nature of the pituitary-specific transcription factor involved in these effects.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Cancer Institute of Canada. We are grateful to Dr P. W. Gout for the gift of Nb2 lymphoma cells, the NHPP, NIDDK, NICHD and USDA for the oPRL and anti-rat PRL and GH antibodies, Dr. M. Ederly who kindly provided his long form of the Flag-PRLR expression vector and Dr P. Poyet for the gift of the β -casein promoter.

References

- Abraham, E.J., Faught, W.J., Frawley, L.S., 1996. Intercellular communication: relative importance of cellular adhesion and paracrine signaling to hormonal gene expression. *Endocrinology* 137, 4050–4053.
- Albarracín, C.T., Parmer, T.G., Duan, W.R., Nelson, S.E., Gibori, G., 1994. Identification of a major prolactin-regulated protein as 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase: coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 134, 2453–2460.
- Ali, S., Ederly, M., Pellegrini, I., Lesueur, L., Paly, J., Djiane, J., Kelly, P.A., 1992. The Nb2 form of prolactin receptor is able to activate a milk protein gene promoter. *Mol. Endocrinol.* 6, 1242–1248.
- Ali, S., Pellegrini, I., Kelly, P.A., 1991. A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 20110–20117.
- Ben-Jonathan, N., Arbogast, L.A., Hyde, J.F., 1989. Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog. Neurobiol.* 33, 399–447.
- Bentley, A.M., Wallis, M., 1987. In-vitro evidence for the autoregulation of prolactin secretion at the level of the pituitary gland in the rat. *J. Endocr.* 115, 13–18.
- Berlanga, J.J., Gualillo, O., Buteau, H., Applanat, M., Kelly, P.A., Ederly, M., 1997. Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 2050–2052.
- Billis, W.M., Delidow, B.C., White, B.A., 1992. Posttranscriptional regulation of prolactin (PRL) gene expression in PRL-deficient pituitary tumor cells. *Mol. Endocrinol.* 6, 1277–1284.
- Biswas, R., Vonderhaar, B.K., 1987. Role of serum in the prolactin responsiveness of MCF-7 human breast cancer cells in long-term tissue culture. *Cancer Res.* 47, 3509–3514.
- Boockfor, F.R., Hoeffler, J.P., Frawley, L.S., 1985. Cultures of GH3 cells are functionally heterogeneous: thyrotropin-releasing hormone, estradiol and cortisol cause reciprocal shifts in the proportions of growth hormone and prolactin secretors. *Endocrinology* 117, 418–420.
- Boockfor, F.R., Schwarz, L.K., 1986. Cultures of GH3 cells contain both single and dual hormone secretors. *Endocrinology* 122, 762–764.
- Boutin, J.M., Jolicœur, C., Okamura, H., Gagnon, J., Ederly, M., Shirota, M., Banville, D., Dusanter, F.I., Djiane, J., Kelly, P.A., 1988. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 53, 69–77.
- Burdon, T.G., Demmer, J., Clark, A.J., Watson, C.J., 1994. The mammary factor MPBF is a prolactin-induced transcriptional regulator which binds to STAT factor recognition sites. *Febs Lett.* 350, 177–182.
- Butnev, V.Y., Gotschall, R.R., Baker, V.L., Moore, W.T., Gout, P.W., Bousfield, G.R., 1996. Glycosylated equine prolactin and its carbohydrate moiety. *J. Protein Chem.* 15, 413–426.
- Castano, J.P., Faught, W.J., Glave, E.E., Russell, B.S., Frawley, L.S., 1997. Discordance of prolactin gene transcription, mRNA storage, and hormone release in individual mammotropes. *Am. J. Physiol.* 272, E390–E396.
- Chiu, S., Koos, R.D., Wise, P.M., 1992. Detection of prolactin receptor (PRL-R) mRNA in the rat hypothalamus and pituitary gland. *Endocrinology* 130, 1747–1749.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Dajee, M., Kazansky, A.V., Raught, B., Hocke, G.M., Fey, G.H., Richards, J.S., 1996. Prolactin induction of the alpha 2-Macroglobulin gene in rat ovarian granulosa cells: stat 5 activation and binding to the interleukin-6 response element. *Mol. Endocrinol.* 10, 171–184.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., deLuca, M., Helinski, D.R., Subramani, S., 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 7, 725–737.

- Frantz, W.L., Payne, P., Dombroske, O., Sonnenschein, C., 1975. Binding of ovine 125I-prolactin to cultured anterior pituitary tumour cells and normal cells. *Nature* 255, 636–638.
- Frawley, L.S., Clark, C.L., 1986. Ovine prolactin (PRL) and dopamine preferentially inhibit PRL release from the same subpopulation of rat mammatropes. *Endocrinology* 119, 1462–1466.
- Ganguly, T.C., O'Brien, M.L., Karpen, S.J., Hyde, J.F., Suchy, F.J., Vore, M., 1997. Regulation of the rat liver sodium-dependent bile acid cotransporter gene by prolactin-mediation of transcriptional activation by STAT5. *J. Clin. Invest.* 99, 2906–2914.
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M., 1986. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46, 645–652.
- Giss, B.J., Walker, A.M., 1985. Mammatroph autoregulation: intracellular fate of internalized prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 42, 259–267.
- Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M., Groner, B., 1994. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *Embo J.* 13, 4361–4369.
- Greenan, J.R., Balden, E., Ho, T.W.C., Walker, A.M., 1989. Biosynthesis of the secreted 24 K isoforms of prolactin. *Endocrinology* 125, 2041–2048.
- Herbert, D.C., Ishikawa, H., Rennels, E.G., 1979. Evidence for the autoregulation of hormone secretion by prolactin. *Endocrinology* 104, 97–100.
- Ho, T.W., Leong, F.S., Olaso, C.H., Walker, A.M., 1993. Secretion of specific nonphosphorylated and phosphorylated rat prolactin isoforms at different stages of the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 58, 160–165.
- Ho, T.W.C., Greenan, J.R., Walker, A.M., 1989. Mammatroph autoregulation: the differential roles of the 24 K Isoforms of prolactin. *Endocrinology* 124, 1507–1514.
- Hosojima, H., Wyche, J.H., 1985. Prolactin control of growth and prolactin autoregulation in cultured human pituitary cells. *Hormone Res.* 21, 240–245.
- Ingraham, H.A., Flynn, S.E., Voss, J.W., Albert, V.R., Kapiloff, M.S., Wilson, L., Rosenfeld, M.G., 1990. The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1-Pit-1 interactions. *Cell* 61, 1021–1033.
- Iverson, R.A., Day, K.H., d'Emden, M., Day, R.N., Maurer, R.A., 1990. Clustered point mutation analysis of the rat prolactin promoter. *Mol. Endocrinol.* 4, 1564–1571.
- Kadowaki, J., Ku, N., Oetting, W.S., Walker, A.M., 1984. Mammatroph autoregulation: uptake of secreted prolactin and inhibition of secretion. *Endocrinology* 114, 2060–2067.
- Keech, C.A., Jackson, S.M., Siddiqui, S.K., Ocran, K.W., Gutierrez, H.A., 1992. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate activation of the rat prolactin promoter is restricted to the pituitary-specific cell type. *Mol. Endocrinol.* 6, 2059–2070.
- Krown, K.A., Wang, Y.-F., Ho, T.W.C., Kelly, P.A., Walker, A.M., 1992. Prolactin isoform 2 as an autocrine growth factor for GH3 cells. *Endocrinology* 131, 595–602.
- Krown, K.A., Wang, Y.-F., Walker, A.M., 1994. Autocrine interaction between prolactin and its receptor occurs intracellularly in the 235-1 mammatroph cell line. *Endocrinology* 134, 1546–1552.
- Lebrun, J.J., Ali, S., Goffin, V., Ullrich, A., Kelly, P.A., 1995a. A single phosphotyrosine residue of the prolactin receptor is responsible for activation of gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4031–4035.
- Lebrun, J.J., Ali, S., Ullrich, A., Kelly, P.A., 1995b. Proline-rich sequence-mediated Jak2 association to the prolactin receptor is required but not sufficient for signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270, 10664–10670.
- Lesueur, L., Edery, M., Ali, S., Paly, J., Kelly, P.A., Djiane, J., 1991. Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 824–828.
- Martel, C., Gagne, D., Couet, J., Labrie, Y., Simard, J., Labrie, F., 1994. Rapid modulation of ovarian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase gene expression by prolactin and human chorionic gonadotropin in the hypophysectomized rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 99, 63–71.
- Meister, B., Jacobsson, G., Elde, R., 1992. Observations on the localization of prolactin receptor mRNA in rat tissues as revealed by in situ hybridization. *Acta Physiol. Scand.* 146, 533–534.
- Melmed, S., Carlson, H.E., Briggs, J., Hershman, J.M., 1980. Autofeedback of prolactin in cultured prolactin-secreting pituitary cells. *Hormone Res.* 12, 340–344.
- Milenkovic, L., D'Angelo, G., Kelly, P.A., Weiner, R.I., 1994. Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1244–1247.
- Morel, G., Ouhtit, A., Kelly, P.A., 1994. Prolactin receptor immunoreactivity in rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 59, 78–84.
- Naar, A.M., Boutin, J.M., Lipkin, S.M., Yu, V.C., Holloway, J.M., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 1991. The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 65, 1267–1279.
- Nelson, C., Albert, V.R., Elsholtz, H.P., Lu, L.I., Rosenfeld, M.G., 1988. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science* 239, 1400–1405.
- O'Neal, K.D., Yu, L.L., 1994. Differential signal transduction of the short, Nb2, and long prolactin receptors. Activation of interferon regulatory factor-1 and cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 269, 26076–26082.
- Rosen, J.M., Poyet, P., Goodman, H., Lee, K.F., 1989. Mechanisms by which prolactin and glucocorticoids regulate casein gene expression. *Biochem. Soc. Symp.* 55, 115–123.
- Shirota, M., Banville, D., Ali, S., Jolicœur, C., Boutin, J.M., Edery, M., Djiane, J., Kelly, P.A., 1990. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Mol. Endocrinol.* 4, 1136–1143.
- Simmons, D.M., Voss, J.W., Ingraham, H.A., Holloway, J.M., Broide, R.S., Rosenfeld, M.G., Swanson, L.W., 1990. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev.* 4, 695–711.
- Stevens, A.M., Wang, Y.F., Sieger, K.A., Lu, H.F., Yu, L.L., 1995. Biphasic transcriptional regulation of the interferon regulatory factor-1 gene by prolactin: involvement of gamma-interferon-activated sequence and Stat-related proteins. *Mol. Endocrinol.* 9, 513–525.
- Wang, Y.-F., O'Neal, K.D., Yu-Lee, L.-Y., 1997. Multiple prolactin (PRL) receptor cytoplasmic residues and Stat1 mediate PRL signaling to the interferon regulatory factor-1 promoter. *Mol. Endocrinol.* 11, 1353–1364.
- Wang, Y.F., Walker, A.M., 1993. Dephosphorylation of standard prolactin produces a more biologically active molecule: evidence for antagonism between nonphosphorylated and phosphorylated prolactin in the stimulation of Nb2 cell proliferation. *Endocrinology* 133, 2156–2160.
- Xu, L., Lavinsky, R.M., Dasen, J.S., Flynn, S.E., McInerney,

E.M., Mullen, T.M., Heinzl, T., Szeto, D., Korzus, E., Kurokawa, R., Aggarwal, A.K., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 1998. Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature* 395, 301–306.

Zacur, H.A., Mitch, W.E., Tyson, J.E., Ostrow, P.T., Foster, G.V., 1982. Autoregulation of rat pituitary prolactin secretion demon-

strated by a new perfusion method. *Am. J. Physiol.* 242, E226–E233. 100

Zhong, L., Parmer, T.G., Robertson, M.C., Gibori, G., 1997. Prolactin-mediated inhibition of 20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and the tyrosine kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 587–592.

CHAPITRE 6

**Regulation of the rat prolactin gene transcription by the orphan
receptors COUP-TFII and Nur77 on a newly defined site
of the distal enhancer**

Dominic Devost and Jean-Marie Boutin

Molecular and Cellular Biology (en soumission)

ABSTRACT**Regulation of rat prolactin gene transcription by the orphan receptors COUP-TFII and Nur77 on a newly defined site of the distal enhancer.**

The control of rat prolactin (PRL) gene transcription has been studied extensively as a model of gene regulation during cell differentiation. Many transcription factors have been shown to be involved in the specific expression of this gene in the anterior pituitary. However, most of them act on *cis*-elements of the proximal promoter and cannot account for the major role played by the distal enhancer. Orphan nuclear receptors are increasingly recognized as important regulators during cell differentiation, and their involvement in the control of rat PRL gene transcription is unknown. We first looked at the action of COUP-TFII on this gene. By transient co-transfection studies in the somatomammotroph GC cell line, we demonstrated that COUP-TFII is a strong repressor of PRL promoter-enhancer activity, and this action is gene-specific since no effect of COUP-TFII was observed on growth hormone and Pit-1 promoter activities. Dnase 1 footprinting analysis and studies with deletional and substitutive mutations allowed us to locate the COUP-TFII response element (COUPRE) between -1731 and -1706 in the distal enhancer of the rat PRL gene. Several complexes bind to this region, as indicated by gel shift studies with GC nuclear extracts. Binding of multiple nuclear proteins on this site is also supported by South-Western blot analysis with GC nuclear extracts. The perfectly-conserved AGGTCA half-site is required for the binding of endogenous COUP-TFII as a homo- or heterodimer. Since the COUPRE also contains a NBRE (AAAGGTCA), we examined the effect of the orphan nuclear receptor Nur77 on PRL gene activity. Expression of this receptor in GC cells led to strong stimulation of promoter activity that

was antagonized by COUP-TFII co-expression, and this stimulation was completely abolished by mutation of the poly-adenosine stretch of the COUPRE. Gel shift studies on the COUPRE revealed the binding of a member of the Nur77/Nurr1 family of nuclear receptors present in GC nuclear extracts and that the functional antagonism between Nur77 and COUP-TFII is due to direct competition for binding on this site. These data suggest that this newly defined site in the distal enhancer constitutes a major regulatory center of rat PRL gene transcription and that equilibrium between the stimulatory action of Nur77 and the repressive effect of COUP-TFII on this response element plays a major role in the activity of the gene.

INTRODUCTION

The anterior pituitary gland is composed of 5 endocrine cell types that are distinguished by the hormones they produce. In recent years, the molecular mechanism leading to this cellular specialization in the pituitary has been gradually uncovered and shown to involve autocrine/paracrine soluble factors, membrane receptors and nuclear factors that drive gene expression according to various combinations.

Among the nuclear factors, orphan nuclear receptors, a subclass of the superfamily of nuclear receptors for which ligands are unknown, are reported to be good candidates for selective modulation of gene transcription in the proper tissue context (33). Until now, 4 of these receptors have been found to be involved in pituitary-specific gene expression.

Steroidogenic factor 1 (SF-1), a key regulator of endocrine function within the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and adrenal cortex, is an essential factor in sex differentiation. This receptor binds DNA as a monomer to an estrogen-responsive element (ERE) half-site preceded by 3 additional nucleotides, 5'-PyCAAGGTCA-3'. SF-1 activates many steroidogenic genes and, in gonadotropes, modulates expression of the α GSU, β LH and GnRH receptor genes (4, 29, 38, 44, 47). The biological functions of SF-1 are intimately linked to the presence of DAX-1, another orphan nuclear receptor (82). Structurally speaking, DAX-1 is unique in lacking the zinc-finger DNA-binding domain but binds to DNA on palindromic stem-loop sequences found in the promoter of the steroidogenic acute regulatory protein gene (StAR) (83). Both receptors are co-expressed in the adrenals, gonads, hypothalamus and pituitary gland, and mutations of one

of these genes lead to adrenal insufficiency and hypogonadotropic hypogonadism, suggesting that the receptors act along the same developmental cascade (60, 82).

The NGFI-B subfamily of orphan nuclear receptors is comprised of Nur77 or NGFI-B (nerve growth factor induced gene B), Nurr1 (Nur-related factor 1) and NOR-1 (neuron derived orphan receptor) (54). They bind DNA as monomer to an octamer sequence, NGFI-B response element (NBRE, 5'-AAAGGTCA-3'). Unlike SF-1, NGFI-B and Nurr1, but not NOR-1, can also heterodimerize with RXR and mediates 9-cis RA signaling on both DR-5 and NBRE (32, 63). They are expressed in most tissues tested (3, 53), particularly the hypothalamus, pituitary and adrenal glands where they modulate corticotropic and steroidogenic gene expression (59, 64, 80). Moreover, Nurr1 has been shown to be important for the normal development and differentiation of midbrain dopaminergic neurons (85) while NGFI-B and NOR-1 are both involved in T cell receptor (TCR)-mediated T-cell apoptosis (14). Along the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, the expression of different members of the NGFI-B family is stimulated by physical and emotional stress (20, 24, 41, 73, 79). In the corticotropic cell line AtT-20, the expression of members of the NGFI-B subfamily is up-regulated in the presence of corticotrope releasing hormone (CRH), and, in transient co-transfection experiments, over-expression of these nuclear receptors leads to pro-opiomelanocortin (POMC) promoter gene activation (59, 64). Recently, Maira et al. reported, in these same cells, the homodimerization and heterodimerization of members of the Nur77 subfamily on a composite NBRE called NurRE that lead to gene activation (52, 64). Experimental evidence suggests that glucocorticoid-negative feedback regulation on the POMC promoter involves the Nur77 signaling pathway (59, 65).

The ROR subfamily of nuclear receptors contains 3 members, α , β and γ , that bind to DNA on Rev-Erb α and β canonical sequences in a monomeric fashion. It is suggested that the ROR α and β isoforms are important regulators of cell survival in the central nervous system while the γ isoform may play a role in thymocyte development (1, 39, 40, 55). One of the 3 members of the ROR receptor family, ROR β , is specifically expressed in the central nervous system, and *in situ* hybridization discloses its presence in the developing and adult anterior pituitary, suggesting a possible role of this receptor in pituitary gene regulation (67). Recently, Chu and Zingg demonstrated by transient transfection in a neuroblastoma cell line that the oxytocin gene promoter is activated by ROR α (17).

Prolactin (PRL), produced by lactotroph and somatomammotroph cells, is involved in many physiological processes such as lactation, immune responses and reproduction (18). PRL production and secretion are maintained under tonic inhibition by the neuromediator dopamine. Besides dopamine inhibition, the activity of the PRL gene is modulated by a complex array of hormones, growth factors and neuromediators like TRH, VIP, EGF, estradiol, thyroid hormone and glucocorticoids (36). Recently, we demonstrated that PRL itself acts as an autocrine/paracrine regulator by inhibiting its own gene transcription in somatomammotroph cell lines (27). The 5'-flanking region of the rat PRL gene is composed of 2 regulatory segments, the proximal promoter located between -422 and +33 and a 300-bp distal enhancer located between -1831 and -1530 (Figure 1). These 2 functional regions are required for optimal as well as restrictive expression of the PRL gene (21). The pituitary restrictive expression of the PRL gene is assumed, at least partially, by the POU-homeobox transcription factor Pit-1/GHF-1 (8, 43). This pituitary-specific transcription factor regulates GH, PRL and TSH β gene activity by binding to the

DNA consensus sequence TATnCAT (42). Both regulatory regions of the rat PRL gene contain 4 of the Pit-1 responsive elements (61).

Most studies have focused on functional components of the proximal promoter of the rat PRL gene. DNA sites responsible for basal activity as well as gene regulation by multiple hormones, growth factors and oncogenes are co-localized to Pit-1-responsive elements found along the proximal promoter. Besides Pit-1, transcriptional studies show that the presence of a basal transcription element called BTE, with ubiquitous F2F factor binding on a contiguous sequence, is responsible for the tissue-specificity of PRL gene expression (45). Many binding sites are also found for ETS factor which is the downstream effector of many signal transduction pathways of tyrosine kinase receptors and oncogenes like src, ras and raf (10, 11). Both Pit-1 and ETS-1 synergize their action on a composite GHF-1/ETS-1 responsive element located at -214 to -190, at the level of the FP IV, that reconstitutes pituitary-specific gene expression (12). Recently, a new transcription factor, called PREB, was cloned using the DNA sequence surrounding Pit-1 box 1P as a probe (31). The biological importance of this new transcription factor is not clear but when expressed in PREB-negative C6 rat glial cells, it stimulates basal activity of the PRL promoter to the same extent as Pit-1 and mediates transcriptional activation by protein kinase A. Jacob and Stanley showed, in a recent paper, the binding of CCAAT/Enhancer-binding protein alpha (C/EBP α) to the proximal promoter region between -101 to -92 and its importance in basal and insulin-increased PRL gene expression (46).

The distal enhancer is much less characterized. In addition to Pit-1-responsive elements, the distal regulatory region has a functional ERE and a putative P-OTX responsive element that are located between -1582 and -1570 (56, 78) and -1686 to

–1707 (74) respectively. ERE is important for the formation of a chromatin structure involving the 2 regulatory regions in the presence of estradiol. By using nuclear ligation assay, Seyfred et al. showed that estrogen stabilized a chromatin loop between the distal enhancer and the proximal promoter, leading to juxtaposition of both control regions (22, 35). P-OTX is an OTX-related homeodomain transcription factor cloned in the yeast 2-hybrid system with an adult mouse pituitary cDNA library and the Pit-1 N-terminus as bait. This factor is expressed throughout pituitary development and is capable of activating many pituitary genes, including the PRL gene. This last activation involves synergy between P-OTX and Pit-1 actions (74).

Despite the important roles of orphan nuclear receptors in pituitary gene expression, there have been no studies on the possible role, if any, of these receptors in PRL gene activity. Cloning by our team of 2 members of orphan nuclear receptors, COUP-TFII and ear 2 (9), from an estrogen-treated pituitary (lactotroph enriched) cDNA library led us to examine a possible role of COUP-TF in PRL gene expression.

In this report, we characterize a new functional DNA element in the distal enhancer of the rat PRL 5'-flanking region between –1731 to –1706 that is responsible for nearly 90% of basal activity of the gene. Moreover, this new element is the site of action of the orphan nuclear receptors Nur77 and COUP-TFII that mutually antagonize their actions by direct DNA-binding competition.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

Rat pituitary GC cells were grown on poly-d-lysine pre-treated plastic dishes in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM+) containing 4.5 g/liter glucose (Gibco-BRL). The medium was supplemented with 12.5% horse serum (HS) (Hyclone) and 2.5% fetal bovine serum (FBS) (BIO MEDIA, Montréal, Canada).

Plasmids

Luciferase reporter constructs containing the 3-kb 5'-flanking region of the rat PRL gene (3kb-PRL), the rat PRL distal enhancer fused to the rat PRL promoter (D/P-PRL), the rat Pit-1 promoter (210Pit-1), the Pit-1 mouse enhancer fused to the 210 bp rat Pit-1 promoter (NHB0.7) and the 320-bp rat growth hormone promoter (320GH) have been described previously (61, 66).

To make the GST-COUP-TFII construct, we created an NcoI site at position 184 and a XhoI site at position 1431 of rat COUP-TFII (9) by in vitro mutagenesis with the oligonucleotides S' (GCTGACTACCATTGCCATGGCTATGGGGGCCGCGTC) and T' (CCCCTTATTTTGATTTCTCGAGTTATTGAATTGCCATG) respectively. The NcoI-XhoI fragment, containing the entire coding frame, was inserted in the same sites in pGEX-KG vector. For the pGEM-COUP-TFII construct, a BamHI site at position 177 and a XbaI site at position 1432 were created, as described above, with oligonucleotides S (GTGCTGACTACCATTGCCATATTGGATCCGGCCGCGTCCGG ACTT) and T (CTCCCCCTTATTTTGATTTCTAGATTTATTGAATTGCCATGTATG) respectively. The BamHI-XbaI fragment was inserted in the pEA EXP1 vector cut with these 2

enzymes. PCMX-NGFI-B and pcDNA-nurr1 were kindly provided by Dr. Vincent Giguère and Dr. Robert Gallo respectively (15, 34).

Mutagenesis

Mutations of putative COUP-TF response elements were created with a PCR-based mutagenesis strategy (13), using PWO polymerase (Boehringer Mannheim). A first round of PCR amplification was done with the D/P-PRL DNA template employing sense-oligonucleotide containing a BamH1 restriction enzyme site (PRL-1831s): 5'-GTGCGGATCCAAAAATCTCTTAAAAG-3' and one of the following oligonucleotides containing substitutive mutation in either box 1: 5'-TTTGGACTGACAGAGAGTTTCGTTTCTTGTTTTTTT-3'; box 2: 5'-CTGTTTCTGAATTTGGACGGGCCCATGACCTGGTTC-3'; box 3: 5'-GGCTTTACTGTTTCGGGCCCTGGACTGACAGATG-3'; box 4: 5'-CTGAAGCAGCTTGGATATCTTAGTTTTGGCTTTAC-3'; box A: 5'-GCAGCTTGACCTGGGCCCTTGGCTTTACTGTTTC-3'; box 5: 5'-GATTCATTCATCTAGATCTAGTTGTGACCTTTAG-3'; box 6: 5'-CTTTAATTTGGGGATTCGGGCCCTGAA GCAGCTTG-3'; or boxes 4 and 5: 5'-GATTCATTCATCTAGATCTAGTTGGATATCTTAG-3'. Corresponding PCR fragments were gel-purified, and a second round of PCR amplifications on the same template with the first round PCR fragments, served as sense primers with an anti-sense oligonucleotide containing a Xho-1 restriction enzyme site (PRL-1530as): 5'-TGACCTCGAGATCTATCTGC-3'. For both rounds of PCR, we implemented the manufacturer's protocol and the following parameters: an initial incubation of 1 min at 95°C, 25 cycles comprising 10 sec at 95°C, 10 sec at 37°C and 30 sec at 72°C, followed by 5 min incubation at 37°C. The final PCR products were gel-purified and double-digested by BamH1 and XhoI. The original BamH1/XhoI fragment

of the distal enhancer was exchanged with the mutated one using the same restriction sites. All constructions were verified by DNA sequencing.

Transient transfection studies

GC cells were transiently transfected by the DEAE-Dextran method, as described previously (27). 2.5 μg of luciferase reporter constructs and 1 μg of each expression vector plasmid were used but for co-transfections involving COUP-TFII, 1 or 2 μg of the expression plasmid were included equivalently since there was no significant difference in inhibitory potency at these 2 concentrations. When the effect of estradiol was examined, the transfected cells were maintained in a serum free medium composed of DMEM+ supplemented with 2 mg/L of fatty acid-free BSA (bovine serum albumin), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of bovine insulin and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of holo-transferrin (all from Sigma). Estradiol was added at 1 μM final concentration.

Protein production

For footprinting experiments, COUP-TFII was produced in a bacterial recombinant system. GST-COUP-TFII fusion protein was overexpressed and purified, as described by Guan and Dixon (37). To remove the GST portion, the glutathione-agarose beads binding the fusion proteins were washed extensively with thrombin buffer (50 mM tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 12.5 mM CaCl_2) and resuspended in 250 μl of the same buffer. Then, 15 units of thrombin (Pharmacia) was added, followed by incubation for 2 h at room temperature (RT). The reaction was stopped by 1 mM PMSF treatment for 15 min. at RT. The cleaved COUP-TFII preparation was mixed twice with fresh glutathione-agarose beads to remove any trace of uncut protein, and the supernatant was dialysed

against the buffer used for nuclear extract preparation (see below). Protein content was evaluated by SDS-PAGE using BSA as standard, and the protein preparation was kept at -80°C after rapid freezing in liquid nitrogen.

Recombinant proteins in EMSA experiments were generated in an *in vitro* transcription and translation system (TNT kit, Promega, Madison, WI). All proteins were obtained by transcription with T7 RNA polymerase and translation in cold amino acids according to the manufacturer's recommendations. After the reaction, the vials were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. To check the integrity of the proteins produced, parallel translation reactions were carried out in the presence of [³⁵S]methionine and examined by 10% denaturing SDS-PAGE.

Nuclear extract preparation

Nuclear extracts from GC were prepared according to the protocol of Dignam et al. (28). They were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further use. Protein concentration was estimated with the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) and BSA served as standard.

DNase 1 footprinting analysis

The WT BamH1/Xho1 PCR fragment corresponding to the distal enhancer of the PRL gene was radiolabeled with [α -³²P]dCTP by filling the recessed termini of the Xho1 restriction site with *E. coli* DNA polymerase I. Reactions contain various amounts of bacterial-produced COUP-TFII, 12,000 cpm of the labeled PRL enhancer fragment and 1 μ g poly(dI·dC) in a buffer composed of 12 mM Hepes, pH 7.9, 12% glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 35 mM KCl, 1.5 mM dithiothreitol, and 300 μ g/ml bovine serum albumin in a

final volume of 30 μ l. After incubation for 30 min, at RT, 1 μ l of diluted (0.2 U/ μ l) RQ-1 DNase 1 (Promega) was added and incubated for 90 sec at RT. The reactions were stopped, extracted with phenol, precipitated with ethanol, and then examined by denaturing PAGE.

Electrophoresis mobility shift assay

EMSA experiments were generally performed with 1 μ l of *in vitro* translated proteins or with 5 μ g of GC nuclear extracts. Different EMSA probes were generated by annealing of 2 complementary oligonucleotides containing an extra protruding strand of 10 nucleotides that were filled up with klenow and labeled with [α -³²P]dCTP. Proteins were mixed with 20,000 cpm of labeled probes, 1 μ g of poly(dI·dC) in EMSA buffer 1 (12 mM HEPES, pH 7.9, 12% glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 35 mM KCl, 1.5 mM dithiothreitol (DTT), and 300 μ g/ml BSA) in a total volume of 30 μ l. The reaction was incubated for 30 min at RT and then migrated on 4% nondenaturing polyacrylamide gel containing 2.5% glycerol in 0.25X Tris-Borate-EDTA (TBE) electrophoresis buffer. Binding of the Nur77 family of receptors is somewhat better if EMSA experiments are done using buffer 2 (10 mM TRIS, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA and 5% glycerol) and keeping other parameters constant. COUP-TFII binds as well to DNA in both conditions. For supershift analysis, 1-2 μ g of Nur77-specific antiserum (Santa Cruz) or anti-COUP-TFII antiserum (15), at 1/50 dilution, were incubated with nuclear extracts for 15 min before addition of the probe. For competition studies, excess of unlabeled probe was pre-incubated with proteins 15 min before binding started. The sequences of the oligonucleotides studied are: PRL-COUPRE-S: 5'-AAGGGGATCCAAAACCTAAAGGTCACAAGCTGCTTCA-3'

PRL-COUPRE-AS: 5'-AGGAAGATCTTGAAGCAGCTTGTGACCTTTAGTTTT-3'
 AD5-S: 5'-AAGGGGATCCGTGTACACAGGAAGTGACAATTTTC-3', AD5-AS: 5'-
 AGGAAGATCTCGAAAATTGTCACCTTCCTGTGTAC-3', PRL-COUPRE-S/ Δ box4: 5'-
 AAGGGGATCCAAAATAAGATATCCAAGCTGCTTCA-3', PRL-COUPRE-
 AS/ Δ box4: 5'-AGGAAGATCTTGAAGCAGCTTGGATATCTTAGTTTT-3', PRL-
 COUPRE-S/ Δ box5: 5'-AAGGGGATCCAAAATAAAGGTCACAATAAGATCT A-3'
 PRL-COUPRE-AS/ Δ box5: 5'-AGGAAGATCTTAGATCTAGTTGTGACCTTTAGTTT
 T-3', DR1-S: 5'-AAGGGGATCCGTGTACAGGTCACAGGTCAATTTTC-3', DR1-AS:
 5'-AGGAAGATCTCGAAAATTGACCTGTGACCTGTAC-3'

South-Western blotting

Large portions of the protocol used for South-Western blotting experiments were taken from Berg et al. (5) with some modifications. The double-stranded probe was labeled by the same procedure as in the EMSA experiments. GC nuclear extracts were separated on 10% SDS-PAGE and electroblotted on nitrocellulose membranes (Hybond C, Amersham). The blot was soaked for 1 h at RT in a denaturing solution (50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 4 M urea, 0.1 mM DTT and 10 mM Tris, pH 7.4), then washed 3 times for 10 min each at RT in renaturation/binding solution (10 mM Tris (pH 7.4), 100 μ M ZnSO₄, 50 mM NaCl, 0.02% (w/v) BSA, 0.02% (w/v) Ficoll 400, 0.02% (w/v) polyvinyl pyrrolidone) containing 2.5% NP-40 and submitted to two last washes with renaturing/binding solution only. Membrane lanes were cut and immersed in 1 ml/lane of binding solution containing 10 μ g of poly(dI-dC) for 1 h at RT and washed again three times. Binding was done in 1 ml/lane in binding solution containing 1 μ g of poly(dI-dC), 150,000 cpm labeled probe with or without a 100-fold excess of cold competitive or AD-5

(non specific probe) for 2 h at RT, followed by 5 5-min washes in binding solution.

Membrane strips were air-dried and submitted to autoradiography.

RESULTS

COUP-TFII repression of PRL gene transcription is gene-specific

To test any effect of COUP-TFII on lactotroph gene transcription, we transiently transfected the somatomammotroph GC cell line with the COUP-TFII expression vector along with various gene regulatory regions driving the luciferase reporter gene. This well-characterized cell line was selected because of high reproducibility of the transfection results obtained. Figure 2 shows clearly that COUP-TFII causes a 9-fold inhibition of PRL promoter-enhancer activity, and this repression is specific since COUP-TFII does not affect GH and Pit-1 promoter activities, 2 other highly-expressed genes in somatomammotrophs.

The COUP-TFII response element is located on the distal enhancer

According to the results shown in Figure 2, the first 3 Kb of the regulatory region of the PRL gene are sufficient for COUP inhibition. To better delineate the COUP-TFII response element, we used gross deletional mutants of the PRL promoter linked to the luciferase reporter gene in co-transfection experiments. COUP-TFII is able to repress the activity of the complete promoter (distal plus proximal, or D/P-PRL) but not of the proximal promoter (P-PRL) only (Figure 3). This observation indicates that the distal enhancer contributes mostly, if not totally, to the repressive action of COUP-TFII.

To more accurately define the site of action of COUP-TFII on the distal enhancer, DNase 1 footprinting analysis was conducted using recombinant COUP-TFII protein (Figure 4). Increasing amounts of the nuclear receptor revealed 2 protected regions, -1772 to -1761 and -1725 to -1716, that overlap box 1 and box 4 respectively (Figure 1).

Protection of the box 4 DNA region requires much less protein than box 1, suggesting that COUP-TFII has higher affinity for box 4. Moreover, both regions contained a single, perfectly-conserved steroid/thyroid nuclear receptor half-site sequence, AGGTCA. Extending footprinting toward 3' to -1566 did not reveal any other protected regions (data not shown). Those results suggest that the 2 COUP-TFII putative responsive elements are constituted of a single half-site motif.

Co-transfection studies using substitutive mutations made along the distal enhancer between -1769 and -1699, linked to the proximal promoter and the luciferase reporter gene, showed that the 2 functional regions, boxes 4 and 5, are the most potent in terms of basal activity and repression by COUP-TFII (Figure 5). Combined mutations of both boxes 4 and 5 led to a significant fall of PRL promoter basal activity (a decrease of nearly 90% activity of the D/P-PRL construct) and to virtual disappearance of the repressive effect by COUP-TFII. In addition, 2 other regions, the 5' A/T rich region (box A) and the putative Pit-1 responsive element 4D (box 6), contribute significantly to basal activity, and they are involved, at least partially, in COUP-TFII action. Mutations of 3 other regions containing putative half-site motifs, among which the box 1 region protected by DNase 1, did not change the repressive action of COUP-TFII, although basal activity of the promoter was decreased by box 1 mutation.

The widespread action of COUP-TFII suggests that the orphan receptor can act on different and independent cis-elements or that the regions on which COUP-TFII is interacting are themselves organized in a large regulatory complex. These observations indicate that COUP-TFII represses the action of one or many trans-acting factors that interact with a new and apparently complex regulatory region located on the distal enhancer of the PRL gene.

COUP-TFII interacts as an homo- or heterodimer with the DNA sequence between –1731 to –1706.

In general, COUP-TFII exerts its repressive effect by binding to a wide variety of responsive elements that contain half-site motifs with variable spacing and orientation (76). EMSA studies were conducted using a probe (COUPRE) designed to cover the distal enhancer DNA sequence from –1731 to –1706. This probe includes the A/T-rich region (box A), boxes 4 and 5 but does not contain Pit-1 4D response element (box 6). EMSA studies of GC nuclear proteins show 4 major mobility shift complexes (Figure 6A). Non-radioactive probe in excess (lane c), but not the AD-5 probe (lane d), competes for binding of the 3 first complexes, demonstrating the specificity of their interactions. Characterization of the complexes, using a specific antibody for COUP-TFII during the EMSA reaction, led to a supershift of complex II (lane f). This immuno-reactive complex can represent a dimeric form of COUP-TFII since *in vitro* translated COUP-TFII, in the presence of a DR1 probe, migrates at a similar level as complex II (Figure 6B, compare lanes a and d). However, a closer look at complex II revealed a slight difference in shift migration when compared to *in vitro* translated COUP-TFII bound to the same DNA probe (Figure 6B, compare lanes a and e). This last observation suggests that COUP-TFII from GC nuclear extracts bound to the COUPRE probe as an heterodimer or, perhaps, that the nuclear receptor is post-translationally modified, leading to slower shift migration.

Diverse probes of similar design that target different functional boxes by mutation were used to further characterize COUP-TFII binding element of the distal enhancer. The box 4 mutant, but not the mutation affecting box 5, led to a complete loss of binding (Figure 6C). In concordance with the footprinting experiments, all the binding data

converge to a model implicating the binding of a COUP-TFII homo- or heterodimer on the AGGTCA half-site. Comparative binding between a DR1 and the COUPRE probe using *in vitro* translated COUP-TFII shows that the nuclear receptor binds with apparently higher affinity to the direct repeat than to the natural responsive element (Figure 6B, compare lanes d and e). This fact opens the way for a mechanism where the repressive action of COUP-TFII can be competed on the half-site motif by a specific and high-affinity nuclear receptor that stimulates basal activity of the PRL gene promoter. Such a mechanism has been highlighted on an half-site motif located on the aromatase P450 promoter (II) between COUP-TF and the monomeric receptor SF-1 (84).

PRL promoter activity is modulated by members of the Nur77 family of orphan monomeric nuclear receptors on the PRL COUPRE

We first tested the possibility that one of the positive *trans*-acting factors, competed by COUP-TFII and responsible for important basal activity associated with the PRL COUPRE, is the estrogen receptor (ER). This hypothesis is based on 3 facts: 1) estrogen exerts a strong stimulatory effect on the PRL promoter, 2) it has been shown that the COUP-TF nuclear receptor family can antagonize the action of the ER on several genes (16, 49, 71), and 3) Murdoch *et al.* found that the half-site motif of the PRL COUPRE is a better ERE, affinity-wise, than the functional ERE located downstream on the distal enhancer (58). However, transient transfections in the GC cell line show that COUP-TFII cannot inhibit the stimulatory action of E2 on the PRL promoter luciferase construct (Figure 7A), indicating that the ER is not a likely candidate to account for the basal activity competed by COUP-TF.

We screened for the presence of a consensus sequence of a known response

element on the distal enhancer between -1731 to -1706 using the Transcription Element Search System (TESS) program (62). It is clear that our newly-characterized response element (RE) contained a perfectly-conserved NGF1-B\Nur77-binding RE called NBRE (AAAGGTCA). The Nur77 family of orphan nuclear receptors is composed of monomeric receptors that are strongly expressed in the pituitary and are involved in modulating the corticotropic axis (54). There are 3 isoforms: Nur77, Nurr1 and NOR-1, and the antibody used in the following experiments can cross-react with both Nur77 and Nurr1. To examine the role of Nur77 or Nurr1 on PRL gene activity, we transiently co-transfected GC cells with a Nur77 expression vector along with the D/P luciferase reporter. Nur77 expression led to strong stimulation of promoter activity that was antagonized by COUP-TFII co-expression (Figure 7A). These results clearly indicate that the activity of the nuclear orphan receptor Nur77 can be modulated by COUP-TFII and that the spectrum of Nur77 actions is not restricted to corticotrophs in the pituitary as it can potentially play an important role in lactotrophs.

PRL enhancer mutants of boxes A, 4, 5 and 1 were used in co-transfection experiments on GC cells to explore the functional sites of Nur77 action (Figure 7B). Mutation of box A totally abolished Nur77 stimulation of PRL gene activity and, consequently, antagonism by COUP-TFII vanished. Surprisingly, mutation of box 4, which is composed of the AGGTCA core of the consensus NBRE, only partially affects Nur77 action. Clearly, the A/T-rich upstream sequence of NBRE seems to be more important, functionally, for the action of Nur77 on PRL gene transcription than the half-site motif. On the contrary, COUP-TFII concentrates its repressive action mainly on boxes 4 and 5 that are contiguous to box A. Competition between both factors is likely and can explain the antagonistic action of COUP-TFII on Nur77 stimulation.

To prove that PRL COUPRE is, in fact, an independently functional NBRE, we prepared constructs containing oligomers of the COUPRE in front of the thymidine kinase promoter driving the luciferase reporter gene. Expression of these constructs in GC cells is modulated by Nur77 overexpression, proportionally to the number of COUPRE repeats (Figure 7C). However, oligomerization of COUPRE does not increase basal activity *per se* as the combined mutation of boxes 4 and 5 would suggest.

EMSA studies using *in vitro* translated Nur77 and Nurr1 showed specific binding of proteins to the COUPRE probe (Figure 8, lanes b and c). Since both factors (COUP-TFII and Nur77) bind to the same RE and functionally antagonize each other, it is tempting to hypothesize direct competition or heterodimerization of these factors on PRL COUPRE. We proved, along experimental lines of evidence using an EMSA approach that COUP-TFII and members of the Nur77 family of nuclear receptors compete with each other on this RE. First, we revealed the presence of Nur77/Nurr1 binding from GC nuclear extracts by selective titration of COUP-TFII with a DR1 probe. This simple experiment is based on the fact that COUP-TFII has a higher binding affinity on the DR1 probe compared to the COUPRE probe (see Figure 6B). Then, addition of an excess amount of unlabeled DR1 probe, during the pre-incubation step in the EMSA reaction, leads to titration of COUP-TFII, and the Nur77/Nurr1 present in GC cells is free to bind to the labeled PRL COUPRE probe (Figure 8, lanes k, l, m and n). Next, increasing amounts of *in vitro* translated Nur77 displace, in a specific manner, the binding of a constant quantity of COUP-TFII (Figure 9A). Finally, using the same experimental procedure, NGFI-B can compete with binding of the endogenous COUP-TFII present in GC cell nuclear extracts (Figure 9B). We never observed any heterodimer complex on DNA between both nuclear factors since no intermediate band is seen when we mix the 2

factors together during competition experiments. These results suggest that the transcriptional activity of the PRL gene is regulated by the orphan nuclear receptors NGFI-B and COUP-TFII that exert their antagonistic activity through their own but overlapping responsive element on the distal enhancer of the PRL gene promoter by mutual binding competition.

PRL COUPRE DNA element binds multiple nuclear DNA binding proteins

The accumulated data indicate that the DNA fragment between -1731 to -1706 (PRL COUPRE) is an important player in the regulation of PRL promoter activity in somatomammotrophs, and the orphan receptors COUP-TFII and Nur77/Nurr1 are probably not the only intervening factors. To reveal the array of possible nuclear factors involved in PRL gene regulation at that level of the distal enhancer, we conducted South-Western blot analysis from renatured GC cell line nuclear proteins blotted on a nitrocellulose membrane after they were previously resolved by SDS-PAGE (Figure 10). The PRL COUPRE DNA probe interacts with at least 8 nuclear proteins of different molecular weight, suggesting that this regulatory element is a molecular center of convergence for many individually-binding proteins or forms a regulatory complex in which COUP-TFII/Nur77 pathways of regulation take place.

DISCUSSION

The regulation of PRL gene expression in the rat pituitary has been studied for many years and appears to be complex. Since the discovery of pituitary-specific factor Pit-1 and its involvement in PRL gene activity, many other regulatory sequences and *trans*-acting factors have been found (36). Characterization has mostly been directed to the proximal promoter, and much less is known about *cis* and *trans* factors governing the activity of the distal enhancer outside the 4 Pit-1 and ERE. This is surprising considering the fact that the distal enhancer has a dramatic effect on basal activity and is essential in tissue-restrictive expression of the gene (21, 26).

COUP-TFII is an orphan nuclear receptor that acts mainly by inhibiting gene transcription. Its expression pattern has been studied more extensively in the brain (76). It has been shown to be present in the pituitary but its particular cell type distribution has not been detailed (51). No study has been devoted to the possible roles of COUP-TFII in the pituitary.

A major interest of our group concerns PRL gene regulation in pituitary cells (27). We conducted experiments to study if COUP-TFII has any role in PRL gene regulation in somatolactotrophs. We used a standard approach of co-transfection in a relevant cell line (GC), with 5'-flanking regulatory regions linked to the luciferase reporter gene and an expression vector coding for rat COUP-TFII. In this study, we have shown that COUP-TFII specifically represses the activity of the 5'-flanking regulatory region of the PRL gene while it has no effect on GH and Pit-1 promoters. We found that the COUP-TFII repressive action occurs in the distal enhancer on a very poorly-characterized segment upstream of the last Pit-1 consensus sequence. Mutagenesis was induced along the distal

enhancer from the more distal COUP-TFII footprinting, centered at -1767 (box 1), to the Pit-1 box 4D consensus sequence (box 6). This analysis revealed that boxes 4 and 5 are the most critical for both basal activity and COUP-TFII action. Comparison of the -1731 to -1706 region between rats and humans, as demonstrated by Berwaer *et al.*, reveals that 23 of these 26 nucleotides are identical (7). This last observation suggests that the molecular mechanism of PRL gene regulation involving COUP-TFII is conserved from rats to humans and that this region plays an essential regulatory function. Surprisingly, oligomerization of this sequence does not lead to the stimulation of basal activity *per se* but is sensitive to the action of Nur77 when overexpressed. This indicates that the sequence requires a proper genomic context for optimal activity.

As shown in Figure 1, the shaded sequence that encompasses boxes 5 and 6 corresponds to published Pit-1 4D footprinting (61). The results presented here clearly reveal that this reported footprinting does not correspond to a Pit-1 responsive element only, since the effect of mutation on boxes 5 and 6 is not equivalent. This emphasizes that the DNA region is more complex than we originally thought. Rosenfeld's group found a P-OTX responsive element in the vicinity of Pit-1 4D and they observed synergistic actions of Pit-1 and P-OTX on the stimulation of PRL gene activity (74). It is possible that Pit-1 serves as a molecular bridge between different *trans* factors on that DNA region. In fact, such synergistic interactions with Pit-1 have been shown with the nuclear receptors ER (25, 72) and TR (69), and with the transcription factors P-Lim (2), OCT-1 (77), Ets-1 (12), c-Jun (30), C/EBP (68) and Zn-15 (50), on PRL or GH promoters in the pituitary. By these combinatorial interactions, Pit-1 can drive tissue-specific gene regulation in the pituitary. Therefore, the Pit-1 4D and surrounding sequences, including

COUP-RE, may represent such a tissue-restrictive *cis*-element where Pit-1 can possibly interact with Nur77 and/or COUP-TFII to modulate PRL gene expression.

Footprinting and EMSA assays strongly suggest that the COUP-TFII binding site is limited to the ERE half-site of box 4 with some overlapping on the A/T rich upstream sequence (box 3). These results are in accordance with those of co-transfection experiments performed with distal enhancer mutants. Moreover, EMSA experiments using *in vitro* translated protein indicate that COUP-TFII binds to this ERE half-site as an homodimer. These observations are surprising since COUP-TFII was reported originally to bind as an homodimer and an heterodimer to DNA sequences composed of direct repeats of AGGTCA half-sites with various combinations of spacing and orientation (76). However, it has already been reported by 2 other groups that COUP-TF homodimers can bind with high affinity to a single half-site motif (49, 70), and a third group has found such an ERE half-site on the aromatase P450 promoter but did not explore if the nuclear receptor binds as an homodimer or as a monomer to this DNA sequence (84). Our report constitutes a fourth example of this kind and strengthens a new paradigm of COUP-TFII mechanism of action.

Based on the footprinting experiment, box 1 contains another perfect ERE half-site on which COUP-TFII binds but with a lower affinity compared to box 4. This last result, in addition to the functional studies with mutant constructs, clearly indicates that box 1 constitutes a minor COUP-TFII responsive element.

A different phenomenon is observed with box 5. Indeed, while the sequence has an important role in basal activity of the PRL gene promoter and its inhibition by COUP-TFII, we did not reveal binding of a nuclear protein on it. This may result either from inappropriate binding conditions or from the absence of other sequences that are required

to stabilize the interaction between DNA and box 5 nuclear protein. Since no known consensus sequences can be found in box 5, we have no clue to the identity of the factor binding to it. Consequently, the action of COUP-TFII on that sequence remains puzzling. It is probably not mediated by direct DNA binding on box 5 but by interacting with several neighbor factors like Pit-1 and P-OTX.

A major finding of this study is the involvement of the Nur77/Nurr1 family of orphan receptors in PRL gene activity. It has already been reported that Nur77 and Nurr1 affect the corticotroph gene expression of the POMC gene and are modulated by its main activator, CRH (59, 64). Interestingly, the highest level of expression of NGF1-B, as demonstrated by quantitative RT-PCR, is located in the pituitary gland (3, 53). Therefore, it would not be surprising that this nuclear receptor affects more than one endocrine axis in the pituitary.

Another interesting finding is the nature of the functional response element found for Nur77. The mutagenesis of only a small A/T-rich region upstream of the ERE half-site motif is sufficient to totally abolish the stimulation of PRL gene activity by Nur77. Mutation of the ERE half-site alone affects, to a lower degree, Nur77 action. It has been reported that adenosine trailing of the NBRE, to the same extent as the ERE half-site motif, is crucial for both binding and activity of Nur77 (57). It is clear from our results that, in the context of the PRL distal enhancer, the A/T region fulfills this essential role for the proper action of Nur77 as reported by others. However, it was recently described that Nur77 can drive the POMC gene through a different response element, NurRE, that is a palindrome of 2 partially-conserved NBRE (64). Moreover, Nur77 can mediate retinoic acid signaling through a DR-5 (63). Thus, it appears that Nur77 can drive gene

transcription through a variety of response element structures that are more or less related to the original consensus NBRE.

We observed that the immunoreactive COUP-TFII and Nurr1 present in nuclear extracts give bands with lower migration on EMSA. In addition, we found that COUP-TFII from nuclear extracts binds with higher affinity to the COUPRE probe than *in vitro* translated COUP-TFII (data not shown). These discrepancies may reflect a possible post-translational modification of the nuclear receptors or even the existence of a new isoform. Another hypothesis would be that COUP-TFII and Nurr1 bind as heterodimers with another nuclear protein *in vivo* since such complexes of COUP-TFII or Nur77 with RXR have been documented previously (6, 19, 32, 48, 63, 75). However, it is unlikely that both COUP-TFII and Nurr1 together form an heterodimer because 1) anti-Nurr1 has no effect on the EMSA band pattern from GC nuclear extract, and 2) no intermediate band can be seen when both *in vitro* translated proteins are mixed together.

Based on the experimental evidence presented in this study, we suggest that COUP-TFII represses the rat PRL gene by interfering with the binding of Nur77/Nurr1 on COUPRE. This hypothesis is reinforced by the fact that COUP-TFII has much less affinity for the COUPRE than for a standard COUP response element (DR1), allowing effective competition with another receptor, like Nur77, on this element. Binding competition on DNA is actually the most common way by which COUP-TFII exerts its repressive action on gene transcription (76). Since the activity of the PRL promoter is influenced by a stimulator and a repressor of transcription (NGFI-B and COUP-TFII respectively) in GC cells, we can hypothesize that equilibrium based on relative expression of the 2 receptors may exist and drives the activity of the PRL gene in lactotrophs and sommatolactotrophs. Such an equilibrium between COUP-TF and other

orphan nuclear receptors has been reported *in vivo*. The relative expression of COUP-TFII and SF-1 modulates the activity of the aromatase P450 gene promoter II in endometrium tissue (84) and of the α 2-macroglobulin gene promoter in granulosa cells (23) by a similar mechanism of DNA-binding site competition between both factors. Another example is the expression, in the liver and intestine, of Apolipoprotein CIII gene that is dependant on the relative activities of both COUP-TFII and hepatocyte nuclear factor 4 (57). Also, a dynamic balance of Nur77 and COUP-TFII regulates retinoic acid sensitivity of retinoic acid response element containing genes in lung cancer cell lines (81). In this case, the factors interact by protein-protein interactions in solution.

This report also revealed the existence of a new and highly potent regulatory region in the distal enhancer of the PRL gene that encompasses the previously-described Pit-1 4D footprinting region; its activity is regulated, at least partly, by 2 families of orphan nuclear receptors. The numerous DNA binding proteins that bind to this functional element, as highlighted by the South-Western technique, suggest that this DNA sequence is a molecular point of convergence that has a major impact on gene transcription. Further studies are necessary to reveal the identity of these other binding factors and the nature of their interaction with orphan receptors and Pit-1.

LEGENDS

Figure 1. Schematic representation of the 5'-regulatory region of the rat prolactin gene.

A) Structure of the reporter gene construct used in transfection studies. Numbers overlying each regulatory region of the promoter indicate their position relative to the transcription initiation site depicted by the arrow.

B) Sequence of the distal enhancer. Nucleotides that are targeted for mutagenesis are depicted by boxes and the corresponding mutated sequences are written on top. Each of these mutated sequences (or boxes) corresponds to either a putative site of action for orphan nuclear receptors (box 1 to 5 and box A) or to the consensus sequence of the Pit-1 responsive element 4D (box 6). Shaded sequences correspond to Pit-1 footprintings. Underlined sequences delineate either the estrogen (ERE) or P-OTX (P-OTX RE) response element.

Figure 2. Effect of COUP-TFII on various pituitary gene promoters in GC cells.

RSV expression vector, encoding either the neomycin resistance gene (NEO) as control or rat COUP-TFII gene, was co-transfected in GC cells with a reporter gene driven by PRL (3kbPRL), GH (320GH), Pit-1 distal (NHB0.7) or Pit-1 proximal (210Pit-1) gene promoters. Results are the means of triplicate determinations, and error bars represent the SEM. Statistical significance of the effect of PRL was determined by one-way analysis of variance: *** $p < 0.005$, * $p < 0.05$. Similar results were obtained in 4 experiments of similar design.

Figure 3. Gross mapping of the repressive effect of COUP-TFII on PRL promoter gene activity.

GC cells were co-transfected with different luciferase reporter constructs containing either the full 3000 bp regulatory region (3Kb-PRL), the distal enhancer directly fused to the proximal promoter (D/P-PRL), the proximal promoter alone (P-PRL), the minimal promoter (36-PRL) or the promoter-less reporter (0-PRL), in the presence of either COUP-TFII or control Neomycin (NEO) expression vectors. Numbers indicate the fold repression of luciferase activity in co-transfections with COUP-TFII relative to co-transfections with NEO. Results are the means of triplicate determinations, and error bars represent the SEM. Statistical significance of the effect of COUP-TFII was determined by one-way analysis of variance: *** $p < 0.001$. Similar results were obtained in 4 experiments of similar design.

Figure 4. Footprinting analysis using recombinant COUP-TFII revealed 2 protected regions on the distal enhancer.

DNase 1 footprinting analysis of COUP-TFII binding sites on the distal enhancer using a) 0 ng, b) 0.05 ng, c) 0.1 ng, d) 0.2 ng, e) 0.5 ng, f) 1.0 ng, g) 2.0 ng and h) 10 ng recombinant of COUP-TFII protein mixed with a 3'-end labeled 300-bp distal enhancer fragment (sense strand). i) is a control lane with 10 ng COUP-TFII but without DNase 1 treatment. The last lane (j) represents a G+A Maxam-Gilbert sequencing reaction of the DNA probe.

Figure 5. Effect of mutations made along the distal enhancer between -1769 and -1699 on the repressive action of COUP-TFII.

GC cells were co-transfected with COUP-TFII or Neomycin (NEO) expression vectors, and a luciferase reporter gene driven by the wild type rPRL promoter (D/P) or various substitutive mutants of the distal enhancer: mutations at box 1 (D/P Δ 1), box 2 (D/P Δ 2), box 3 (D/P Δ 3), box A (D/P Δ A), box 4 (D/P Δ 4), box 5 (D/P Δ 5), box 6 (D/P Δ 6), and at both boxes 4 and 5 (D/P Δ 4+5). Numbers indicate the fold repression of the luciferase activity in co-transfections with COUP-TFII relative to co-transfections with NEO. Results are the means of triplicate determinations, and error bars represent the SEM. Statistical significance of the effect of COUP-TFII was determined by one-way analysis of variance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Similar results were obtained in 3 experiments of similar design.

Figure 6. Binding of nuclear proteins to the -1731 to -1706 DNA fragment COUPRE probe.

A) Nuclear extracts from GC cells (lanes b to f) or dialysis buffer (lane a) were incubated with the [32 P]-labeled COUPRE oligonucleotide (-1731 to -1706) and analyzed by EMSA, as described in Materials and Methods. A 100-fold excess of the corresponding unlabeled COUPRE oligonucleotide or of the AD-5 control oligonucleotide was added in lanes c and d, respectively. The specifically-bound retarded complexes are indicated (I - III). The presence of COUP-TFII in nuclear extracts was revealed by co-incubating the labeled probe with anti-COUP-TFII antiserum (lane f) or pre-immune serum used as control (lane e).

B) The mobility of nuclear protein complex II, bound to the COUPRE probe (lanes a and b), was compared to that of *in vitro* translated COUP-TFII, bound to the same probe (lanes e and f) or to an oligonucleotide probe containing a DR-1 sequence (lane d). Empty

Bluescript vector was used as an *in vitro* translated control (lane c). Some binding reactions were made in the presence of pre-immune serum (lanes a and e) or of anti-COUP-TFII antibody (lanes b and f).

C) EMSA assays of nuclear extracts from GC cells (lanes b to m) or dialysis buffer (lane a) incubated with the labeled wild type COUPRE probe (lanes a to e) or with labeled COUPRE mutated either at box 4 (lanes f to i) or box 5 (lanes j to m). Some binding reactions contained either 100-fold excess of the corresponding unlabeled probe (lanes c, g and k), pre-immune serum control (lanes d, h and l) or anti-COUP-TFII antiserum (lanes e, i and m).

Figure 7. COUP-TFII has an antagonistic effect on stimulation of PRL promoter activity by Nur77 but not by estrogen. The COUPRE DNA fragment (-1731 to -1706) is a Nur77 responsive element.

A) This panel is representative of 2 sets of independent experiments testing functional interactions between COUP-TFII and 2 stimulators of the PRL gene promoter: estrogen (first 4 graph bars) and the nuclear orphan receptor NGF1-B/Nur77 (last 4 bars). GC cells were co-transfected with the D/P-PRL reporter gene and the indicated expression vectors, as described in Materials and Methods, except that 1 μ g of the estrogen receptor and of Nur77 expression vectors was used. Numbers indicate the fold repression of luciferase activity in co-transfections with COUP-TFII relative to corresponding co-transfections with NEO. Statistical significance of the effects of various effectors was determined relative to co-transfections with NEO only (white bar of each set) by one-way analysis of variance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

B) Similar to the Nur77 experiments described in A) but, in addition to D/P-PRL, luciferase reporter genes driven by various substitutive distal enhancer mutants were tested: mutations of box 1 (D/P Δ 1), box A (D/P Δ A), box 4 (D/P Δ 4) and box 5 (D/P Δ 5). Statistical significance of the effects of Nur77 and/or COUP-TFII was determined relative to co-transfections with NEO only (white bar of each set) by one-way analysis of variance: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Similar results were obtained in 2 experiments of similar design

C) Oligomers composed of 2 (2xCOUPRE) and 5 (5xCOUPRE) copies of the -1731 to -1706 fragment of the PRL distal enhancer were cloned upstream of the thymidine kinase promoter driving the luciferase reporter gene (TKSL). Their respective activities, before and after stimulation by co-transfection with Nur77 expression, were compared with the activity of the enhancer/proximal promoter reporter construct (P/D-PRL). The bar graph gives the luciferase activity (light units) of the reporter constructs in the presence of NEO (white bar) or Nur77 (black bar). Statistical significance of the effect of Nur77 was determined by one-way analysis of variance: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Similar results were obtained in 2 experiments of similar design.

Figure 8. Binding of a Nurrr1-related factor, present in GC nuclear extracts, on COUPRE is revealed when COUP-TFII is titrated by an excess of DR-1 responsive element.

EMSA experiments using *in vitro* translated Nur77 (lane b) and Nurrr1 (lanes c to f) were performed with [32 P]-labeled COUPRE oligonucleotide (-1731 to -1706). Selectivity of Nurrr1 binding to the COUPRE DNA probe was accomplished by adding 100-fold excess of the corresponding unlabeled COUPRE oligonucleotide (lane d), 500-

fold excess of a DR-1 oligonucleotide (lane e) and 500-fold excess of the control AD-5 oligonucleotide (lane f). Empty Bluescript vector served as an *in vitro* translated control (lane a). Lanes g to o represent EMSA analysis of proteins present in the nuclear extract of GC cells that bind to the COUPRE DNA probe in the absence (lanes g to i) or presence of 100-fold excess (lane k) or 500-fold excess (lanes l to n) of a DR-1 oligonucleotide. Specificity of binding was established by adding either 100-fold excess of corresponding unlabeled COUPRE (lane j) or 500-fold excess of an AD-5 control oligonucleotide (lane o). In some lanes, antisera against COUP-TFII (lanes h and m) and Nurr1 (lanes i and n) were added to the EMSA reactions for supershifting experiments, as described in Materials and Methods.

Figure 9. Direct binding competition on the -1731 to -1706 COUPRE DNA probe between COUP-TFII and Nur77 *in vitro*.

EMSA experiments showing the direct binding competition of 1 μ l of *in vitro* translated COUP-TFII (panel **A**) or of COUP-TFII present in 2.5 μ g nuclear extract from GC cells (panel **B**) by increasing amounts of *in vitro* translated Nur77: 0 μ l (lane f), 0.25 μ l (lane g), 0.5 μ l (lane h), 1 μ l (lane i), 2 μ l (lane j), 5 μ l (lane k), 10 μ l (lane l) or 5 μ l of *in vitro* translated negative control (lane m). In panel **A**, the nature of *in vitro* translated COUP-TFII (lanes b and c) and Nur77 (lanes d and e) used in this assay was checked by adding corresponding antisera to the EMSA reactions; lane b: pre-immune serum, lane c: anti-COUP-TFII, lane d: control antiserum, lane e: anti-Nurr-1. In panel **B**, the nature of the *in vitro* translated NGFI-B (lanes b and c) and identification of the band corresponding to COUP-TFII in GC nuclear extracts (lanes d and e) were checked by adding corresponding antisera to the EMSA reactions; lane b: control antiserum, lane c: anti-

Nurr1, lane d: pre-immune serum, lane e: anti-COUP-TFII. In both panels, empty Bluescript vector served as an *in vitro* translated control (lane a). The arrows on the left side of each panel indicate the position of COUP-TFII (C) and Nur77 (N) respectively.

Figure 10. South-Western blotting analysis shows the multiplicity of nuclear proteins from GC cells that binds to the COUPRE oligonucleotide probe.

South-Western blot obtained with nuclear proteins from the GC cell line and the [³²P]-labeled -1731 to -1706 DNA probe using the procedure described in Materials and Methods. Binding was done in the absence (lane a) or presence of 100-fold excess of either the corresponding COUPRE oligonucleotide (lane b) or the control AD-5 oligonucleotide (lane c). Numbers on the left indicate the molecular weights of SDS-PAGE protein standards.

REFERENCES

1. **Andre, E., F. Conquet, M. Steinmayr, S. C. Stratton, V. Porciatti, and M. Becker-Andre** 1998. Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice *Embo J.* **17**:3867-77.
2. **Bach, I., S. J. Rhodes, R. V. Pearse, 2nd, T. Heinzl, B. Gloss, K. M. Scully, P. E. Sawchenko, and M. G. Rosenfeld** 1995. P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1 *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:2720-4.
3. **Bandoh, S., T. Tsukada, K. Maruyama, N. Ohkura, and K. Yamaguchi** 1997. Differential expression of NGFI-B and RNR-1 genes in various tissues and developing brain of the rat: comparative study by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction *J Neuroendocrinol.* **9**:3-8.
4. **Barnhart, K. M., and P. L. Mellon** 1994. The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone alpha-subunit gene in pituitary gonadotropes *Mol Endocrinol.* **8**:878-85.
5. **Berg, V., G. Vassart, and D. Christophe** 1997. A zinc-dependent DNA-binding activity co-operates with cAMP-responsive-element-binding protein to activate the human thyroglobulin enhancer *Biochem J.* **323**:349-57.
6. **Berrodin, T. J., M. S. Marks, K. Ozato, E. Linney, and M. A. Lazar** 1992. Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein *Mol Endocrinol.* **6**:1468-78.
7. **Berwaer, M., P. Monget, B. Peers, M. Mathy-Hartert, E. Bellefroid, J. R. Davis, A. Belayew, and J. A. Martial** 1991. Multihormonal regulation of the human prolactin gene expression from 5000 bp of its upstream sequence *Mol Cell Endocrinol.* **80**:53-64.
8. **Bodner, M., J. L. Castrillo, L. E. Theill, T. Deerinck, M. Ellisman, and M. Karin** 1988. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein *Cell.* **55**:505-18.

9. **Boutin, J.-M., Ronsin,B., Devost,D., Lipkin,S.M., Rosenfeld,M.G. and Morel,G.** 1997. Cloning and expression of COUPb and COUPg in the rat anterior pituitary. GenBank. **accession numbers: AF003944 (COUPb) and AF003926.**
10. **Bradford, A. P., K. E. Conrad, P. H. Tran, M. C. Ostrowski, and A. Gutierrez-Hartmann** 1996. GHF-1/Pit-1 functions as a cell-specific integrator of Ras signaling by targeting the Ras pathway to a composite Ets-1/GHF-1 response element *J Biol Chem.* **271:**24639-48.
11. **Bradford, A. P., K. E. Conrad, C. Wasylyk, B. Wasylyk, and A. Gutierrez-Hartmann** 1995. Functional interaction of c-Ets-1 and GHF-1/Pit-1 mediates Ras activation of pituitary-specific gene expression: mapping of the essential c-Ets-1 domain *Mol Cell Biol.* **15:**2849-57.
12. **Bradford, A. P., C. Wasylyk, B. Wasylyk, and A. Gutierrez-Hartmann** 1997. Interaction of Ets-1 and the POU-homeodomain protein GHF-1/Pit-1 reconstitutes pituitary-specific gene expression *Mol Cell Biol.* **17:**1065-74.
13. **Chen, B., and A. E. Przybyla** 1994. An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR Biotechniques. **17:**657-9.
14. **Cheng, L. E., F. K. Chan, D. Cado, and A. Winoto** 1997. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis *Embo J.* **16:**1865-75.
15. **Chew, L. J., F. Huang, J. M. Boutin, and V. Gallo** 1999. Identification of nuclear orphan receptors as regulators of expression of a neurotransmitter receptor gene *J Biol Chem.* **274:**29366-75.
16. **Chu, K., J. M. Boutin, C. Breton, and H. H. Zingg** 1998. Nuclear orphan receptors COUP-TFII and Ear-2: presence in oxytocin-producing uterine cells and functional interaction with the oxytocin gene promoter *Mol Cell Endocrinol.* **137:**145-54.
17. **Chu, K., and H. H. Zingg** 1999. Activation of the mouse oxytocin promoter by the orphan receptor RORalpha *J Mol Endocrinol.* **23:**337-46.
18. **Cooke, N. E.** 1989. Prolactin: normal synthesis, regulation, and actions., p. 384-407. *In* L. J. DeGroot (ed.), *Endocrinology*, vol. vol.1. W. B. Saunders compangny, Philadelphia, Pen.

19. **Cooney, A. J., S. Y. Tsai, B. W. O'Malley, and M. J. Tsai** 1992. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTC A response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D₃, thyroid hormone, and retinoic acid receptors *Mol Cell Biol.* **12**:4153-63.
20. **Crawford, P. A., Y. Sadovsky, K. Woodson, S. L. Lee, and J. Milbrandt** 1995. Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice *Mol Cell Biol.* **15**:4331-16.
21. **Crenshaw, E. B. D., K. Kalla, D. M. Simmons, L. W. Swanson, and M. G. Rosenfeld** 1989. Cell-specific expression of the prolactin gene in transgenic mice is controlled by synergistic interactions between promoter and enhancer elements *Genes Dev.* **3**:959-72.
22. **Cullen, K. E., M. P. Kladde, and M. A. Seyfred** 1993. Interaction between transcription regulatory regions of prolactin chromatin *Science.* **261**:203-6.
23. **Dajee, M., G. H. Fey, and J. S. Richards** 1998. Stat 5b and the orphan nuclear receptors regulate expression of the alpha2-macroglobulin (alpha2M) gene in rat ovarian granulosa cells *Mol Endocrinol.* **12**:1393-409.
24. **Davis, I. J., and L. F. Lau** 1994. Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands *Mol Cell Biol.* **14**:3469-83.
25. **Day, R. N., S. Koike, M. Sakai, M. Muramatsu, and R. A. Maurer** 1990. Both Pit-1 and the estrogen receptor are required for estrogen responsiveness of the rat prolactin gene *Mol Endocrinol.* **4**:1964-71.
26. **Day, R. N., and R. A. Maurer** 1989. The distal enhancer region of the rat prolactin gene contains elements conferring response to multiple hormones *Mol Endocrinol.* **3**:3-9.
27. **Devost, D., and J. M. Boutin** 1999. Autoregulation of the rat prolactin gene in lactotrophs *Mol Cell Endocrinol.* **158**:99-109.
28. **Dignam, J. D., R. M. Lebovitz, and R. G. Roeder** 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei *Nucleic Acids Res.* **11**:1475-89.

29. **Duval, D. L., S. E. Nelson, and C. M. Clay** 1997. A binding site for steroidogenic factor-1 is part of a complex enhancer that mediates expression of the murine gonadotropin-releasing hormone receptor gene *Biol Reprod.* **56**:160-8.
30. **Farrow, K. N., N. Manning, F. Schaufele, and A. Gutierrez-Hartmann** 1996. The c-Jun delta-domain inhibits neuroendocrine promoter activity in a DNA sequence- and pituitary-specific manner *J Biol Chem.* **271**:17139-46.
31. **Fliss, M. S., P. M. Hinkle, and C. Bancroft** 1999. Expression cloning and characterization of PREB (prolactin regulatory element binding), a novel WD motif DNA-binding protein with a capacity to regulate prolactin promoter activity *Mol Endocrinol.* **13**:644-57.
32. **Forman, B. M., K. Umesono, J. Chen, and R. M. Evans** 1995. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors *Cell.* **81**:541-50.
33. **Giguère, V.** 1999. Orphan nuclear receptors: from gene to function *Endocr Rev.* **20**:689-725.
34. **Giguère, V., L. D. McBroom, and G. Flock** 1995. Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor *Mol Cell Biol.* **15**:2517-26.
35. **Gothard, L. Q., J. C. Hibbard, and M. A. Seyfred** 1996. Estrogen-mediated induction of rat prolactin gene transcription requires the formation of a chromatin loop between the distal enhancer and proximal promoter regions *Mol Endocrinol.* **10**:185-95.
36. **Gourdji, D., and J. N. Laverriere** 1994. The rat prolactin gene: a target for tissue-specific and hormone-dependent transcription factors *Mol Cell Endocrinol.* **100**:133-42.
37. **Guan, K. L., and J. E. Dixon** 1991. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase *Anal Biochem.* **192**:262-7.
38. **Halvorson, L. M., U. B. Kaiser, and W. W. Chin** 1996. Stimulation of luteinizing hormone beta gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1 *J Biol Chem.* **271**:6645-50.

39. **Hamilton, B. A., W. N. Frankel, A. W. Kerrebrock, T. L. Hawkins, W. FitzHugh, K. Kusumi, L. B. Russell, K. L. Mueller, V. van Berkel, B. W. Birren, L. Kruglyak, and E. S. Lander** 1996. Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice [published erratum appears in Nature 1996 May 23;381(6580):346] *Nature*. **379**:736-9.
40. **He, Y. W., M. L. Deftos, E. W. Ojala, and M. J. Bevan** 1998. RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells *Immunity*. **9**:797-806.
41. **Imaki, T., T. Shibasaki, N. Chikada, S. Harada, M. Naruse, and H. Demura** 1996. Different expression of immediate-early genes in the rat paraventricular nucleus induced by stress: relation to corticotropin-releasing factor gene transcription *Endocr J*. **43**:629-38.
42. **Ingraham, H. A., V. R. Albert, R. P. Chen, E. B. Crenshaw III, H. P. Elsholtz, X. He, M. S. Kapiloff, H. J. Mangalam, L. W. Swanson, M. N. Treacy, and M. G. Rosenfeld** 1990. A family of POU-domain and Pit-1 tissue-specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development *Annu Rev Physiol*. **52**:773-91.
43. **Ingraham, H. A., R. P. Chen, H. J. Mangalam, H. P. Elsholtz, S. E. Flynn, C. R. Lin, D. M. Simmons, L. Swanson, and M. G. Rosenfeld** 1988. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype *Cell*. **55**:519-29.
44. **Ingraham, H. A., D. S. Lala, Y. Ikeda, X. Luo, W. H. Shen, M. W. Nachtigal, R. Abbud, J. H. Nilson, and K. L. Parker** 1994. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis *Genes Dev*. **8**:2302-12.
45. **Jackson, S. M., C. A. Keech, D. J. Williamson, and A. Gutierrez-Hartmann** 1992. Interaction of basal positive and negative transcription elements controls repression of the proximal rat prolactin promoter in nonpituitary cells *Mol Cell Biol*. **12**:2708-19.
46. **Jacob, K. K., and F. M. Stanley** 1999. CCAAT/enhancer-binding protein alpha is a physiological regulator of prolactin gene expression *Endocrinology*. **140**:4542-50.

47. **Keri, R. A., and J. H. Nilson** 1996. A steroidogenic factor-1 binding site is required for activity of the luteinizing hormone beta subunit promoter in gonadotropes of transgenic mice *J Biol Chem.* **271**:10782-5.
48. **Kliwer, S. A., K. Umesono, R. A. Heyman, D. J. Mangelsdorf, J. A. Dyck, and R. M. Evans** 1992. Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:1448-52.
49. **Klinge, C. M., B. F. Silver, M. D. Driscoll, G. Sathya, R. A. Bambara, and R. Hilf** 1997. Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor interacts with estrogen receptor, binds to estrogen response elements and half-sites, and inhibits estrogen-induced gene expression *J Biol Chem.* **272**:31465-74.
50. **Lipkin, S. M., A. M. Naar, K. A. Kalla, R. A. Sack, and M. G. Rosenfeld** 1993. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression *Genes Dev.* **7**:1674-87.
51. **Lopes da Silva, S., A. M. Van Horssen, C. Chang, and J. P. Burbach** 1995. Expression of nuclear hormone receptors in the rat supraoptic nucleus *Endocrinology.* **136**:2276-83.
52. **Maira, M., C. Martens, A. Philips, and J. Drouin** 1999. Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation *Mol Cell Biol.* **19**:7549-57.
53. **Maruyama, K., T. Tsukada, S. Bandoh, K. Sasaki, N. Ohkura, and K. Yamaguchi** 1997. Expression of the putative transcription factor NOR-1 in the nervous, the endocrine and the immune systems and the developing brain of the rat *Neuroendocrinology.* **65**:2-8.
54. **Maruyama, K., T. Tsukada, N. Ohkura, S. Bandoh, T. Hosono, and K. Yamaguchi** 1998. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review) *Int J Oncol.* **12**:1237-43.
55. **Matysiak-Scholze, U., and M. Nehls** 1997. The structural integrity of ROR alpha isoforms is mutated in staggerer mice: cerebellar coexpression of ROR alpha1 and ROR alpha4 *Genomics.* **43**:78-84.
56. **Maurer, R. A., and A. C. Notides** 1987. Identification of an estrogen-responsive element from the 5'-flanking region of the rat prolactin gene *Mol Cell Biol.* **7**:4247-54.

57. **Mietus-Snyder, M., F. M. Sladek, G. S. Ginsburg, C. F. Kuo, J. A. Ladas, J. E. Darnell, Jr., and S. K. Karathanasis** 1992. Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells *Mol Cell Biol.* **12**:1708-18.
58. **Murdoch, F. E., L. M. Byrne, E. A. Ariazi, J. D. Furlow, D. A. Meier, and J. Gorski** 1995. Estrogen receptor binding to DNA: affinity for nonpalindromic elements from the rat prolactin gene *Biochemistry.* **34**:9144-50.
59. **Murphy, E. P., and O. M. Conneely** 1997. Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors *Mol Endocrinol.* **11**:39-47.
60. **Muscatelli, F., T. M. Strom, A. P. Walker, E. Zanaria, D. Recan, A. Meindl, B. Bardoni, S. Guioli, G. Zehetner, W. Rabl, H. P. Schwarz, J.-C. Kaplan, G. Camerino, T. Meitinger, and A. P. Monaco** 1994. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism *Nature.* **372**:672-6.
61. **Nelson, C., V. R. Albert, H. P. Elsholtz, L. I. Lu, and M. G. Rosenfeld** 1988. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor *Science.* **239**:1400-5.
62. **Overton, G. C., and J. Schug** 1997. TESS: Transcription Element Search Software on the WWW Technical Report CBIL-TR-1997-1001-v0.0, of the Computational Biology and Informatics Laboratory, School of Medicine, University of Pennsylvania.
63. **Perlmann, T., and L. Jansson** 1995. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1 *Genes Dev.* **9**:769-82.
64. **Philips, A., S. Lesage, R. Gingras, M. H. Maira, Y. Gauthier, P. Hugo, and J. Drouin** 1997. Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells *Mol Cell Biol.* **17**:5946-51.
65. **Philips, A., M. Maira, A. Mullick, M. Chamberland, S. Lesage, P. Hugo, and J. Drouin** 1997. Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription *Mol Cell Biol.* **17**:5952-9.

66. **Rhodes, S. J., R. Chen, G. E. DiMattia, K. M. Scully, K. A. Kalla, S. C. Lin, V. C. Yu, and M. G. Rosenfeld** 1993. A tissue-specific enhancer confers Pit-1-dependent morphogen inducibility and autoregulation on the pit-1 gene *Genes Dev.* **7**:913-32.
67. **Schaeren-Wiemers, N., E. Andre, J. P. Kapfhammer, and M. Becker-Andre** 1997. The expression pattern of the orphan nuclear receptor RORbeta in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm *Eur J Neurosci.* **9**:2687-701.
68. **Schaufele, F.** 1996. CCAAT/enhancer-binding protein alpha activation of the rat growth hormone promoter in pituitary progenitor GHFT1-5 cells *J Biol Chem.* **271**:21484-9.
69. **Schaufele, F., B. L. West, and J. D. Baxter** 1992. Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor *Mol Endocrinol.* **6**:656-65.
70. **Schrader, M., C. Danielsson, I. Wiesenberg, and C. Carlberg** 1996. Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. They also bind COUP-TF homodimers *J Biol Chem.* **271**:19732-6.
71. **Shigeta, H., R. R. Newbold, J. A. McLachlan, and C. Teng** 1996. Estrogenic effect on the expression of estrogen receptor, COUP-TF, and lactoferrin mRNA in developing mouse tissues *Mol Reprod Dev.* **45**:21-30.
72. **Simmons, D. M., J. W. Voss, H. A. Ingraham, J. M. Holloway, R. S. Broide, M. G. Rosenfeld, and L. W. Swanson** 1990. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors *Genes Dev.* **4**:695-711.
73. **Smith, M. A., S. Y. Kim, H. J. van Oers, and S. Levine** 1997. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain *Endocrinology.* **138**:4622-8.
74. **Szeto, D. P., A. K. Ryan, S. M. O'Connell, and M. G. Rosenfeld** 1996. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:7706-10.

75. **Tran, P., X. K. Zhang, G. Salbert, T. Hermann, J. M. Lehmann, and M. Pfahl** 1992. COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways *Mol Cell Biol.* **12**:4666-76.
76. **Tsai, S. Y., and M. J. Tsai** 1997. Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age *Endocr Rev.* **18**:229-40.
77. **Voss, J. W., L. Wilson, and M. G. Rosenfeld** 1991. POU-domain proteins Pit-1 and Oct-1 interact to form a heteromeric complex and can cooperate to induce expression of the prolactin promoter *Genes Dev.* **5**:1309-20.
78. **Waterman, M. L., S. Adler, C. Nelson, G. L. Greene, R. M. Evans, and M. G. Rosenfeld** 1988. A single domain of the estrogen receptor confers deoxyribonucleic acid binding and transcriptional activation of the rat prolactin gene *Mol Endocrinol.* **2**:14-21.
79. **Watson, M. A., and J. Milbrandt** 1989. The NGFI-B gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily: genomic structure and expression in rat brain after seizure induction *Mol Cell Biol.* **9**:4213-9.
80. **Wilson, T. E., T. J. Fahrner, and J. Milbrandt** 1993. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction *Mol Cell Biol.* **13**:5794-804.
81. **Wu, Q., Y. Li, R. Liu, A. Agadir, M. O. Lee, Y. Liu, and X. Zhang** 1997. Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization *Embo J.* **16**:1656-69.
82. **Zanaria, E., F. Muscatelli, B. Bardoni, T. M. Strom, S. Guioli, W. Guo, E. Lalli, C. Moser, A. P. Walker, E. R. McCabe, T. Meitinger, A. P. Monaco, P. Sassone-Corsi, and G. Camerino** 1994. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita *Nature.* **372**:635-41.
83. **Zazopoulos, E., E. Lalli, D. M. Stocco, and P. Sassone-Corsi** 1997. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis *Nature.* **390**:311-5.
84. **Zeitoun, K., K. Takayama, M. D. Michael, and S. E. Bulun** 1999. Stimulation of aromatase P450 promoter (II) activity in endometriosis and its inhibition in

endometrium are regulated by competitive binding of steroidogenic factor-1 and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor to the same cis-acting element *Mol Endocrinol.* **13**:239-53.

85. **Zetterstrom, R. H., L. Solomin, L. Jansson, B. J. Hoffer, L. Olson, and T. Perlmann** 1997. Dopamine neuron agenesis in *Nurr1*-deficient mice [see comments] *Science.* **276**:248-50.

Figure 1

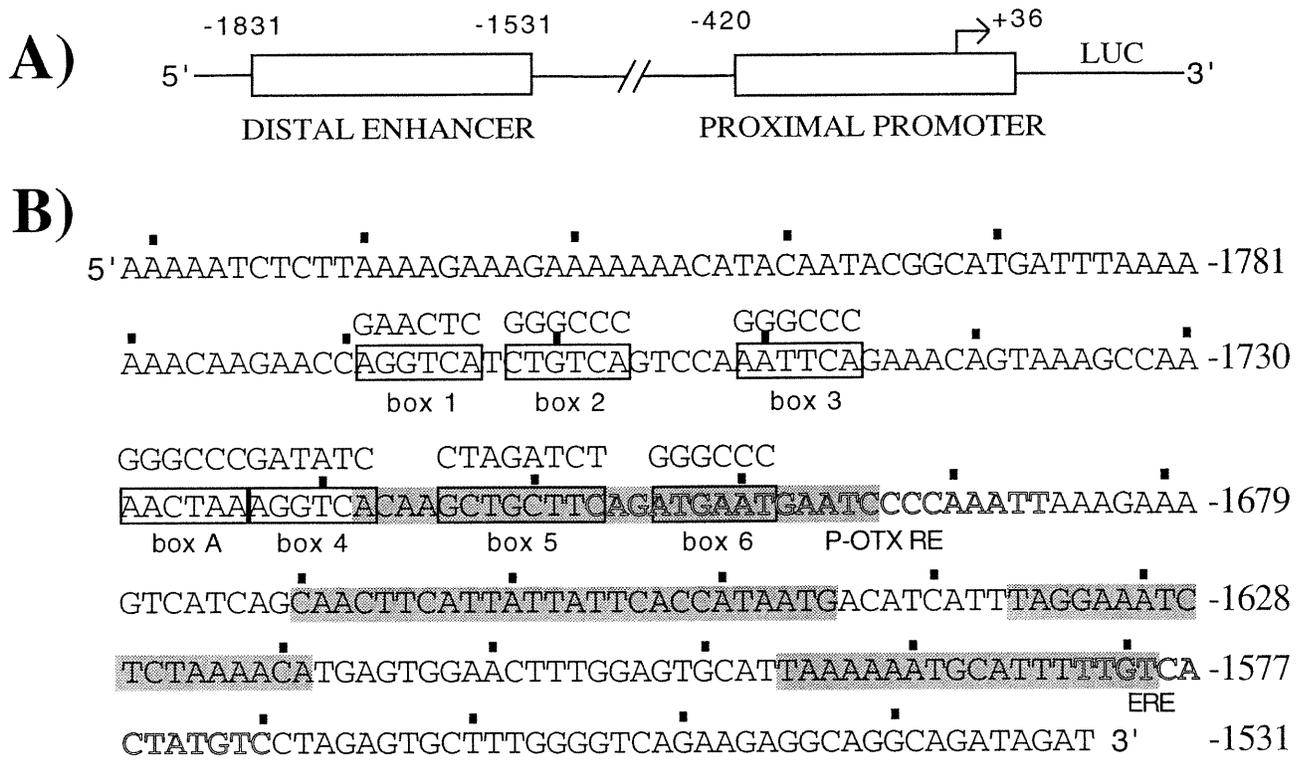


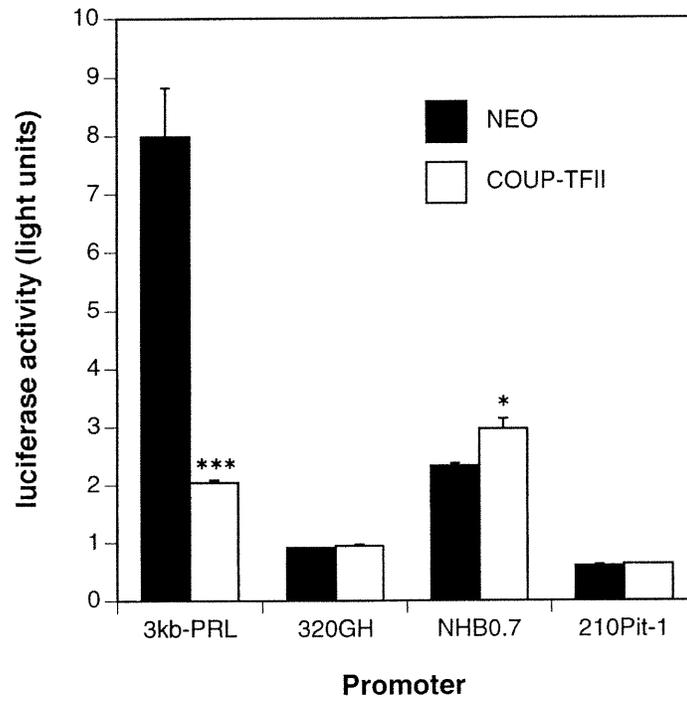
FIGURE 2

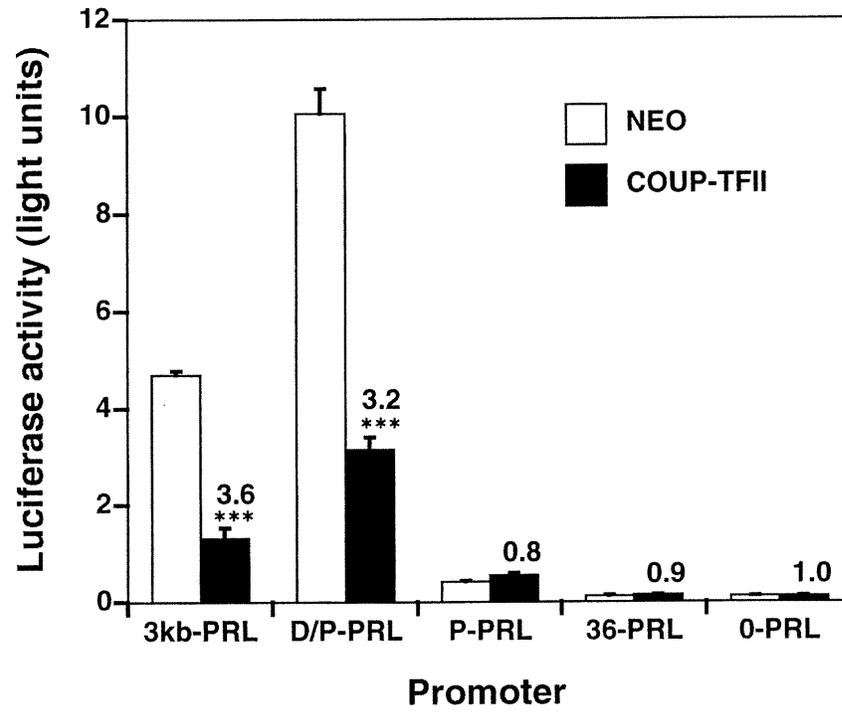
FIGURE 3

FIGURE 4

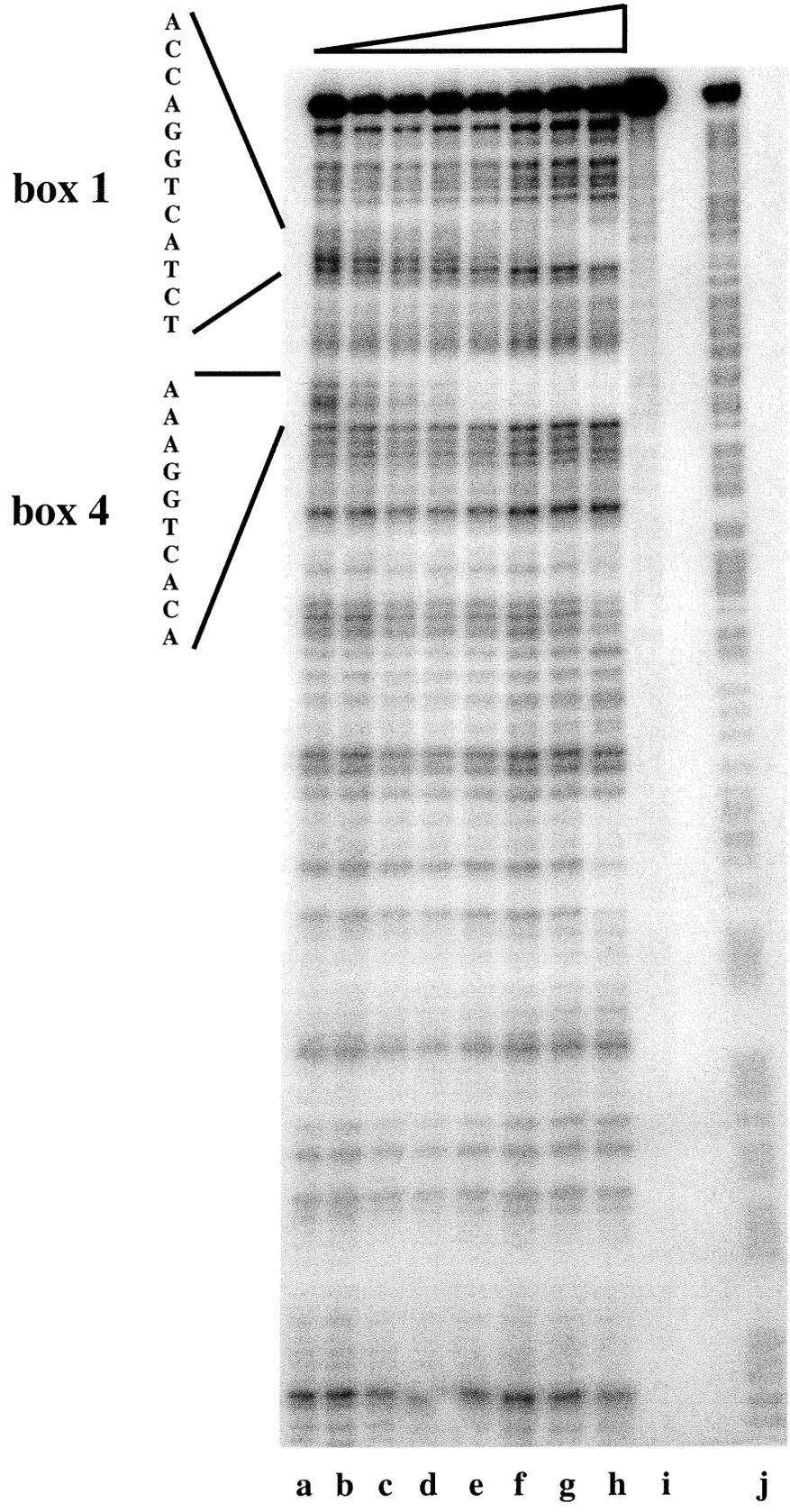


FIGURE 5

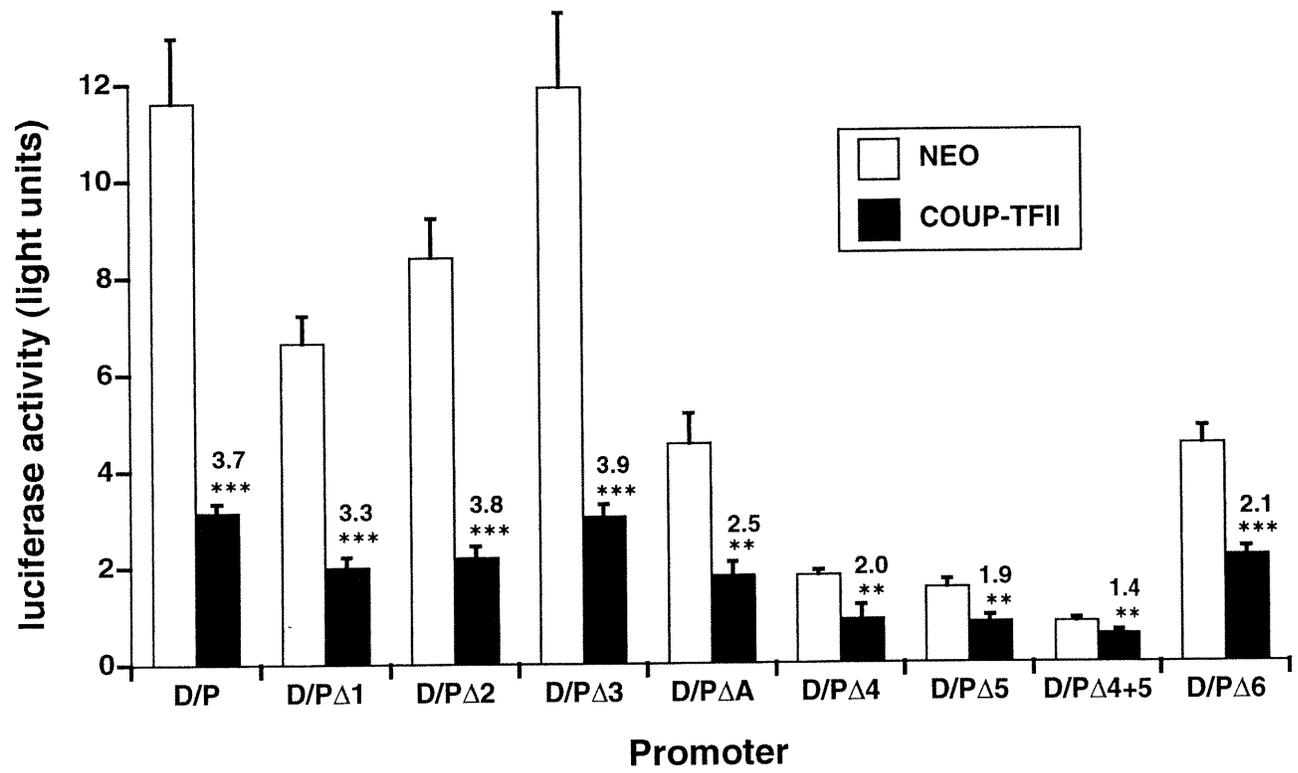


FIGURE 6

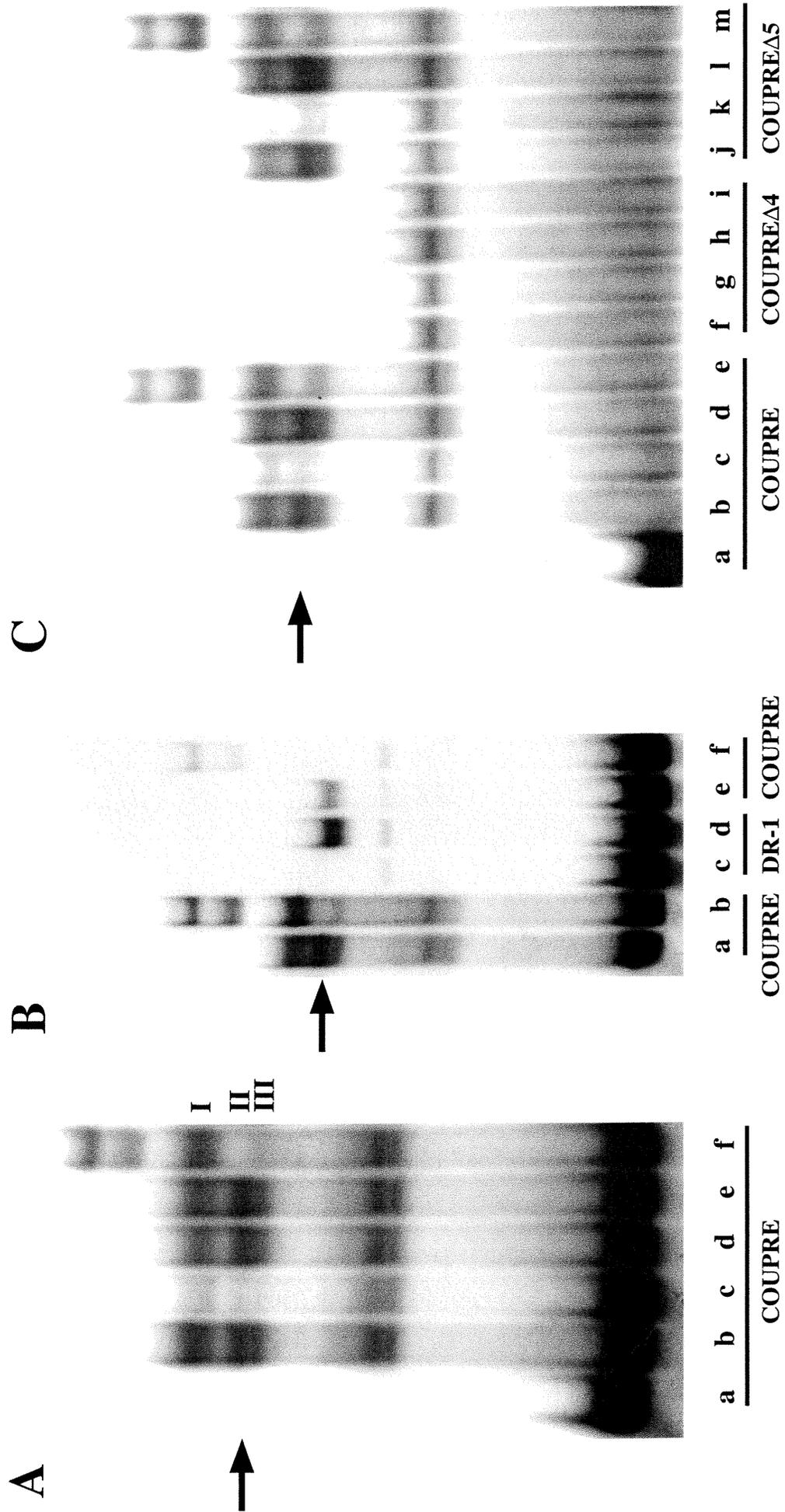


FIGURE 7

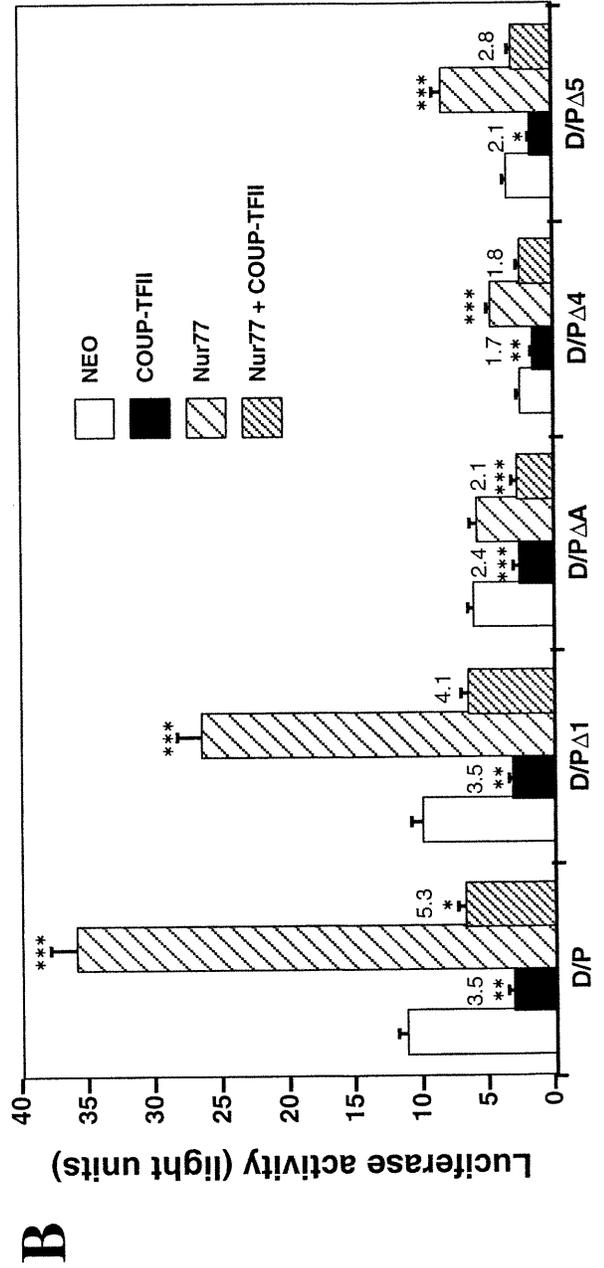
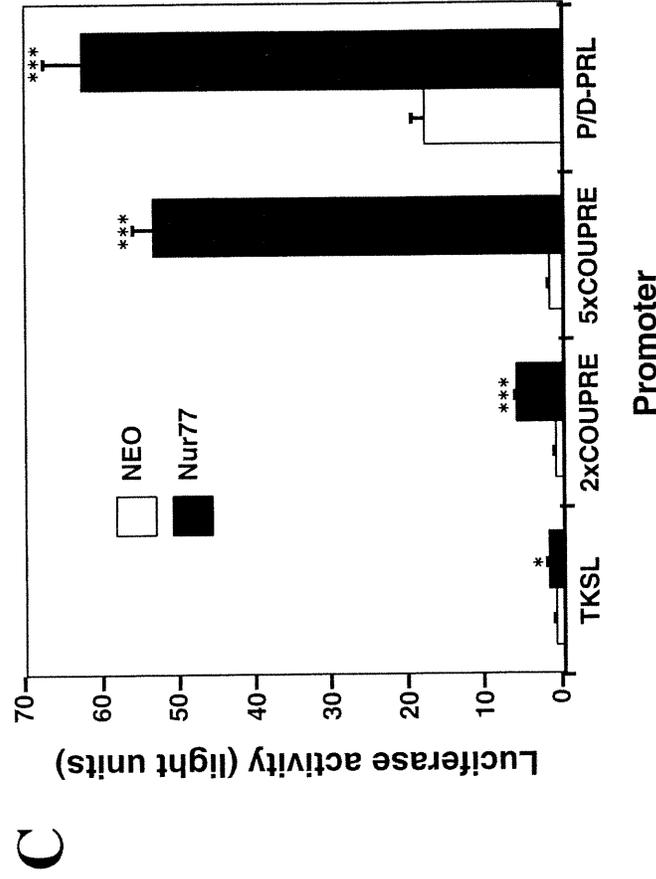
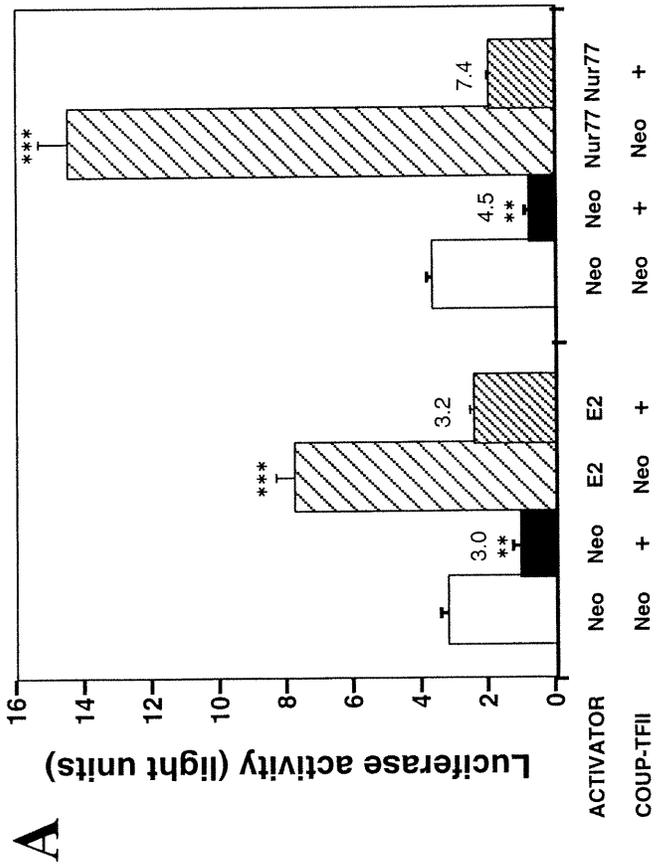
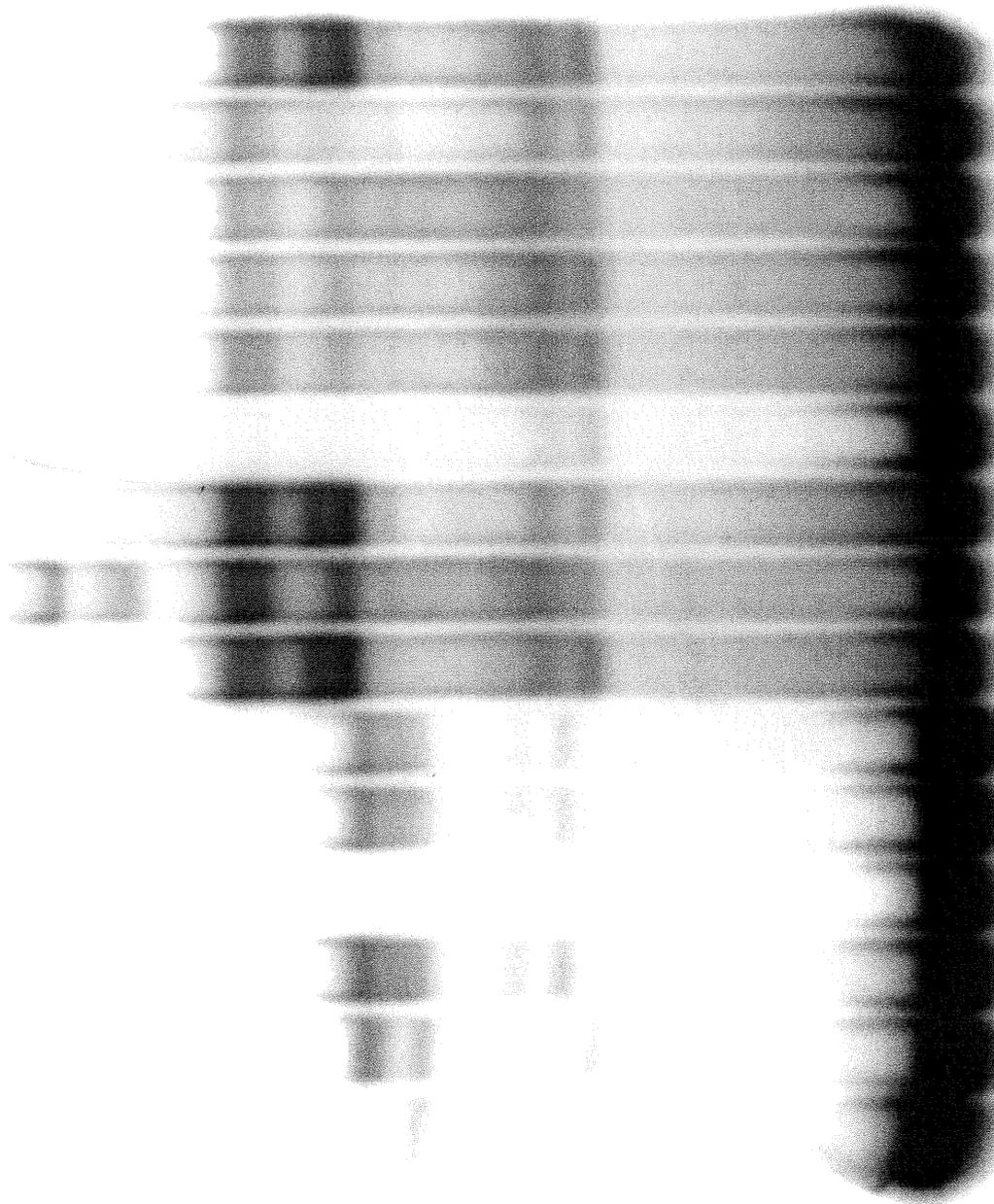


FIGURE 8



a b c d e f g h i j k l m n o

FIGURE 9

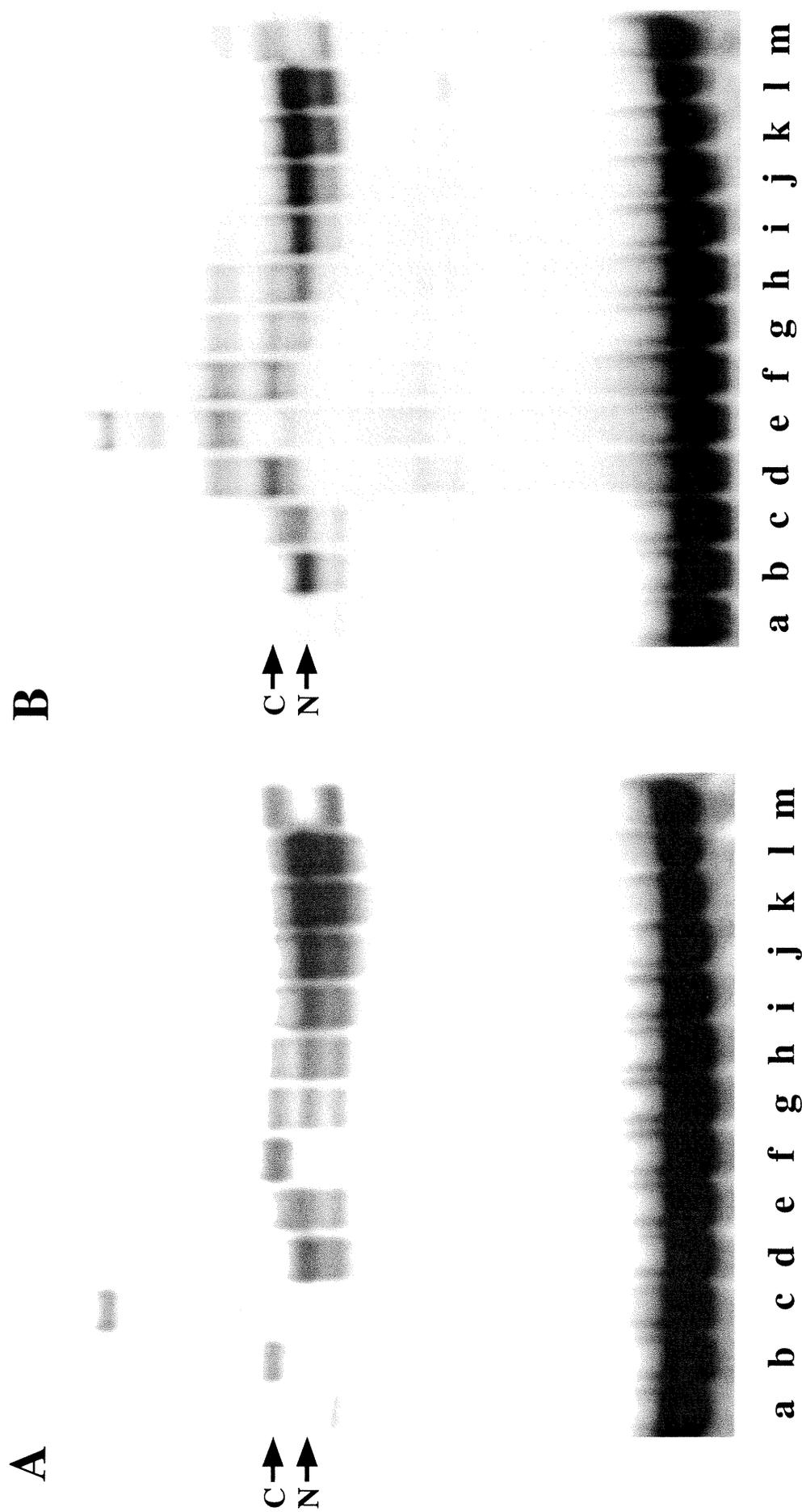
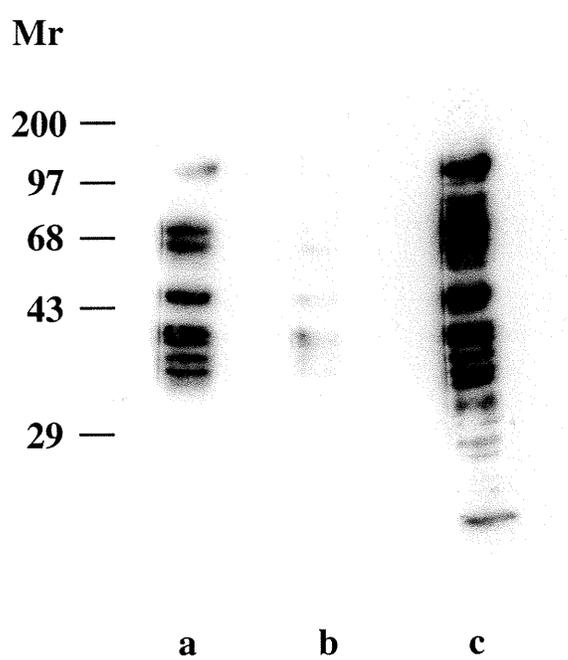


FIGURE 10

CHAPITRE 7

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

7.1) Autorégulation du gène de la PRL de rat au niveau de la transcription:

Contrairement aux autres hormones de l'antérophypophyse dont la sécrétion est provoquée par la présence de facteurs de relâche hypothalamiques qui leurs sont spécifiques, les fonctions lactotropiques sont régulées négativement par la dopamine. Par un mécanisme d'autorégulation, les hormones hypophysaires circulantes modulent les sécrétions de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les sécrétions lactotropes n'échappent pas à cette boucle de régulation où la PRL exerce, sur les noyaux dopaminergiques, une stimulation de leur activité. L'action directe de la PRL sur la fonction lactotropique reste un sujet de vives polémiques. Pourtant, plusieurs indices convergent en ce sens: concentration de PRL très élevée dans le système porte (396), et présence de récepteurs de la PRL à la surface des lactotropes (397, 398).

La détermination d'un effet régulateur de la PRL sur sa propre sécrétion et sa synthèse reste une démonstration particulièrement astreignante et une source de résultats contradictoires. En effet, il faut comprendre qu'il n'est pas évident d'établir des conditions expérimentales adéquates *in vitro* afin d'observer quelconques effets d'une hormone exogène présentée à des cellules lactotropes qui peuvent larguer de grandes quantités d'hormone dans le milieu de culture. Malgré quelques échecs (399-401), plusieurs équipes ont réussi à démontrer une telle boucle de régulation négative, aux niveaux des lactotropes, dans des modèles d'organes isolés et retransplantés, de lignées hypophysaires primaires et établies (402-408). Des études montraient, dans certains cas, une action inhibitrice de la PRL sur sa sécrétion sans affecter, toutefois, sa synthèse résultant en une accumulation intracellulaire de l'hormone (402, 403, 406). Un autre cas montrait, plutôt, que la PRL réprimait sa sécrétion et favorisait sa recaptation (407). De toutes ces études, aucune ne documentait l'autorégulation de la PRL sur la transcription de son propre gène. C'est dans cette optique que s'inscrivent les travaux présentés au chapitre cinq.

Pour parvenir à cette fin, la sélection d'un modèle physiologique *in vitro* était cruciale. La lignée cellulaire GC s'imposait pour plusieurs raisons: lignée très bien caractérisée, facile à transfecter, reproductibilité dans les réponses, présence apparente des

facteurs de transcription nécessaires à l'expression du gène de la PRL sans, toutefois, l'embarrassante expression de PRL endogène (385). Cependant, ces cellules n'expriment pas le récepteur de la PRL (PRLR) et il nous fallait, donc, rajouter un vecteur d'expression de PRLR au moment de la transfection. Les récepteurs, ainsi exprimés, étaient parfaitement fonctionnels car des concentrations physiologiques de PRL stimulaient l'expression du promoteur de la β caséine. L'ennui avec un tel système, où l'on force l'expression de récepteurs à la surface des cellules, est la sur-expression de ceux-ci, conduisant à des observations artéfactuelles. Cependant, il est très peu probable qu'il y ait eu sur-expression du PRLR, sur les cellules GC transfectées, puisque aucune technique de détection des récepteurs n'était suffisamment sensible pour en quantifier l'expression. Seul le RT-PCR semi-quantitatif nous permettait de confirmer l'expression ainsi que la nature des récepteurs ainsi exprimés. La présence des messagers n'est pas toujours le reflet exact de l'expression de la protéine qu'ils codent. Malgré de très nombreuses tentatives avec tous les anticorps anti-PRLR susceptibles de reconnaître ce récepteur, il nous a fallu, donc, nous rabattre sur un système hétérologue afin d'évaluer l'expression relative, en protéine, des deux récepteurs. Cependant, l'absence de réponse dans les transfections contrôles, RSV-NEO, ainsi que l'allure des courbes doses-réponses indiquent bien que les effets observés sont le résultat de l'expression des PRLR et non le fruit d'un artéfact de transfection. Nous avons tenté d'établir des lignées stables du PRLR dans les cellules GC mais sans grands succès.

Nous avons pu démontrer, avec ce modèle, que la PRL réprimait la transcription du gène de la PRL de rat. Cette répression est tissu et gène-spécifique. Fait surprenant, la répression observée était toujours plus importante avec le récepteur intermédiaire Nb2 qu'avec la forme longue et, cela, même à forte concentration de PRL utilisée. L'analyse de l'expression des deux formes de PRLR, dans les cellules COS-7, suggère que la forme intermédiaire s'exprime mieux que la forme longue. C'est pour cette raison que la forme Nb2 a surtout été utilisée dans nos expériences. Aucune étude d'immunohistochimie ou de RT-PCR n'a été conçue pour détecter une forme intermédiaire du récepteur, dans l'hypophyse (343, 344, 409). Des tentatives personnelles visant l'isolation de telles formes, dans l'hypophyse de rat, n'ont donné aucun résultat probant (résultats non présentés). L'isolation récente d'une forme intermédiaire humaine, présente dans certains

cancers du sein ainsi que dans le tractus gastro-intestinal, et dont la structure s'approche beaucoup de la forme Nb2 de rat (338, 339, 410), ouvre de nouvelles possibilités pour la découverte d'un tel récepteur dans l'hypophyse.

Nous avons utilisé la PRL ovine afin de réprimer l'activité du gène de la PRL de rat. Afin de donner plus de poids aux conclusions tirées des expériences avec les GC, nous voulions reproduire les mêmes résultats avec une lignée sécrétant la PRL, les GH3. Melmed *et al.* avait déjà montré que la PRL ovine inhibait la sécrétion des GH3 (403). Cette dernière lignée a également été utilisée par le Dr Ameae Walker afin d'étudier l'activité autocrine de la PRL (411). L'isoforme 2, qui apparaît être la seule forme de PRL de 24 Kda sécrétée par les GH3, n'exerçait pas d'activité autorégulatrice. La même équipe a remarqué que l'isoforme 3 exogène, ajoutée au milieu de culture des GH3, provoquait une inhibition de la sécrétion de la PRL (411). Pour sa part, l'isoforme 2 serait un facteur de croissance autocrine pour les GH3 (384). Il semble donc que ces isoformes de la PRL de rat ont des fonctions distinctes.

Contrairement aux observations du Dr Walker, l'ajout d'un anticorps anti-PRL de rat, dans le milieu de culture, déréprimait l'activité du promoteur du gène de la PRL dans les GH3 *in vitro*; cet effet de l'anticorps est renversé par la PRL ovine. Nous n'avons pas analysé les isoformes produites et sécrétées par nos GH3. La contradiction des observations nous porte à penser que l'expression de certaines isoformes de la PRL varie selon les conditions de culture des cellules sécrétrices. D'ailleurs, le statut hypophysaire des isoformes de 24 KDa de la PRL, varie selon l'état physiologique de l'animal (412). Il serait donc intéressant de tester, dans notre modèle, toutes les isoformes connues de PRL sur l'activité de son propre gène.

Nos travaux sur l'autorégulation du gène de la PRL de rat, au niveau transcriptionnel, constituent un précédent. Cependant, certaines observations publiées, provenant du laboratoire du Dr Stephen Frawley, étaient des indices sérieux qui appuyaient fortement nos résultats (392). En effet, l'activité du promoteur dans une seule cellule lactotrope chutait uniquement lorsque cette cellule était accompagnée d'une autre cellule lactotrope. Le facteur responsable n'avait pas été défini mais la PRL pouvait être

un prospect à considérer.

Nous avons défini, à l'aide de mutants de délétion, que les deux régions régulatrices, proximales et distales, sont impliquées dans cette autorégulation. Des mutations plus fines du promoteur permettront d'isoler le ou les éléments *cis* responsables de l'autorégulation. Des sondes d'ADN de ces éléments seront utilisées en EMSA. La mise au point des conditions expérimentales de liaison entre les protéines et les éléments de réponse permettra d'isoler les facteurs *trans*, par clonage, à partir d'une librairie d'expression de cellules lactotropes. Il serait peu probable que Pit-1 soit l'un de ces facteurs puisqu'il ne peut médier l'autorégulation dans les lignées cellulaires contrôles. Cependant, on ne peut pas complètement rayer Pit-1 de la liste des candidats puisqu'il est crucial au maintien d'une expression optimale du gène de la PRL; Pit-1 pourrait être nécessaire, mais sûrement pas suffisant, afin de médier la répression du gène par la PRL.

La principale cascade de signalisation intracellulaire de la PRL est la voie JAK2/STAT-5 (voir chapitre un). Généralement, cette voie médie des signaux stimulant l'activité transcriptionnelle et non la répression de celle-ci. Cependant, dans les cellules Nb2, l'activité du gène de l'IRF-1 (Interferon Regulatory Factor-1) est réprimée par la sur-expression de STAT-5 (413). On pourrait imaginer que la PRL réprimerait l'activité de son propre gène en activant la voie JAK2/STAT-5. L'autorégulation pourrait, aussi, nécessiter la synthèse de nouvelles protéines comme dans le cas de l'inhibition, par la PRL, de l'expression de la 20 α -hydroxystéroïde déshydrogénase dans les cellules de la granulosa (414).

J'ai tenté de définir la voie de signalisation de l'autorégulation par une approche pharmacologique. Durant la période post-transfection, les cellules GC ont été incubées en présence d'une série exhaustive d'inhibiteurs sélectifs ciblant les enzymes impliquées dans la signalisation intracellulaire: AG490 (JAK-2), génisteine/herbémimycine (tyrosine kinases), 2-aminopurine (ser/thr kinases), acide okadaïque (ser/thr phosphatases type 1 et 2A), pervanadate (tyrosine phosphatase), CGP 41251 (PKC), PD 98059 (MEK-1), staurosporine (PKC+ser/thr kinases), H7 (ser/thr kinases), H89 (PKA), quercétine (tyrosine kinases+PKC), GF109 203X (PKC calcium-dépendante). Malgré l'essai de

plusieurs conditions expérimentales (durée du traitement, concentrations de l'inhibiteur, etc), toutes les drogues testées n'avaient aucun effet ou exerçaient des effets non-spécifiques (lorsqu'on les compare à un gène contrôle) sur l'activité basale et aucune n'arrivait à réprimer l'action de la PRL sur son propre gène (résultats non présentés).

L'approche pharmacologique est simple d'application mais comporte plusieurs limitations: manque de sélectivité, effets toxiques, mauvaise caractérisation de la drogue. La co-transfection de versions dominantes négatives des molécules médiatrices de la signalisation intracellulaire (JAK-2, PKC, PKA, STAT-5 entre autre) aurait été une approche plus laborieuse mais, en retour, plus performante et sélective.

Tous ces travaux reposent sur l'idée que la régulation transcriptionnelle tient un rôle prépondérant dans l'homéostasie prolactinémique. On s'accorde pour dire que la régulation transcriptionnelle est une étape clef dans l'expression des gènes. En est-il vraiment de même pour le gène de la PRL s'exprimant dans les lactotrope? Un article publié par l'équipe du Dr Frawley vient brouiller les cartes (415). Les auteurs de l'article en question ont évalué trois paramètres sur une même cellule lactotrope: l'activité transcriptionnelle, mesurée à l'aide d'une construction de type "promoteur de la PRL-luciférase" qui était microinjectée dans la cellule, l'emmagasiner du messenger de la PRL dosé par hybridation *in situ* ainsi que le taux de sécrétion de l'hormone évalué par RHPA (Reverse Hemolytic Plaque Assay). L'analyse de ces trois paramètres, sur un large échantillon de cellules lactotropes, n'établit aucune relation entre l'activité transcriptionnelle du gène, l'emmagasiner des transcripts ainsi que la sécrétion de la PRL. Cette discordance apparente nous porte à penser que la transcription, même si elle est au début de la chaîne de l'expression de l'hormone, n'est qu'une étape de l'expression, parmi tant d'autres, et sa régulation n'a peut-être pas l'impact escompté sur le niveau d'expression de la PRL.

On ne peut que reconnaître l'élégance de l'approche expérimentale utilisée (mesure de l'activité luciférase en temps réel) mais ces observations ne représentent qu'un cas isolé. De plus, la validation du schéma expérimental comporte de nombreuses faiblesses comme, par exemple, l'impact possible sur l'expression de l'hormone d'une compétition

des facteurs de transcription, comme Pit-1, entre le gène endogène présent en une seule copie par cellule et le promoteur exogène micro-injecté en plusieurs copies et en quantité variable d'une injection à l'autre. On admet que les cellules lactotropes sont hétérogènes, par nature, mais il serait étonnant que la glande hypophysaire soit constituée de cellules aux activités totalement désordonnées.

Une caractéristique qui différencie la lignée GH (dont fait partie les GC et les GH3) et les cellules hypophysaires isolées (modèle utilisé par Frawley) concerne l'emmagasinage de la PRL. En effet, contrairement aux cellules isolées, les GH3 contiennent très peu de PRL intracellulaire (357). Cette dynamique pourrait fausser les données sur l'activité transcriptionnelle du gène de la PRL obtenues dans cette lignée. Cependant, le nombre important de facteurs et d'éléments de réponse influençant la transcription du gène de la PRL de rat, suggère fortement que la transcription tient un rôle très important dans la régulation de l'expression de l'hormone.

De façon plus général, quels rôles physiologiques tient l'autorégulation de la PRL au niveau des lactotropes? D'abord, la PRL est un facteur de croissance des lactotropes (384). Ainsi, une action locale de l'hormone pourrait contenir la division cellulaire des lactotropes, en réprimant sa propre expression dans ses cellules cibles, afin d'éviter un emballement prolifératif. De plus, cette action autocrine/paracrine pourrait servir de système redondant qui, en parallèle avec la dopamine hypothalamique, permettrait une modulation optimale de l'expression de la PRL; cette hypothèse est appuyée par les travaux de Stephen Frawley qui a montré que la PRL et la dopamine réprimaient la sécrétion de la même sous-population de cellules lactotropes *in vitro* (407).

L'autorégulation directement au niveau des lactotropes pourrait jouer un rôle non négligeable dans le contrôle de la prolactinémie. En effet, la répression de la transcription du gène de la PRL, observée dans notre modèle, se produit à des concentrations plasmatiques normalement retrouvées chez le rat (10 à 100 ng/ml). Cette boucle de régulation, en parallèle avec la boucle courte dopaminergique, permettrait une régulation optimale de la prolactinémie.

J'ai souligné, plus haut, l'importance du récepteur de la PRL dans l'autorégulation au niveau des lactotropes. Les souris KO du PRLR (14) pourraient, donc, être un modèle expérimental très utile pour évaluer l'importance physiologique de l'autorégulation. Entre autre, il serait intéressant de comparer les taux de PRL plasmatiques et hypophysaires chez les souris WT et homozygotes traitées ou non avec des antagonistes dopaminergiques (halopéridol, dompéridone) afin de soustraire l'influence des neurones TIDA sur la sécrétion des lactotropes. L'effet de ces traitements sur l'activité transcriptionnelle du gène de la PRL pourrait être évalué, par des expériences de "run on", sur des noyaux de cellules isolées des différentes souris.

En conclusion, le manuscrit présenté au chapitre cinq montre les premières évidences expérimentales de l'autorégulation de la PRL, sur son propre gène, dans les lactotropes *in vitro*. Ces nouvelles données s'inscrivent parfaitement dans le contexte d'expériences suggérant une régulation par la PRL de sa production et sa sécrétion directement au niveau hypophysaire. Une meilleure compréhension des mécanismes voués à la régulation de l'expression et de la sécrétion de la PRL, tant dans l'hypophyse que dans d'autres tissus, nous permettra d'en apprendre beaucoup plus sur cette hormone.

7.2) COUP-TFII est un régulateur puissant de la transcription du gène de la PRL de rat dans les lactotropes:

Le manuscrit présenté au chapitre 6 suggère fortement que COUP-TFII est un modulateur puissant de la transcription du gène de la PRL de rat. Cette action répressive de COUP-TFII s'exerce sur une courte séquence de l'enhancer, séquence elle-même responsable de la majeure partie de l'activité basale. Des résultats préliminaires montrent que la mutation de la boîte 4, de la boîte 5 ou la mutation combinée des deux n'a aucun effet sur l'activité basale du gène dans la lignée non-hypophysaire HepG2 (résultats non présentés). Ces observations suggèrent que l'élément-*cis* (COUPRE) est spécifiquement activé dans les somatomammotropes.

Deux données appuient l'importance de cet élément-*cis*. Premièrement, cet

élément, situé entre -1730 à -1706, trouve son équivalent entre les nucléotides -1353 à -1329 du promoteur du gène de la PRL humaine avec plus de 90% d'homologie (244). Une telle conservation laisse peu de doute sur l'importance de cet élément d'ADN dans la régulation de l'activité du promoteur du gène de la PRL mais cette homologie laisse également suggérer que le ou les mécanismes moléculaires qui animent cette séquence sont conservés. L'autre donnée vient du résultat surprenant obtenu par l'analyse des extraits nucléaires de cellules GC par South-Western (voir la figure 10). Le nombre important de protéines qui s'associent à cet élément-*cis* de façon spécifique, suggère que cette séquence est un carrefour important d'évènements moléculaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène de la PRL. Les conditions expérimentales qui ont permis d'obtenir ces résultats peuvent être appliquées intégralement au clonage de ces protéines à partir d'une banque d'expression appropriée. La nature de ces protéines ainsi révélée pourra nous en dire plus sur le rôle et le fonctionnement de cet élément-*cis* dans la régulation du gène de la PRL. En effet, leur surexpression dans les cellules GC, mais également dans des systèmes hétérologues, pourrait influencer l'activité du promoteur positivement ou négativement. À l'instar du facteur NGFI-B, l'activité de certaines de ces protéines pourrait être antagonisée par COUP-TFII lorsque que co-exprimées dans la cellule. De plus, la co-expression de ces facteurs permettra de savoir s'ils agissent seuls ou en synergie. Cette synergie d'action pourrait être le résultat d'interactions moléculaires entre les facteurs. Ces interactions pourraient être étudiées en utilisant la technologie du double hybride chez la levure. De la même manière, il sera possible de vérifier si COUP-TFII et NGFI-B interagissent avec ces mêmes facteurs. Enfin, rappelons que l'élément-*cis* chevauche largement l'élément Pit-1 4D et il ne serait, donc, pas étonnant que le facteur POU hétérodimérise avec certaines de ces protéines.

D'après les données obtenues par EMSA, il est clair que l'élément-*cis* n'est pas le site d'action d'un seul complexe de facteurs de transcription car trois complexes ADN-protéines retardent la migration de la sonde marquée. Ces complexes pourront être caractérisés à l'aide d'anticorps spécifiquement développés contre chacune des protéines clonées. De plus, la comparaison du retard sur gel de la sonde entre les complexes obtenus soit à partir d'extraits nucléaires, de protéines recombinantes ou obtenues par transcription/traduction *in vitro* permettra de confirmer les résultats de super-shift. Afin

de compléter le tableau, des études de footprinting et de protection au diméthylsulfoxyde (DMS) permettront de circonscrire avec plus de précision les sites de liaison des protéines sur l'ADN.

Jusqu'à maintenant, nous n'avons discuté que des protéines associées à la boîte 4 de l'élément-*cis* car les complexes obtenus en EMSA ne lient pas la sonde dont la boîte 4 est mutée. Rappelons que le fragment d'ADN isolé comprend, en plus du demi-site ERE (boîte 4), une séquence riche en adénine et en thymidine (boîte A) ainsi qu'une séquence de 8 pb (boîte 5) située entre la boîte 4 et la boîte 6 (Pit 4D). Les résultats de transfection indiquent clairement que la boîte A est essentielle pour l'action de NGFI-B (voir la figure 7B). Pour sa part, la boîte 5 reste mystérieuse car, malgré l'absence apparente de liaison de protéines en EMSA, la mutation de cette boîte exerce un impact important sur l'activité du promoteur (voir figures 5 et figure 6C). L'hypothèse la plus vraisemblable serait que les facteurs liant la boîte 5 aient besoin de séquences en aval, afin de stabiliser leur liaison à l'ADN. Rappelons que ces séquences ne sont pas incluses dans la sonde utilisée en EMSA. Les nucléotides couvrant la boîte 6 pourraient très bien faire l'affaire puisque, d'une part, les deux boîtes sont juxtaposées et, d'autre part, COUP-TFII exerce une répression équivalente sur les deux structures suggérant que les facteurs liant les deux boîtes forment un complexe (voir figure 5). Cependant, la boîte 5 semble être un site de régulation de la transcription plus important que la boîte 6 (voir la figure 5, comparez les activités basales des mutants 5 et 6). La comparaison de l'activité basale des mutants déjà existants à celle d'un double mutant des boîtes 5 et 6, en transfection transitoire, permettrait de révéler l'existence d'interactions entre ces deux boîtes. L'analyse des facteurs-*trans* associés à ces deux boîtes passe par l'utilisation d'une sonde couvrant cette région du gène lors d'études d'EMSA. Compte tenu que l'activité basale des mutants des boîtes 5 et 6 ne sont pas équivalentes, il est donc peu probable que cette région de l'enhancer soit occupée uniquement par le facteur Pit-1 comme le laisse suggérer les études de footprinting publiées par l'équipe de Rosenfeld et illustrées dans la figure 1 du chapitre 6 (194).

Les données actuelles sont insuffisantes afin d'établir un modèle précis et complet des interactions qui existent entre les différents éléments de réponse de l'élément-*cis* et des

facteurs-*trans* qui s'y associent ainsi que des mécanismes par lesquels COUP-TFII exerce ses effets. Cependant, l'ensemble des résultats recueillis nous amènent à suggérer que COUP-TFII, en se fixant à la boîte 4, dissocie à la fois NGFI-B de sa liaison à la boîte A, les facteurs associés à la boîte 4 (incluant NGFI-B) ainsi que d'autres facteurs (incluant ou non Pit-1) de leur liaison aux boîtes 5 et 6. Ce modèle simple n'est, cependant, pas le seul scénario que l'on puisse imaginer afin d'illustrer l'action répressive de COUP-TFII sur l'élément-*cis*.

En effet, comme nous l'avons vu au chapitre 4, l'interférence que peut exercer COUP-TFII sur la liaison d'un récepteur nucléaire sur un élément de réponse commun n'est qu'un des mécanismes connus pouvant expliquer l'action inhibitrice du récepteur. COUP-TFII peut également entrer en compétition pour la liaison d'un facteur commun (récepteur RXR) avec un récepteur nucléaire activateur, il peut aussi inhiber la transcription par des mécanismes de répression active (dépendant de la liaison de COUP-TFII à l'ADN) et de transrépression (indépendant de sa liaison à l'ADN). Quelques expériences simples pourraient nous aider à définir lequel ou lesquels de ces mécanismes sont impliqués.

Le partage pour la liaison avec RXR peut être abordé de deux façons. D'une part, l'utilisation d'un anticorps anti-RXR, dans des expériences de EMSA, pourrait nous dire si le complexe B (voir la figure 6A du chapitre 6) est formé d'un hétérodimère COUP-TFII-RXR. D'autre part, si RXR contribue à l'activité basale au site de l'élément-*cis*, sa surexpression en transfection transitoire, dans les cellules GC, devrait stimuler l'expression du gène rapporteur.

C'est par une approche de mutagenèse, au niveau de la partie C-terminale de COUP-TFII, que les mécanismes de répression active et de transrépression pourront être discriminés. En effet, les travaux de Paulweber *et coll.* sur la cartographie des domaines de répression active et de transrépression de COUP-TFII ont montré que les acides aminés couvrant le DBD et les résidus 193 à 399 représentaient le domaine de transrépression tandis que les résidus 210 à 414 délimitaient le domaine de répression active (326). Un mutant de COUP-TFII dont les 15 derniers acides aminés de la partie C-terminale (résidus

400 à 414) auront été retranchés, perdra sa fonction de répression active sans pour autant affecter sa fonction de transrépression. L'utilisation d'un tel mutant, en transfection transitoire, permettra de trancher entre les deux mécanismes. Il est bien possible que COUP-TFII utilise plus qu'un type de mécanisme d'inhibition. Peu importe le modèle qui sera retenu, il est clair que COUP-TFII joue un rôle-clef dans l'organisation fonctionnelle et structurale de l'élément-*cis*.

Les hypothèses formulées plus haut, sur l'action répressive de COUP-TFII, sont basées sur des résultats de transfections transitoires, d'études de footprinting et d'EMSA. Une question se pose alors: COUP-TFII exerce-t-il réellement une répression sur l'activité transcriptionnelle du gène de la PRL dans les cellules somatomammotropes *in vivo*? L'analyse des ARNs, par Northern blot, provenant de lignées stables de cellules GH3 surexprimant COUP-TFII, ou son ADNc antisens, nous donnent un début de réponse (résultats non présentés). En effet, la surexpression de COUP-TFII inhibe tandis que la présence de l'antisens stimule l'expression du transcript endogène de la PRL comparativement aux cellules contrôles. L'action de COUP-TFII semble spécifique au gène de la PRL. Cependant, des mécanismes indépendants de la régulation transcriptionnelle, tels que ceux impliqués dans la stabilité du messager, pourraient expliquer les effets de COUP-TFII sur le transcript. Bien que ces résultats préliminaires soient importants, ils ne peuvent être présentés car ils demeurent incomplets.

D'après les travaux de Seyfred *et coll.*, détaillés au chapitre 3, une boucle chromatinienne permet au promoteur proximal et à l'enhancer distal d'être juxtaposés de manière à permettre l'action à longue distance d'élément de réponse situés dans l'enhancer comme celui de l'estrogène (138, 139). Donc, il serait intéressant de vérifier si l'action répressive de COUP-TFII, au niveau de l'élément-*cis*, entraîne une déstabilisation de cette boucle chromatinienne.

L'utilisation de quelques mutants de délétion des principaux domaines de COUP-TFII, en transfection transitoire, nous ont permis de découvrir que le récepteur nucléaire pouvait également stimuler la transcription (résultats non présentés). Rappelons que les principaux domaines de COUP-TFII sont la partie N-terminale, le domaine de liaison à

l'ADN (DBD) et la partie C-terminale. Le récepteur sauvage comme celui dont le domaine N-terminal a été retranché, réprime la transcription. Cependant, lorsque la partie C-terminale seule est exprimée, on observe une stimulation significative de la transcription. Cette stimulation peut être reproduite lorsque de grandes quantités de vecteurs d'expression de COUP-TFII sauvage sont utilisées lors de la transfection des cellules GC (résultats non présentés). En effet, l'utilisation d'une quantité croissante de vecteurs d'expression de COUP-TFII mène, d'abord, à une répression qui est dépendante de la quantité de vecteur (0 à 2 µg) puis à une stimulation de l'activité basale à plus forte concentration d'ADN (10 µg). Cette stimulation de la transcription s'exerce au niveau du promoteur minimal (résultats non présentés). Ceci nous amène à penser que lorsque tous les sites de liaison sur l'élément-*cis* sont saturés, le surplus de COUP-TFII, se trouvant en solution, fixe les co-répresseurs et les empêche, du même coup, de réprimer la machinerie transcriptionnelle générale. L'analyse du niveau de messagers de la PRL, dans des lignées clonales de GH3 surexprimant fortement COUP-TFII, permettra de démontrer que cette stimulation n'est pas le fruit d'un artéfact de transfection transitoire. Afin d'aider à élucider les mécanismes d'action de COUP-TFII, la cartographie détaillée des domaines fonctionnels responsables des actions du récepteur nucléaire sur l'activité du gène de la PRL, sera nécessaire.

Le chapitre 6 présente un modèle basé sur l'équilibre entre l'expression d'un facteur stimulateur, Nurr77, et un facteur répresseur, COUP-TFII, afin d'expliquer une partie des activités associées à l'élément-*cis*. Afin de valider ce modèle, des études d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, sur des coupes d'hypophyse, seront nécessaires afin d'évaluer l'expression relative des deux récepteurs dans des conditions normales d'expression de l'hormone mais également dans des conditions d'hyperprolactinémie physiologique (grossesse, lactation) et pathologique (prolactinome). Si un tel équilibre module l'expression du gène de la PRL dans l'hypophyse, alors la découverte de ligands spécifiques pour COUP-TFII et NGFI-B pourra signifier le début d'une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement des hyperprolactinémies d'origine pathologique.

Cet équilibre entre COUP-TFII et NGFI-B est dépendant des facteurs qui

modulent leur expression. Tel que mentionné au chapitre 4, seuls les morphogènes Sonic Hedgehog et l'acide rétinoïque sont connus pour moduler l'expression de COUP-TFII. Par contre, les membres de la famille NGFI-B sont rapidement exprimés sous l'influence de plusieurs facteurs tels que le sérum, le PMA, l'AMP cyclique, le calcium, des facteurs de croissance comme l'EGF, le NGF et le bFGF, des hormones et des neurotransmetteurs (421). Certains des facteurs reconnus pour stimuler la synthèse de NGFI-B influencent également celle de la PRL dans les cellules lactotropes comme l'AMP cyclique, le calcium et l'EGF. Il serait intéressant de mesurer l'expression de NGFI-B et de la PRL dans la lignée GH3, stimulée par ces différents facteurs. Dans ce type d'expérience, il est à prévoir que la poussée de synthèse du récepteur nucléaire devrait précéder celle de la PRL et que la surexpression d'un NGFI-B dominant négatif devrait abolir l'accumulation de l'hormone. Au niveau de l'activité du promoteur, la mutation de la boîte A devrait abolir l'effet des facteurs exogènes sur l'expression du gène rapporteur, en transfection transitoire. Ces résultats représenteront les premières données détaillant les rôles physiologiques du récepteur NGFI-B dans les lactotropes.

Bien sûr, la place que tiennent COUP-TFII et NGFI-B dans l'homéostasie du système lactotrope pourra être définie par l'utilisation de modèles souris knock-out. Compte tenu de l'expression étendue des deux récepteurs ainsi que le manque de viabilité des souris COUP-TFII^{-/-} (253), une stratégie d'inactivation des gènes basée sur le système Cre/loxP serait plus appropriée (422). Cette technique permet l'inactivation du gène, par recombinaison homologue, spécifiquement dans le tissu où s'exprime la recombinaison Cre. La région 5' régulatrice du gène de la PRL pourrait être utilisée afin de cibler l'expression de la recombinaison dans les cellules lactotropes. De la même manière, les rôles possibles de COUP-TFII et NGFI-B dans l'ontogénie hypophysaire pourraient être étudiés à l'aide de modèles dont l'expression de la recombinaison serait induite par les promoteurs des gènes comme Pit-1, Prop-1 ou Lhx3.

Il serait également possible d'étudier l'activité de l'élément-*cis* à l'aide d'un modèle de souris transgéniques. Ces souris auront acquis, dans leur génome, un transgène constitué du promoteur du gène de la PRL fusionné au gène rapporteur β -galactosidase d'*E.coli*. C'est par cette même technique que l'équipe du Dr. Rosenfeld a pu étudier le

rôle des différentes régions régulatrices du gène de la PRL sur la spécificité d'expression tissulaire (188). L'expression du transgène sauvage pourrait être comparée à celle d'un autre dont l'élément-*cis* aurait été muté. Ce genre d'étude pourra nous indiquer si cet élément-*cis* participe à la restriction tissulaire de l'expression de la PRL au cours du développement et s'il est impliqué dans l'augmentation de l'expression de l'hormone durant la grossesse et la lactation et même dans les cas d'hyperprolactinémie pathologiques.

En conclusion, COUP-TFII est un puissant modulateur du promoteur du gène de la PRL de rat *in vitro* et probablement *in vivo*. Rappelons que COUP-TFII n'est qu'un des trois membres de la sous-famille COUP-TF. Il serait donc intéressant de vérifier l'action des autres membres de cette sous-famille sur la transcription du gène de la PRL. Des résultats préliminaires montrent que EAR-2 réprime l'activité du promoteur *in vitro* et *in vivo* (résultats non présentés). Cependant, lors d'expériences du type EMSA, aucun des complexes protéines-ADN provenant d'extraits nucléaires de cellules GC ont été reconnus par l'anticorps anti-EAR-2 (résultats non présentés). Des études de footprinting et de mutagenèse du promoteur nous permettront de connaître les sites d'action de EAR-2. Le même exercice pourrait être appliqué à COUP-TFI. Enfin, j'ai montré que le récepteur nucléaire orphelin NGFI-B stimule l'activité du promoteur du gène de la PRL *in vitro* et que son action est antagonisée par COUP-TFII. Rappelons que NGFI-B est l'un des membres de la famille des récepteurs NGFI-B dont fait également partie Nurr-1 et Nor-1. Ainsi, nous devons tenir compte de l'ensemble de la famille NGFI-B dans nos prochaines études.

7.3) Conclusion finale:

La PRL est une hormone aux multiples facettes dont la régulation de son expression, au niveau hypophysaire, est complexe et encore partiellement comprise. Dans ces pages, j'ai présenté trois nouveaux modulateurs puissants de l'activité transcriptionnelle du gène de la PRL de rat dans les lactotropes: la PRL elle-même agissant comme facteur autocrine/paracrine ainsi que les récepteurs nucléaires orphelins COUP-

TFII et NGFI-B. Plusieurs questions restent en suspend dont, peut-être, la plus importante est celle concernant la pertinence de ces modulateurs dans l'homéostasie du système lactotrope. Les prochains efforts devront être consacrés à répondre à cette question.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrinol Rev* 19: 225-68.
- 2) Stricker S, Grueter F. (1928) Action du lobe anterieur de l'hypophyse sur la montee laiteuse. *Compt Rend Soc Biol.* 99:1978-1980
- 3) Riddle O, Braucher PF. (1931) Studies on the physiology of reproduction in birds. Control of the special secretion of the crop-gland in pigeons by anterior pituitary hormone. *Am J Physiol* 97:617-627
- 4) Lewis UJ, Singh RNP, Seavey BK. (1971) Human prolactin: isolation and some properties. *Biochem Biophys Res Comm* 44:1169-76.
- 5) Hwang P, Guyda H, Friesen H. (1971) A radioimmunoassay for prolactin. *Proc Nat Acad Sci* 68:1902-06.
- 6) Shome B, Parlow AF. (1977) Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence. *J Clin Endocrinol metab*
- 7) Cooke NE, Coit D, Weiner RI, et al. (1980) Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. *J Biol Chem* 255:6502-10.
- 8) Cooke NE, Baxter JD (1982) Structural analysis of the prolactin gene suggests a separate origin for 5'-end. *Nature* 297:603-06.
- 9) Vorherr H. (1979) Hormonal and biochemical changes of pituitary and breast during pregnancy. *Semin Perinatol* 3:193-8.
- 10) Tucker HA. (1979) Endocrinology of lactation. *Semin Perinatol* 3: 199-223.

- 11) Nicoll CS. (1974) Physiological actions of prolactin. Dans: Knobil E, Sawyer WH (eds) Handbook of physiology. Section 7: Endocrinology. American Physiological Society, Washinton, DC, pp 253-292.
- 12) Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E and Dorshkind K. (1997) Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. EMBO J 15:6926-35.
- 13) Steger RW, Chandrashekar V, Bartke ZA, Horseman ND. (1998) Neuroendocrine and reproductive functions in male mice with targeted disruption of the prolactin gene. Endocrinology 139: 3691-95.
- 14) Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N and Kelly PA. (1997) Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. Genes and development 11:167-78.
- 15) Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. (1997) Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. Genes Dev 11: 179-86.
- 16) Neville MC, Daniel CW (eds) (1987) The mammary gland: development, regulation and function. Plenum Press, Ney York.
- 17) Oppat CA, Rillema JA. (1988) Characteristics of the early effect of prolactin on lactose biosynthesis in mouse mammary gland explants. Proc Soc Exp Biol Med 188: 342-45.
- 18) Waters SB, Rillema JA. (1988) Effect of prolactin on enzymes of lipid biosynthesis in mammary gland explants. Am J Physiol 255: E567-71.
- 19) Leroy-Martin B, Bouhdiba M, Saint Pol P, Peyrat JP. (1989) Effets périphériques de la

prolactine dans la fonction de la reproduction. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 18: 288-94.

20) Dorrington J, Gore-Langton RE. (1981) Prolactin inhibits estrogen synthesis in the ovary. *Nature* 290: 600-02.

21) Ota H, Wakizaka A, Fukushima M, Maki M. (1982) Dual regulation of rat ovarian LH-receptor by the administration of prolactin or sulpiride. *IRCS Med Sci* 10: 859-60.

22) Blackwell RE. (1992) Hyperprolactinemia: evaluation and management. *Endocrinol Metab Clin North Am* 21: 105-24.

23) Nag S, Sanyal S, Ghosh KK, Biswas NM. (1981) Prolactin suppression and spermatogenic developments in maturing rats. *Horm Res* 15: 72-77.

24) Dombrowicz D, Sente B, Closset J, Hennen G. (1992) Dose-dependent effects of human prolactin on the immature hypophysectomized rat testis. *Endocrinology* 130: 695-700.

25) Purvis K, Clausen OP, Olsen A, Haug E, Hansson V. (1979) Prolactin and Leydig cell responsiveness to LH/hCG in the rat. *Arch Androl* 3: 219-30.

26) Rubin RT, Poland RE, Tower BB. (1976) Prolactin-related testosterone secretion in normal adult men. *J Clin Endocrinol Metab* 42: 112-16.

27) Gunasekar PG, Kumaran B, Govindarajulu P. (1988) Prolactin and Leydig cell steroidogenic enzymes in the bonnet monkey (*Macaca radiata*). *Int J Androl* 11: 53-59.

28) Guillaumot P, Tabone E, Benahmed M. (1996) Sertoli cells as potential targets of prolactin action in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 122: 199-206.

29) Fukuda A, Mori C, Hashimoto H, Noda Y, Mori T, Hoshino K. (1989) Effects of

prolactin during preincubation of mouse spermatozoa on fertilizing capacity in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 6: 92-97.

30) Yazigi RA, Quintero CH, Salameh WA. (1997) Prolactin disorders. *Fertil Steril* 67: 215-25.

31) Wennbo H, Kindblom J, Isaksson OGP, Tornell J. (1997) Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland. *Endocrinology* 138: 4410-15.

32) Lavalle C, Loyo E, Paniagua R, Bermudez JA, Herrera J, Graef A, Gonzalez-Barcena D, Fraga A. (1987) Correlation study between prolactin and androgens in male patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheum* 14: 268-72.

33) Kira JI, Harada M, Yamaguchi Y, Shida N, Goto I. (1991) Hyperprolactinemia in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 102: 61-66.

34) Chikanza IC, Petrou P, Chrousos G, Kingsley G, Panayi GS. (1993) Excessive and dysregulated secretion of prolactin in rheumatoid arthritis: Immunopathogenetic and therapeutic implications. *Br J Rheumatol* 32: 445-48.

35) Graef AS, Gonzalez SS, Baca VR, Ramirez ML, Daza LB, Blanco FF, Ortiz OA, Lavalle CM. (1994) High serum prolactin levels in asymptomatic HIV-infected patients and in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 72: 390-93.

36) Carrier M, Emery RW, Wild-Mobley J, Perrotta NJ, Russell DH, Copeland JG. (1987) Prolactin as a marker of rejection in human heart transplantation. *Transplant Proc* 19: 3442-43.

37) Nagy E, Berczi I, Friesen HG. (1983) Regulation of immunity in rats by lactogenic and

growth hormones. *Acta Endocrinol* 102: 351-57.

38) Nagy E, Berczi I. (1989) Pituitary dependence of bone marrow function. *Br J Haematol* 71: 457-62.

39) Murphy WJ, Durum SK, Longo DL. (1993) Differential effects of growth hormone and prolactin on murine T cell development and function. *J Exp Med* 178: 231-36.

40) Gala RR, Shevach EM. (1993) Influence of prolactin and growth hormone on the activation of dwarf mouse lymphocytes in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med* 204: 224-30.

41) Yu-Lee LY. (1997) Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 215: 35-52.

42) Gout PW, Beer CT, Noble RL. (1980) Prolactin-stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb rat lymphomas. *Cancer Res* 40: 2433-36.

43) Sinha Yn. (1992) Prolactin variants. *Trends Endocrinol Metab* 3: 100-106.

44) Horseman ND, Yu-Lee LY. (1994) Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocr Rev* 15: 627-649.

45) Idelman S. (1990) *Endocrinologie, fondements physiologiques*, Presses Universitaires de Grenoble (Grenoble, France).

46) Sinha YN. (1995) Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 16: 35-42.

47) Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. (1996) Extrapituitary Prolactin: Distribution, Regulation, Functions, and Clinical Aspects. *Endocr Rev* 17:639-

669.

48) Anthony PK, Stoltz RA, Pucci ML, Powers CA. (1993) The 22K variant of rat prolactin: evidence for identity to prolactin-(1-173), storage in secretory granules, and regulated release. *Endocrinology* 132:806-814.

49) D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-KDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6374-78.

50) Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F, Weiner RI. (1993) The 16-Kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133:1292-1299.

51) Pellegrini I, Gunz G, Grisoli F, Jaquet P. (1990) Different pathways of secretion for glycosylated and nonglycosylated human prolactin. *Endocrinology* 126:1087-1095.

52) Ho TWC, Leong FS, Olaso CH, Walker AM. (1993) Secretion of specific nonphosphorylated and phosphorylated rat prolactin isoforms at different stages of the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 58:160-165.

53) Krown KA, Wang Y, Ho TWC, Kelly PA, Walker AM. (1992) Prolactin isoform 2 as an autocrine growth factor for GH3 cells. *Endocrinology* 131:595-602.

54) Horvath Kovacs K. (1994) Morphology of adenohipophysial cells and pituitary adenomas. Imura H (ed) *The pituitary gland*, ed 2. Raven Press, New York, pp29-62.

55) Takahashi S. (1995) Development and heterogeneity of prolactin cells. *Inter Rev Cyto* 157: 33-98.

- 56) Horvath E, Kovacs K. (1995) Anatomy and histology of the normal and abnormal pituitary gland. De Groot, LJ (ed) Endocrinology, ed 3. Saunders, Philadelphia, Pen, pp160-77.
- 57) Fraley SL. (1989) Mammosomatotropes: current status and possible functions. Trends Endocrinol Metab 1: 31-34.
- 58) Nikitovitch-Winer MB, Atkin J, Maley BE. (1987) Colocalization of prolactin and growth hormone within specific adenohypophyseal cells in male, female, and lactating rats. Endocrinology 121: 625-30.
- 59) Frawley LS, Boockfor FR, Hoeffler JP. (1985) Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. Endocrinology 116: 734-37.
- 60) Mulchahey JJ, Jaffe RB. (1987) Detection of a progenitor cell in the human fetal pituitary that secretes both growth hormone and prolactin. J Clin Endocrinol Metab 66: 24-32.
- 61) Kineman RD, Frawley LS. (1994) Secretory characteristics and phenotypic plasticity of growth hormone- and prolactin-producing cell lines. J Endocrinol 140: 455-63.
- 62) Bancroft FC. (1981) GH cells: functional clonal lines of rat pituitary tumor cells. Functionally differentiated cell lines. Eds G Sato, New York: Alan R Liss Inc. pp 47-49.
- 63) Boockfor FR, Hoeffler JP, Frawley LS. (1985) Cultures of GH3 cells are functionally heterogeneous: thyrotropin-releasing hormone, estradiol and cortisol cause reciprocal shifts in the proportions of growth hormone and prolactin secretors. Endocrinology 117: 418-20.
- 64) Takasuka N, White MRH, Wood CD, Robertson WR, Davis JRE. (1998) Dynamic changes in prolactin promoter activation in individual living lactotrophic cells.

Endocrinology 139: 1361-68.

65) Castano JP, Kineman RD, Frawley LS. (1996) Dynamic monitoring and quantification of gene expression in single, living cells: a molecular basis for secretory cell heterogeneity. *Mol Endocrinol* 10: 599-605.

66) Jacobsohn D. (1966) The techniques and effects of hypophysectomy, pituitary stalk section and pituitary transplantation in experimental animals. In: Harris GS, Donovan BT (eds) *The Pituitary Gland*, Butterworth, London, vol 2:1-21.

67) Nagy E, Berczi I. (1991) Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. *Endocrinology* 128: 2776-2784.

68) Dubois PM, ElAmraoui A. (1995) Embryology of the pituitary gland. *Trends Endocrinol Metab* 6: 1-7.

69) Takor-Takor T, Pearse AGE. (1975) Neuroectodermal origin of avian hypothalamo-hypophyseal complex: the role of the ventral neural ridge. *J Embryol Exp Morphol* 34: 311-326.

70) Eagleson DW, Jenks BG, Overbeeke APV. (1986) The pituitary adrenocorticotropes originate from neural ridge tissue in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* 95: 1-14.

71) Rosenfeld MG, Bach I, Erkman L, Li P, Lin C, Lin S, McEvelly R, Ryan A, Rhodes S, Schonemann M, Scully K. (1996) Transcriptional control of cell phenotypes in the neuroendocrine system. *Rec Prog Horm Res* 51:217-239.

72) Elkabes S, Loh YP, Nieburgs A, Wray S. (1989) Prenatal ontogenesis of pro-opiomelanocortin in the mouse central nervous system and pituitary gland: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *Dev Brain Res* 46: 85-95.

73) Japon MA, Rubinstein M, Low MJ. (1994) In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 42: 1117-25.

74) Jacobson L, Drouin J. (1994) Regulation of proopiomelanocortin gene transcription. In: Imura H (ed) *The pituitary gland*. Raven Press, LTD, New York, pp117-38.

75) Drouin J, Lanctôt C, Tremblay JJ. (1998) La famille Ptx des facteurs de transcription à homéodomaine. *Médecine/Sciences* 14: 335-339.

76) Parks JS, Adess ME, Brown MR. (1997) Genes regulating hypothalamic and pituitary development. *Acta Paediatr Suppl* 423: 28-32.

77) Szeto D, Ryan AK, O'Connell SM, Rosenfeld MG. (1996) P-OTX: A PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci* 93: 7706-7710.

78) Kappen C, Schughart K, Ruddle FH. (1993) Early evolutionary origin of major homeodomain sequence classes. *Genomics* 18: 54-70.

79) Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE *et al.* (1996) Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384: 327-33.

80) Gage PJ, Brinkmeier ML, Scarlett LM *et al.* (1996) The Ames dwarf gene, *df*, is required early in pituitary ontogeny for the extinction of RPX transcription and initiation of lineage-specific cell proliferation. *Mol Endocrinol* 10: 1570-81.

81) Tremblay JJ, Lanctôt C, Drouin J. (1998) The pan-pituitary activator of transcription, PTX1 (Pituitary Homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit-1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene *Lim/Lhx3*. *Mol Endocrinol* 12: 428-44.

- 82) Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctôt C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J. (1996) Ptx1, a *bicoid* - related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev* 10: 1284-1295.
- 83) Seidah NG, Barale JC, Marcinkiewicz M, Mattie MG, Day R, Chretien M. (1994) The mouse homeoprotein mLIM-3 is expressed early in cells derived from the neuroepithelium and persists in adult pituitary. *DNA Cell Biol* 13: 1163-80.
- 84) Bach I, Rhodes SJ, Pearse RV II, Heinzel T *et al.* (1995) P-Lim, a LIM homeodomain factor is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2720-4.
- 85) Zhadanov AB, Bertuzzi S, Taira M, Dawid IB, Westphal H. (1995) Expression pattern of the murine LIM class homeobox gene LHX3 in subsets of neural and neuroendocrine tissues. *Dev Dyn* 202: 354-64.
- 86) Roberson MS, Schoderbek WE, Maurer RA. (1994) Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor. *Mol Cell Biol* 14: 2985-93.
- 87) Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B Jr, Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, *et al.* (1996) Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx. *Science* 272: 1004-7.
- 88) Sheng HZ, Kenji M, Yamashita T, Hung L, Potter SS *et al.* (1997) Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 278: 1809-12.
- 89) Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ *et al.* (1996) Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384: 327-332.

- 90) Wu W, Cogan JD, Pfäffle RW, Dasen JS *et al.* (1998) Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nature genetics* 18: 147-9.
- 91) Ingraham HA, Albert VR, Chen RC, Crenshaw III EB, Elsholtz HP *et al.* (1990) A family of pou-domain and Pit-1 tissue-specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development. *Ann Rev Physiol* 52: 773-91.
- 92) Bodner M, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M. (1988) The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55: 505-18.
- 93) Mangalam HJ, Albert VR, Ingraham HA, Kapiloff M, Wilson L, Nelson C *et al.* (1989) A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev* 3: 946-58.
- 94) Ingraham HA, Chen R, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE *et al.* (1988) A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55: 519-529.
- 95) Voss J, Wilson L, Rosenfeld MG. (1991) POU-domain proteins Pit-1 and Oct-1 interact to form a heteromeric complex and can cooperate to induce expression of the prolactin promoter. *Genes Dev* 5: 1309-1320.
- 96) Konzak KE, Moore DD. (1992) Functional isoforms of Pit-1 generated by alternative messenger RNA splicing. *Mol Endocrinol* 6: 241-247.
- 97) Haugen BR, Wood WM, Gordon DF, Ridgway EC. (1993) A thyrotrope-specific variant of Pit-1 transactivates the thyrotropin beta promoter. *J Biol Chem* 268:20818-20824.
- 98) Voss JW, Wilson L, Rhodes SJ, Rosenfeld MG. (1993) An alternative Pit-1 RNA

splicing product reveals modular binding and nonmodular transcriptional activities of the POU-specific domain. *Mol Endocrinol* 7: 1551-1560.

99) Anderson B, Rosenfeld MG. (1994) Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland. *J Biol Chem* 269: 29335-8.

100) Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG, Swanson LW. (1990) Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev* 4: 695-711.

101) Chen R, Ingraham HA, Treacy MN, Albert VR, Wilson L, Rosenfeld MG. (1990) Autoregulation of Pit-1 gene expression mediated by two cis-active promoter elements. *Nature* 346: 583-6.

102) Rhodes SJ, Chen R, DiMattia GE, Scully KM, Kalla KA, Lin SC, Yu VC, Rosenfeld MG. (1993) A tissue-specific enhancer confers Pit-1-dependant morphogen inducibility and autoregulation on the *pit-1* gene. *Genes Dev* 7: 913-32.

103) Sánchez-Pacheco A, Palomino T, Aranda A. (1995) Retinoic acid induced expression of the transcription factor GHF-1/Pit-1 in pituitary prolactin- and growth hormone-producing cell lines. *Endocrinology* 136: 5391-98.

104) DiMattia GE, Rhodes SJ, Kronen A, Carrière C, O'Connell S, Kalla K, Arias C, Sawchenko P, Rosenfeld MG. (1997) The Pit-1 gene is regulated by distinct early and late pituitary-specific enhancers. *Dev Biol* 182: 180-90.

105) Kapiloff MS, Fakash Y, Wegner M, Rosenfeld MG. (1991) Variable effects of phosphorylation of Pit-1 dictated by the DNA response elements. *Science* 253: 786-789.

106) Okimura Y, Howard PW, Maurer RA. (1994) Pit-1 binding sites mediate

transcriptional responses to cyclic adenosine 3',5'-monophosphate through a mechanism that does not require inducible phosphorylation of pit-1. *Mol endocrinol* 8: 1559-1565.

107) Steinfelder HJ, Radovick S, Wondisford FE. (1992) Hormonal regulation of the thyrotropin β -subunit gene by phosphorylation of the pituitary-specific transcription factor pit-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5942-45.

108) Jacobson EM, Li P, Leon-del-Rio A, Rosenfeld MG, Aggarwal AK. (1997) Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimer: unexpected arrangement and flexibility. *Genes Dev* 11: 198-97.

109) Radovick S, Cohen LE, Wondisford FE. (1998) The molecular basis of hypopituitarism. *Horm Res* 49 (suppl 1): 30-36.

110) Ingraham HA, Flynn SE, Voss JW, Albert VR, Kapiloff MS, Wilson L. (1990) The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependant pit-1 - pit-1 interactions. *Cell* 61: 1021-33.

111) Schaufele F, West BL, Baxter JD. (1992) Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 6: 656-65.

112) Day RN, Koike S, Sakai M, Muramatsu M, Maurer RA. (1990) Both Pit-1 and the estrogen receptor are required for estrogen responsiveness of the rat prolactin gene. *Mol Endocrinol* 4: 1964-71.

113) Schaufele F. (1996) CCAAT/enhancer-binding protein a activation of the rat growth hormone promoter in pituitary progenitor GHFT1-5 cells. *J Biol Chem* 271: 21484-89.

114) Lipkin SM, Näär AM, Kalla KA, Sack RA, Rosenfeld MG. (1993) Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1 dependent GH gene expression. *Genes Dev* 7: 1674-87.

- 115) Bradford AP, Wasylyk C, Wasylyk B, Gutierrez-Hartmann A. (1997) Interaction of Ets-1 and the POU-Homeodomain protein GHF-1/Pit-1 reconstitutes pituitary-specific gene expression. *Mol Cell Biol* 17: 1065-74.
- 116) Farrow K, Manning N, Schaufele F, Gutierrez-Hartmann A. (1996) The c-Jun domain inhibits neuroendocrine promoter activity in a DNA sequence- and pituitary-specific manner. *J Biol Chem* 271: 17139-46.
- 117) Gordon DF, Lewis SR, Haugen BR, James RA, McDermott MT, Wood WM, Ridgway EC. (1997) Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin b-subunit promoter. *J Biol Chem* 272: 24339-47.
- 118) Cavailles V, Dauvois S, L'Horset F, Lopez G, Hoare S, Kushner PJ, Parker MG. (1996) Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J* 14: 3741-51.
- 119) Chang W, Zhou W, Theill LE, Baxter JD, Schaufele F. (1996) An activation function in Pit-1 required selectively for synergistic transcription. *J Biol Chem* 271: 17733-38.
- 120) Chuang FM, West BL, Baxter JD, Schaufele F. (1997) Activities in Pit-1 determine whether receptor interacting protein 140 activates or inhibits Pit-1/nuclear receptor transcriptional synergy. *Mol Endocrinol* 11: 1332-41.
- 121) Li S, Crenshaw III B, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG. (1990) Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *pit-1*. *Nature* 347: 528-33.
- 122) Tatsumi K, Miyai K, Notomi T *et al.* (1992) Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nat Genet* 1: 56-58.

123) Irie Y, Tatsumi K, Ogawa M *et al.* (1995) A novel E250X mutation of the Pit-1 gene in patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocrinology* 134: 351-54.

124) Pernasetti S, Milner RDG, Al Ashwal AAZ, de Zegher F, Chavez VM, Muller M, Martial JA. (1998) Pro239Ser: A novel recessive mutation of the Pit-1 gene in seven middle eastern children with growth hormone, prolactin, and thyrotropin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2079-83.

125) Pellegrini I, Barlier A, Gunz G, Figarella-Branger D, Enjalbert A, Grisoli F, Jaquet P. (1994) Pit-1 gene expression in the human pituitary and pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 189-96.

126) Pellegrini-Bouiller I, Morange-Ramos I, Barlier A, Gunz G, Enjalbert A, Jaquet P. (1997) Pit-1 gene expression in human pituitary adenomas. *Horm Res* 47; 251-58.

127) Friend KE, Chiou YK, Lopes MB, Laws ER, Hughes KM, Shupnik MA. (1994) Estrogen receptor expression in human pituitary: correlation with immunohistochemistry in normal tissue, and immunohistochemistry and morphology in macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1497-1504.

128) Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Lloyd RV, Buchfelder M, Fahlbush R, Smyth H. (1994) *In situ* hybridation study of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human adenohypophysial cells and pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 78-83.

129) Mitchner NA, Garlick C, Ben-Jonathan N. (1998) Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors α and β in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 139: 3976-83.

130) Gash D, Ahmad N, Weiner R, Schechter J. (1980) Development of presumptive mammatrophs in isografts is dependent on the endocrine state of the host. *Endocrinology* 106: 1246-1252.

131) Staubaugh MB, Lieberman ME, Rutledge JJ, Gorski J. (1982) Ontogeny of growth hormone and PRL gene expression in mice. *Endocrinology* 110: 1489-97.

132) Lieberman ME, Slabaugh MB, Rutledge JJ, Gorski J. (1983) The role of estrogen in the differentiation of PRL producing cells. *J Steroid Biochem* 19: 275-81.

133) Wendell DL, Herman A, Gorski J. (1996) Genetic separation of tumor growth and hemorrhagic phenotypes in an estrogen-induced tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8112-16.

134) Maurer RA, Notides AC. (1987) Identification of an estrogen-responsive element from the 5'-flanking region of the rat PRL gene. *Mol Cell Biol* 7: 4247-54.

135) Waterman ML, Adler SR, Nelson CA, Greene GL, Evans RM, Rosenfeld MG. (1988) A single domain of the estrogen receptor confers DNA binding and transcriptional activation of the rat PRL gene. *Mol Endocrinol* 2: 14-21.

136) Murdoch FE, Byrne LM, Ariazi EA, Furlow JD, Meier DA, Gorski. (1995) Estrogen receptor binding to DNA: Affinity for nonpalindromic elements from the rat PRL gene. *Biochemistry* 34: 9144-50.

137) Seyfred MA, Gorski J. (1990) An interaction between the 5' flanking distal and proximal regulatory domains of the rat PRL gene is required for transcriptional activation by estrogens. *Mol Endocrinol* 4: 1226-34.

138) Cullen KE, Kladde MP, Seyfred MA. (1993) Interaction between transcription regulatory regions of PRL chromatin. *Science* 261: 203-6.

139) Gothard LQ, Hibbard JC, Seyfred MA. (1996) Estrogen-mediated induction of the rat prolactin gene transcription requires the formation of a chromatin loop between the distal

enhancer and proximal promoter regions. *Mol Endocrinol* 10: 185-95.

140) Shupnik MA, Rosenzweig BA. (1991) Identification of an estrogen-responsive element in the rat LHB gene. *J Biol Chem* 266: 17084-91.

141) Shupnik MA, Gharib SD, Chin WW. (1988) Estrogen suppresses rat gonadotropin gene transcription *in vivo*. *Endocrinology* 122: 1842-46.

142) Quinones-Jenab V, Jenab S, Ogawa S, Funabashi T, Weesner GD, Pfaff DW. (1996) Estrogen regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in female rat pituitary tissue. *Mol Brain Res* 38: 243-50.

143) Kakar SS, Grantham K, Musgrove LC, Devor D, Sellers JC, Neill JD. (1994) Rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: tissue expression and hormonal regulation of its mRNA. *Mol Cell Endocrinol* 101: 151-57.

144) Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS, Rosenfeld MG. (1997) Role of estrogen receptor- α in the anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol* 11: 674-81.

145) Gonzalez GA, Montminy MR. (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675-89.

146) Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE. (1993) GHRH receptor of *little* mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nature Gen* 4: 227-32.

147) Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG. (1992) Pit-1- dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360: 765-68.

148) Petersenn S, Rasch AC, Heyens M, Schulte HM. (1998) Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 12: 233-47.

149) Montminy M. (1993) Cell differentiation: the road not taken. *Nature* 364: 190-1.

150) Lin SC, Lin CR, Gukovsky I, Lusk AJ, Sawchenko PE, Rosenfeld MG. (1993) Molecular basis of the *little* mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. *Nature* 364: 208-13.

151) Struthers RS, Vale WW, Arias C, Sawchenko PE, Montminy MR. (1991) Somatotroph hypoplasia and dwarfism in transgenic mice expressing a non-phosphorylatable CREB mutant. *Nature* 350: 622-24.

152) Drolet DW, Scully KM, Simmons DM, Wegner M, Chu K, Swanson LW, Rosenfeld MG. (1991) TEF, a transcription factor expressed specifically in the anterior pituitary during embryogenesis, defines a new class of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 5: 1739-53.

153) Parker KL, Schimmer BP. (1997) Steroidogenic factor 1: A key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Rev* 18: 361-77.

154) Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M *et al.* (1995) Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1-disrupted mice. *Dev Dyn* 204: 22-29.

155) Barnhart KM, Mellon PL. (1994) The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone α -subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol Endocrinol* 8: 878-85.

156) Wong M, Ikeda Y, Luo X, Caron KM, Weber TJ, Swain A, Schimmer BP, Parker KL. (1997) Steroidogenic factor 1 plays multiple roles in endocrine development and

function. *Rec Prog Horm Res* 52: 167-84.

157) Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. (1995) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 9: 478-86.

158) Milbrandt J. (1987) A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 238: 797-99.

159) Swirnoff AH, Milbrandt J. (1995) DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol Cell Biol* 15: 2275-87.

160) Watson MA, Milbrandt J. (1990) Expression of the nerve growth-factor-regulated NGFI-A and NGFI-B genes in the developing rat. *Development* 110: 173-83.

161) Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Trembleau A, Gourdji D, Driancourt MA, Rao CV, Charnay P. (1997) Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol Endocrinol* 12: 107-22.

162) Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, Goda P, Gavriline G, Milbrandt J. (1996) Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 273: 1219-21.

163) Dollé P, Ruberte E, Petkovich M, Kastner P, Stoner M, Gudas LJ, Chambon P. (1989) Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptor and CRABP in the developing limbs in the mouse. *Nature* 342: 702-05.

164) Dollé P, Fraulob V, Kastner P, Chambon P. (1994) Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech Dev* 45: 91-104.

165) Sugawara A, Yen PM, Qi Y, Lechan RM, Chin WW. (1995) Isoform-specific

retinoid-X receptor (RXR) antibodies detect differential expression of RXR proteins in the pituitary gland. *Endocrinology* 136: 1766-74.

166) Tremblay Y, Tretjakoff I, Peterson A, Antakly T, Zhang CX, Drouin J. (1988) Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of pro-opiomelanocortin (POMC) fusion gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8890-94.

167) Therrien M, Drouin J. (1993) Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 13: 2342-53.

168) Poulin G, Turgeon B, Drouin J. (1997) NeuroD1/b2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 17: 6673-82.

169) Borrelli E. (1994) Pitfalls during development: controlling differentiation of the pituitary gland. *TIG* 10: 222-24.

170) Frawley LS, Boockfor FR. (1991) Mammosomatotropes: presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. *Endocrinol Rev* 12: 337-55.

171) Burrows HL, Birkmeier TS, Seasholtz, Camper SA. (1996) Targeted ablation of cells in the pituitary primordia of transgenic mice. *Mol Endocrinol* 10: 1467-77.

172) Watanabe YG, Daikoku S. (1979) An immunohistochemical study on the cytogenesis of adenohypophysial cells in fetal rats. *Dev Biol* 68: 557-67.

173) Gash D, Ahmad N, Schechter J. (1982) Comparison of gonadotroph, thyrotroph and mammotroph development in situ, in transplants and in organ culture. *Neuroendocrinol* 34: 222-28.

174) Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ. (1996) The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for

the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* 10: 60-69.

175) Akita S, Readhead C, Stefanescu L, Fine J, Tampanaru-Sarmesiu A, Kovacs K, Melmed S. (1997) Pituitary-directed Leukemia Inhibitory Factor transgene forms Rathke's cleft cysts and impairs adult pituitary function. *J Clin Invest.* 99: 2462-69.

176) Yano H, Readhead C, Nakashima M, Ren SG, Melmed S. (1998) Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene causes cushing's syndrome: neuro-immune-endocrine modulation of pituitary development. *Mol Endocrinol* 12: 1708-20.

177) Alarid ET, Holley S, Hayakawa M, Mellon PL. (1998) Discrete stages of anterior pituitary differentiation recapitulated in immortalized cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 140: 25-30.

178) Miller WL, Eberhardt NL. (1983) Structure and evolution of the growth hormone family. *Endocr Rev* 4: 97-130.

179) Gubbins EJ, Maurer RA, Lagrimini M, Erwin CR, Donelson JE. (1980) Structure of the rat prolactin gene. *J Biol Chem* 255: 8655-8662.

180) Maurer RA, Erwin CR, Donelson JE. (1981) Analysis of 5' flanking sequences and intron-exon boundaries of the rat prolactin gene. *J Biol Chem* 256: 10524-28.

181) Nelson C, Crenshaw III EB, Franco R, Lira SA, Albert VR, Evans RM, Rosenfeld MG. (1986) Discrete cis-acting genomic sequences dictate the pituitary cell type-specific expression of rat prolactin and growth hormone genes. *Nature* 322: 557-62.

182) Gutierrez-Hartmann A, Siddiqui S, Loukin S. (1987) Selective transcription and DNase I protection of the rat prolactin gene by GH3 pituitary cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci* 84: 5211-15.

- 183) Lufkin T, Bancroft C. (1987) Identification by cell fusion of gene sequences that interact with positive trans-acting factors. *Science* 237: 283-86.
- 184) Cao Z, Barron EA, Carillo AJ, Sharp DZ. (1987) Reconstitution of cell-type-specific transcription of the rat prolactin gene in vitro. *Mol Cell Biol* 7: 3402-08.
- 185) Schuster WA, Treacy MN, Martin F. (1988) Tissue specific trans-acting factor interacting with proximal rat prolactin gene promoter sequences. *EMBO J* 7: 1721-33.
- 186) Day RN, Maurer RA. (1989) The distal enhancer region of the rat prolactin gene contains elements conferring response to multiple hormones. *Mol Endocrinol* 3: 3-9.
- 187) Lufkin T, Jackson AE, Pan WT, Bancroft C. (1989) Proximal rat prolactin promoter sequences direct optimal, pituitary cell-specific transcription. *Mol Endocrinol* 3: 559-566.
- 188) Crenshaw III EB, Kalla K, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG. (1989) Cell-specific expression of the prolactin gene in transgenic mice is controlled by synergistic interactions between promoter and enhancer elements. *Genes Dev* 3: 959-72.
- 189) Willis SD, Seyfred MA. (1996) Pituitary-specific chromatin structure of the rat prolactin distal enhancer element. *Nucl Ac Res* 24: 1065-72.
- 190) Gourdj D, Laverrière JN. (1994) The rat prolactin gene: a target for tissue-specific and hormone-dependent transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 100: 133-42.
- 191) Laverrière JN, Muller M, Buisson N, Tougard C, Tixier-Vidal A, Gourdj D. (1986) Differential implication of deoxyribonucleic acid methylation in rat prolactin and rat growth hormone gene expression: a comparison between rat pituitary cell strains. *Endocrinology* 118: 198-206.

- 192) Ngô VM, Laverrière JN, Gourджи D. (1995) CpG methylation represses the activity of the rat prolactin promoter in rat GH3 pituitary cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 108: 95-105.
- 193) Ngô V, Gourджи D, Laverrière JN. (1996) Site-specific methylation of the rat prolactin and growth hormone promoters correlates with gene expression. *Mol Cell Biol* 16: 3245-54.
- 194) Nelson C, Albert VR, Elsholtz HP, Lu LIW, Rosenfeld MG. (1988) Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science* 239: 1400-05.
- 195) Cao Z, Barron EA, Carrilo AJ, ZD Sharp. (1987) Reconstitution of cell-type-specific transcription of the rat prolactin gene in vitro. *Mol Cell Biol* 7: 3402-08.
- 196) Verrijzer CP, van Oosterhout JA, van Weperen WW, van der Vliet PC. (1991) POU proteins bend DNA via the POU-specific domain. *EMBO J* 10: 3007-14.
- 197) Sharp ZD. (1995) Rat Pit-1 stimulates transcription in vitro by influencing pre-initiation complex assembly. *BBRC* 206: 40-45.
- 198) Elsholtz HP, Albert VR, Treacy MN, Rosenfeld MG. (1990) A two-base change in a POU factor-binding site switches pituitary-specific to lymphoid-specific gene expression. *Genes Dev* 4: 43-51.
- 199) Day RN, Day KH. (1994) Specific repression of rat prolactin gene expression in transplanted tumor cells. *Mol Endocrinol* 8: 12-20.
- 200) Day RN, Day KH. (1994) An alternatively spliced form of Pit-1 represses prolactin gene expression. *Mol Endocrinol* 8: 374-81.
- 201) Wasylyk B, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A. (1998) Ets transcription factors:

nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *TIBS* 23: 213-16.

202) Castillo AI, Tolon RM, Aranda A. (1998) Insulin-like growth factor-1 stimulates rat prolactin gene expression by a Ras, ETS and phosphatidylinositol 3-kinase dependent mechanism. *Oncogene* 16: 1981-91.

203) Fagin JA, Fernandez-Mejia C, Melmed S. (1989) Pituitary insulin-like growth factor-1 gene expression: regulation by triiodothyronine and growth hormone. *Endocrinology* 125: 2385-91.

204) Fagin JA, Brown A, Melmed S. (1988) Regulation of pituitary insulin-like growth factor-1 messenger ribonucleic acid levels in rats harboring somatomammotropic tumors: Implications for growth hormone autoregulation. *Endocrinology* 122: 2204-10.

205) Stanley F. (1988) Stimulation of prolactin gene expression by insulin. *J Biol Chem* 263: 13444-48.

206) Stanley F. (1992) An element in the prolactin promoter mediates the stimulatory effect of insulin on transcription of the prolactin gene. *J Biol Chem* 267: 16719-26.

207) Ouyang L, Jacob KK, Stanley FM. (1996) GABP mediates insulin-increased prolactin gene transcription. *J Biol Chem* 271: 10425-28.

208) Iverson RA, Day KH, d'Emden M, Day RN, Maurer RA. (1990) Clustered point mutation analysis of the rat prolactin promoter. *Mol Endocrinol* 4: 1564-71.

209) d'Emden MC, Okimura Y, Maurer RA. (1992) Analysis of functional cooperativity between individual transcription-stimulating elements in the proximal region of the rat prolactin gene. *Mol Endocrinol* 6: 581-88.

210) Guttierrez-Hartmann A, Siddiqui S, Loukin S. (1987) Selective transcription and

DNase 1 protection of the rat prolactin gene by GH3 pituitary cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5211-16.

211) Harvey C, Jackson SM, Siddiqui SK, Gutierrez-Hartmann A. (1991) Structure-function analysis of the rat prolactin promoter: phasing requirements of proximal cell-specific elements. *Mol Endocrinol* 5: 836-43.

212) Jackson SM, Keech CA, Williamson DJ, Gutierrez-Hartmann A. (1992) Interaction of basal positive and negative transcription elements controls repression of the proximal rat prolactin promoter in nonpituitary cells. *Mol Cell Biol* 12: 2708-19.

213) Alexander LM, Williamson DJ, Wood WM, Gordon DF, Chester Ridgway EC, Gutierrez-Hartmann A. (1990) Activation of the murin thyrotropin-beta-subunit promoter by GH4 rat pituitary cell-free extracts. *Mol Endocrinol* 4: 1887-96.

214) Bradford AP, Conrad KE, Tran PH, Ostrowski MC, Gutierrez-Hartmann A. (1996) GHF-1/Pit-1 functions as a cell-specific integrator of ras signaling by targeting the ras pathway to a composite Ets-1/GHF-1 response element. *J Biol Chem* 271: 24639-48.

215) Johnson L, Baxter J, Vlodaysky I, Gospodrowicz D. (1980) Epidermal growth factor and expression of specific genes: effects on cultured rat pituitary cells are dissociable from the mitogenic response. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 394-98.

216) Schonbrunn A, Krasnoff M, Westendorf J, Tashjian AJ. (1980) Epidermal growth factor and thyrotropin-releasing hormone act similarly on a clonal pituitary cell strain. Modulation of hormone production and inhibition of cell proliferation. *J Cell Biol* 85: 786-97.

217) Elsholtz HP, Mangalam HJ, Potter E, Albert VR, Supowit S, Evans RM, Rosenfeld MG. (1986) Two different cis-active elements transfer the transcriptional effects of both EGF and phorbol esters. *Science* 234: 1552-57.

218) Pickett CA, Gutierrez-Hartmann. (1994) Ras mediates Src but not epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase signaling pathways in GH4 neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8612-16.

219) Farrow KN, Manning N, Schaufele F, Gutierrez-Hartmann A. (1996) The c-Jun domain inhibits neuroendocrine promoter activity in a DNA sequence- and pituitary-specific manner. *J Biol Chem* 271: 17139-46.

220) Pickett CA, Gutierrez-Hartmann. (1995) Epidermal growth factor and Ras regulate gene expression in GH4 pituitary cells by separate, antagonistic signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 15: 6777-84.

221) Li Y, Koga M, Kasayama S, Matsumoto K et al. (1992) Identification and characterization of high molecular weight forms of basic fibroblast growth factor in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 1436-41.

222) Atkin S, Landolt A, Jeffreys R, Diver M, Radcliffe J, White M. (1993) Basic fibroblastic growth factor stimulates prolactin secretion from human anterior pituitary adenomas without affecting adenoma cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 831-37.

223) Zimering M, Katsumata N, Sato Y, Brandi M et al. (1993) Increased basic fibroblast growth factor in plasma from multiple endocrine neoplasia type 1: relation to pituitary tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1182-87.

224) Shimon I, Huttner A, Said J, Spirina O, Melmed S. (1996) Heparin-binding secretory transforming gene (hst) facilitates rat lactotrope cell tumorigenesis and induces prolactin gene transcription. *J Clin Invest* 97: 187-95.

225) Schweppe RE, Frazer-Abel AA, Gutierrez-Hartmann A, Bradford AP. (1997)

Functional components of Fibroblast Growth Factor (FGF) signal transduction in pituitary cells. *J Biol Chem* 272: 30852-59.

226) Maurer RA. (1982) Adenosine 3',5'-monophosphate derivatives increase prolactin synthesis and prolactin messenger ribonucleic acid levels in ergocryptine-treated pituitary cells. *Endocrinology* 110: 1957-63.

227) Fischberg DJ, Bancroft C. (1995) The D₂ receptor: blocked transcription in GH₃ cells and cellular pathways employed by D_{2A} to regulate prolactin promoter activity. *Mol Cell Endocrinol* 111: 129-37.

228) Elsholtz HP, Lew AM, Albert PR, Sundmark VC. (1991) Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine. *J Biol Chem* 266: 22919-25.

229) Lew AM, Elsholtz HP. (1995) A dopamine-responsive domain in the N-terminal sequence of Pit-1. *J Biol Chem* 270: 7156-60.

230) Keech CA, Jackson SM, Siddiqui SK, Ocran KW, Gutierrez-Hartmann A. (1992) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate activation of the rat prolactin promoter is restricted to the pituitary-specific cell type. *Mol Endocrinol* 6: 2059-70.

231) Gonzalez GA, Yamamoto KK, Fischer WH, Karr D, Menzel P, Biggs III W, Vale WW, Montminy MR. (1989) A cluster of phosphorylation sites on the cyclic-AMP regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 337: 749-52.

232) Liang J, Kim KE, Schoderbek WE, Maurer RA. (1992) Characterization of a nontissue-specific, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-responsive element in the proximal region of the rat prolactin gene. *Mol Endocrinol* 6: 885-92.

233) Yan GZ, Chen XH, Bancroft C. (1994) A constitutive active form of CREB can activate expression of the rat prolactin promoter in non-pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol*

101: R25-30.

234) Rajnarayan S, Chiono M, Alexander LM, Gutierrez-Hartmann A. (1995) Reconstitution of protein kinase A regulation of the rat prolactin promoter in HeLa nonpituitary cells: identification of both GHF-1/Pit-1-dependent and -independent mechanisms. *Mol Endocrinol* 9: 502-12.

235) Yan GZ, Bancroft C. (1991) Mediation by calcium of thyrotropin-releasing hormone action on the prolactin promoter via transcription factor Pit-1. *Mol Endocrinol* 5: 1488-97.

236) Tian J, Ma HW, Bancroft C. (1995) Constitutively active G_q-α stimulates prolactin promoter activity via a pathway involving Raf activity. *Mol Cell Endocrinol* 112: 249-56.

237) Jackson AE, Bancroft C. (1988) Proximal upstream flanking sequences direct calcium regulation of the rat prolactin gene. *Mol Endocrinol* 2: 1139-44.

238) Enyeart JJ, Biagi B, Day RN. (1990) Opposing actions of Bay 8644 enantiomers on calcium current, prolactin secretion, and synthesis in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 4: 727-35.

239) White BA, Bancroft FC. (1983) Epidermal growth factor and thyrotropin-releasing hormone interact synergistically with calcium to regulate prolactin mRNA levels. *J Biol Chem* 258: 4618-22.

240) Jefferson AB, Travis SM, Schulman H. (1991) Activation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase in GH3 cells. *J Biol Chem* 266: 1484-90.

241) Nowakowski BE, Okimura Y, Maurer RA. (1997) Characterization of DNA regions mediating the ability of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II to stimulate prolactin promoter activity. *Mol Cell Endocrinol* 132: 109-16.

- 242) Kim KE, Day RN, Maurer RA. (1988) Functional analysis of the interaction of a tissue-specific factor with an upstream enhancer element of the rat prolactin gene. *Mol Endocrinol* 2: 1374-81.
- 243) Naylor LH, Clark EM. (1990) d(TG)_n*d(CA)_n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription. *Nucl Acids Res* 18: 1595-1601.
- 244) Berwaer M, Monget P, Peers B, Mathy-Hartert M, Bellefroid E, Davis JRE, Belayew A, Martial JA. (1991) Multihormonal regulation of the human prolactin gene expression from 5000 pb of its upstream sequence. *Mol Cell Endocrinol* 80: 53-64.
- 245) Beato M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-44.
- 246) Evans RM. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-95.
- 247) Naar AM, Boutin JM, Lipkin SM, Yu VC, Holloway JM, Glass CK, Rosenfeld MG. (1991) The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 65: 1267-79.
- 248) Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM. (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65: 1255-66.
- 249) Danielsen M, Hinck L, Ringold GM. (1989) Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell* 57: 1131-8.
- 250) Mader S, Kumar V, de Verneuil H, Chambon P. (1989) Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a

glucocorticoid-responsive element. *Nature* 338: 271-4.

251) Umesono K, Evans RM. (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57: 1139-46.

252) Enmark E, Gustafsson JA. (1996) Orphan nuclear receptors-The first eight years. *Mol Endocrinol* 10: 1293-1307.

253) Tsai SY, Tsai MJ. (1997) Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. *Endocrinol Rev* 18: 229-240.

254) Pastorcic M, Wang H, Elbrecht A, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. (1986) Control of transcription initiation in vitro requires binding of a transcription factor to the distal promoter of the ovalbumin gene. *Mol Cell Biol* 6: 2784-91.

255) Sagami I, Tsai SY, Wang H, Tsai MJ, O'Malley BW. (1986) Identification of two factors required for transcription of the ovalbumin gene. *Mol Cell Biol* 6: 4259-67.

256) Wang LH, Tsai SY, Cook RG, Beattie WG, Tsai MJ, O'Malley BW. (1989) COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature* 340: 163-66.

257) Wang LH, Tsai SY, Sagami I, Tsai MJ, O'Malley BW. (1987) Purification and characterization of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor from HeLa cells. *J Biol Chem* 262: 16080-86.

258) Bagchi MK, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. (1987) Purification and characterization of chicken ovalbumin gene upstream promoter transcription factor from homologous oviduct cells. *Mol Cell Biol* 7: 4151-8.

259) Miyajima N, Kadowaki Y, Fukushige SI, Shimizu SI, Semba K, Yamanashi Y *et al.* (1988) Identification of two novel members of erbA superfamily by molecular cloning: the

gene products of the two are highly related to each other. *Nucleic Acids Res* 16: 11057-66.

260) Wang LH, Ing NH, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai MJ. (1991) The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors. *Gene Expr* 1: 207-16.

261) Ladias JAA, Karathanasis SK. (1991) Regulation of the apolipoprotein A1 gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. *Science* 251: 561-65.

262) Achatz G, Hölzl B, Speckmayer R, Hauser C, Sandhofer F, Paulweber B. (1997) Functional domains of the human orphan receptor ARP-1/COUP-TFII involved in active repression and transrepression. *Mol Cell Biol* 17: 4914-32.

263) Pereira FA, Qiu Y, Tsai MJ, Tsai SY. (1995) Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 53: 503-08.

264) Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-39.

265) Chu K, Zingg HH. (1997) The nuclear orphan receptors COUP-TFII and Ear-2 act as silencers of the human oxytocin gene promoter. *J Endocrinol* 19: 163-72.

266) Chu K, Boutin JM, Breton C, Zingg HH. (1998) Nuclear orphan receptors COUP-TF II and Ear-2: presence in oxytocin-producing uterine cells and functional interaction with the oxytocin gene promoter. *Mol Cell Endocrinol* 137: 145-54.

267) Malik S, Karathanasis S. (1995) Transcriptional activation by the orphan nuclear receptor ARP-1. *Nucleic acids Res* 23: 1536-43.

268) Legraverend C, Eguchi H, Ström A, Lahuna O, Mode A, Tollet P. (1994) Transactivation of the rat CYP2C13 gene promoter involves HNF-1, HNF-3, and members

of the orphan receptor subfamily. *Biochemistry* 33: 9889-97.

269) Vorgia P, Zannis VI, Kardassis D. (1998) A short proximal promoter and the distal hepatic control region-1 (HCR-1) contribute to the liver specificity of the human apolipoprotein C-II gene. *J Biol Chem* 273: 4188-96.

270) Mlodzik M, Hiromi Y, Weber U, Goodman CS, Rubin GM. (1990) The *Drosophila* seven-up gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell* 60: 221-24.

271) Ritchie HH, Wang LH, Tsai S, O'Malley BW, Tsai MJ. (1990) COUP-TF gene: a structure unique for the steroid/thyroid receptor superfamily. *Nucleic Acids Res* 18: 6857-62.

272) Qiu YH, Tsai SY, Tsai MJ. (1994) COUP-TF: an orphan member of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily. *Trends Endocrinol Metab* 5: 234-39.

273) Power RF, Lydon JP, Conneely OM, O'Malley BW. (1991) Dopamine activation of an orphan of the steroid receptor superfamily. *Science* 252: 1546-48.

274) Tsai SY, Sagami I, Wang LH, Tsai MJ, O'Malley BW. (1987) Interactions between a DNA-binding transcription factor (COUP) and a non-DNA binding factor (S300-II). *Cell* 50: 701-09.

275) Hwung YP, Wang LH, Tsai SY, Tsai MJ. (1988) Differential binding of the chicken ovalbumin upstream promoter (COUP) transcription factor to two different promoters. *J Biol Chem* 263: 13470-74.

276) Haddad I, Ordovas J, Fitzpatrick T, Karathanasis SK. (1986) Linkage, evolution, and expression of the rat apolipoprotein A-I, C-III and A-IV genes. *J Biol Chem* 261: 13268-77.

- 277) Wijnolds J, Muller E, Ab G. (1991) Oestrogen facilitates the binding of ubiquitous and liver enriched nuclear proteins to the apoVLDL II promoter in vivo. *Nucleic Acids Res* 19: 33-41.
- 278) Liu Y, Teng CT. (1992) Estrogen response module of the mouse lactoferrin gene contains overlapping chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor and estrogen receptor-binding elements. *Mol Endocrinol* 6: 355-64.
- 279) Schoorlemmer J, van Puijenbroek A. (1994) Characterization of negative retinoic acid response elements in the murine Oct4 promoter. *Mol Cell Biol* 14: 1122-36.
- 280) Kadowaki Y, Toyoshima K, Yamamoto T. (1992) Ear3/COUP-TF binds most tightly to a response element with tandem repeats separated by one nucleotide. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 492-98.
- 281) Burbach JPH, da Silva SL, Cox JJ, Adan RAH, Cooney AJ, Tsai MJ, Tsai SY. (1994) Repression of estrogen-dependent stimulation of the oxytocin gene by COUP transcription factor I. *J Biol Chem* 269: 15046-53.
- 282) Chan S, Xu N, Niemeyer CC, Bone JR, Flytzanis CN. (1992) SpCOUP-TF: a sea urchin member of the steroid/thyroid hormone receptor family. *Proc Natl Acad USA* 89: 10568-72.
- 283) Lu XP, Salbert G, Pfahl M. (1994) An evolutionary conserved COUP-TF binding element in a neural-specific gene and COUP-TF expression patterns support a major role for COUP-TF in neural development. *Mol Endocrinol* 8: 1774-88.
- 284) Cooney AJ, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai MJ. (1991) Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor binds to a negative regulatory region in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* 65: 2853-60.

285) Lazennec G, Kern L, Valotaire Y, Salbert G. (1997) The nuclear orphan receptors COUP-TF and ARP-1 positively regulate the trout estrogen receptor gene through enhancing autoregulation. *Mol Cell Biol* 17: 5053-66.

286) Carter ME, Gulick T, Moore DD, Kelly DP. (1994) A pleiotropic element in the medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene promoter mediates transcription regulation by multiple nuclear receptor transcription factors and defines novel receptor-DNA binding motifs. *Mol Cell Biol* 14: 4360-72.

287) Cooney AJ, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai MJ. (1992) Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimer binds to different GGTC A response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D₃, thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol Cell Biol* 12: 4153-63.

288) Schröder M, Danielsson C, Wiesenberg I, Carlberg C. (1996) Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. *J Biol Chem* 271: 19732-36.

289) Klinge CM, Silver BF, Driscoll MD, Sathya G, Bambara RA, Hilf R. (1997) Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor interacts with estrogen receptor, binds to estrogen response elements and half-sites, and inhibits estrogen-induced gene expression. *J Biol Chem* 272: 31465-74.

290) Qiu YH, Cooney AJ, Kuratani S, DeMayo FJ, Tsai SY, Tsai MJ. (1994) Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system: evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4451-55.

291) Lopes Da Silva S, Van Horsen AM, Chang C, Burbach JP. (1995) Expression of nuclear hormone receptors in the rat supraoptic nucleus. *Endocrinology* 136: 2276-83.

- 292) Jonk LJC, De Jonge MEJ, Vervaart JMA, Wissink S, Kruijer W. (1994) Isolation and developmental expression of retinoic-acid-induced genes. *Dev Biol* 161: 604-14.
- 293) Soosaar A, Neuman K, Nornes HO, Neuman T. (1996) Cell type specific regulation of COUP-TF II promoter activity. *FEBS Let* 391: 95-100.
- 294) Echelard Y, Epstein DJ, St-Jaques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNA polarity. *Cell* 75: 1417-30.
- 295) Lutz B, Kuratani S, Cooney A, Wawersik S, Tsai SY, Eichele G, Tsai MJ. (1994) Motor neuron-specific expression of the orphan receptor COUP-TF during early spinal cord development. *Development* 120: 25-36.
- 296) Krishnan V, Elberg G, Tsai MJ, Tsai SY. (1997) Identification of a novel sonic hedgehog response element in the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II promoter. *Mol Endocrinol* 11: 1458-66.
- 297) Krishnan V, Pereira FA, Qiu Y, Chen CH, Beachy PA, Tsai SY, Tsai MJ. (1997) Mediation of sonic Hedgehog-induced expression of COUP-TFII by a protein phosphatase. *Science* 278: 1947-50.
- 298) Anderson GW, Larson RJ, Oas DR, Sandhofer CR, Schwartz HL, Mariash CN, Oppenheimer JH. (1998) Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) modulates expression of the Purkinje cell protein-2 gene. *J Biol Chem* 273: 16391-99.
- 299) Olsen EN. (1993) Signal transduction pathways that regulate skeletal muscle gene expression. *Mol Endocrinol* 7: 1369-78.

- 300) Muscat GEO, Rea S, Downes M. (1995) Identification of a regulatory function for an orphan receptor in muscle: COUP-TF II affects the expression of the myoD gene family during myogenesis. *Nucleic acids Res* 23: 1311-18.
- 301) Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, Kurokawa M, Mitani K, Nishida J. *et al.* (1995) An acute myeloid leukemia gene, AML 1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *Embo J* 14: 341-50.
- 302) Ahn MY, Huang G, Bae SC, Wee HJ, Kim WY, Ito Y. (1998) Negative regulation of granulocytic differentiation in the myeloid precursor cell line 32Dcl3 by ear-2, a mammalian homolog of drosophila seven-up, and a chimeric leukemogenic gene, AML1/ETO(MTG8). *Proc Natl Sci USA* 95: 1812-17.
- 303) Wu Q, Li Y, Liu R, Agadir A, Lee MO, Liu Y, Zhang XK. (1997) Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. *EMBO J* 16: 1656-69.
- 304) Power RF, Mani SK, Codina J, Conneely OM, O'Malley BW. (1991) Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 254: 1636-39.
- 305) Sawaya BE, Rohr O, Aunis D, Schaeffer E. (1996) Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, a transcriptional activator of HIV-1 gene expression in human brain cells. *J Biol Chem* 271: 23572-76.
- 306) Qiu Y, Pereira FA, DeMayo FJ, Lydon JP, Tsai SY, Tsai MJ. (1997) Null mutation of mCOUP-TFI results in defects in morphogenesis of the glossopharyngeal ganglion, axonal projection, and arborization. *Genes Dev* 11: 1925-37.
- 307) Hertz R, Magenheimer J, Berman I, Bar-Tana J. (1998) Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4a. *Nature* 392: 512-16.

308) Cooney AJ, Leng X, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai MJ. (1993) Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *J Biol Chem* 268: 4152-60.

309) Kliewer SA, Umesono K, Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Evans RM. (1992) Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1448-52.

310) Tran PBV, Zhang XK, Salbert G, Hermann T, Lehmann JM, Pfahl M. (1992) COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways. *Mol Cell Biol* 12: 4666-76.

311) Wehrenberg U, Ivell R, Jansen M, von Goedecke S, Walther N. (1994) Two orphan receptors binding to a common site are involved in the regulation of the oxytocin gene in the bovine ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1440-44.

312) Bakke M, Lund J. (1995) Mutually exclusive interactions of two nuclear orphan receptors determine activity of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive sequence in the bovine CYP17 gene. *Mol Endocrinol* 9: 327-39.

313) Schaeffer E, Guillou F, Part D, Zakin MM. (1993) A different combination of transcription factors modulates the expression of the human transferrin promoter in liver and sertoli cells. *J Biol Chem* 268:23399-408.

314) Sugawara A, Yen PM, Apriletti JW, Ribeiro RCJ, Sacks DB, Baxter JD, Chin WW. (1994) Phosphorylation selectively increases triiodothyronine receptor homodimer binding to DNA. *J Biol Chem* 269: 433-37.

315) Liu Y, Yang N, Teng CT. (1993) COUP-TF acts as a competitive repressor for

estrogen receptor-mediated activation of the mouse lactoferrin gene. *Mol Cell Biol* 13: 1836-46.

316) Yu RN, Ito M, Jameson JL. (1998) The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (Steroidogenic Factor-1) and inhibited by COUP-TF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-transcription Factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. *Mol Endocrinol* 12: 1010-22.

317) Mangelsdorf DJ, Evans RM. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83: 841-50.

318) Berrodin TJ, Marks MS, Ozato K, Linney E, Lazar MA. (1992) Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein. *Mol Endocrinol* 6: 1468-78.

319) Casanova J, Helmer E, Selmi-Ruby S, Oi JS, Au-Fliegner M, Desai-Yajmih V, Koudinova N, Yarm F, Raaha BM, Samuels HH. (1994) Functional evidence for ligand dependent dissociation of thyroid hormone and retinoic acid receptors from an inhibitory cellular factor. *Mol Cell Biol* 14: 5756-65.

320) Inc NH, Beekman JM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. (1992) Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J Biol Chem* 267: 17617-23.

321) Tsai SY, Sagami LH, Wang LH, Tsai MJ, O'Malley BW. (1987) Interactions between a DNA-binding transcription factor (COUP) and a non-DNA binding factor (S300-II). *Cell* 50: 701-09.

322) Baniahmad A, Ha I, Reinberg D, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. (1993) Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target

gene derepression and activation by thyroid hormone. Proc Natl Acad Sci USA 90: 8832-36.

323) Leng X, Cooney AJ, Tsai SY, Tsai MJ. (1996) Molecular mechanisms of COUP-TF mediated transcriptional repression: evidence for transrepression and active repression. Mol Cell Biol 16: 2332-40.

324) Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R *et al.* (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature 377: 397-404.

325) Chen JD, Evans RM. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature 377: 454-57.

326) Shibata H, Nawaz Z, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai MJ. (1997) Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TF I) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT).

327) Bailey PJ, Dowhan DH, Franke K, Burke LJ, Downes M, Muscat GEO. (1997) Transcriptional repression by COUP-TF II is dependent on the C-terminal domain and involves the N-CoR variant, RIP13d1.

328) Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Grnemyer H, Moras D. (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. Nature 375: 377-82.

329) Rottman JN, Gordon JI. (1993) Comparison of the patterns of expression of rat intestinal fatty acid binding protein/human growth hormone fusion genes in cultured intestinal cell lines and in gut epithelium of transgenic mice. J Biol Chem 268: 11994-2002.

330) Kadowaki Y, Toyoshima K, Yamamoto T. (1995) Dual transcriptional control by Ear3/COUP: negative regulation through the DR1 direct repeat and positive regulation through a sequence down stream of the transcriptional start site of the mouse mammary tumor virus promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4432-36.

331) Power SC, Cereghini S. (1996) Positive regulation of the vHNF1 promoter by the orphan receptors COUP-TFI/Ear3 and COUP-TFII/Arp1. *Mol Cell Biol* 778: 91.

332) Kimura A, Nishiyori A, Murakami T, Tsukamoto T, Hata S, Osumi T *et al.* (1993) Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) represses transcription from the promoter of the gene for ornithine transcarbamylase in a manner antagonistic to hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4). *J Biol Chem* 268: 11125-33.

333) Hall RK, Sladek FM, Granner DK. (1995) The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 412-16.

334) Rodriguez JC, Ortiz JA, Hegardt FG, Haro D. (1997) Chicken ovalbumin upstream-promoter transcription factor (COUP-TF) could act as a transcriptional activator or repressor of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene. *Biochem J* 326: 587-92.

335) Gaudet F, Ginsburg GS. (1995) Transcriptional regulation of the cholesteryl ester transfer protein gene by the orphan nuclear hormone receptor apolipoprotein A1 regulatory protein-1. *J Biol Chem* 270: 29916-22.

336) Marcus SL, Winrow CJ, Capone JP, Rachubinski RA. (1996) A p56^{lck} ligand serves as a coactivator of an orphan nuclear hormone receptor. *J Biol Chem* 271: 27197-200.

337) Clapp C, Lopez-Gomez FJ, Nava G, Corbacho A, Torner L, Macotela Y *et al.* (1998) Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence

for autocrine effects. *J Endocrinol* 158: 137-44.

338) Reynolds C, Montone KT, Powell CM, Tomaszewski JE, Clevenger CV. (1997) Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinomas. *Endocrinol* 138: 5555-60.

339) Clevenger CV, Chang WP, Ngo W, Pasha TLM, Montone KT, Tomaszewski JE. (1995) Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinomas. *Am J Path* 146: 695-705.

340) Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. (1991) The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrinol Rev* 12: 235-51.

341) Wells JA, De Vos AM. (1996) Hematopoietic receptor complexes. *Annu Rev Biochem* 65: 609-34.

342) Ali S, Edery M, Pellegrini I, Lesueur L, Paly J, Djiane J, Kelly PA. (1992) The Nb2 form of prolactin receptor is able to activate a milk protein gene promoter. *Mol Endocrinol* 6: 1242-48.

343) Chiu S, Koos RD, Wise PM. (1992) Detection of prolactin receptor (PRL-R) mRNA in the rat hypothalamus and pituitary gland. *Endocrinology* 130: 1747-49.

344) Morel G, Ouhtit A, Kelly PA. (1994) Prolactin receptor immunoreactivity in rat anterior pituitary. *Neuroendocrinol* 59: 78-84.

345) Nagano M, Kelly PA. (1994) Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. *J Biol Chem* 269: 13337-45.

346) Lebrun JJ, Ali S, Sofer L, Ullrich A, Kelly PA. (1994) Prolactin-induced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the prolactin receptor and its associated

tyrosine kinase. *J Biol Chem* 269: 14021-26.

347) Goupille O, Daniel N, Bignon C, Jolivet G, Djiane J. (1997) Prolactin signal transduction to milk protein genes: carboxy-terminal part of the prolactin receptor and its tyrosine phosphorylation are not obligatory for Jak2 and Stat 5 activation. *Mol Cell Endocrinol* 127: 155-69.

348) Pezet A, Ferrag F, Kelly PA, Edery M. (1997) Tyrosine docking sites of the rat prolactin receptor required for association and activation of Stat5. *J Biol Chem* 272: 25043-50.

349) Hennighausen L, Robinson GW, Wagner KU, Liu X. (1997) Prolactin signaling in mammary gland development. *J Biol Chem* 272: 7567-69.

350) Schindler C, Darnell JE. (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: The JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64: 621-51.

351) Decker T, Kovarik P, Meinke A. (1997) GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interf Cyt Res* 17: 121-34.

352) Reichlin S. (1992) Neuroendocrinology (chap 5) dans "Textbook of endocrinology", Wilson JD and Foster DW. Eds, Saunders (Philadelphia, Pen., USA), p.p.: 135-219.

353) Villalobos C, Nunez L, Frawley LS, Garcia-Sancho J, Sanchez A. (1997) Multi-responsiveness of single anterior pituitary cells to hypothalamic-releasing hormones: acellular basis for paradoxical secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14132-37.

354) Van Cauter E, L'Hermite M, Copinschi G *et al.* (1981) Quantitative analysis of spontaneous variations of plasma prolactin in normal man. *Am J Physiol* 241: E355-63.

355) Thorner MO, Vance ML, Horvath E, Kovacs K. (1992) The anterior pituitary (chap 6)

dans "Textbook of endocrinology", Wilson JD and Foster DW. Eds, Saunders (Philadelphia, Pen., USA), p.p.: 221-310.

356) Chen CL, Amenomori Y, Lu KH, Voogt JL, Meites J. (1970) Serum prolactin levels in rats with pituitary transplants or hypothalamic lesions. *Neuroendocrinology* 6: 220-27.

357) Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Hyde JF. (1989) Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog Neurobiol* 33: 399-447.

358) Collu R. (1989) Neuroendocrine control of pituitary hormone secretion. *Pediatric Endocrinology*, second edition. Collu R, Ducharme JR, Guyda HJ. eds. Raven Press, LTD., New York.

359) Lamberts SWJ, Macleod RM. (1990) Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 70: 279-318.

360) Nansel DD, Gudelski GA, Reymond MJ, Neaves WB, Porter JC. (1981) A possible role for lysosomes in the inhibitory action of dopamine on prolactin release. *Endocrinology* 108: 896.

361) Burriss TP, Nguyen DN, Smith SG, Freeman ME. (1992) The stimulatory and inhibitory effects of dopamine on prolactin secretion involve different G-proteins. *Endocrinology* 130: 926-32.

362) Burriss TP, Stringer LC, Freeman ME. (1991) Pharmacologic evidence that a D2 receptor subtype mediates dopaminergic stimulation of prolactin secretion from the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 54: 175-83.

363) Moore KE. (1987) Interactions between prolactin and dopaminergic neurons. *Biol Reprod* 36: 47-58.

- 364) Arbogast LA, Voogt JL. (1997) Prolactin (PRL) receptors are colocalized in dopaminergic neurons in fetal hypothalamic cell cultures: effect of PRL on tyrosine hydroxylase activity. *Endocrinology* 138: 3016-23.
- 365) Arbogast LA, Voogt JL. (1996) The responsiveness of tuberoinfundibular dopaminergic neurons to prolactin feedback is diminished between early lactation and midlactation in the rat. *Endocrinology* 137: 47-54.
- 366) Melis GB, Paoletti AM, Mastrapasqua NM, *et al.* (1982) The effects of the GABAergic drug, sodium valproate, on prolactin secretion in normal and hyperprolactinemic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 54: 485-9.
- 367) Kimura N, Hayafuji C, Konagaya H, Takahashi K. (1986) 17 β -Estradiol induces somatostatin (SRIF) inhibition of prolactin release and regulates SRIF receptors in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 119: 1028-36.
- 368) Yu WH, Seeburg PH, Nikolics K, McCann SM. (1988) Gonadotropin-releasing hormone-associated peptide exerts a prolactin-inhibiting and weak gonadotropin-releasing activity in vivo. *Endocrinology* 123: 390-95.
- 369) Sakai DD, Helms S, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Rottman FM, Yamamoto KR. (1988) Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev* 2: 1144-54.
- 370) Maurer RA. (1982) Thyroid hormone specifically inhibits prolactin synthesis and decreases prolactin messenger ribonucleic acid levels in cultured pituitary cells. *Endocrinology* 110: 1507-14.
- 370a) Prager D, Weber MM, Gebremedhin S, Melmed S. (1993) Interaction between insulin and thyroid hormone in rat pituitary tumor cells: insulin attenuates tri-iodothyronine-induced growth hormone mRNA levels. *J Endocrinol* 137: 107-14.

371) Coleman DT, Chen X, Sassaroli M, Bancroft C. (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates prolactin promoter activity via a protein kinase A-mediated pathway that is independent of the transcriptional pathway employed by thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 137: 1276-85.

372) Vrontakis ME, Peden LM, Duckworth ML, Friesen HG. (1987) Isolation and characterization of a complementary DNA (galanin) clone from Estrogen-induced pituitary tumor messenger RNA. *J Biol Chem* 262: 16755-58.

373) Steinmetz R, Gutierrez-Hartmann A, Bigsby RM, Ben-Jonathan N. (1994) Activation of the prolactin promoter in transfected GH3 cells by posterior pituitary cells. *Endocrinology* 135: 2737-41.

374) Morgan PJ, Webster CA, Mercer JG, Ross AW, Hazlerigg DG, MacLean A, Barrett P. (1996) The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology* 137: 4018-26.

375) Hnasko R, Khurana S, Shackleford N, Steinmetz R, Low MJ, Ben-Jonathan N. (1997) Two distinct pituitary cell lines from mouse intermediate lobe tumors: a cell that produces prolactin-regulating factor and a melanotroph. *Endocrinology* 138: 5589-96.

376) Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S *et al.* (1998) A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 393: 272-76.

377) Franks S. (1983) Regulation of prolactin secretion by oestrogens: physiological and pathological significance. *Clin Sci Lond* 65: 457-62.

378) Demarest KT, Riegle GD, Moore KE. (1984) Long-term treatment with estradiol induces reversible alterations in tuberoinfundibular dopaminergic neurons: a decreased responsiveness to prolactin. *Neuroendocrinology* 39: 193-99.

- 379) Eikenburg DC, Ravitz AJ, Gudelsky GA, Moore KE. (1977) Effects of oestrogen on prolactin and tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *J Neural Transm* 40: 235-41.
- 380) Raymond VM, Beaulieu M, Labrie F, Boissier J. (1978) Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. *Science Wash. DC* 200: 1173-75.
- 381) De Lean A, Ferland L, Drouin J, Kelly P, Labrie F. (1977) Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormone. *Endocrinology* 100: 1496-1501.
- 382) Delidow BC, Bilis WM, Agarwal P, White BA. (1991) Inhibition of prolactin gene transcription by transforming growth factor-b in GH3 cells. *Mol Endocrinol* 5: 1716-22.
- 383) De A, Morgan TE, Speth RC, Boyadjieva N, Sarkar DK. (1996) Pituitary lactotrope expresses transforming growth factor b (TGFb) type II receptor mRNA and protein and contains 125I-TGFb1 binding sites. *J Endocrinol* 149: 19-27.
- 384) Krown KA, Wang YF, Ho TWC, Kelly PA, Walker AM. (1992) Prolactin isoform 2 as an autocrine growth factor for GH3 cells. *Endocrinology* 131: 595-602.
- 385) Billis WM, Delidow BC, White BA. (1992) Posttranscriptional regulation of prolactin (PRL) gene expression in PRL-deficient pituitary tumor cells. *Mol Endocrinol* 6: 1277-84.
- 386) Fletcher WH, Anderson NC, Everett JW. (1975) Intercellular communication in the rat anterior pituitary gland. *J Cell Biol* 67: 469-76.
- 387) Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C *et al.* (1996) Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology* 137: 3356-67.

- 388) Hoefler MT, Heiman ML, Ben-Jonathan N. (1984) Prolactin secretion by cultured anterior pituitary cells: influence of culture conditions and endocrine status of the pituitary donor. *Mol Cell Endocrinol* 35: 229-35.
- 389) Ben-Jonathan N, Liu JW. (1992) *Trends Endocrinol Metab* 3: 254-58.
- 390) Carmeliet P, Maertens P, Deneef C. (1989) Stimulation and inhibition of prolactin release from rat pituitary lactotrophs by the cholinomimetic carbachol in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 63: 121-31.
- 391) Shull JD, Pennington KL. (1993) Changes in population density elicit quantitative changes in the estrogen receptor in intact GH4C1 pituitary tumor cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44: 53-60.
- 392) Abraham EJ, Faught WJ, Frawley S. (1996) Intercellular communication: relative importance of cellular adhesion and paracrine signaling to hormonal gene expression. *Endocrinology* 137: 4050-53.
- 393) Abraham EJ, Villalobos C, Frawley LS. (1998) Effects of cellular interactions on calcium dynamics in prolactin-secreting cells. *Endocrinology* 139: 2988-93.
- 394) Krown KA, Wang YF, Walker AM. (1994) Autocrine interaction between prolactin and its receptor occurs intracellularly in the 235-1 mammotroph cell line. *Endocrinology* 134: 1546-52.
- 395) Boockfor FR, Frawley LS. (1987) Functional variations among prolactin cells from different pituitary regions. *Endocrinology* 120: 874-79.
- 396) Oliver C, Mical RS, Porter JC. (1977) Hypothalamic-pituitary vasculature: evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk. *Endocrinology* 101: 598-604.

- 397) Giss BJ, Walker AM. (1985) Mammoth autoregulation: intracellular fate of internalized prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 42: 259-67.
- 398) Morel G, Ouhtit A, Kelly PA. (1994) Prolactin receptor immunoreactivity in rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 59: 78-84.
- 399) Voogt JL, Ganong WF. (1974) In vitro evidence against the anterior pituitary as a site of negative feedback of prolactin. *Proc Soc Exp Biol Med* 147: 795-97.
- 400) Maltz BL, Buckman MT, Peake GT. (1978) Studies on autoregulation of prolactin secretion from perfused rat pituitary glands in the basal and thyrotropin-releasing hormone-stimulated states. *Endocrinology* 103: 480-85.
- 401) Vician L, Lieberman ME, Gorski J. (1982) Evidence that autoregulation of prolactin production does not occur at the pituitary level. *Endocrinology* 110: 722-26.
- 402) Herbert DC, Ishikawa H, Rennels EG. (1979) Evidence for the autoregulation of hormone secretion by prolactin. *Endocrinology* 104: 97-100.
- 403) Melmed S, Carlson HE, Briggs J, Hershman JM. (1980) Autofeedback of prolactin in cultured prolactin-secreting pituitary cells. *Hormone Res* 12: 340-44.
- 404) Zacur HA, Mitch WE, Tyson JE, Ostrow PT, Foster GV. (1982) Autoregulation of rat pituitary prolactin secretion demonstrated by a new perfusion method. *Am J Physiol* 242 (Endocrinol Metab. 5): E226-E233.
- 405) Kadowaki J, Ku N, Oetting WS, Walker AM. (1984) Mammoth autoregulation: uptake of secreted prolactin and inhibition of secretion. *Endocrinology* 114: 2060-67.
- 406) Hosojima H, Wyche JH. (1985) Prolactin control of growth and prolactin

autoregulation in cultured human pituitary cells. *Hormone Res* 21: 240-45.

407) Frawley LS, Clark CL. (1986) Ovine prolactin (PRL) and dopamine preferentially inhibit PRL release from the same subpopulation of rat mammotropes. *Endocrinology* 119: 1462-66.

408) Bentley AM, Wallis M. (1987) In-vitro evidence for the autoregulation of prolactin secretion at the level of the pituitary gland in the rat. *J Endocr.* 115: 13-18.

409) Nagano M, Kelly PA. (1994) Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. *J Biol Chem* 269: 13337-45.

410) Nagano M, Chastre E, Choquet A, Bara J, Gespach C, Kelly PA. (1995) Expression of prolactin and growth hormone receptor genes and their isoforms in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 31: G431-42.

411) Ho TWC, Greenan JR, Walker AM. (1989) Mammothroph autoregulation: the differential roles of the 24 K isoforms of prolactin. *Endocrinology* 124: 1507-14.

412) Sinha YN. (1995) Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrinol Rev* 16: 354-69.

413) Luo G, Yu-Lee LY. (1997) Transcriptional inhibition by Stat-5. *J Biol Chem* 272: 26841-49.

414) Zhong L, Parmer TG, Robertson MC, Gibori G. (1997) Prolactin-mediated inhibition of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and the tyrosine kinase system. *Biochem Biophys Res Comm* 235: 587-92.

415) Castano JP, Faught WJ, Glavé EE, Russell BS, Frawley LS. (1997) Discordance of prolactin gene transcription, mRNA storage, and hormone release in individual

mammotropes. *Am J Physiol* 272 (endocrinol metab 35): E390-96.

416) Hazel TG, Nathans D, Lau LF. (1988) A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8444-8.

417) Milbrandt J. (1988) Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1: 183-8.

418) Maira M, Alexandre P, Drouin J. (1998) Signalisation par le récepteur orphelin Nur77: nouveau mécanisme d'action et antagonisme par les glucocorticoïdes. *Med Sci* 14: 1317-21.

419) Kornhauser JM, Mayo KE, Takahashi JS. (1996) Light, immediated-early genes, and circadian rhythms. *Behav Genet* 26: 221-40.

420) Morris ME, Viswanathan N, Kuhlman S, Davis FC, Weitz CJ. (1998) A screen for genes induced in the suprachiasmatic nucleus by light. *Science* 279: 1544-47.

421) Maruyama K, Tsakada T, Ohkura N, Bando S, Hosono T, Yamaguchi K. (1998) The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily. *Int J Onco* 12: 1237-43.

422) Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10887-90.