



Impact de la signalisation constitutive du récepteur de la prolactine sur la physiopathologie mammaire

Ibtissem Cherifi

► To cite this version:

Ibtissem Cherifi. Impact de la signalisation constitutive du récepteur de la prolactine sur la physiopathologie mammaire. Physiologie [q-bio.TO]. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T061 . tel-01195990

HAL Id: tel-01195990

<https://theses.hal.science/tel-01195990>

Submitted on 8 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2014

**THÈSE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES**

Discipline: **Médecine**
Spécialité: **Physiopathologie**

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

Présentée par
Mademoiselle Ibtissem CHERIFI

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

**Impact de la signalisation constitutive du récepteur de la
prolactine sur la physiopathologie mammaire**

Thèse dirigée par le
Dr. Vincent GOFFIN
Soutenue le **26 novembre 2014**

JURY:

Mr le Pr Philippe Touraine
Mme le Dr Eve Devinoy
Mme le Dr Marina Glukhova
Mr le Dr Jacques Medioni
Mr le Dr Ivan Bièche
Mr le Dr Vincent Goffin

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : Mme Eve Devinoy, Mme Marina Glukhova, M. Jacques Medioni, M. Ivan Bièche et M. Philippe Touraine pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements vont aussi à mon directeur de thèse, M. Vincent Goffin qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et m'a permis de mener à bien ma thèse et de m'avoir aidée à rédiger ce manuscrit.

Un très grand merci à toi, Jacques-Emmanuel. Tu as été d'un très grand soutien pour moi tout au long de ces deux dernières années. Grâce à tes idées, ta présence et ton implication, tu m'as permis d'orienter mon projet dans la bonne direction et d'écrire cette histoire.

Je remercie aussi tous les membres de mon équipe, en commençant par toi, ma Flo. Je te remercie de m'avoir appris à disséquer des souris, merci d'avoir toujours répondu à mes questions à chaque fois que je débarquais dans ton bureau et te disais « Flo, je peux t'embêter », mais en plus d'avoir toujours été disponible quand il s'agissait du laboratoire, tu as toujours été présente pour moi dans les moments de doutes, les moments de stress. Nos discussions de midi avec Nat, Julie et Mamia vont me manquer, tu es une personne géniale et je t'adore.

Merci à toi Marie, de m'avoir initiée à la culture cellulaire et de m'avoir apporté ton aide à certains moments de ma thèse.

Ma Chi, merci pour ta bonne humeur, pour tous tes câlins et bisous, mais aussi merci pour ton aide et ton soutien au cours de ma thèse.

Natascha, merci de m'avoir aidé à chaque fois que j'avais un souci informatique du style « je ne vais pas supprimer mes datas du CD-Rom », merci pour tous les fous rires que l'on a partagés ensemble.

Aurélie, merci de m'avoir appris à faire des immunofluorescences, merci d'avoir été une source de fous rires dans notre bureau et cela pendant un an et aussi merci de « m'avoir sauvé la vie ».

Julie et Mamia, merci pour nos séances de marche quotidiennes pendant six mois, mais aussi pour votre soutien.

Lucila, merci pour tes corrections en anglais et pour avoir toujours été disponible quand j'avais des questions à te poser.

Thierry, merci pour tes taquineries et pour les moments passés en pièce de culture ensemble.

Sophie, merci de m'avoir guidée au tout début de ma thèse.

Julie G, merci et c'est bientôt ton tour aussi donc courage !

Sabrina et Marina, nous avons intégré le laboratoire toutes les trois en même temps, nous avons partagé le même bureau et beaucoup d'autres choses et, au fil du temps, nous sommes devenues de très bonnes amies et j'en suis très fière.

Un grand merci à Lili et Céline qui ont toujours tout fait pour nous faciliter notre travail.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse, et qui ont fait que ces trois années passées à leur côté soient agréables : Aurore, Aurélien, Bouchra, James, Marion (ma gazelle de compète), Ivan, Yassmina.

Je remercie mes amis : Amina, Youcef, Meriem, Rafik, Amine, Amel, Hakima et Ziene pour leur soutien tout au long de ma thèse.

Mes remerciements vont aussi à mes tantes chéries, à mes oncles, à mes cousins et cousines pour m'avoir soutenue et avoir toujours cru en moi.

Merci à toi ma Kawtar, pour ton soutien et tes encouragements.

Un très grand merci à mes deux frères Mohammed el Ghaouti et Fadlallah pour leur soutien, leur amour, leur présence et leurs encouragements.

Mille mercis à toi, Ahmed, de croire toujours en moi, de me booster, de me soutenir et d'être toujours à mes côtés.

Ces remerciements ne peuvent s'achever sans s'adresser à ma première fan « Ma maman ». Tu es mon pilier, ma force, ma raison de vivre. Tu as toujours été présente pour moi à chaque instant, tu as cru en moi quand moi-même je n'y croyais plus. Je te dédie cette thèse car, sans toi, je ne serai jamais arrivée là où je suis.

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ARN	acide ribonucléique
Cav	cavéoline
CK	cytokeratine
C-terminal	COOH terminal
EGF	epidermal growth factor
EGFR	récepteur de l'EGF
EMT	epithelial mesenchymal transition
EPO	érythropoïétine
ER	récepteur des estrogènes
ERE	élément de réponse aux estrogènes
GATA3	GATA binding protein 3
GH	growth hormone
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
H	humain
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
IF	immunofluorescence
IHC	immunohistochimie
IL	interleukine
kDa	kiloDalton
KI	knock-in
KO	knock-out
M	mouse
MAPK	mitogen activated protein kinase
N-terminal	NH ₂ -terminal
pb	paires de base
PGK	phospho glycerate kinase
PAM	polyadénomatose mammaire
PKC	protein kinase C
PI3K	phosphatidyl inositol 3 kinase
PIKE-A	PI3kinase enhancer-A
PR	récepteur de la progestérone
PRL	prolactine
PRLR	récepteur de la prolactine

PSA	prostatic specific antigen
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTP	protein tyrosine phosphatase
SH2	Src homology domain 2
SMA	smooth muscle actin
SNP	single nucleotide polymorphism
SOCS	suppressor of cytokine signaling
Stat	signal transducer and activator of transcription
TIDA	tuberoinfundibular dopamine
TM	transmembrane domain
TRH	thyrotropin releasing hormone
Vim	vimentine
VEGF	vascular endothelial growth factor
WAP	whey acidic protein
WT	wild type

Tables des matières

REMERCIEMENTS.....	2
RESUME.....	4
LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
TABLE DES MATIERES.....	7
INTRODUCTION	11
1. La glande mammaire.....	12
1 .1 Chez l’Homme.....	13
1 .2 Chez la souris	13
2. Structure de la glande mammaire de la souris.....	14
3. L'épithélium mammaire	15
3.1 Le compartiment glandulaire	16
3.2 Les lobes et lobules	16
3.3 Les canaux galactophores	17
3.4 Les alvéoles	17
3.5 Le stroma	17
4. Etapes clés du développement de la glande mammaire.....	17
5. Les facteurs impliqués dans le développement mammaire	19
5.1 Les œstrogènes	19
5.2 La progestérone	19
5.3 La prolactine	20
5.4 Les facteurs de croissance	20
5.4.1 IGF-1	20
5.4.2 L' Epidermal Growth Factor (EGF)	20
5.5 Matrice extracellulaire dans la glande mammaire	20
5.5.1 Le collagène	21
6. Pathologies de la glande mammaire	23
6.1 La polyadenomatose mammaire.....	23
6.2 Le cancer du sein.....	23
6.2.1 Les sous-types moléculaires des cancers du sein.....	24
6.2.1.1 Les tumeurs luminales	24
6.2.1.2 Les tumeurs "basal-like"	25

La prolactine et son récepteur.....	26
1. La prolactine	27
1.1 Le gène de la PRL humaine.....	27
1.2 Structure de la Prolactine.....	28
1.3 Régulation de la sécrétion hypophysaire de prolactine.....	29
1.4 Les niveaux physiologiques de la prolactine.....	30
1.5 Fonctions biologiques de la prolactine.....	31
1.6 Actions de la Prolactine sur la glande mammaire de souris	32
2. Structure du PRLR.....	33
2.1 Les isoformes du PRLR.....	35
2.2 Le mécanisme d'activation du PRLR.....	36
2.3 Les voies de signalisation du PRLR.....	37
2.4 Régulation négative de la signalisation.....	40
3. Modèles animaux développés pour étudier l'implication de la PRL et de son récepteur dans les pathologies mammaires.....	41
3.1 Abolition du signal PRL.....	41
3.1.1 Souris KO pour la PRL.....	41
3.1.2 Souris KO pour le PRLR.....	41
3.2 Sur-activation du signal PRL.....	42
3.2.1 Souris transgéniques Met-PRL (hyperprolactinémie systémique).....	42
3.2.2 Souris WAP-PRL (hyperprolactinémie locale).....	42
3.2.3 Souris transgéniques exprimant un PRLR gain-de-fonction.....	43
4. Physiopathologie de la prolactine chez l'Homme.....	43
4.1 L'hyperprolactinémie.....	43
4.2 Le cancer du sein	44
4.3 Cancer de la prostate.....	45
5. Variants génétiques du PRLR.....	46
5.1 Données de la littérature	46
5.2 PRLR I146L.....	46
OBJECTIFS DE TRAVAIL	49
MATERIELS ET METHODES	52
1. Géotypage des souris	53
a. Extraction ADN génomique (ADNg)	53

b. PCR.....	53
2. Extraction des protéines.....	54
3. Immunoblot	55
a. Electrophorèse et transfert sur membrane des échantillons protéiques.....	55
b. Immunodétection	55
4. Extraction des ARN totaux et reverse transcription.....	56
5. PCR quantitative en temps réel (qPCR)	57
6. Analyses histologiques.....	58
a. Whole mount	58
b. Immunohistochimie (IHC) et immunofluorescence (IF).....	58
RESULTATS.....	60
I. Residue 146 Regulates Prolactin Receptor Folding, Basal Activity and Ligand-Responsiveness: Potential Implications in Breast Tumorigenesis.....	61
II. Génération des souris Knock-in hPRLR-I146L et hPRLRwt.....	62
1. Description du transgène.....	63
2. Validation de la construction in vitro	66
2.1 Expression des hPRLR.....	66
2.2 Activité biologique des hPRLR	67
2.3 L'expression du hPRLR perturbe-t-il l'activation du PRLR de souris?.....	68
3. Génération des souris transgéniques	69
4. Validations et caractérisation moléculaire du modèle.....	71
4.1 Génotypage	71
4.2 Expression de l'ARNm du hPRLR (qRT-PCR).....	72
4.3 Expression de la protéine (immunoblot).....	74
4.4 Mise en évidence du marquage hPRLR-I146L et wt par immunohistochimie.....	74
4.5 Activation de la voie de signalisation PRL:mise en évidence de l'activation de Stat5.....	77
5. Caractérisation phénotypique des souris.....	78

5.1 Analyse globale des souris transgéniques.....	78
5.2 Analyse phénotypique de la glande mammaire.....	80
5.3 Analyse histologique de la glande mammaire	80
5.3.1 Whole mounts.....	80
5.3.2 Coupes histologiques.....	82
5.3.3 Immunofluorescence.....	83
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	84
I. Développement du modèle animal.....	85
II. Rôle de la signalisation prolactine dans la tumorigenèse mammaire.....	90
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	95

INTRODUCTION

LA GLANDE MAMMAIRE

La glande mammaire est une glande exocrine tubulo-alvéolaire sécrétant le lait. Elle constitue l'une des caractéristiques morphologiques des mammifères. Cette glande subit d'importantes modifications physiologiques tout au long de la vie de la femme, en particulier à la puberté, durant le cycle menstruel, la grossesse, la lactation et après la ménopause. Ces modifications sont sous l'influence de diverses hormones.

1. La glande mammaire

1.1 Chez l'Homme

Les glandes mammaires sont au nombre de deux chez la femme. Elles sont considérées comme des glandes sudoripares modifiées qui peuvent croître ou régresser selon la période de vie de la femme. Elles sont logées à la surface des muscles grands pectoraux et dentelés antérieurs qui recouvrent la paroi antérieure du thorax entre le sternum et la limite antérieure de l'aisselle. Elles sont fixées par une membrane fibro-elastique composée de tissu conjonctif dense irrégulier. Séparée l'une de l'autre par un sillon mammaire, chacune se termine sur sa partie centrale par une protubérance pigmentée, désignée par le terme 'mamelon', comportant plusieurs orifices ou pores rapprochés menant à des canaux lactifères ou galactophores qui permettront la synthèse du lait en période de lactation. Du tissu adipeux tapisse l'intérieur de la glande et détermine la taille des seins, tout en séparant les 15 à 20 lobes indépendants en forme de grappe présents à l'intérieur de chaque glande (Figure I.1). Les lobes se subdivisent en lobules, lesquels sont enfouis dans le tissu adipeux du stroma et ont la particularité de renfermer des alvéoles (acinus). Chaque lobe possède un canal lactifère encore appelé canal galactophore qui se trouve près du mamelon et qui emmagasine une certaine quantité de lait qui sera libéré lors de la période de lactation.

1.2 Chez la souris

Contrairement à l'espèce humaine, la souris (modèle d'étude *in vivo* du laboratoire) possède cinq paires de glandes mammaires. Les glandes mammaires humaines et de souris ont des structures et fonctions similaires. Cependant, bien que de manière commune, les structures de ces deux espèces soient sensibles aux hormones, il y a des différences morphologiques au niveau des unités fonctionnelles des glandes mammaires. Chez la souris, la glande mammaire adulte quiescente ne présente qu'une structure majoritairement canalaire, comprenant peu de bourgeons alvéolaires rudimentaires qui sont formés à chaque cycle œstral. La morphogenèse lobulo-alvéolaire a lieu essentiellement au cours de chaque période de gestation.

Par ailleurs, le stroma mammaire murin est majoritairement adipeux tandis que chez la femme il est principalement fibreux. En dépit de ces quelques différences, l'organisation générale et la fonction globale des unités fonctionnelles sont conservées entre les espèces murine et humaine.

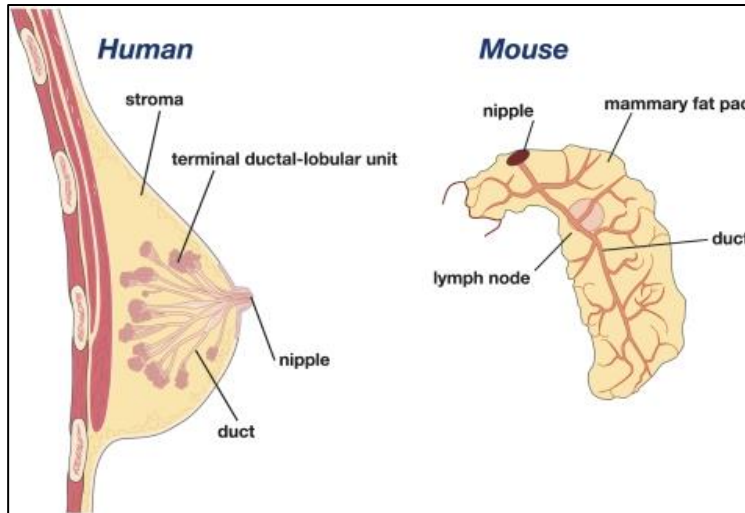


Figure I.1 : Représentation schématique de la glande mammaire humaine et de souris
(D'après Visvader 2009).

2. Structure de la glande mammaire de la souris

La souris possède cinq paires de glandes mammaires : une paire de cervicale, deux paires thoraciques, une paire abdominale et une paire inguinale (Figure I.2).

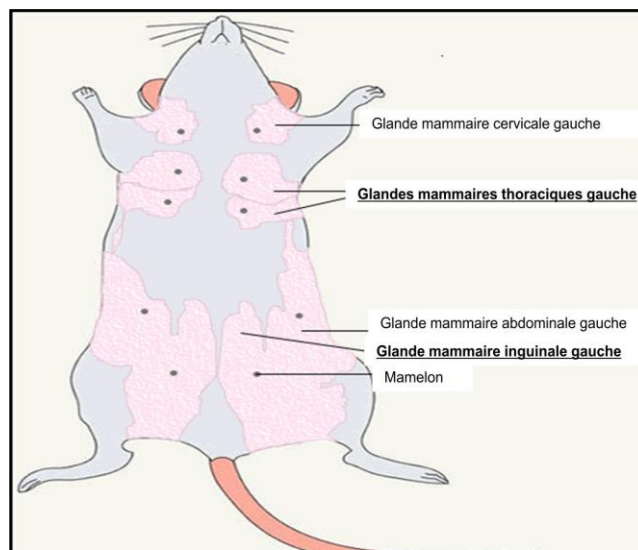


Figure I.2: Schématisation des cinq paires de glandes mammaires chez la souris.

(<http://ctrngenpath.net/static/atlas/mousehistology/Windows/femaleu/mousemammgldiagram.html>)

Le développement de la glande mammaire commence durant l'embryogenèse et n'est pas complètement terminé à la puberté. Le dimorphisme sexuel commence à peu près au douzième jour du développement embryonnaire, avec une réponse aux androgènes différente entre mâles et femelles (Sakakura et al., 1987). Ainsi, le développement de la glande mammaire chez le mâle est inhibé à ce stade alors que chez la femelle l'invasion cellulaire continue et s'accompagne d'une différenciation cellulaire formant des canaux en forme de branche dès la troisième semaine (Stange et al., 2001).

L'organisation de la glande est le produit de l'interaction de cellules épithéliales et stromales à travers un système de communication qui fait appel à la matrice extracellulaire. Par l'intermédiaire de mécanismes sécrétoires locaux autocrines et paracrines, les fibroblastes, les adipocytes et la matrice extracellulaire contribuent au développement de la glande mammaire.

3. L'épithélium mammaire

L'épithélium mammaire est organisé en une bicouche cellulaire : une couche composée de cellules épithéliales luminales sécrétrices formant le lumen mammaire et une couche de cellules basales myoépithéliales (Figure I.3).

Les cellules luminales sont des cellules hautement différenciées dont une partie est caractérisée par l'expression de récepteurs hormonaux (récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et à la prolactine). Elles sont caractérisées par l'expression de certaines cytokératines (CK8, CK18) ainsi que des facteurs de transcription spécifiques comme GATA3 (Asselin-Labat., 2007).

Ces cellules luminales sont très importantes au moment de la gestation et de la lactation car elles permettent la synthèse de protéines du lait telles que la β -caséine et WAP (Whey Acidic Protein).

Les cellules myoépithéliales expriment d'autres marqueurs spécifiques comme les cytokératines CK5 et CK14 et dès la période périnatale, des marqueurs du muscle lisse comme l' α -actine du muscle lisse (α -SMA) (Moumen et al., 2011), elles atteignent leur différenciation terminale en début de lactation. Les cellules myoépithéliales permettent le maintien de la structure de la glande mammaire en orientant les cellules luminales ; elles sont aussi impliquées dans la régulation du signal entre les cellules luminales et le stroma.

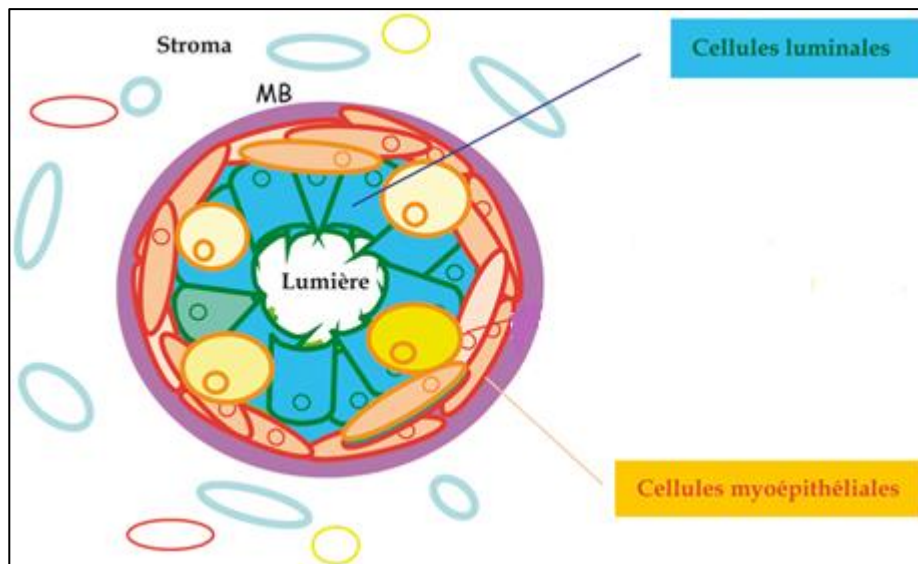


Figure I.3 : Schéma d'une coupe transversale d'un canal de la glande mammaire.

On distingue deux types de cellules : les cellules luminales, en contact avec la lumière, les cellules myoépithéliales, en contact avec la membrane basale (MB).

(http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/102/Chapitre_26.html)

3.1 Le compartiment glandulaire

Le tissu glandulaire est formé par des glandes exocrines tubulo-alvéolaires qui sécrètent le lait.

3.2 Les lobes et lobules

Chaque glande mammaire adulte est constituée de 10 à 20 lobes drainés par des canaux galactophores collecteurs « lactifères » s'ouvrant individuellement à la peau au niveau du mamelon. Chaque lobe est lui-même composé de 20 à 40 lobules, constitués chacun de 10 à 100 alvéoles, ou acini, correspondant à la partie sécrétrice de la glande. Les lobes sont séparés par du tissu conjonctif dense et sont entourés par du tissu adipeux abondant. Les lobules sont eux aussi entourés par du tissu conjonctif.

3.3 Les canaux galactophores

Appelés aussi canaux excréteurs, ils sont d'abord intralobulaires, puis interlobulaires (épithélium cubique avec présence de cellules myoépithéliales) et enfin interlobaires à épithélium pavimenteux stratifié. Chaque canal est constitué d'une couche de cellules épithéliales qui assurent la synthèse et la sécrétion du lait, et d'une couche de cellules myoépithéliales (Guiebretiere et al., 2005).

3.4 Les alvéoles

Plusieurs lobules regroupés forment une alvéole qui est entourée de tissu adipeux ; les alvéoles sont séparées l'une de l'autre par du tissu conjonctif.

L'épithélium alvéolaire est formé d'une couche unique de cellules épithéliales irriguées par leur pôle basal et d'une couche de cellules myoépithéliales contractiles qui permettent l'expulsion du lait dans la lumière des canalicules (Hennighausen et al., 2001). Les fonctions de ces deux types cellulaires s'achèvent après la lactation lors de l'involution.

3.5 Le stroma

Il représente le tissu conjonctivo-vasculaire avec un important contingent adipeux. Il joue un rôle de soutien de la glande mammaire.

4. Etapes clés du développement de la glande mammaire

La glande mammaire est un organe dont le développement et la différenciation sont sous le contrôle de multiples hormones et de facteurs de croissances. Elle se développe essentiellement après la naissance et n'atteint sa différenciation terminale qu'au moment de la gestation.

Son développement se déroule en quatre étapes :

- A l'état embryonnaire, il y a formation du système canalaire rudimentaire, qui se développe de manière très réduite lors des premières semaines post-natales.
- A la puberté ces canaux vont croître en s'allongeant, et ce de manière coordonnée avec le développement des tissus conjonctif et adipeux,
- Pendant chaque cycle oestral l'épithélium mammaire va de nouveau croître, et ainsi entraîner l'apparition de nouvelles structures appelées bourgeons terminaux (ou "end buds") (figure I.4).
- Durant la gestation et jusqu'à la fin de la lactation, des ramifications terminales prenant naissance au niveau des canaux primaires se développent et se multiplient. On note aussi l'apparition de nombreuses structures lobulo-alvéolaires le long de ces ramifications, responsables de la synthèse du lait. (Fata, et al., 2001; Sternlicht et al., 2006). A la fin de la lactation (sevrage), la glande mammaire régresse. Le processus dit « d'involution » implique l'arrêt d'expression des gènes codant les protéines du lait (caséine, lactalbumine et lactoglobuline) et la diminution du nombre de cellules épithéliales, remplacées par du tissu adipeux (figure I.5 et I.6).

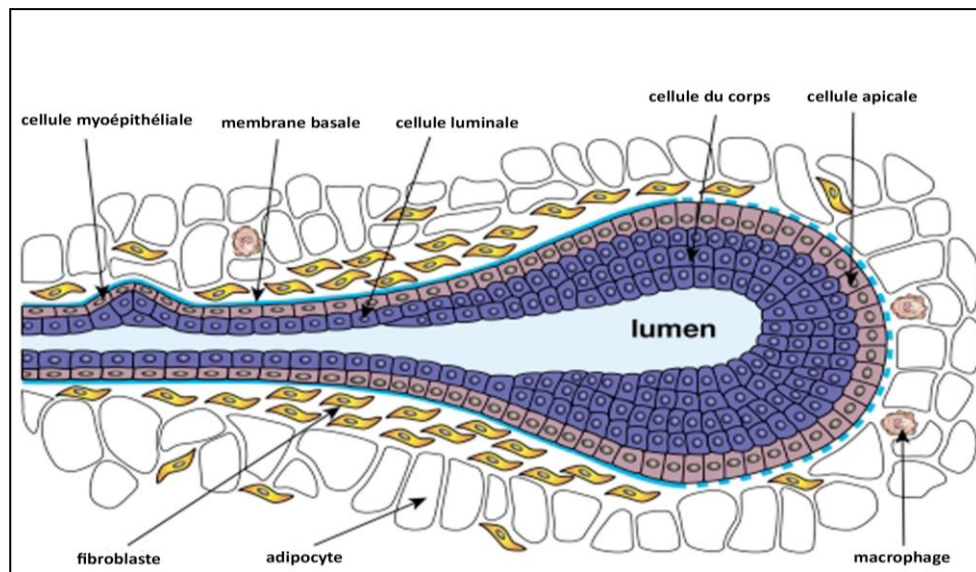


Figure I.4 : Représentation schématique d'un bourgeon terminal (Modifié d'après Visvader et al 2009)

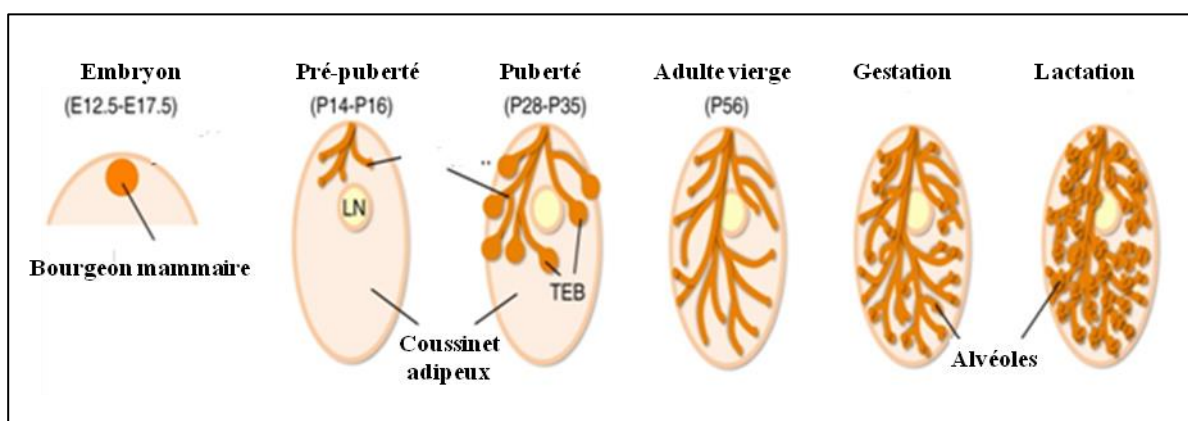


Figure I.5: Etapes clés du développement de la glande mammaire chez la souris

(Modifié d'après Van Amerongen R et al., 2012)

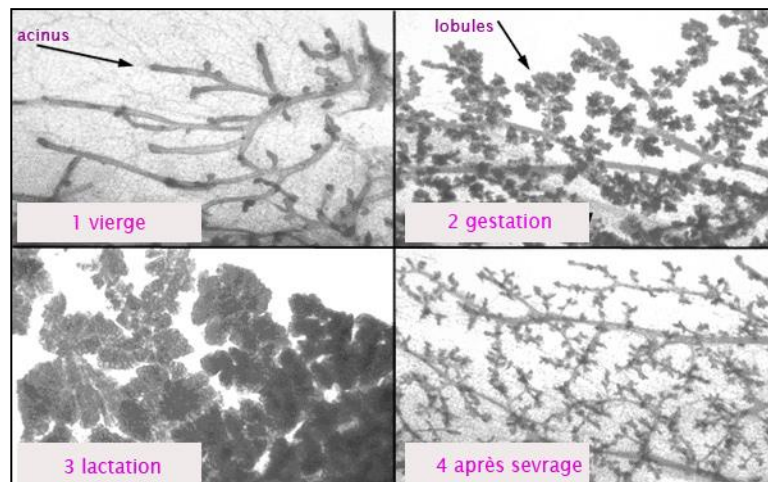


Figure I.6 : Analyse histologique de whole mount de glandes mammaires de souris à différents stades de développement post-natal

(<http://mammary.nih.gov/reviews/development/Development001/index.html>)

5. Les facteurs impliqués dans le développement mammaire

La figure I.7 et le tableau I.1 résument les principaux facteurs impliqués dans le développement de la glande mammaire, et précisent le stade de développement auxquels ils agissent. Dans la plupart des cas décrits ci-dessous, ce sont les analyses phénotypiques de souris invalidées pour ces facteurs ou leurs récepteurs qui ont permis d'obtenir ces informations.

5.1 Les œstrogènes

Les œstrogènes possèdent deux types de récepteur, ER α et ER β . L'inactivation individuelle de ces deux récepteurs a permis de montrer que seul ER α est impliqué dans le développement de la glande mammaire (Couse et al., 1997), (Krege et al., 1998). Plus précisément, les œstrogènes sont indispensables à la croissance initiale de l'épithélium mammaire, bien qu'ils jouent également un rôle dans l'établissement des ramifications secondaires et la mise en place des lobules alvéolaires (Mallepell et al., 2006).

5.2 La progestérone

Des études d'inactivation du récepteur de la progestérone (PR) chez la souris (Lydon JP, 1995 ; Briskin et al., 1998 ; Briskin et al., 2010), ont permis d'obtenir des souris femelles homozygotes pour l'absence de PR fonctionnel dont les glandes mammaires présentaient des canaux

galactophores mais pas de lobules soulignant effectivement le rôle important de la progestérone dans la différenciation terminale de la glande mammaire.

5.3 La prolactine

La prolactine (PRL) est indispensable à toutes les périodes de développement de la glande mammaire que sont la croissance de la glande, l'induction et l'entretien de la sécrétion lactée.

Pendant la période de croissance mammaire qui débute à la puberté, la prolactine est indispensable pour assurer une croissance des canaux alvéolaires. Cette action se fait en association avec les œstrogènes, la progestérone et les glucocorticoïdes.

5.4 Les facteurs de croissance

Ces facteurs de croissance sont exprimés au cours du développement de la glande mammaire et sont des promoteurs de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Ils stimulent la phosphorylation des récepteurs aux œstrogènes et participent donc indirectement à la mise en place des canaux galactophores de la glande mammaire (Gregg et al., 2004) et à la formation des bourgeons terminaux.

5.4.1 IGF-1

C'est un médiateur de l'hormone de croissance (GH) qui a un rôle prépondérant dans la croissance de nombreux organes et tissus dans la période postnatale et notamment de la glande mammaire. Chez les souris femelles mutantes IGF-I KO, la croissance des canaux galactophores au sein du coussinet adipeux est très limitée, bien que le taux en GH soit normal chez ces animaux. Ainsi les présences de GH et d'IGF-I sont importantes pour la formation post-natale de l'arbre mammaire (Richards et al., 2004).

5.4.2 L' Epidermal Growth Factor (EGF)

L'EGF augmente la synthèse de collagène de type IV et favorise ainsi l'attachement des cellules épithéliales de la glande mammaire à la membrane basale (Gayrard et al., 2007).

5.5 Matrice extracellulaire dans la glande mammaire

Dans la littérature, de nombreuses études font état de l'importance de la matrice extracellulaire composant les différents tissus. Ainsi, à l'instar des hormones, les protéines composant la matrice extracellulaire jouent aussi un rôle prépondérant dans le développement de la glande mammaire.

5.5.1 Le collagène

Le collagène est l'une des protéines majoritairement représentée dans la matrice extracellulaire de la glande mammaire. Il existe principalement deux types : le collagène de type I retrouvé dans le tissu conjonctif au pourtour des canaux galactophores, et le collagène de type IV, localisé au niveau de la membrane basale de ces canaux. Ces collagènes sont essentiels au développement de la glande (Nagai et al., 2000).

5.5.2 La laminine

La laminine est une glycoprotéine présente dans la lame basale. Il existe 15 isoformes de laminine toutes codées par un gène différent. Les chaînes de laminine sont synthétisées par les cellules myoépithéliales et par les cellules stromales et s'associent en trimère. La laminine V est retrouvée dans les structures d'ancrage des cellules myoépithéliales. Elle joue également un rôle important dans la structure des acini.

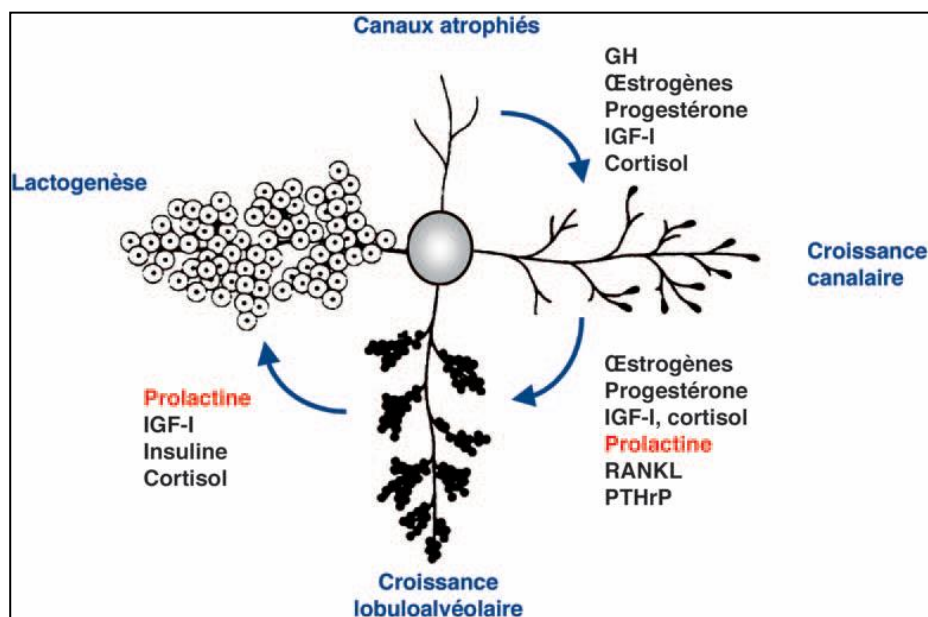


Figure I.7: Représentations schématiques du développement de la glande mammaire, implication des hormones dans le développement mammaire (Modifié d'après LyonsWR 1958)

STADE	FACTEUR	EFFETS
Vie foetale	Mésenchyme mammaire	☐ Induit la ramification du canal galactophore primaire
	Testostérone	☐ Dégénérescence de l'unité fonctionnelle de la glande mammaire
A la puberté	Oestrogènes	☐ Élongation des canaux galactophores à la puberté et développement tubuloalvéolaire (préférentiellement les ER α des cellules mésenchymateuses) ☐ Activation de la synthèse de prolactine dans l'hypophyse.
	Prolactine	☐ Mise en place des bourgeons terminaux ☐ Développement alvéolaire des glandes mammaires ☐ Induction de la synthèse des protéines du lait dans les cellules de l'épithélium mammaire
	Progestérone	☐ Développement du système alvéolaire ☐ Limite l'augmentation du nombre de récepteurs à la prolactine ☐ Limite l'effet lactogène de la prolactine pendant la mammogenèse
	Hormones thyroïdiennes	☐ Maintien des alvéoles au moment de l'involution de la glande mammaire
	IGF-I	☐ Stimule la croissance des canaux galactophores primaires et de leurs ramifications avec la progestérone ☐ Stimule la formation des bourgeons terminaux et des bourgeons alvéolaires avec les oestrogènes
	EGF	☐ Stimule la synthèse de collagène de type IV

Tableau I.1 : Facteurs dans le développement des glandes mammaires de la souris (Modifié d'après la thèse d'Edwige FERRIER 2012)

6. Pathologies de la glande mammaire

6.1 La polyadenomatose mammaire

La polyadénomatose mammaire est une maladie rare dont la fréquence n'est pas déterminée avec précision, notamment car son diagnostic n'est pas toujours aisé. Elle est définie par l'existence d'au moins trois fibroadénomes dans au moins un des deux seins. Le fibroadénome est une tumeur bénigne bien limitée qui se développe aux dépens du tissu mammaire ; il est habituellement découvert chez la jeune femme entre 20 et 30 ans et ne nécessite qu'une surveillance clinique et échographique, il est exceptionnellement opéré quand il dépasse une certaine taille et qu'il déforme le sein.

6.2 Le cancer du sein

Le cancer du sein touchera une femme sur huit au cours de sa vie et se développe dans trois quarts des cas chez des sujets de plus de 50 ans. En France, environ 48.800 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année, et en 2012, 11.900 patientes sont décédées suite à cette maladie. Or, ce cancer qui est le plus fréquent et le plus meurtrier chez la femme, s'il est repéré à un stade précoce peut être guéri dans plus de 90 % des cas.

Le cancer du sein est une tumeur maligne qui touche la glande mammaire. Les cellules malignes sont des cellules transformées qui ont la propriété de se multiplier de manière désordonnée jusqu'à créer un amas cellulaire que l'on nomme tumeur. Celle-ci est dite soit 'localisée' si elle reste cantonnée au compartiment glandulaire ("in situ"), soit 'invasive' si elle se propage aux tissus sains avoisinants. Lorsqu'à un stade plus tardif, les cellules tumorales envahissent les ganglions lymphatiques les plus proches puis ceux d'autres tissus (l'os par exemple), on parle de métastases.

De nombreux facteurs de risque sont associés à la survenue de ce cancer : l'âge, les antécédents familiaux, l'âge respectif de la puberté et de la ménopause, les facteurs hormonaux et les facteurs environnementaux.

Parmi les gènes de prédisposition les plus associés au cancer du sein on peut citer les gènes BRCA1 et BRCA2, qui ont été localisés respectivement sur les chromosomes 17 et 13. Environ 2 femmes sur 1000 sont porteuses d'une mutation du BRCA1 ou du BRCA2. Les femmes qui héritent d'anomalies sur le gène BRCA1 (breast cancer 1) ont un risque extrêmement élevé de développer un cancer du sein (87% à 70 ans) ainsi qu'un cancer de l'ovaire. Par contre, des mutations du gène BRCA2 sont associées à une augmentation modérée du risque de cancer du

sein. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Kinzler et al., 1997).

6.2.1 Les sous-types moléculaires des cancers du sein

Pendant plusieurs décennies, les carcinomes du sein ont été classés selon leur type histologique, leur grade et l'expression des récepteurs hormonaux (Reis-Filho et al., 2005; Simpson et al., 2005).

La classification des tumeurs et leur type histologique fournit des informations importantes pour évaluer leur pronostic. Toutefois, d'autres paramètres tels que le degré de différenciation (grade) ou le degré d'extension (stade) permettent de préciser le potentiel évolutif. Le grade histopronostique d'un adénocarcinome mammaire, évalué par le score SBR (Scarff-Bloom-Richardson), prend en compte 3 variables : la différenciation glandulaire, les atypies cytonucléaires et le nombre de mitoses.

Cette classification a donc un intérêt majeur dans le traitement de cancers du sein (Forus A et al., 2001).

6.2.1.1 Les tumeurs lumineuses

Le terme luminal fait référence au nom donné aux cellules différenciées de l'épithélium mammaire. Ces tumeurs sont appelées lumineuses car elles ont un aspect histologique différencié et expriment des gènes typiques des cellules épithéliales de la lumière des canaux ou des lobules du sein.

Ce sont les formes les plus fréquentes des cancers du sein avec près des deux tiers des cas. Elles comprennent deux sous-groupes A et B. Ces tumeurs expriment les cytokératines (CK8 et CK18), typiques de l'état différencié.

Le sous-type luminal A est caractérisé par une expression des récepteurs hormonaux œstrogènes (ER+, souvent élevée) et/ou à la progestérone (PR+), l'absence de surexpression de gène HER2 et un taux de mutations p53 faible. Les tumeurs sont souvent de bas grade histologique.

Le sous-type luminal B a la même caractéristique en ce qui concerne les récepteurs hormonaux bien que ER puisse être exprimé à des niveaux plus faibles, mais il y a, plus souvent, une surexpression du gène HER2 +. Les tumeurs sont habituellement de haut grade histologique, et montrent une activité proliférative plus élevée. Le sous-type A est de bon pronostic, le sous-type B est moins favorable.

6.2.1.2 Les tumeurs "basal-like"

Le terme basal/myoépithélial fait référence au nom donné à l'autre type de cellules du tissu mammaire normal. Cette forme représente 15 à 20 % des cancers du sein. Les tumeurs sont moins différenciées et elles n'expriment pas les récepteurs hormonaux et ne surexpriment pas l'oncogène HER2. Leur phénotype ER–/PR–/HER2– conduit souvent à appeler ces tumeurs "triples négatives", bien que cette assimilation n'est sans doute pas absolument totale. Elles expriment les cytokératines (CK5 et 14) et, souvent, le récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR et la protéine c-Kit. Dans plus de 80 % des cas, le gène codant pour TP53 est muté. C'est dans ce groupe que l'on retrouve des mutations du gène BRCA1. Souvent de grade III, elles sont de pronostic réservé et, par leur caractère triple négatif, elles ne peuvent bénéficier ni d'une hormonothérapie ni d'un traitement par l'Herceptin™ (trastuzumab).

LA PROLACTINE
ET
SON RECEPTEUR

1. La prolactine

La prolactine est une hormone hypophysaire initialement identifiée par sa capacité à induire la sécrétion de lait chez le lapin (Stricker et al., 1928). On lui connaît plus de 300 fonctions biologiques notamment sur le développement de la glande mammaire et la lactation mais aussi sur la reproduction, la croissance, le comportement maternel, l'immunorégulation et la régulation du métabolisme (Bole-Feysot et al., 1998).

1.1 Le gène de la PRL humaine

L'ADN complémentaire (ADNc), puis le gène de la PRL humaine ont été clonés dans les années 80. Ce dernier est localisé sur le chromosome 6 et est composé de 5 exons et 4 introns (Cooke et al., 1980 ; Truong et al., 1984). Il résulte de la duplication d'un gène ancestral commun à plusieurs hormones apparentées, dont les membres principaux sont l'hormone de croissance (GH) et le lactogène placentaire (PL).

Le gène de la PRL humaine (hPRL) contient deux promoteurs distincts (figure I.8). Le promoteur proximal, qui régule la synthèse de la protéine dans l'hypophyse. Il comporte plusieurs sites de liaison au facteur de transcription Pit-1 ainsi que des éléments de réponse aux oestrogènes (ERE). Un promoteur distal, situé plus en amont, serait lui responsable de l'expression de la hPRL dans les sites extra-hypophysaires. La séquence de la protéine exprimée dans les deux cas est strictement identique, mais l'ARNm résultant de l'activation du promoteur extra-hypophysaire est plus long (150 bases) que celui synthétisé dans l'hypophyse.

La structure primaire de la hPRL est composée de 227 acides aminés dans sa forme immature, c'est-à-dire incluant un peptide signal de 28 acides aminés, nécessaire pour son transport vers les granules de sécrétion. Ce peptide est ensuite clivé dans le réticulum endoplasmique pour libérer une forme mature de 199 acides aminés de masse moléculaire de 23 kDa.

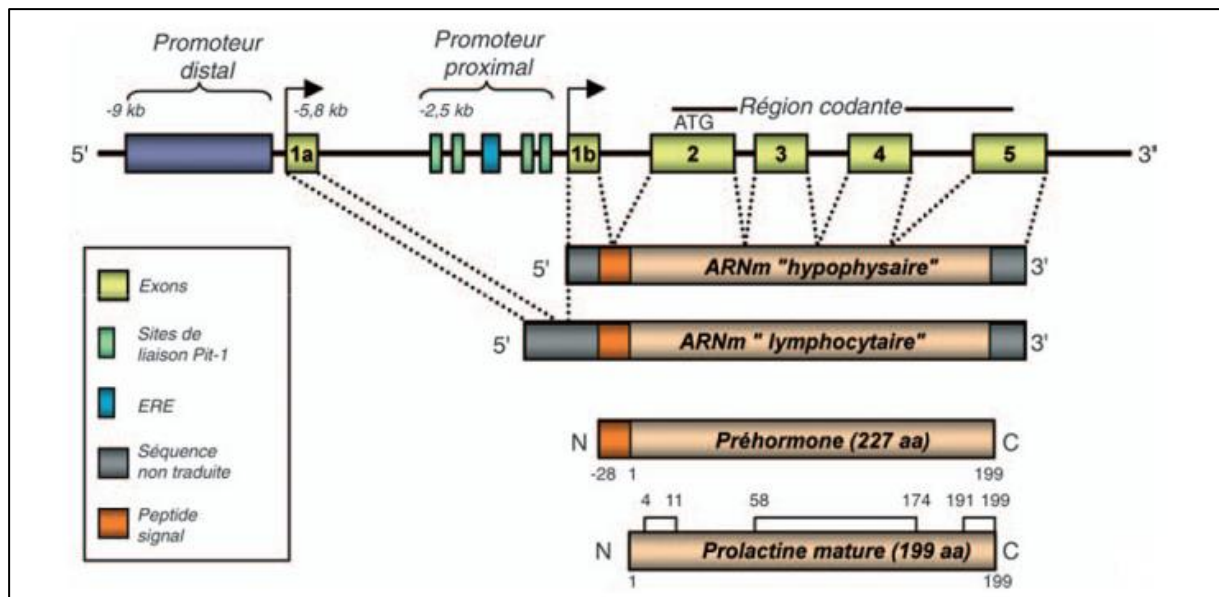


Figure I.8 : hPRL, du gène à la protéine (Goffin et Touraine., 2005)

1.2 Structure de la Prolactine

La protéine hPRL est organisée en une chaîne unique d'acide aminés avec trois pont disulfures intramoléculaires entre six cystéines (Cys4-Cys11, Cys58-Cys174 et Cys191-Cys199) (Goffin et al., 1996). La structure tertiaire de la PRL est formée par 4 hélices α , qui se regroupent en deux paires antiparallèles : hélice 1/hélice 4, hélice 2/hélice 3 (Teilum et al., 2005) (figure I.9). Cette structure est retrouvée chez d'autres hormones telles que la GH et la PL, et constitue de manière plus générale la signature structurale de la famille des "cytokines hématopoïétiques". On la retrouve ainsi, aussi au niveau de nombreuses interleukines, de l'érythropoïétine, de la leptine et d'autres membres de cette superfamille de protéines (Horseman et al, 1994; Gadina et al., 2001).

Des isoformes de la PRL ont été décrites. Elles résultent soit de l'épissage alternatif de l'ARNm primaire, soit de modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, la phosphorylation ou encore le clivage protéique. L'une des principales isoformes, outre la forme native, est un fragment de PRL de 16kDa, appelé PRL 16K, qui est produit par protéolyse et qui possède des propriétés anti-angiogéniques (Clapp et al., 2006). L'isoforme phosphorylée (sur la sérine 179) est elle, moins active que la forme non phosphorylée (Gala et al., 1995) ; une étude suggère même qu'elle aurait des propriétés antagonistes de la PRL native (Coss et al., 1999). Enfin la hPRL glycosylée (sur l'asparagine 31) présente une faible activité biologique (Gala et al., 1995).

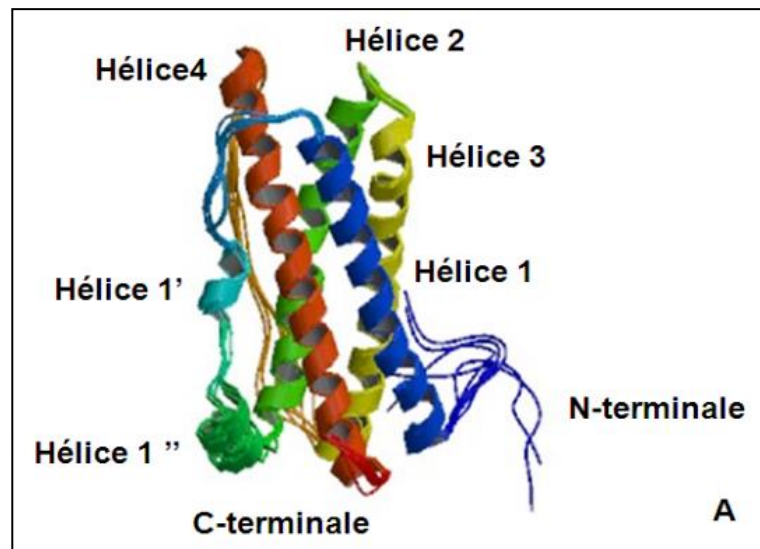


Figure I.9: Structure tridimensionnelle de la hPRL (Teilum et al ., 2005)

1.3 Régulation de la sécrétion hypophysaire de prolactine

Plusieurs niveaux de contrôle de régulation de la sécrétion de PRL hypophysaire sont connus. Le contrôle de l'expression hypophysaire du gène de la PRL est essentiellement d'origine hypothalamique et périphérique dans une moindre mesure. La dopamine est le principal régulateur négatif. Sa production a lieu principalement dans les neurones TIDA (Hypothalamic Tubero-Infundibular Dopaminergic) qui jouent donc un rôle dans la modulation de la sécrétion de PRL.

La PRL peut aussi augmenter la sécrétion de la dopamine en provoquant ainsi une boucle de régulation négative sur sa propre sécrétion.

D'autres facteurs comme les opioïdes, la sérotonine et l'angiotensine II, empêchent la sécrétion de dopamine. Ils sont donc considérés comme des régulateurs indirects de la sécrétion de PRL en modulant celle de la dopamine.

Les neurones à TRH (Thyrotropin-releasing Hormone), situés dans le noyau para-ventriculaire (PVN) de l'hypothalamus secrètent la TRH. Celle-ci, en se liant à son récepteur, active l'entrée de calcium, responsable de la migration des vésicules de PRL à la membrane plasmique et la libération de son contenu dans le milieu extracellulaire. Elle agit à l'inverse de la dopamine. D'autres régulations, situées en dehors du système nerveux central, existent aussi. Ainsi, la production intestinale de VIP agit également sur la sécrétion de PRL par les cellules lactotropes et ce, via des mécanismes semblables à ceux de la TRH. Les oestrogènes favorisent également cette sécrétion en

contrôlant la prolifération des cellules lactotropes et l'augmentation de l'expression du gène PRL dans ces cellules (Ben-Jonathan et al., 2001; Brandebourg T et al., 2007; Soares et al., 2007).

Enfin, un rétro-contrôle négatif de la PRL sur sa propre sécrétion a été décrit. En effet, des rats traités avec un anticorps neutralisant du PRLR deviennent hyperprolactinémiques (Damiano et al., 2013)(figure I.10).

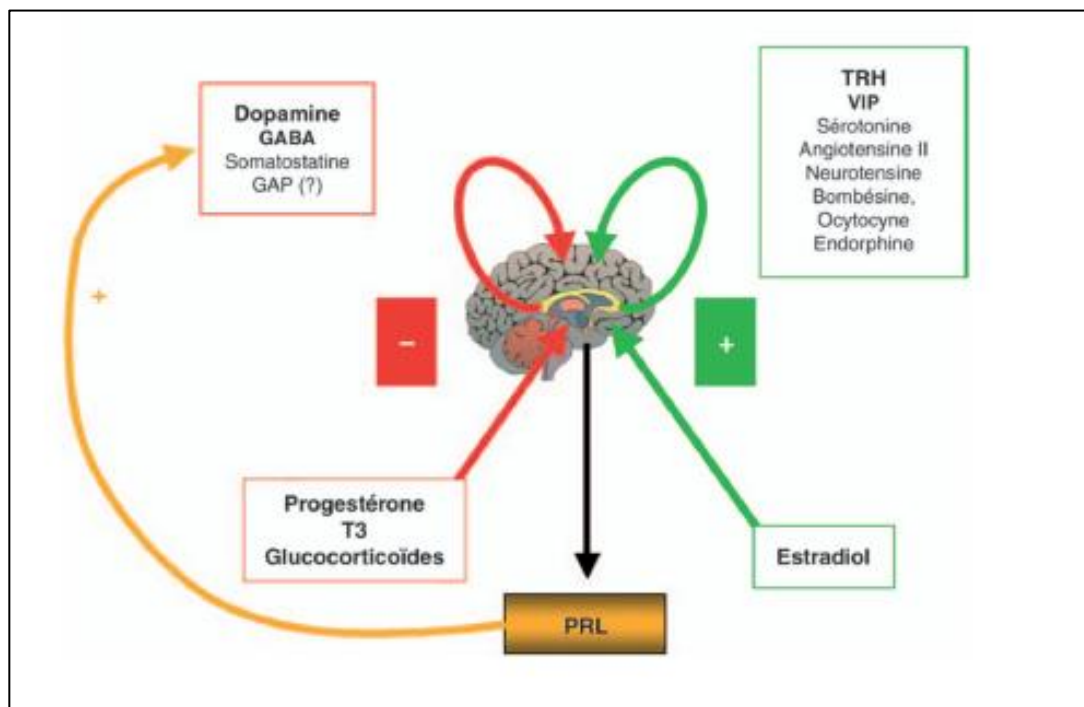


Figure I.10 : facteurs impliqués dans la régulation de la Prolactine

(Goffin et Touraine, 2005)

1.4 Les niveaux physiologiques de la prolactine

Les niveaux physiologiques de PRL sont compris entre 8 et 22 ng/ml chez la femme, et sont un peu plus faibles chez l'homme (Goffin et Touraine 2005). Les situations physiologiques d'élévation de la PRL sont en premier lieu la grossesse et l'allaitement, les concentrations plasmatiques de PRL pouvant atteindre des niveaux très élevés, supérieurs à 300 ng/ml. En post-partum, les niveaux de PRL se normalisent environ 7 jours après l'accouchement puis s'élèvent de nouveau en réponse à la succion en cas d'allaitement. Cet effet est relayé par l'ocytocine (Goffin et Touraine 2005).

1.5 Fonctions biologiques de la prolactine

La PRL est connue en premier lieu pour sa capacité à stimuler la synthèse de lait. Mais à ce jour, plus de 300 fonctions sont identifiées chez les vertébrés (Nicoll et al., 1972; Bole-Feysot et al., 1998). Ces actions peuvent être classées en 6 catégories principales : effets sur la reproduction qui sont le plus étudiés et décrits ; équilibre hydro-électrolytique (osmorégulation) ; croissance et développement ; actions endocriniennes et métaboliques ; contrôle du comportement, et enfin immunorégulation. Il est important de noter que cette pléiotropie fonctionnelle a été surtout observée chez l'animal et doit encore être dans sa grande majorité validée chez l'Homme (figure I.11).

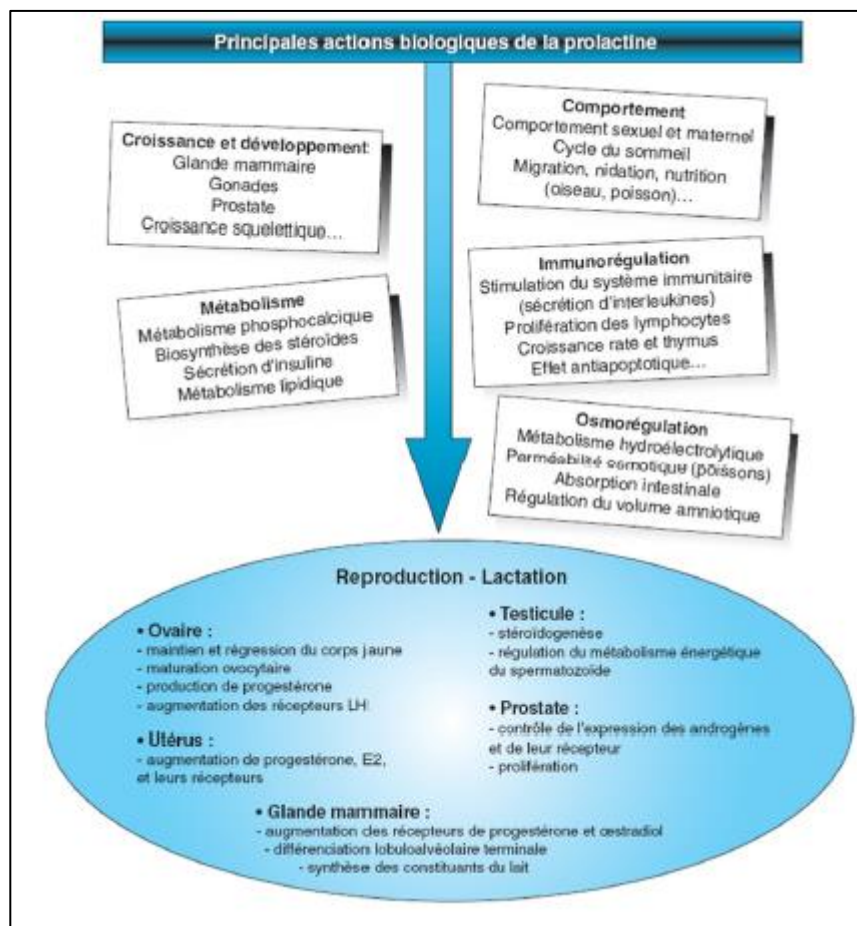


Figure I.11 : Principales actions de la PRL (Goffin et Touraine., 2005).

1.6 Actions de la Prolactine sur la glande mammaire de souris

Les effets de la PRL sont mineurs sur le changement morphologique qui se produit pendant les étapes fœtale, néonatale et péri-pubertale. Chez les souris invalidées pour le gène de la PRL (PRL-KO) ou de son récepteur (PRLR-KO), les glandes mammaires montrent un réseau canalaire normal jusqu'à la puberté (Ormandy et al., 1997; Horseman et al., 1997). Néanmoins la PRL est impliquée fortement dans les plupart des stades permettant la lactation: la mammogenèse (la différenciation lobulo-alvéolaire), la lactogenèse (l'acquisition de la capacité de sécréter du lait), la galactopoïèse (la maintenance de la sécrétion du lait) et l'involution (le retour à l'état de non lactation).

La PRL joue aussi le rôle de détecteur physiologique pour répondre à la demande de la production du lait, puisque sa libération est considérablement augmentée lors de la tétée (Goffin et Touraine., 2005), cela en affectant la synthèse de tous les constituants majeurs du lait: les protéines, le lactose et les lipides (McManaman et al., 2004). Parmi les protéines du lait, la PRL stimule la synthèse de la beta-caséine, de la protéine WAP et de la lactalbumine. Après le sevrage, la glande mammaire retourne à l'état morphologique similaire à celui qu'elle avait avant la gestation, c'est la phase d'involution. Le rôle éventuel de la PRL dans cette étape n'est pas bien caractérisé, même si les souris surexprimant la PRL dans la glande mammaire subissent une involution incomplète après la lactation (Manhes et al., 2006). En résumé, la PRL joue donc un rôle majeur sur la glande mammaire pendant la lactation. Elle produit des effets sur le développement de celle-ci, sur la stimulation de la synthèse du lait et sur le maintien de la lactation (figure I.12).

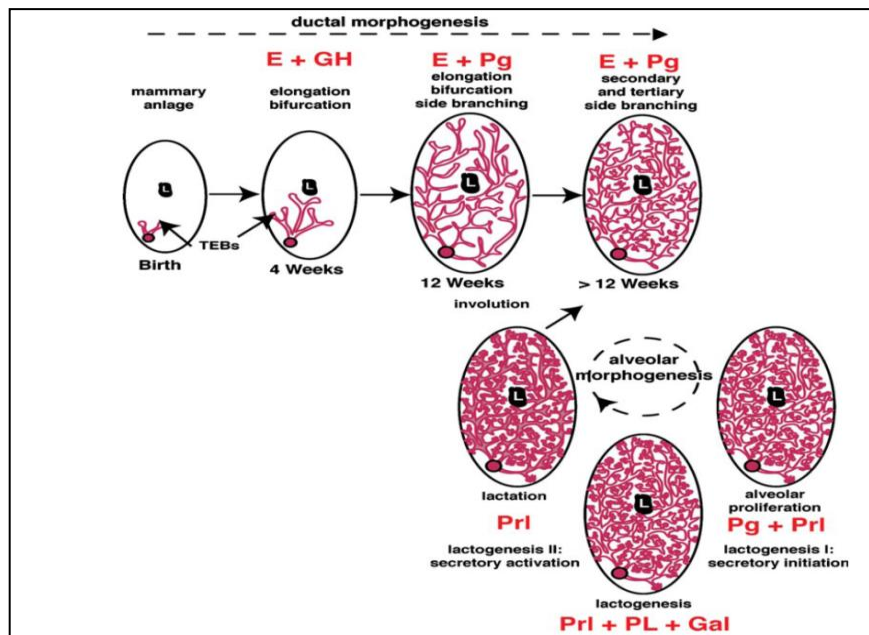


Figure I.12 : Actions de la Prolactine sur la glande mammaire de souris

Le récepteur de la prolactine (PRLR)

2. Structure du PRLR

Le récepteur de la prolactine (PRLR) fait partie de la super-famille des récepteurs des cytokines hématopoïétiques de type 1. Ce récepteur a été cloné par l'équipe du Pr Paul Kelly en 1988, à partir d'une banque d'ADNc de foie de rat (Boutin et al., 1988). Chez l'Homme, son gène est localisé sur le chromosome 5 et contient 11 exons. Il est exprimé de façon ubiquiste dans l'organisme ; cette large distribution est à corrélérer avec le large spectre d'activité de la PRL (Bole-Feysot et al., 1998) (figure I.14).

Comme tous les récepteurs de cytokines hématopoïétiques de type 1 (récepteur EPO, récepteur GH, chaîne α du récepteur de l'IL6,...), le PRLR contient 3 motifs structuraux très conservés :

Le domaine extracellulaire (ECD), constitué de 210 acides aminés, interagit directement avec la PRL. Il est divisé en deux sous-domaines D1 ou S1 (à l'extrémité N-terminale) et D2 ou S2 (à l'extrémité C-terminale) qui sont connectés par une boucle de 5 à 6 résidus. Chaque sous-domaine comprend 7 brins β organisés en 2 feuillets β antiparallèles. La structure cristallographique de l'ECD montre que les deux sous domaines adoptent une forme en V, formant un angle d'environ

110 degrés (Elkins et al., 2000). Le site d'interaction avec le ligand se situe sur "l'angle externe" de cette structure en V.

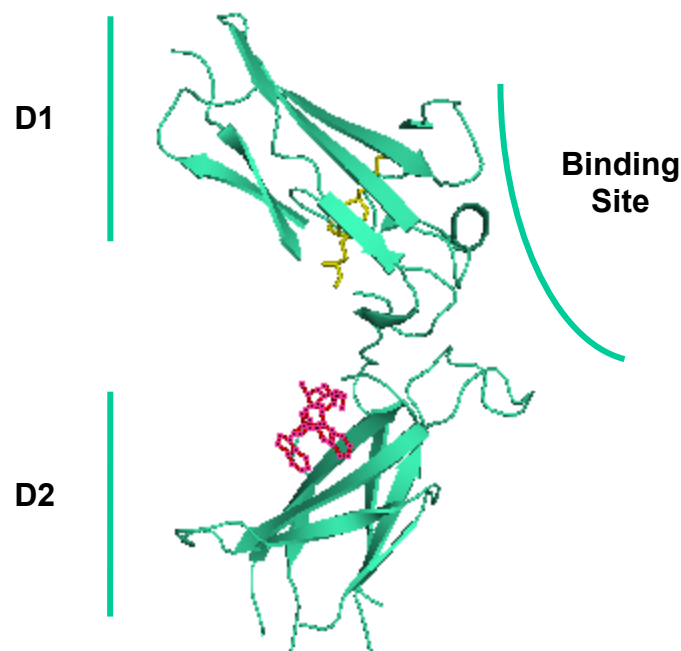


Figure I.13: Structure du PRLR-ECD humain (Svensson et al., 2008). Le domaine extracellulaire contient deux sous domaines D1 et D2. Les quatre cystéines sont représentées en jaune, et le motif WSXWS est en rouge.

Le domaine transmembranaire (TM), constitué de 24 acides aminés, est une chaîne transmembranaire à passage unique. Composé principalement d'acides aminés hydrophobes, il est supposé former une hélice α (Grotzinger et al., 2002), mais aucune donnée structurale disponible pour le récepteur entier n'est disponible pour confirmer cette prédiction ou déterminer le rôle de TM dans l'activation du récepteur. Certaines études ont toutefois montré que le domaine TM pourrait jouer un rôle important dans l'activation du récepteur.

Le domaine intracellulaire (ICD) est constitué d'une région juxtamembranaire qui est composée de plusieurs motifs: la boîte 1, la boîte variable (V-Box) entre les boîtes 1 et 2 (37 acides aminés), la boîte 2 et la boîte X (X-Box) constituée des résidus situés en C-terminal de la boîte 2 (Clevenger et al., 2003). Les boîtes 1 et 2 sont relativement bien conservées dans les récepteurs de cytokines de type I. Les fonctions de ces motifs lors de l'activation du PRLR sont

encore peu caractérisées. Les récepteurs de cette famille n'ont pas d'activité kinase intrinsèque, c'est pourquoi, ils s'associent à des kinases cytoplasmiques, telle que la protéine kinase Jak2 (*Janus kinase 2*), assurant ainsi la transduction du signal. Il est très bien établi que la boîte 1 est nécessaire pour l'engagement et l'activation de Jak2 après la stimulation du ligand (Lebrun et al., 1994 ; Pezet et al., 1997). Néanmoins il n'est pas totalement établi si le contact entre le récepteur et la kinase est direct ou implique une protéine adaptatrice. La fonction de la région de l'extrémité C-terminale d'ICD est encore moins bien caractérisée, à l'exception des résidus tyrosine dont le rôle dans l'engagement des protéines Stat (*signal transducer and activator of transcription*), dont Stat5, et de la phosphatase SHP-2 (*SH2-containing protein tyrosine phosphatase*) a été très bien étudié (Pezet et al., 1997). Ces résidus tyrosine sont en réalité des sites de phosphorylation par Jak2, ce qui leur permet d'interagir avec des protéines présentant des domaines SH2 (Src homology domain 2).

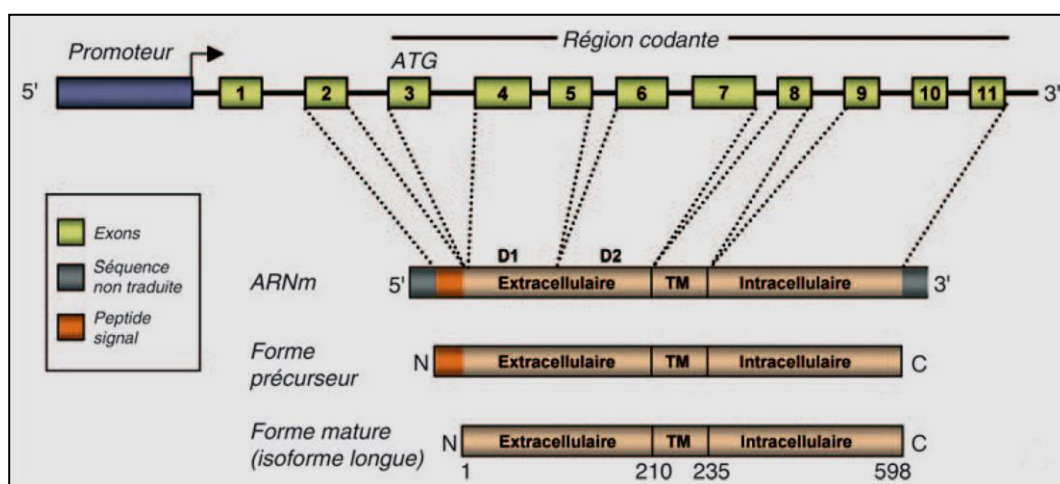


Figure I.14: Le PRLR, du gène à la protéine (Goffin et Touraine., 2005)

2.1 Les isoformes du PRLR

Il existe plusieurs isoformes du récepteur qui sont le résultat d'un épissage alternatif du transcrit primaire. Les protéines codées par ces différents ARNm se différencient le plus souvent par leurs domaines cytoplasmiques (longueur et parfois composition). On distingue ainsi chez de nombreuses espèces des isoformes dites courtes, intermédiaires ou longues (figure I.15). Les études préliminaires *in vitro* ont montré que ces isoformes possèdent de réelles spécificités fonctionnelles dues à la divergence de la partie cytoplasmique, responsable de l'interaction du PRLR avec les protéines intracellulaires impliquées dans la transmission du signal. On considère

que les formes longues sont capables d'exercer l'ensemble des fonctions attribuées au PRLR (Bole-Feysot et al., 1998; Clevenger et al., 2003).

Ces diverses isoformes peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation (il existe trois sites de glycosylation dans le domaine extracellulaire) ou la phosphorylation sur diverses tyrosines du domaine intracellulaire. Le PRLR est dépourvu d'activité kinase intrinsèque, comme les autres membres de la superfamille des récepteurs de cytokines hématopoïétiques (récepteur EPO, récepteur GH, chaîne α du récepteur de l'IL6,...).

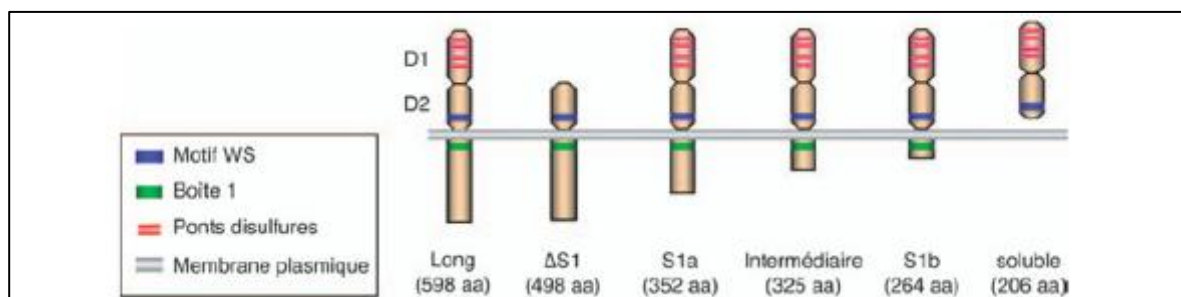


Figure I.15: Les isoformes du PRLR (Goffin et Touraine., 2005)

2.2 Le mécanisme d'activation du PRLR

Deux grandes hypothèses sont à ce jour émises quant à l'activation du PRLR par ses ligands agonistes. D'une part, le modèle d'activation séquentielle du PRLR, proposé il y a plus de quinze ans, suggère que le PRLR serait monomérique au repos, sa dimérisation étant induite par la liaison à la PRL, qui se lie à deux molécules de récepteur via ses deux sites de liaison, appelés sites 1 et 2 (Goffin et al., 1994). D'autre part, le modèle de récepteur pré-dimérisé à la membrane a émergé suite aux travaux de l'équipe de M. Waters proposant que le récepteur de la GH soit, à l'état inactivé, déjà sous forme d'un homodimère à la surface de la cellule (Brown et al., 2005 +2014). L'interaction de l'hormone avec le récepteur induirait un changement de conformation au sein du récepteur prédimérisé, plus précisément une rotation du domaine transmembranaire, qui permettrait de rapprocher les domaines intracellulaires, entraînant ainsi la transphosphorylation des kinases associées au récepteur. Les travaux récents de notre équipe suggèrent qu'au moins une partie de la population du PRLR membranaire soit effectivement pré-dimérisée (Tallet et al 2011).

Cependant, le modèle de rotation n'ayant pas pu être validé pour le PRLR (Brooks 2011), le mécanisme fin de son activation demeure inconnu à ce jour (figure I.16).

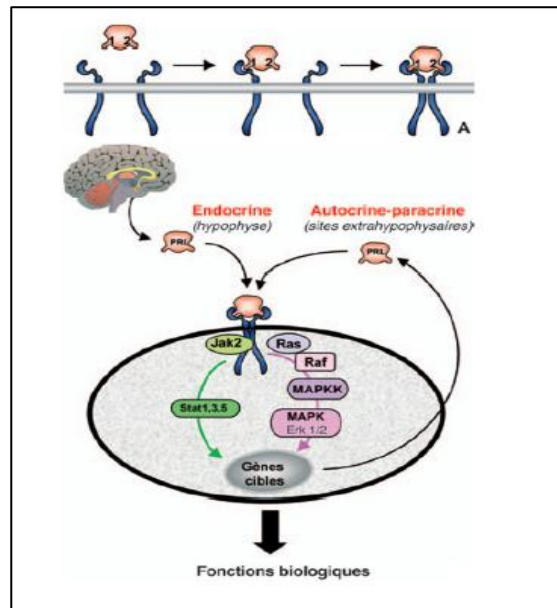


Figure I.16 : Le mécanisme d'activation du PRLR (Goffin et Touraine., 2005)

2.3 Les voies de signalisation du PRLR

L'activation du PRLR conduit à un ensemble de modifications intracellulaires, dont les conséquences sont la transcription des gènes cibles. Le PRLR ne possédant pas d'activité kinase intrinsèque, ces phosphorylations font intervenir diverses kinases associées au récepteur. La première fut identifiée en 1994 comme étant la tyrosine kinase Jak2, un des quatre membres de la famille des protéines Jak. L'association entre Jak2 et le PRLR implique la boîte 1 (des expériences de mutagenèse dirigée ont souligné l'importance des résidus proline de cette région conservée du récepteur dans l'interaction avec la kinase). L'activation de Jak2 se fait par trans-phosphorylation (Andrew J. Brooks et al., 2014). A l'heure actuelle, on considère que l'activation de Jak2 est prérequis pour l'expression de la majorité, sinon de toutes les activités biologiques de la PRL. Le PRLR peut être phosphorylé au niveau de plusieurs résidus tyrosine, mais il semble que la tyrosine C-terminale du domaine cytoplasmique (Tyr587) a une importance prépondérante dans la signalisation. Les tyrosines phosphorylées du PRLR constituent à ce titre des points d'ancrage pour des protéines de la famille des Stats, qui possèdent de tels domaines, appelés domaines SH2. Les Stats sont à la fois des protéines cytoplasmiques de la transmission du signal et des facteurs de transcription, fonctions à l'origine de leur dénomination : Signal transducer and activator of

transcription. Parmi les sept membres de la famille des Stats, le PRLR en active trois : Stat1, Stat3 et, de manière prépondérante, Stat5. Ce dernier, appelé initialement MGF (Mammary gland factor), interagit avec la tyrosine C-terminale du PRLR, puis est phosphorylé à son tour par Jak2 avant de se dissocier du récepteur. Cette phosphorylation va provoquer sa dimérisation et c'est sous cette forme qu'il va alors migrer dans le noyau, où il active directement la transcription de gènes spécifiques, et cela en se fixant sur sa cible ADN présente dans le promoteur de ces gènes. Par exemple, dans la cellule épithéliale mammaire, Stat5 transactive les gènes codant pour les protéines du lait (béta caséine, lactoglobuline, WAP, etc).

Bien que cette cascade apparaisse dans la littérature comme la voie de signalisation majeure du PRLR, d'autres voies, impliquant d'autres kinases, sont également activées par ce récepteur. Une des autres grandes voies activée par la PRL est la voie des MAPK ("mitogen activated protein kinase"). Elle implique l'activation de la cascade Shc/SOS/Grb2/Ras/Raf/MAPK. L'activation des MAPK par la PRL a été rapportée dans de nombreux modèles cellulaires (Vonderhaar et al., 1996). Bien que la voie Jak/Stat et celle des MAPK aient été étudiées initialement comme des voies indépendantes, il existe actuellement des données suggérant que ces deux voies peuvent être interconnectées entre elles (Ihle et al., 1996 ; Aksamitiene et al., 2011).

Il a aussi été montré récemment que PI3kinase enhancer-A (PIKEA) s'associait directement avec Stat5 et le PRLR et participait à la transcription des gènes cibles via l'activation de Stat5 (Chen et al., 2012). Le complexe Grb2/Sos active Ras, une protéine à activité GTPasique intrinsèque, qui elle-même active ensuite la cascade de signalisation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) via le recrutement de Raf à la membrane plasmique. L'activation de Ras provoque également celle de la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) qui participe à la formation d'un lipide membranaire, le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. Ce composé recrute AKT connu initialement sous l'appellation PKB (Protein Kinase B), une sérine/thréonine kinase, et permet alors son activation par la PDK1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1) (Brandebourg T et al., 2007). Grâce à l'activation de ces différentes voies de signalisation qui permettent la transcription des gènes cibles, la PRL joue de nombreux rôles physiologiques (figure I.17).

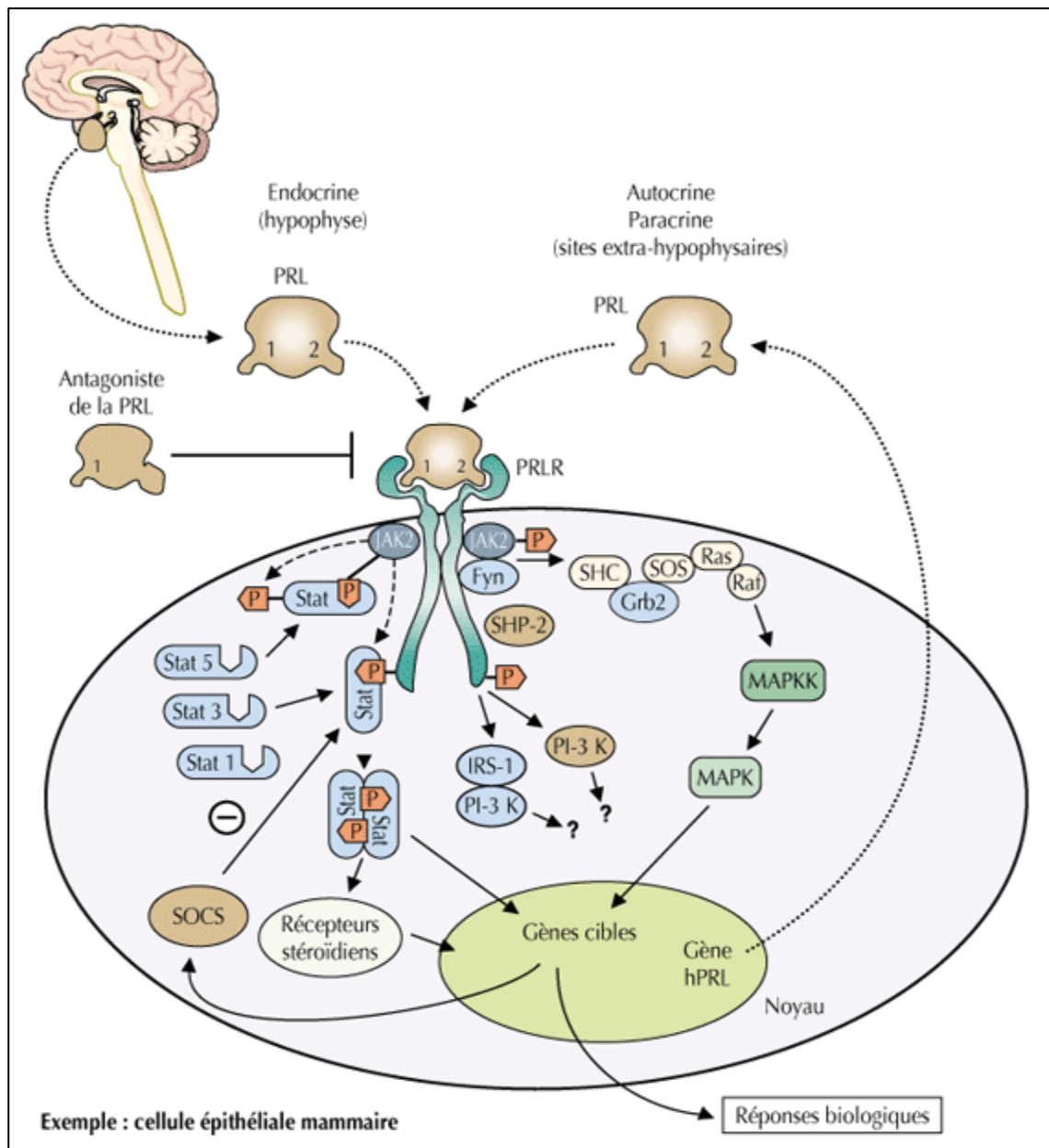


Figure I.17 : Transmission du signal par le PRLR

(Source : Médecine Thérapeutique Endocrinologie & Reproduction, Volume 2, numéro 4, Juillet -Août 2000).

Le PRLR s'homodimérise après s'être lié à la PRL, transmet le signal hormonal dans la cellule par plusieurs voies. Dans la voie Jak/Stat, Stat1, Stat3 et surtout Stat5 sont phosphorylés par Jak2, les Stats activés forment alors des dimères qui migrent dans le noyau où ils activent des gènes cibles. D'autres voies, comme celles des MAP kinases (SHC, Grb2, SOS, Ras, Raf, MAPK), de la PI-3 kinase (PI-3k) ou de la protéine kinase C (PKC) sont également activées par le PRLR.

2.4 Régulation négative de la signalisation

Il existe aussi des mécanismes régulant négativement les effets résultant de l'activation du récepteur à la prolactine. La majorité des signaux activateurs mettant en jeu des processus de phosphorylation, l'implication des phosphatases a été rapidement suspectée. C'est le cas par exemple de la tyrosine-phosphatase SHP-2 (appelée aussi PTP-1D), qui est activée par le PRLR mais qui cependant a été décrite comme un régulateur positif, et non comme un inhibiteur.

Une famille de protéines appelée SOCS (Suppressor of cytokine signalling) a été découverte (Nicola et al., 1999). Les SOCS inhibent les voies de signalisations Jak/Stat par des mécanismes de rétrocontrôle négatif au niveau moléculaire (Alexander et al., 2004). Le domaine SH2 de SOCS1 se lie directement à Jak2 et inhibe son activité catalytique (Ungureanu et al., 2002). Par des approches génétiques, SOCS1 et SOCS2 ont été montrés comme impliqués dans la régulation de l'activation de Stat5 par le PRLR. L'importance physiologique de SOCS1 dans la régulation de la cascade PRLR/Stat5 a été mise en évidence grâce à l'utilisation de souris génétiquement modifiées. En effet, les souris hétérozygotes pour le PRLR (PRLR+/-) présentent des défauts de lactation. La délétion d'un seul allèle de SOCS1 s'est avérée suffisante pour restaurer un niveau d'activité normale de Stat5, et ainsi corriger le défaut de lactation des souris PRLR+/- (Lindeman et al., 2001).

SOCS2 a été identifié comme une cible directe de Stat5a dans la glande mammaire (Harris et al., 2006). Cette molécule atténue aussi la signalisation du PRLR, mais contrairement à SOCS1, la délétion des deux allèles est ici nécessaire pour restaurer un développement normal de l'épithélium mammaire des souris PRLR+/- . De plus, la délétion des deux allèles de SOCS2 n'affecte pas le développement de la glande mammaire. La différence d'inhibition de la signalisation du PRLR par SOCS1 et SOCS2 peut être en partie expliquée par le fait que contrairement à SOCS1, SOCS2 ne contient pas de domaine inhibiteur de l'activité kinase de Jak2.

3. Modèles animaux développés pour étudier l'implication de la PRL et de son récepteur dans les pathologies mammaires

De nombreux modèles animaux ont été mis au point pour décrypter le rôle de la PRL, notamment son rôle dans la glande mammaire. Ces modèles d'étude étaient basés sur l'ablation de l'hypophyse soit par hypophysectomie, soit par un traitement avec des agonistes des récepteurs dopaminergiques. Un autre modèle d'intérêt est celui de la mutation spontanée du facteur de transcription Pit-1 conduisant à la disparition des cellules somatotropes, produisant la GH, et des cellules lactotropes, provoquant ainsi un nanisme chez ces souris (Cohen et al., 1996). Toutefois ces modèles incomplets ont été largement critiqués en raison de leur trop large sévérité sur le plan hypophysaire et aussi à cause de la sécrétion possible de PRL par les tissus extra-hypophysaires.

3.1 Abolition du signal PRL

3.1.1 Souris KO pour la PRL

Un modèle de souris déficient en PRL a été développé par invalidation génique (souris PRL KO). Ces souris sont stériles, de ce fait le seul moyen d'étudier l'impact de l'absence de la PRL sur la glande mammaire est de greffer (de manière orthotopique) l'épithélium mammaire de ces souris chez des femelles sauvages, ou de traiter les animaux KO à la PRL.

Le traitement des souris PRL KO avec de la progestérone pendant 19 jours post-naissance a permis de restaurer le développement des ramifications secondaires mais pas la formation des bourgeons alvéolaires (Horseman et al., 1997 ; Vomachka et al., 2000). Par contre l'injection de PRL durant une période équivalente a permis un développement normal et complet de la glande mammaire.

3.1.2 Souris KO pour le PRLR

En 1997 un modèle de souris déficientes en PRLR a été généré dans le laboratoire de Paul Kelly. L'exon 5 du gène, codant pour une partie du domaine extracellulaire, a été remplacé par une cassette néomycine par recombinaison homologue ciblée. La traduction de l'ARN messager résultant aboutit à une protéine tronquée non fonctionnelle. Ce modèle a contribué à mieux comprendre les effets propres de la signalisation PRL sur ses tissus cibles (Ormandy et al., 1997). Les premiers phénotypes décrits chez les souris femelles PRLR^{-/-} étaient une absence totale de développement de la glande mammaire ainsi qu'une infertilité (Ormandy et al., 1997). En effet, lors de la gestation, la progestérone, synthétisée et sécrétée par le corps jaune permet le maintien

de l'implantation de l'embryon. Or, durant la gestation, la 20 α -HSD, l'enzyme dégradant la progestérone est réprimée par la signalisation de la PRL. L'absence de PRLR ne permet donc plus l'inhibition de cet enzyme qui dégrade alors la totalité de la progestérone produite, empêchant l'implantation de l'œuf fécondé. Une analyse histologique de la glande mammaire prélevée sur des souris PRLR +/-, 48 heures après la mise bas, montre un défaut majeur du développement lobulo-alvéolaire comparé à celui des souris témoins. Cette altération du développement de la glande mammaire est moins marquée lors des gestations suivantes et permet alors la survie des souriceaux (Ormandy et al., 1997).

3.2 Sur-activation du signal PRL

3.2.1 Souris transgéniques Met-PRL (hyperprolactinémie systémique)

D'autres souris transgéniques cette fois ci sur-exprimant la PRL de manière systémique ont été générées, en mettant l'ADNc de la PRL sous contrôle d'un promoteur métallothionéine d'expression ubiquiste. Le développement mammaire de ces souris n'a pas été décrit; néanmoins, il a été montré que les femelles développaient spontanément des adénocarcinomes mammaires entre 11 et 15 mois (Wennbo et al., 1997). De manière intéressante, une transgénèse identique mais impliquant cette fois la GH bovine n'a donné aucun phénotype tumoral, suggérant que chez la souris, la PRL ait un potentiel pro-tumoral mammaire plus élevé que son homologue GH. Enfin, il est à noter que l'on observe une hyperplasie prostatique qui se développe dès 3 à 4 mois chez les mâles (Wennbo et al., 1997).

3.2.2 Souris WAP-PRL (hyperprolactinémie locale)

La plupart de ces travaux ont été réalisés sur des souris vierges présentant une glande mammaire non différenciée. Un modèle pour étudier l'impact de la PRL produite localement sur une glande mammaire différenciée a été généré par notre équipe (Manhes et al., 2006). Il s'agit d'un modèle transgénique de souris exprimant la PRL sous le contrôle du promoteur WAP, une protéine du lait exprimée naturellement dans la glande mammaire à la fin de la gestation et pendant toute la lactation, jusqu'au début de l'involution. Ces souris présentent des altérations profondes de la glande mammaire se traduisant par un défaut de lactation. Une différence frappante avec les autres modèles transgéniques réalisés avec des souris vierges est que la surexpression de PRL à des stades tardifs de la différenciation mammaire induit des lésions bénignes, et non des adénocarcinomes (Manhes et al., 2006). Cette expérience suggère que la PRL produite localement

pourrait avoir des effets physiopathologiques différents selon le stade de différenciation de la glande mammaire.

3.2.3 Souris transgéniques exprimant un PRLR gain-de-fonction

Il existe aussi un modèle de souris transgénique où les animaux sur-expriment en permanence un PRLR constitutivement actif dans la glande mammaire. Ce récepteur consiste en une délétion de 200 acides aminés dans le domaine extracellulaire du PRLR (Gourdou et al., 1996).

Ces souris présentent un développement exacerbé des canaux et des alvéoles, conduisant à une absence de lactation. Cette étude suggère qu'une sur-activation du PRLR débutant tôt dans la vie induit un développement mammaire anormal, altère la différenciation terminale de la glande mammaire et donc la production de lait et enfin, retarde son involution (Gourdou et al., 2004).

4. Physiopathologie de la prolactine chez l'Homme

4.1 L'hyperprolactinémie

Les augmentations de sécrétion de prolactine par l'hypophyse peuvent relever de différents mécanismes. Il peut s'agir d'une stimulation directe de la cellule lactotrope (oestrogènes) ou plus souvent, d'une inhibition du tonus dopaminergique, normalement freinateur, provoquant alors une sécrétion de prolactine supraphysiologique pouvant conduire à l'hyperprolactinémie. Cette pathologie, dans laquelle l'hypophyse sécrète des quantités excessives de prolactine en l'absence d'allaitement, conduit à des troubles hormonaux.

L'hyperprolactinémie peut aussi dans certains cas résulter d'une tumeur localisée au niveau de l'hypophyse. Cette tumeur est généralement bénigne et sécrète en abondance de la prolactine.

Cette maladie provoque des troubles hormonaux à la fois chez l'homme et chez la femme et peut par exemple diminuer la libido. Les personnes concernées présentent une perte de vitalité. A long terme, il existe chez la femme un risque de problèmes de fertilité (réversibles) et de décalcification osseuse prématurée (ostéoporose). Enfin chez la femme, l'hyperprolactinémie peut induire la production de lait en dehors de la grossesse, on parle alors de galactorrhée.

Il existe différents traitements en fonction de la gravité de la maladie. Les analogues dopaminergiques rétablissent l'équilibre de la production de prolactine. Une intervention chirurgicale est cependant parfois nécessaire notamment dans le cas de tumeurs de l'hypophyse.

4.2 Le cancer du sein

La PRL étant une hormone impliquée dans le développement mammaire, son importance dans l'étiologie des cancers du sein a depuis longtemps été proposée (Nagasawa 1977). Il a été montré que certains facteurs de risques comme l'augmentation de densité à la mammographie étaient accompagnés d'une forte concentration en prolactine. En fait, la prolactine participe au développement de la tumeur et à sa progression en agissant sur la prolifération et la mobilité cellulaire. Ainsi de fortes concentrations de prolactine sont mesurées au sein de nombreuses tumeurs mammaires.

Les études épidémiologiques sur la corrélation entre la PRL et le cancer du sein sont limitées. Dès les années 80, diverses études rétrospectives ou prospectives ont été menées afin de corréler les taux circulants de PRL avec le risque de cancer du sein (Clevenger et al., 2003; Tworoger et al., 2008). Cependant, les limites d'échantillons (cohortes de petites tailles) et des biais méthodologiques n'ont pas permis d'aboutir à des conclusions convaincantes. Ceci contraste avec les deux plus grandes études réalisées au cours de la décennie écoulée impliquant les cohortes Nurses Health Study (NHS) (Tworoger et al., 2004) et NHS II (Tworoger et al., 2007). Ces deux études portaient sur une cohorte d'environ 30.000 femmes américaines (infirmières) âgées de 25 à 55 ans qui ont été suivies pendant 10 ans, et dont plus d'un millier a développé un cancer du sein. Les auteurs ont trouvé une augmentation de 30% du risque de développer un cancer du sein chez les femmes pré et post-ménopausées lorsque celles-ci présentaient un taux de PRL dans le quartile supérieur de la normale. Ce risque s'élevait à 80%, pour le développement de tumeurs positives pour les récepteurs ER et PR (Tworoger et al., 2013).

A la lecture de ces études cliniques, il apparaît donc que La PRL pourrait jouer un rôle dans le développement du cancer de sein chez les femmes.

Toutefois celui-ci n'est pour l'instant pas compris et reste donc difficile à évaluer chez les patients. Des études futures devraient permettre d'élucider les mécanismes cellulaires régulés par la PRL et potentiellement impliqués dans le cancer du sein.

4.3 Cancer de la prostate

La prostate est une glande du système reproducteur masculin. Le cancer de la prostate est le plus fréquent des cancers chez l'homme de plus de 50 ans. Les causes du cancer de la prostate ne sont pas encore totalement établies. Certains facteurs de risque sont reconnus comme l'âge (le plus important), les antécédents familiaux, le mode de vie, l'origine ethnique et l'alimentation trop riche en graisses animales. Dans la plupart des cas, le cancer de la prostate est asymptomatique. Deux examens permettent son diagnostic: le toucher rectal et le dosage de l'antigène spécifique prostatique (PSA). Le PSA est une protéine normalement sécrétée par les cellules prostatiques; le taux normal de PSA dans le sang est inférieur à 4 ng/ml. Plus le taux de PSA est élevé, plus le risque qu'il reflète un cancer prostatique est grand.

La rôle potentiel de la PRL dans le cancer de la prostate est actuellement ignoré dans le monde clinique en raison du manque de corrélation dans les études épidémiologiques (Eaton et al., 1999; Stattin et al., 2001)

L'analyse des souris transgéniques qui expriment la PRL localement au niveau de la prostate a clairement montré l'action pro-tumorale de l'hormone autocrine sur le tissu prostatique de souris. En effet, ces souris développent dès 6 mois de vie des lésions précancéreuses et à un âge plus avancé, quelques cas d'adénocarcinomes prostatiques ont été observés (Rouet et al., 2010). Chez l'homme, différentes études permettent d'accumuler un certain nombre d'argument en faveur d'un rôle joué par la PRL dans le développement du cancer prostatique. Ainsi, il a été montré que la prostate humaine saine exprime à la fois la PRL et son récepteur (PRLR), permettant ainsi l'établissement d'une boucle d'action autocrine-paracrine (Nevalainen et al., 1997) comme chez la souris transgénique. Le PRLR a lui été retrouvé exprimé dans des tumeurs bénignes et des cancers de prostate chez l'Homme. L'augmentation de son expression a aussi été suggérée dans les dysplasies bénignes (Leav et al., 1999). De manière très intéressante, une corrélation positive entre le grade du cancer ("Gleason score") et l'immunomarquage PRL a été observée (Li et al., 2004). Allant dans le même sens, Stat5, cible majeure des cascades de signalisation du PRLR, a été trouvé constitutivement activé dans les cancers prostatiques de haut grade. Les analyses immunohistochimiques démontrent aussi une corrélation positive entre l'activation de Stat5 et un haut score de Gleason dans 114 cas de cancers de la prostate (Li et al., 2004). Enfin, il a été montré que l'activation de Stat5 était un marqueur de récurrence du cancer prostatique.

Ainsi, Le rôle pro-tumoral de la cascade PRL/Stat5 apparait donc plus simple à établir pour les cancers prostatiques que pour les cancers mammaires (Tan et al., 2008).

5. Variants génétiques du PRLR

5.1 Données de la littérature

Il a été longtemps supposé que les mutations du PRLR pourraient être impliquées dans les pathologies semblant impliquer la PRL, dont celles affectant les tissus mammaires et prostatiques. Plusieurs études se sont intéressées aux anomalies génétiques du PRLR (et de la PRL) et à leur association potentielle avec le risque de développement tumoral (Glasow et al., 2001 ; Canbay et al., 2004 ; Lee et al., 2011). Plusieurs polymorphismes nucléotidiques (SNPs) non codants ou silencieux ont été mis en évidence mais seules, deux substitutions faux-sens du gène PRLR avaient été décrites (I76V, I146L), sans que leur impact physiopathologique puisse être établi. Très récemment, une mutation faux-sens dans le domaine extracellulaire du PRLR a été identifiée dans un cas d'hyperprolactinémie familiale (Newey et al., 2013). A cette exception près, on ne connaît donc pas aujourd'hui de pathologie génétique clairement liée à la PRL ou son récepteur.

5.2 PRLR I146L

Dans l'idée que certaines prédispositions génétiques pourraient être un facteur causal de pathologies mammaires bénignes, une étude prospective a été menée par notre laboratoire afin d'identifier d'éventuelles altérations codantes de la PRL et du PRLR dans une cohorte de patientes atteintes d'une maladie bénigne rare, appelée : Polyadenomatose mammaire (PAM) (Courtilot et al., 2010).

La PRL jouant un rôle essentiel dans la morphogenèse et la différenciation de la glande mammaire, notre équipe a émis l'hypothèse que le changement de propriétés de la PRL et /ou du PRLR provoqué par des anomalies génétiques pourrait être impliqué dans l'étiologie de la pathologie PAM. De manière intéressante, la substitution d'une adénine par une cytosine à l'état hétérozygote dans l'exon 6 du gène du PRLR, codant pour un remplacement d'une leucine par une isoleucine en position 146 dans le domaine extra-cellulaire du récepteur a été retrouvé chez 4 patientes atteintes de PAM sur les 95 patientes de l'étude. Ce polymorphisme n'a pas été retrouvé chez les 200 témoins inclus dans l'étude, rendant ainsi la différence avec le groupe de patientes significative (Bogorad et al., 2008, Courtilot et al. 2010).

Deux études précédentes avaient déjà montré que ce variant I146L était présent chez les patientes ayant un cancer du sein et non dans la population contrôle ; toutefois les valeurs statistiques obtenues n'étaient pas significatives (Canbay et al., 2004 ; Vaclavicek et al, 2006). Toutes ces observations suggèrent donc que ce variant pourrait être impliqué dans la pathogenèse mammaire. Des études *in vitro* de ce variant ont donc été réalisées par notre laboratoire afin de déterminer les nouvelles fonctions acquises par le récepteur PRLR qui porte cette substitution Ile146→Leu. Ainsi, ces études fonctionnelles ont été effectuées en faisant exprimer ce récepteur mutant dans différentes lignées cellulaires (Bogorad et al., 2008). Trois modèles cellulaires (HEK 293: cellules rénales embryonnaires humaines; MCF-7: cellules tumorales mammaires humaines ; Ba/F3: cellules lymphoïdes pro-B murines) ont été transfectés stablement par les vecteurs codant pour le hPRLR sauvage (wt) ou I146L. Dans les clones de HEK 293 et MCF-7 qui expriment stablement le PRLRwt, l'addition de PRL au milieu de culture est nécessaire pour induire une phosphorylation sur résidus tyrosines du PRLR et de Stat5. En revanche, dans les clones exprimant le PRLR I146L, la phosphorylation du récepteur et de Stat5 est observée même en absence de stimulation par la PRL. Ces résultats indiquent que le mutant PRLR-I146L a une activité constitutive en absence de PRL, même si cette activité basale est très inférieure à celle induite après ajout de PRL dans le milieu de culture ; l'activation de Stat5 étant alors équivalente à celle obtenue dans les clones cellulaires surexprimant le récepteur sauvage (figure I.18). Cette activité du PRLR-I146L indépendante de la PRL a été validée au plan fonctionnel dans le modèle cellulaire Ba/F3, dépendant de l'interleukine 3 (IL-3) pour sa survie. Cette cytokine peut être remplacée par d'autres cytokines et notamment la PRL pour autant que les cellules Ba/F3 soient transfectées stablement par le récepteur apparenté, en l'occurrence le PRLR. Par conséquent, les cellules Ba/F3-PRLRwt (exprimant le PRLR après transfection stable) prolifèrent en présence de PRL dans le milieu de culture, mais entrent en apoptose massive 24h après l'arrêt d'ajout de PRL dans le milieu de culture. Par contre, les cellules Ba/F3-PRLR-I146L survivent et prolifèrent en présence mais aussi et surtout en absence de PRL (figure I.19). Ce résultat montre la capacité des clones Ba/F3-PRLR-I146L à activer spontanément et de manière fonctionnelle les cascades de signalisation de survie cellulaire et de prolifération, et ce, indépendamment de la stimulation par la PRL du récepteur PRL variant.

Tous ces résultats suggéraient donc que le récepteur variant PRLR-I146L avait une activité constitutive. Néanmoins le mécanisme moléculaire induit par la substitution d'une Isoleucine par une Leucine dans le domaine extracellulaire du PRLR permettant au récepteur d'être constitutivement actif n'était pas décrypté, de même que le rôle potentiel de l'activation constitutive de cette voie dans la pathogenèse mammaire, qu'elle soit bénigne ou maligne.

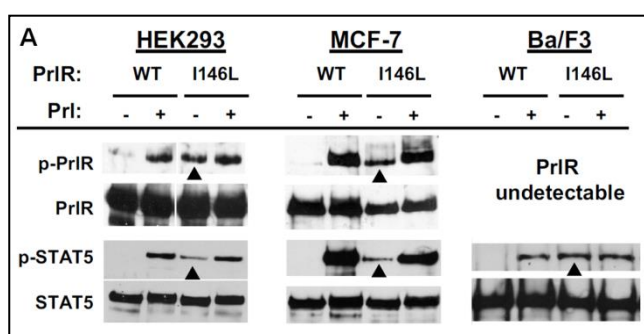


Figure I.18 : mise en évidence de l'activation constitutive du PRLR I146l dans différentes lignées cellulaires (Bogorad et al., 2008)

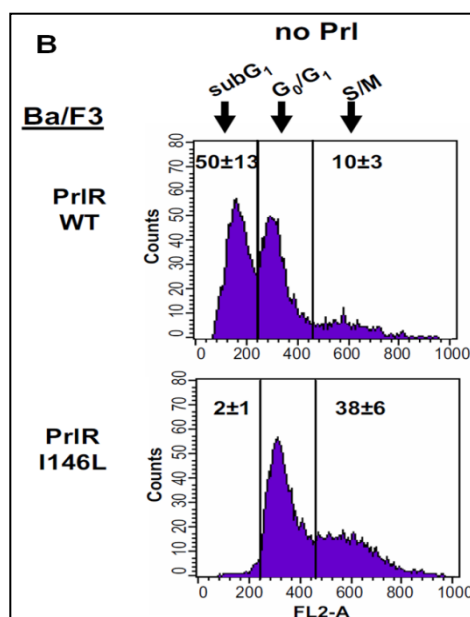


Figure I.19 : Effet du PRLR-I146L sur la prolifération des cellules Ba /F3 (Bogorad et al., 2008)

OBJECTIFS DE TRAVAIL

A l'aube de mon projet de thèse, notre équipe venait d'identifier le premier variant fonctionnel naturel gain-de-fonction du PRLR dans le cadre d'une étude prospective portant sur les pathologies mammaires bénignes rares, dont la polyadénomatose mammaire. Cette mutation germinale est dénommée PRLR-I146L (remplacement de l'isoleucine 146 par une leucine) (Bogorad et al., 2008 ; Courtilot et al., 2010). Il s'agit d'une mutation gain-de-fonction, le PRLR-I146L activant constitutivement les voies de signalisation en aval, dont la voie Stat5, et ce en absence de toute stimulation par la PRL. Cette faculté du PRLR-I146L d'activer la cascade Stat5 a été observée dans différents types cellulaires, dont des cellules tumorales mammaires MCF-7.

Le rôle potentiel du PRLR-I146L dans le tumorigenèse mammaire reste inconnu. En effet, si dans notre étude princeps la prévalence de ce variant génétique s'est révélée comme plus élevée chez les patientes présentant une PAM que chez les sujets témoins (Bogorad et al., 2008 ; Courtilot et al. 2010), le lien de causalité reste à démontrer. De plus, au vu des effets de la signalisation PRL/Jak2/Stat5 dans le cancer du sein, le rôle de ce variant PRLR-I146L activant constitutivement cette voie se devait d'être exploré dans ce contexte spécifique. Une étude en cours ("Prolacsein") vise à étudier la prévalence du PRLR-I146L dans une cohorte prospective de cancer du sein.

Dans ce cadre mon projet de thèse a pour but d'élucider les aspects mécanistiques du PRLR-I146L en répondant à deux questions par le biais de modèles expérimentaux cellulaires et animaux:

- quelles sont les conséquences physiologiques de l'activation constitutive du PRLR suite à une mutation intervenant en position 146 dans des cellules mammaires tumorales ?
- quel est l'impact de l'expression du récepteur I146L sur la pathophysiologie de la glande mammaire chez la souris ?

Hypothèses de travail

Nous avons voulu déterminer quel était l'impact de la position 146 du PRLR et plus particulièrement de la substitution I146L sur la pathophysiologie de la glande mammaire, en sachant que les premiers résultats du laboratoire l'associait à la pathologie mammaire bénigne de type PAM et au niveau moléculaire à une activation constitutive de la voie de signalisation Stat5. D'autre part, nous voulions rechercher plus spécifiquement les effets de l'expression du PRLR I146L sur la pathophysiologie de la glande mammaire à travers l'analyse de souris transgénique exprimant ce variant du PRLR de manière physiologique.

Les objectifs principaux de ce projet sont donc les suivants :

- I. Déterminer si la position 146 du PRLR a un impact sur la progression tumorale mammaire en l'exprimant de manière ectopique dans deux lignées cellulaires humaines représentant deux stades différents du développement du cancer du sein : les cellules MCF-7 qui ont un phénotype luminal (différencié) versus les cellules MDA-MB231 qui ont un phénotype mésenchymateux (indifférencié).
- II. Déterminer si le PRLR-I146L a un impact sur le développement normal et/ou pathologique de la glande mammaire dans un contexte *in vivo* impliquant la création d'un nouveau modèle animal : des souris "knock-in" PRLR-I146L humain (versus le PRLR humain sauvage [PRLR wt] en contrôle) permettant l'intégration du transgène en une seule copie et donc d'obtenir une expression d'un niveau physiologique.

MATERIELS
ET
METHODES

1. Génotypage des souris :

a. Extraction ADN génomique (ADNg)

L'ADNg a été extrait à partir de fragments d'oreilles de souris. Ceux-ci ont été incubés la nuit à 37°C dans 30µl de tampon de lyse (Tris 100mM pH7.5; NaCl 200mM ; SDS 0,2% ; EDTA 5mM) auquel on ajoute de la Protéinase K à la concentration finale de 0,1mg/ml. Le lendemain 3 µl de solution contenant l'ADNg est dilué dans 50 µl H2O puis incubé 10 min à 95°C afin d'inhiber la Protéinase K puis incubé 10min à 4°C.

b. PCR

La présence du transgene hPRLR (I146l ou wt), la détection de la Cre ou encore la présence du transgene hPRLR (i146l ou wt) après excision du gène rapporteur LacZ par la PGK-Cre recombinase, ont été détectés par la méthode PCR (polymerase chain reaction). Pour chaque PCR, les conditions générales d'amplification sont : à 1,5 µl de solution d'ADN génomique extrait dans les conditions décrites ci dessus, sont ajoutés 0,125µl de chaque amorce d'une solution mère à 100µM, 0,2µl d'enzyme Taq polymérase (GOTAQ Promega) , 0,3µl de dNTP (25mM), X µl MgCl2 (25 mM), 5 µl de mix de réaction concentré 5X (Promega) , X µl H2O de manière à obtenir un volume final réactionnel de 25µl. Pour chaque couple d'amorces, nous avons mis au point les conditions d'amplification qui sont indiquées ci-dessous de même que la séquence des amorces utilisées (tableauII.1).

Fragment détecté	Sequences des amorces	Taille de l'amplicon	Conditions de PCR
Transgene	5'CAA-CAG-TGT-CAG-CCT-CAA-CTT-TCC-TC3' 5'TAC-CTT-TTG-ATA-AGG-CTG-CAG-AAG-GA3'	3460pb (avec hygro) 1376pb (sans hygro)	30sec 98°C 30sec 98°C 30sec 68°C 3min 72°C } 30 Cycles
Cre	5'GGACATGTTTCAGGGATCGCCA3' 5'GCATAACCAGTGAAACAGCAT3'	300pb	5min 95°C 1min 94°C 1min 57°C 2min 72°C } 35 Cycles
hPRLR	5'TGGGAAGCAGTTTCTCGGAT3' 5'ACGGTTGTATCATTATGAT3'	385pb	5min 94°C 1min 94°C 1min 56°C 1min 72°C } 30 Cycles
Mouse Rosa26	5' CCCTCTTCCCTCGTGATCTG3' 5' CCTCCCATTTTCCTTATTGCG3'	198pb	5min 94°C 1min 94°C 1min 54°C 1min 72°C } 30 Cycles
pPGK-hPRLR	5'CTTTGCTCCTTCGCTTTCTG3' 5'CCCATCTGGTTAGTGGCATT3'	761pb après action de la Cre 4kb sans l'action de la Cre(fragment non détecté)	5min 94°C 1min 94°C 1min 54°C 1min 72°C } 30 Cycles

Tableau II.1 : Liste des amorces et les conditions utilisées pour le génotypage des souris par PCR

2. Extraction des protéines

Les échantillons tissulaires prélevés lors de la dissection sont broyés, la poudre obtenue est ensuite récupérée dans du tampon de lyse (Tris- HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, fluorure de sodium 50 mM, pyrophosphate de sodium 30mM, orthovanadate de sodium 1mM, phenylmethylsulfonyl 1 mM (PMSF), 1 µg/mL de pepstatin A, 2 µg/mL leupeptin, 5 µg/mL aprotinin, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100). La lyse se fait sous agitation pendant 30min à 4°C puis une centrifugation de 15000 rpm pendant 30min à 4°C est effectuée afin de récupérer les lysats protéiques. La concentration en protéines des lysats tissulaires obtenus est dosée à l'aide de duplicats suivant la méthode de Bradford (Biorad).

3. Immunoblot

a. Electrophorèse et transfert sur membrane des échantillons protéiques

Les échantillons protéiques sont dilués dans du tampon dénaturant de charge (Tris-HCl 0,125M (pH 6,8), SDS 4%, glycérol 20%, bleu de bromophénol), contenant du β -mercaptoéthanol 10%. Ils sont ensuite dénaturés par chauffage à 100°C pendant 5 min, puis déposés sur gel contenant 10 % d'acrylamide (% de gel correspondant à une bonne séparation des protéines à mettre en évidence d'un poids moléculaire compris entre 40 et 95 kDa) La migration à ampérage constant de 30 mA par gel dans un tampon de migration (Tris-HCl 0,025 M, SDS 0,1 %, glycine 0,192 M). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par transfert liquide dans un tampon de transfert (Tris-HCl 0,025 M, SDS 0,1 %, glycine 0,192M, éthanol 20 %) pendant 1 heure à 100 V.

b. Immunodétection

La membrane de nitrocellulose est, par la suite, incubée pendant 1 heure dans du lait écrémé 5% dissout dans du tampon TBST (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 500mM, Tween 0,05%) afin de saturer les sites non-spécifiques.

Après un rinçage en TBST, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire dilué dans du TBST/BSA 3% : durant la nuit à 4°C. La membrane est alors lavé 3 fois 5 min en TBST avant d'être incubée en TBST/BSA 3% en présence de l'anticorps secondaire couplé à la horseradish peroxydase (HRP) pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est de nouveau lavée 3 fois dans le tampon TBST. L'expression de la protéine d'intérêt est révélée par chimioluminescence en incubant la membrane dans la solution du kit de détection (Lumiglo cell signaling) suivant le protocole décrit par le fournisseur. La révélation se fait par autoradiographique, ou directement sur l'appareil Chemidoc (Biorad) qui permet une numérisation directe de l'image et une quantification associée de l'intensité des bandes. Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (tableau II.2).

Anticorps primaires

Anticorps	Fournisseur	Référence	Espèce	Dilution
PRLR	Zymed	35-9200	souris	1000
Phospho Stat 5	Advantex	E47D7	lapin	1000
Stat 5	Santa Cruz	C17-sc835	lapin	1000

Anticorps secondaires couplés à la HRP

Anticorps	Fournisseur	Référence	Espèce	Dilution
Anti-souris	Amersham	NXA-931	mouton	2500
Anti-lapin	Cell signaling	7074	non renseigné	5000

Tableau II.2 : Caractéristiques des anticorps utilisés en western blot

4. Extraction des ARN totaux et reverse transcription

Les ARN totaux sont extraits à partir d'échantillons tissulaires puis purifiés par le kit «RNeasy mini kit » selon le protocole du fournisseur (Qiagen). En résumé, les différents échantillons tissulaires sont broyés puis lysés en présence d'un tampon de forte salinité hautement dénaturant de guanidine-thiocyanate auquel a été ajouté 1% de β -mercaptoéthanol. Le lysat tissulaire obtenu est par la suite homogénéisé à l'aide d'une aiguille de 21G montée sur seringue de 2 ml. Après addition d'un volume d'éthanol absolu, le lysat est déposé sur une colonne pourvue d'une membrane de silice qui fixe les ARN dans des conditions de haute salinité. Plusieurs étapes de lavage permettent d'éliminer les débris cellulaires et autres contaminants. Les ARN totaux sont au final élués dans une solution très peu saline, en l'occurrence dans de l'eau dépourvue en RNase fournie dans le kit. Les ARN totaux obtenus sont ensuite dosés à l'aide du Nanodrop puis 250ng d'ARN totaux sont utilisés pour synthétiser les ADNc, selon le protocole du fournisseur (kit Superscript SSII, Invitrogen). Les ADNc synthétisés sont conservés à -20°C.

5. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Afin d'effectuer une quantification relative de l'expression de différents gènes, des réactions de PCR quantitative en temps réel ont été effectuées sur les ADN complémentaires issus des réactions de réverse transcription selon la technologie SYBR Green à l'aide du kit développé par Invitrogen en suivant le protocole du fournisseur. A 2 µl d'ADNc sont ajoutés 12,5 µl de mix Syber Green, les amorces à une concentration finale de 10 µM, de l'eau pour compléter le volume réactionnel à 25 µl. Les réactions de q-PCR ont été réalisées en plaque 96 puits sur un appareil Vii7 (APPLIED BIOSYSTEMS), chaque point étant fait en duplicat. Les résultats ont été analysés selon la méthode des doubles ΔC_t . La quantification relative a été effectuée en prenant comme gène référent le gène codant pour la cyclophiline B exprimé de manière ubiquitaire. Avant d'être utilisés pour la quantification relative des ARNs des gènes d'intérêt, les couples d'amorces dessinés ont été validés en établissant leur courbe d'efficacité d'amplification.

primer	séquence de l'oligonucléotide
hPRLR-F	CTGGGACAGATGGAGGACTT
hPRLR-R	GGGCCACCGGTTATGTAGT
Cyclophiline-F	CAGGTCCTGGCATCTTGTC
Cyclophiline-R	TTGCTGGTCTTGCCATTCCT

Tableau II. 3 : séquences des oligonucléotides utilisés pour les RT-PCR en temps réel

(Séquences orientées 5'→3'; F désigne l'oligonucléotide sens, et R l'antisens)

6. Analyses histologiques

Tout les organes prélevés sont inclus en paraffine puis coupés (épaisseur : 4 μ m) à l'aide d'un microtome (Reichert-Jung 2030). Les coupes sont colorées à l'hématoxyline/éosine afin de visualiser la structure tissulaire de chaque organe. L'analyse des lames est réalisée sous microscope optique (Evos).

a. Whole mount

Les glandes mammaires prélevées sont étalées sur lames puis incubées la nuit dans une solution Methacan (60% éthanol absolu, 30% chloroforme, 10% acide acétique). Le lendemain; les glandes sont passées dans des bains d'éthanol successifs (70% , 50% , 30%) pendant 15min à chaque fois puis 5min à l'eau distillée. Elles sont par la suite incubées la nuit dans une solution de rouge Carmin. Le surlendemain les glandes sont deshydratées dans des bains d'éthanol successifs (70% , 90% , 100%) puis incubées dans deux bains successifs de substituts de xylène pendant 30min . Les wholes mount sont ensuite photographiés pour être analysés.

b. Immunohistochimie (IHC) et immunofluorescence (IF)

Les immuno-marquages sont réalisés sur des coupes sériées de glandes mammaires de souris (hPRLR-I146I, hPRLR-wt ou des souris contrôles). Dans un premier temps, les coupes de tissu sont déparaffinées à l'aide de bains successifs de substitut de xylène, d'éthanol et d'eau distillée. Les coupes de tissu sont soumises alors à une étape de démasquage d'antigène par incubation de celles-ci dans une solution de citrate pH=6 porté à 90°C pendant 30 min. Les lames sont ensuite incubées dans un tampon de blocage (Dako) en présence de 10% de sérum de cheval pendant 30 min à température ambiante. Puis la lame est incubée en présence de l'anticorps primaire (ici anti-hPRLR, anti-STAT5, anti-CK5 et anti-CK8) dilué dans la solution de blocage durant la nuit à 4°C. Les lames sont ensuite lavées en PBS Tween puis incubé pendant 1 heure à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire dirigée contre l'espèce dans laquelle l'anticorps primaire a été généré. Cet anticorps est couplé à la biotine (kit Vectastain elite ABC reagent, Vector,). Dans ce cas, les lames sont ensuite incubées dans une solution permettant de former un complexe avidine-biotine-peroxydase pendant 30 min à température ambiante. La révélation se fait par incubation des lames dans une solution de DAB (di-aminobenzidine) donnant une coloration marron suite à sa transformation en produit insoluble marron par la peroxydase. Finalement les lames sont contre-colorées à l'hématoxyline.

Pour les détections par immunofluorescence, les anticorps secondaires utilisés sont couplés à un fluorochrome (alexa rouge ou vert). Les lames sont incubées 1 heure à température ambiante en présence des deux anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris à la dilution de 1/200. Puis les lames sont lavées 3 fois en PBS pendant 15 min à chaque bain avant d'être incubée dans une solution de Hoechst (0,3µl dans 1ml) permettant de marquer les noyaux pendant 10 min à température ambiante. Les lames sont finalement montées avec un liquide de montage pour fluorescence (Dako fluorescent medium) après 3 nouveaux lavages en PBS.

Les anticorps utilisés sont :

L'anticorps primaire utilisé en immunohistochimie est un anticorps polyclonal anti-hPRLR (Novartis 1:100) dérivé chez le lapin.

Les deux anticorps primaires utilisés en immunofluorescence sont l'anticorps anti-CK5 (anti-lapin) utilisé à la dilution de 1/100 et l'anti-CK8 utilisé à la dilution de 1/600 généré chez la souris.

Les anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence sont un anti-lapin couplé à l'alexa 488 (vert) et un anti-souris couplé à l'alexa 594 (rouge) aux dilutions respectives de 1/200.

Dans tous les cas des expériences de contrôles négatifs ont été effectuées en présence des anticorps secondaires seuls pour évaluer le bruit de fond générés par ceux-ci.

RESULTATS

Residue 146 Regulates Prolactin Receptor Folding, Basal Activity and Ligand-Responsiveness: Potential Implications in Breast Tumorigenesis

Chi Zhang^{1,2*}, Ibtissem Cherifi^{1,2*}, Mads Nygaard³, Gitte W. Haxholm³, Roman Bogorad^{1,2,#}, Marie Bernadet^{1,2}, Patrick England⁴, Isabelle Broutin^{2,5}, Birthe B. Kragelund³, Jacques-Emmanuel Guidotti^{1,2}, Vincent Goffin^{1,2†}

Publié sur Molecular and Cellular Endocrinology

Residue 146 Regulates Prolactin Receptor Folding, Basal Activity and 1 Ligand-
Responsiveness: Potential Implications in Breast Tumorigenesis

Chi Zhang^{1,2*}, Ibtissem Cherifi^{1,2*}, Mads Nygaard³, Gitte W. Haxholm³, Roman
Bogorad^{1,2,□}, 4 Marie Bernadet^{1,2}, Patrick England⁴, Isabelle Broutin^{2,5}, Birthe B.
Kragelund³, Jacques-5 Emmanuel Guidotti^{1,2}, Vincent Goffin^{1,2†}

¹Inserm, U1151, Institut Necker Enfants Malades (INEM), Equipe Physiopathologie des
hormones PRL/GH, Paris, France, ²Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris,
France, ³Structural Biology and NMR Laboratory, Department of Biology, University of
Copenhagen, Copenhagen, Denmark, ⁴Institut Pasteur, Plateforme de Biophysique des
Macromolécules et de leurs Interactions, Département de Biologie Structurale et Chimie,
F-75015, Paris, France, ⁵Laboratoire de cristallographie et RMN biologiques CNRS, UMR
13 8015, Paris, France.

*Equal contributions

□current affiliation: David H. Koch Institute for Integrative Cancer Research,
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA

†Correspondence:

Dr. Vincent Goffin

Inserm U1151/INEM; Equipe "Physiopathologie des hormones PRL/GH"

Faculté de Médecine Paris Descartes, Bâtiment Leriche – Porte 9

14 Rue Maria Helena Vieira Da Silva, CS61431, 75993 Paris cedex 14

Tél : +33 1 72 60 63 68 / fax: +33 1 72 60 64 01 / e-mail: vincent.goffin@inserm.fr

Keywords: prolactin receptor, gain-of-function, STAT5, MAPK, proliferation, Ile146,
polymorphism, structure, breast cancer.

ABSTRACT

PRLRI146L is the first identified gain-of-function variant of the prolactin receptor (PRLR) that was proposed to be associated with benign breast tumorigenesis. Structural investigations suggested this hydrophobic core position in the extracellular D2 domain to be linked to receptor dimerization. Here, we used a mutational approach to address how the conservative I-to-L substitution induced constitutive activity. Using cell-based assays of different I146-PRLR variants in combination with spectroscopic/nuclear magnetic resonance analyses we found that chemical manipulation of position 146 profoundly altered folding, PRL-responsiveness and ligand-independent activity of the receptor in a mutation-specific manner. Together, these data further add to the critical role of position 146, showing it to also be crucial to structural integrity thereby imposing on the biological PRLR properties. When stably introduced in MCF-7 (luminal) and MDA-MB231 (mesenchymal) breast cancer cells, the most potent of PRL-insensitive mutants (PRLRI146D) had minimal impact on cell proliferation and cell differentiation status.

1. Introduction

The involvement of prolactin (PRL) in breast cancer is supported by a wide array of epidemiological and experimental data (for a review, Clevenger et al., 2003). For example, high-normal circulating levels of PRL have been shown to increase estrogen-receptor positive (ER+) breast cancer risk (Tworoger et al., 2013), while the pro-tumor potency of PRL signaling has been demonstrated in various transgenic mouse models expressing PRL locally or systemically (Wennbo et al., 1997; Rose-Hellekant et al., 2003; Manhes et al., 2006). However, the actual role of PRL signaling in mammary tumor initiation versus progression remains debated, as recent data have suggested that PRL signaling through signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) pathway could eventually protect breast cancer patients from disease progression (Peck et al., 2011). The underlying mechanism that has been proposed suggests that one of the outcomes of PRL/STAT5 signaling is to maintain the differentiation status of breast cancer cells, reminiscent of the physiological role of STAT5 during mammapoiesis (Hennighausen and Robinson, 2008). Accordingly, PRL was shown to promote breast cancer cell adhesion at the expense of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is classically associated with cancer progression and metastasis (Sultan et al., 2005; Sultan et al., 2008; Nouhi et al., 2006). Prolactin signaling may thus exert a dual role in breast cancer by favoring cancer initiation while limiting cancer progression (For a review, Wagner and Rui, 2008).

Attempts to identify PRL receptor (PRLR) mutations in breast cancer have failed. At best, single nucleotide polymorphism (SNPs) - most often in non-coding regions - have been proposed to be associated with the disease, but neither functional data nor potential molecular mechanisms were provided to support the pathophysiological relevance of such variants (Glasow et al., 2001; Canbay et al., 2004; Vaclavicek et al., 2006; Lee et al., 2007; Mong et al., 2011; Nyante et al., 2011). In fact, database screening (e.g. <http://cancergenome.broadinstitute.org/index.php>) suggests that the PRLR gene is not prone to mutation in any cancer.

In the course of a study focused on benign breast diseases (BBDs), we recently identified a 75 PRLR genetic variant that appeared to be slightly more frequent in BBD patients than in the population of control subjects (Bogorad et al., 2008). This germinal variant involved substitution of a leucine for the isoleucine naturally found at position 146, which is located within the extracellular domain (ECD) of the receptor (Fig. 1). Although the presence of the PRLRI146L allele failed to stratify the cohort with respect to patient biological profiles or BBD characteristics, the potential relevance of this PRLR variant in breast tumorigenesis came from its elevated basal activity that was identified in reconstituted cell models (Bogorad et al., 2008; Courtillot et al., 2010). Indeed, PRLRI146L appeared to trigger downstream signaling (STAT5 and Erk1/2) in the absence of PRL stimulus in stably transfected HEK293 fibroblasts, MCF-7 breast cancer cells, and Ba/F3 mouse lymphoid cells. Furthermore, PRLRI146L was able to immortalize Ba/F3 cells, which are totally dependent on cytokine signaling for survival and proliferation, supporting its potential oncogenic potency (Bogorad et al., 2008; Courtillot et al., 2010; Goffin et al., 2010). The gain-of-function properties of this variant were further confirmed by another group who identified its ability to relieve pyruvate kinase M2 inhibition and the resulting lactate accumulation, irrespective of PRL stimulation; these findings further suggested the potential role of PRLRI146L in mammary cell transformation as a metabolic regulator (Varghese et al., 2010).

Although the PRLR is encoded by a single gene, multiple isoforms resulting from alternative splicing have been identified in various species including humans (Hu et al., 2001). Together with the growth hormone receptor (GHR), the PRLR represents an archetype of class I cytokine receptors. Although these receptors were initially referred to as 'homodimeric' receptors (O'Sullivan et al., 2007), subsequent studies showed that various isoforms could actually heterodimerize (Ross et al., 1997; Xie et al., 2009) and even antagonize (Trott et al., 2003). These receptors exhibit minimal structural complexity

compared to other family members (Bazan, 1990). Their ECDs contain a single cytokine receptor homology (CRH) module consisting of two fibronectin type III domains called D1 and D2 (Fig. 1A). In addition to residue I146, the D2 contains the conserved Trp-Ser repeat (WS motif), a hallmark of cytokine receptors whose structural alteration upon receptor activation has been recently elucidated by our group (Dagil et al., 2012) and reviewed (Olsen and Kragelund, 2014). In the absence of ligand, these receptors are pre-dimerized at the cell membrane in a structural conformation that prevents intracellular signaling (Brown et al., 2005; Tan et al., 2005; Gadd and Clevenger, 2006; Qazi et al., 2006; Tallet et al., 2011). Under physiological conditions, intracellular signaling is triggered upon binding of one ligand molecule to preformed receptor homodimers. Crystallographic analyses involving growth hormone (GH) or PRL bound to their cognate homodimerized receptor ECDs have shown that the ternary complexes are overall very similar, although they differ in many atomic details (De Vos et al., 1992; Broutin et al., 2010). The molecular mechanism of membrane-bound GHR activation has been recently elucidated (Brown et al., 2005; Brooks et al., 2014). Ligand binding induces relative rotation and translation of both GHR chains, leading to a shift in the transmembrane α -helix conformation from a parallel to a left-handed crossover arrangement; this results in the separation of GHR intracellular domains and pairing of the kinases domains of the receptor-associated Janus kinase 2 (Jak2), which facilitates their trans-phosphorylation (Brooks et al., 2014). Although this mechanism could be generalized to class I cytokine receptors, mutational studies of juxta-transmembrane sequences failed to support at least the first rotational model for the PRLR (Liu and Brooks, 2011). Thus, the actual mechanism of PRLR activation, and in particular the role of D2 domain in this process, still remains poorly understood (For a review, Brooks, 2012).

To address the mechanism by which the I-to-L substitution shifts the PRLR to a partially activated state, we initially aimed to use a structural approach to compare the 3D structure of free PRLRI146L-ECD to that of ligand-bound PRLRWT-ECD (Broutin et al., 2010; Van Agthoven et al., 2010). Unfortunately, attempts to produce recombinant PRLRI146L-ECD were unsuccessful as the protein precipitated upon refolding; this suggested structural disturbance despite the conservative nature of the substitution. However, it was possible to produce soluble D2I146L to perform nuclear magnetic resonance (NMR) studies. These analyses revealed that despite of the fact that the T-stack conformation of the WS motif typical of the off-state (unbound receptor) was not shifted to the ladder conformation

typical of the on-state (PRL bound receptor), the I146L substitution caused the appearance of a minor population of a low-affinity dimers (Dagil et al., 2012). Furthermore, chemical shift changes compared to D2WT suggested that the I146L substitution led to interference with the D2-D2 dimerization interface (Fig. 1B). These structural observations fitted well with biological observations since the basal activity exhibited by PRLRI146L in in vitro studies (see above) was generally in between the level of activity detected for non-stimulated and PRL-stimulated PRLRWT.

The aim of the present study was to further investigate position 146, which appears to be a key regulator of receptor folding and activity. One of the questions that we raised was whether the gain-of-function properties of hPRLRI146L resulted from the specific loss of I146 or from the specific introduction of L at this position. To that aim, we tested various other representative substitutions at position 146 (146X mutants; see Material and Methods) and monitored their PRL-dependent and PRL-independent signaling properties in various cell types. Our results show that some of the engineered PRLR mutants became PRL-insensitive while at the same time produced much stronger basal activity than the natural SNP variant PRLRI146L. This provided us with a unique opportunity to investigate the impact of gain-of-function receptor-mediated permanent signaling in breast cancer cells.

2. Material and Methods

2.1. Hormones and receptors

Recombinant human (h) PRL was produced in *E. coli* and purified as described previously (Bernichtein et al., 2003b). Biotinylation of hPRL was performed using the eponymous kit from Calbiochem, strictly following the procedure advised by the manufacturer. Human PRLR-D2WT were expressed and purified as described (Dagil et al., 2012); hPRLR-D2I146G, hPRLR-D2I146D and hPRLR-D2I146N were refolded from inclusion bodies as described for hPRLR-ECDWT (Teilum et al., 2005). After dialysis the samples were centrifuged at 15,000×g for 15min, (NH₄)₂SO₄ added to 75% (w/v) and left to precipitate at 4°C overnight. After resuspension in 10mL 100mM NaCl, 30mM NH₄HCO₃ pH 8.0, 1mM DTT the samples were loaded onto the G-50 column and purified as for hPRLR-D2 (Dagil et al., 2012). Stable isotope labeled protein was expressed in M9 media (22mM KH₂PO₄, 42.5mM Na₂HPO₄, 86mM NaCl, 1mM MgSO₄, 1mL M2 trace (Mandrup et al., 1991) containing metal ions, supplemented 11mM (15NH₄)₂SO₄ and 100µg/mL ampicillin.

2.2. Plasmids and mutagenesis

The pcDNA3 (+)-hPRLRWT expression vector was described previously (Goffin et al., 1996). The LHRE (Lactogenic Hormone Response Element)-firefly luciferase reporter plasmid contains six repeats of the STAT5 DNA binding sequence from the beta-casein gene promoter (Goffin et al., 2010). Mutations were introduced by oligonucleotide-directed mutagenesis using the QuikChange II Mutagenesis kit from Stratagene. The coding sequences of vectors were verified on both strands to confirm the presence of the mutations of interest and the absence of unexpected mutations. The hPRLR-D2I146G, hPRLR-D2I146D and hPRLR-D2I146N were generated in the pET11a expression vector harboring the hPRLR-D2 coding region (Dagil et al., 2012) and verified by sequencing (MWG, Germany). Mutagenesis, PCR, and sequencing primers were from Eurogentec (Oligold quality) or from TAGCopenhagen. Sequences are available upon request.

3.3. Culture and transient transfection of HEK 293 cells

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were routinely cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2mM glutamine and antibiotics (50U/mL penicillin, 50µg/mL streptomycin) (Invitrogen). Cells plated in 96-well plates (50,000 cells/well) were cultured in 0.5% FCS medium and cotransfected (Lipofectamine, Invitrogen) using plasmids

encoding the PRLR of interest (20 ng/well), the LHRE-luciferase reporter gene (4 ng/well) and the Renilla luciferase gene (4 ng/well) as an internal (PRL-unresponsive) control of transfection efficiency, as described (Goffin et al., 2010).

3.4. Culture and generation of stable Ba/F3 cell populations

This murine pro-B cell line is dependent on IL-3 for growth. Parental cells were routinely maintained in RPMI medium 1640 supplemented with 10% heat inactivated FCS, 2mM glutamine, antibiotics and 10% of WEHI cell conditioned medium as the source of IL-3 (Goffin et al., 2010). Cells were electroporated (Gene Pulser, BIO-RAD; 200V and 950µF) using 10–20µg of pcDNA3(+)-PRLR (WT or mutants), then populations stably expressing either receptor were selected by several passages in G418-containing medium (selection #1, see Fig S1). Populations #1 were routinely maintained in the same medium as parental cells but containing 500µg/ml G-418. The same medium in which 4 nM hPRL substituted WEHI conditioned medium was used for selection #2. For selection #3, hPRL was omitted (Goffin et al., 2010).

197

3.5. Culture and generation of stable MCF-7 and MDA-MB231 cell clones and populations

MCF-7 is an ER+, luminal breast cancer cell line. This cell line was routinely maintained in RPMI + Glutamax, 10% FCS, and antibiotics. For stable transfections, 4 µg hPRLR plasmids (same as described above for Ba/F3 cells) were transfected using lipofectamine. Two days post-transfection G418 (500 µg/ml) was added to the medium and 15 days later individual clones were picked and amplified individually. MDA-MB231 is a triple negative, mesenchymal-like, breast cancer cell-line in which expression of the PRLR is undetectable; these cells exhibit high Erk1/2 activation at basal conditions (Nouhi et al., 2006). Culture media and transfection protocols were similar to those described for MCF-7 cells.

3.6. Quantitative RT-PCR

Total RNAs were obtained using the RNeasy Minikit (Qiagen, France) according to manufacturer's instructions. RNA (250 ng) was reverse-transcribed using SuperScriptTMII Reverse transcriptase with the SuperScriptTMII First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen, CA, USA). For quantitative (q) RT-PCR analysis, the cDNA was then subjected to real-time PCR amplification using gene specific primers and SYBR® Green PCR MasterMix (Applied Biosystems). Cyclophilin A was used as a housekeeping gene in each reaction. Real-time PCR was performed using a Viia7 PCR system (AB applied systems, Paris,

France). Relative expression of target genes was calculated after normalizing to the expression of Cyclophilin A, which was used as a housekeeping gene. Parental cell lines (as indicated) served as calibrator sample for the calculation of fold induction in gene expression.

3.7. Proliferation assays

Proliferation/survival of Ba/F3 cell populations was monitored using the WST-1 tetrazolium salt method as described (Bernichtein et al., 2003a; Goffin et al., 2010). For monitoring MCF-7 and MDA-MB231 cell proliferation, we used a living cell counting assay, which appeared to be more accurate (sensitive) for cells that proliferate less rapidly. Briefly, 150,000 cells were plated in 12-well plates in 2 mL medium containing either 10% or 1% of FCS. For 96h assays, fresh medium (with/without PRL as indicated) was substituted at 48h. Cells were counted after 48h or 96h as indicated using the counting slides dual chamber for cell counter from Biorad.

3.8. LHRE-luciferase reporter assay

Luciferase assays were performed using dual luciferase (transient transfections) kits 231 (Promega), and plate reading was performed using a Mithras LB 940 reader

(Berthold)(Goffin et al., 2010). The experiments were routinely performed at least three times in triplicate.

3.9. Alphascreen® SureFire® pSTAT5 and pErk1/2 Assays

All reagents were supplied in the SureFire® pSTAT5 or pErk1/2 Assay kits (Perkin Elmer). Various amounts of fresh cell lysates (4-8 µg protein content, $\square$ 1-2x10⁵ cells) were added per well of 384 well plates. Five µL of acceptor mix (Activation buffer, Reaction buffer and acceptor Beads) were added to cell lysates. The plate was incubated at room temperature under low light conditions for 2h. Two µL of donor mix (Dilution buffer and Donor beads) were added. After 2h of incubation, the plate was read on an EnVision™ device (Perkin Elmer).

3.10. Signaling studies

Intracellular signaling was analyzed using cells cultured in 10% FCS medium (MCF-7) or after starvation in 1% FCS medium for 5 h (Ba/F3) or overnight (HEK293, MCF-7) when 247 stimulation using hPRL (1µg/ml, 15 min) was studied. Cell lysates were prepared as 248 previously described (Goffin et al., 2010). Immunoblotting involved either anti-phosphotyrosine STAT5 (C11C5, Cell Signaling, 1:1,000 dilution) or anti-phosphorylated Erk1/2 (D13.14.4E, Cell Signaling, 1:1,000 dilution), or anti-phosphoserine Akt (Cell Signaling, 1:1,000 dilution). Antigen-antibody complexes were revealed using horseradish peroxidase conjugated with anti-rabbit or anti-mouse (1:3,000 dilutions) antibody (GE Healthcare). To ensure equal loading membranes were stripped and re-blotted using the following antibodies: anti-Erk/1/2 (Millipore, 1:1,000 dilution), anti-STAT5 (C-17, Santa Cruz, 1:1,000 dilution) or anti-Akt (Cell Signaling, 1:1,000 dilution) antibodies. Expression (or precipitation) of PRLR was monitored/performed using two anti-PRLR antibodies: the monoclonal 1A2B1 directed against the receptor ECD (Zymed-Invitrogen, 1:1,000 dilution) and/or the polyclonal H300 directed against amino acids 323-622 within the intracellular domain (Santa Cruz biotechnology, 1:1,000 dilution). The Jak2 inhibitor AG490 (α -Cyano- (3,4-dihydroxy)-N-benzylcinnamide, Tyrphostin B42, (E)-N-benzyl-2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylamide) was obtained from Merck Chemicals Ltd. The MEK1/2 inhibitor U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene) was purchased from Cell Signaling. Both inhibitors were dissolved in DMSO and used a final concentration of 50 µM (AG490) or 10 µM (U0126).

3.11. Circular dichroism (CD) spectroscopy

Far-UV CD-spectra were recorded for hPRLR-D2WT, hPRLR-D2I146D, hPRLR-D2I146G, and hPRLR-D2I146N. CD-spectra were acquired from 250nm to 200nm at

20nm/min, bandwidth 1nm, 2s response time at 25°C using a Jasco-810 spectropolarimeter with 1mm light path. Protein concentration was 3.2μM for the hPRLR-D2I146D and hPRLR-D2I146G, 1.6μM for the hPRLR-D2wt and 5μM for the hPRLR-D2I146N all in 10mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.4. The spectra were averaged over 10 scans with a corresponding spectrum of the buffer subtracted.

3.12. NMR spectroscopy

Besides protein the NMR samples contained 10% (v/v) D₂O, 10mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 10mM TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine), 1mM DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) and 0,02% (v/v) NaN₃ at pH 7.4. ¹⁵N-labeled samples were prepared at concentrations of 0.15mM hPRLR-D2WT, 0.03mM hPRLR-D2I146G, 0.03mM hPRLR-D2I146D, and 0.08mM hPRLR-D2I146N. All experiments were recorded at 25°C on either an 800 or 750 MHz Varian INOVA spectrometer. [¹⁵N¹H]-HSQC spectra were recorded for all samples with acquisition times varying from 45 min to 16 hours. Chemical shifts were referenced to DSS at 0.00 ppm (¹H). The spectra were transformed using weighted Fourier transformation and 2D transformed using nmrPipe (Delaglio et al., 1995).

3.13. Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. As indicated in the Legends to Figures, we used One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test, or Two-way ANOVA followed by Bonferonni post hoc test or Tukey's multiple comparisons test. P values are represented using one (p<0.05), two (p<0.01) or three (p<0.001) symbols (□, □).

3. Results

3.1. Generation of I146X mutants

To address the actual role of I146 (the residue found in PRLRWT) or L146 (confirmed SNP), we scanned this position by substituting I146 with various other amino acids (so-called I146X mutants). First, to evaluate the role of the side chain, we used Ala as the classical residue in mutagenesis screening, Val, which should evaluate the role of the methyl group at the δ- position, and Gly assumed to increase the dynamics of the backbone. Second, to challenge the role of the structural integrity for receptor activation we deliberately introduced polar (Asn; by homology to I374N mutation, which confers constitutive activity to □c, another member of the cytokine receptor superfamily) (Jenkins et al., 1996)) and charged (Asp and Arg) groups into the hydrophobic core of the D2 domain.

3.2. PRLRI146N, PRLR146I146D, and PRLRI146R display constitutive activity and PRL-insensitivity in transiently transfected HEK293 cells

We first used transiently transfected HEK293 cells to monitor activation of the STAT5 pathway using immunoblotting or activation of the STAT5-responsive LHRE-Luciferase reporter gene (Bernichtein et al., 2003a). This reconstituted cell system revealed the existence of two categories of I146X mutants based on their PRL-responsiveness (Fig 2A). Group 1 (hPRLRI146A and hPRLRI146V) behaved similarly to hPRLRWT with respect to their ability to activate the reporter gene in hPRL dose-response experiments. In contrast, Group 2 mutants (hPRLRI146G, hPRLRI146N, hPRLRI146D and hPRLRI146R) were totally unresponsive to the hormone in this assay as shown in Fig 2A that displays data normalized to the basal activity of each receptor. However, when looking at absolute luciferase data (firefly/renilla ratio), hPRLRI146D, hPRLRI146N, and hPRLRI146R exhibited >2- to 5-fold increased basal activity compared to hPRLRWT (Fig 2B). The levels of STAT5 phosphorylation as illustrated by immunoblots fully confirmed these findings (Fig 2C): Group 1 mutants induced no detectable basal STAT5 phosphorylation and responded well to PRL (1 μ g/mL, 15 min), while Group 2 mutants exhibited constitutive, though sub-maximal levels of STAT5 phosphorylation. Assuming that the I146X substitutions did not affect the binding affinity of 1A2B1 mAb for the PRLR in the denatured state, all mutants appeared to be expressed at similar levels indicating that the elevated basal activity reflected intrinsic properties of Group 2 mutants (Fig 2C). Importantly, basal STAT5 activity was not further increased under PRL treatment, assessing the PRL-insensitivity of these mutants. Mutant hPRLRI146G was at the border between group 1 and 2 since basal STAT5 phosphorylation was lower than for other Group 2 mutants, while very modest PRL responsiveness could sometimes be observed in this assay (Fig. 2C).

We used hPRLRI146D as a representative for group 2 to investigate whether PRL-insensitivity reflected the absence of cell-surface binding. Transiently transfected cells were stimulated with biotinylated PRL (PRLbiot; 15 min, 37°C), then lysed and ligand-receptor complexes were precipitated using streptavidin-agarose beads; control experiments involved non biotinylated PRL and/or PRLRWT. As shown on Fig 2D, PRLbiot was able to co-precipitate PRLRWT (lane 2) while only background signals were obtained when PRLRI146D and/or non-biotinylated PRL were involved (other lanes). This suggested that the binding scaffold of PRLRI146D was disintegrated and/or that the export of PRLRI146D to the cell surface was impaired. Unfortunately, we could not solve

this issue since PRLbiot binding experiments performed using cell lysates were unsuccessful for both receptors.

We then addressed whether PRLRI146D and PRLRWT could functionally impact each other when expressed in the same cell. First, we investigated the phosphorylation status of STAT5 in HEK293 cells co-transfected with PRLRI146D and/or PRLRWT expression plasmids. To ensure protein expression of both PRLRs, we used the previously validated HA-tagged PRLRWT construct (Tallet et al., 2011) that displays slower electrophoretic mobility (Fig 2E, bottom blot). Co-expression of PRLRWT and PRLRI146D quenched the basal activity of the latter with respect to STAT5 activation (Fig 2E, third lane). Second, we used the LHRE- luciferase reporter assay to test the impact of different receptor ratios on bioactivity. As shown on Fig 2F, a distinct dose-dependent inhibition of PRLRWT towards PRLRI146D basal activity was observed. In contrast, increasing PRLRI146D expression did not inhibit PRL- sensitivity of the PRLRWT (Fig 2E,F). Taken together, these data suggest that both receptors may be able to interact, which resulted in opposite effects on basal (PRLRI146D) versus PRL-induced (PRLRWT) activity. Clearly, further studies are required to fully dissect the molecular mechanisms underlying these effects.

3.3. PRLRI146N, PRLRI146D, and PRLRI146R support autonomous growth of Ba/F3 cells

We next monitored the ability of these mutated PRLRs to induce Ba/F3 cell survival/proliferation. As previously reported, stably transfected Ba/F3 cells express low receptor density and constitute a much more sensitive bioassay than HEK293 cells to discriminate the actual bioactivity of mutated PRLs or PRLRs (Bernichtein et al., 2003a; Bernichtein et al., 2003b; Glezer et al., 2006; Goffin et al., 2010). Moreover, this cell model gives the opportunity to investigate various signaling pathways downstream the PRLR including STAT5 (Onishi et al., 1998) and Erk1/2 (Walker et al., 1998), which nicely complements studies using HEK293 in which only STAT5 is detectably activated (Courtillot et al., 2010). Finally, as Ba/F3 cells are dependent on cytokine receptor signaling for growth, monitoring cell survival/proliferation is a simple way to characterize ligand-dependent versus ligand-independent activity of mutated receptors.

The 3-step selection scheme used in this study to generate and characterize Ba/F3 cell populations stably expressing hPRLRWT or hPRLRI146X variants is explained in Fig. S1, and the results obtained are summarized in Table 1. Stable populations were obtained for all I146X plasmids after several passages in G418-containing medium, keeping IL-3 as the survival/growth factor (populations #1). Qualitatively, the analysis of STAT5 activation in

populations #1 (Fig S2A) confirmed the results obtained using transiently transfected HEK293 cells: Group 1 receptors displayed no detectable basal activity but responded to PRL stimulation, while it was the opposite for Group 2 mutants; again, the behavior of hPRLRI146G was intermediate. The absolute levels of signaling activation were heterogeneous, reflecting low and heterogeneous expression levels of PRLR variants as frequently observed in transfected Ba/F3 cells before PRL selection (Goffin et al., 2010). According to their PRL-responsiveness, cells expressing Group 1 receptors survived substitution of hPRL for IL-3 (Table 1, selection #2), although Ba/F-hPRLRI146V cells could not be maintained more than a few passages, presumably due to insufficient level of PRLR expression in population #1 (Fig S2). Since this mutant exhibited WT-like properties (Fig 2) this was not investigated further. Expectedly, hPRLRWT and hPRLRI146A failed to promote cell survival upon PRL withdrawal (Table 1, selection #3), confirming their lack of PRL-independent signaling activity. In contrast, cells expressing any Group 2 variant were able to survive IL-3 withdrawal from the culture medium (the PRL selection step was omitted for these PRL-insensitive mutants). Since none of these PRLRs were found to be over-expressed in populations #1 (Fig S2A), this observation supports that cell survival/proliferation was actually mediated by intrinsic basal signaling activity. Again, hPRLRI146G was intermediate since we were unable to maintain Ba/F-hPRLRI146G populations #3 more than a few passages (Table 1), despite similar levels of PRLR expression compared to other Group 2 mutants (Fig S2A).

Populations #3 expressing hPRLRI146N, hPRLRI146D, or hPRLRI146R were investigated further (Fig 3). Proliferation assays showed that in growth medium (10% FCS) and irrespective of PRL addition, they grew at similar rates compared to PRL-stimulated Ba/F-hPRLRWT cells (Fig 3A). In low serum condition, hPRLRI146D more potently sustained cell survival/proliferation compared to the two other mutants, which again was not correlated to over-expression of the former mutant (Fig 3B). Signaling analyses indicated that both STAT5 and Erk1/2 cascades were strongly activated in Ba/F-hPRLRI146D cells that survived IL-3 deprivation, while only Erk1/2 pathway was significantly activated in Ba/F-hPRLRI146N and Ba/F-hPRLRI146R compared to non-stimulated Ba/F-hPRLRWT (Fig 3B,C). Expectedly, PRL stimulation had no effect on any of these cell populations. Semi-quantitative SureFire® pSTAT5 and pErk1/2 homogeneous assays using the AlphaScreen® technology (Binder et al., 2008) confirmed the basal signaling capacities of each receptor and identified PRLRI146D as the most potent activator of both pathways (Fig 3D). Coincidentally, the nice parallel between 401 the

proliferation activities (Fig 3A, right) and specific signaling capacities (Fig 3B-D) of each 402 mutant suggested that STAT5 and Erk1/2 pathways exert additive effects. 403 In summary, this first set of data demonstrated that some mutations affecting position 146 404 could shift the receptor towards a permanent on-state, highlighting Ile146 as a key residue of the D2 domain for stabilizing the off-state. Interestingly, the acquisition of ligand-independent activity was at the expense of PRL-responsiveness (Table 2).

3.4. Structural investigation of I146X variants

In order to elucidate the structural basis for the constitutive activity exhibited by Group 2 variants, we aimed to perform biophysical analyses of selected receptor ECD variants. However, in a recent study focusing on the naturally occurring I146L SNP, unsuccessful attempts to obtain hPRLR-ECDI146L by refolding prompted us to transfer the mutation of interest to the recombinant D2 domain (so-called hPRLR-D2I146X) for structural purposes (Dagil et al., 2012). Given the non-conservative nature of the variants generated in the present study, we followed the same strategy. We selected hPRLR-D2I146D as the best representative variant from Group 2, as it displayed high ligand-independent bioactivity, PRL insensitivity, and enhanced levels of basal Erk1/2 and STAT5 phosphorylation (Table 2, Fig 3). It was initially expected that introducing a charged residue in the hydrophobic core of the D2 domain would be detrimental to the protein fold and hence, this mutant would report on the role of the structural scaffold for activation. Therefore, we also included both hPRLR-D2I146N and the hPRLR-D2I146G variants in the analyses, which in principle should cause less dramatic effects. Furthermore, the hPRLR-D2I146G variant harbored the bio-characteristics intermediate between Group 1 and Group 2 variants.

Previous experience with the hPRLR-D2I146L variant had demonstrated expression of a soluble and fully folded domain (Dagil et al., 2012). In contrast, the new D2 variants were expressed as insoluble domains in inclusion bodies, suggestive of folding defects. These variants were subsequently refolded from a denatured state as described for hPRLR-ECDWT (Teilmann et al., 2005), but the resulting, soluble proteins revealed higher-order oligomers by size-exclusion chromatography (data not shown). However, far-UV CD spectroscopic analyses of these variants showed a distinct β -strand signature with minima at 218 nm and these variants were therefore not unfolded (Fig. 4A). We previously showed that the edge-to-face orientation (T-stack) of the indole rings of the WS motif tryptophans, characteristic of the hPRLR-D2WT off-state, gave rise to intense positive ellipticity at 230 nm that masks α -structure absorption (Dagil et al., 2012). No sign of ellipticity from such aromatic exciton couplings was observed for either of the new variants, thereby suggesting

that the WS motif was not in an edge-to-face orientation and hence, that the off-state was perturbed. Interestingly, hPRLR-D2I146G gave rise to a larger negative ellipticity than hPRLR-D2I146D suggesting a structural difference to the other variants. To obtain residue-specific information about the variants we next analyzed their structural properties by $[1H,15N]$ -HSQC NMR spectra (Fig. S3). For all variants, a limited number of broad peaks were observed without the presence of detectable correctly folded monomers (Fig S3). The broad peaks confirmed the large size of the oligomers and also suggested heterogeneity in the samples. We noticed a set of very low-intensity peaks in the low contouring level of the $[1H,15N]$ -HSQC spectrum of hPRLR-D2I146G, that could not be superimposed on the hPRLR-D2WT, suggesting the existence of a small population of a different, but monomeric folded protein.

These investigations clearly demonstrated that position 146 is highly important for maintaining the structural integrity of the D2 domain, which in turn is mandatory for stabilization of the receptor off-state and PRL-binding potency.

3.5. The constitutive activity of Group 2 mutants is maintained in breast cancer cells

As stated in the Introduction, several reports indicate a role for PRLR signaling in breast tumorigenesis. However, whether the outcome is protective or detrimental to disease progression remains a matter of debate. The availability of PRL-insensitive, constitutively active PRLR mutants gave us the unique opportunity to address the intrinsic consequences of permanent PRLR signaling in a breast cancer cell background. To that end, we first reconstituted all Group 2 PRLR mutants in MCF-7 cells (the most widely used breast cancer cell line) to validate their constitutive signaling. As shown in Fig 5A, ligand-independent activity of the three Group 2 PRLR I146X mutants in transiently transfected MCF-7 cells was evidenced by sub-maximal STAT5 phosphorylation in basal conditions. Since MCF-7 cells express the PRLRWT these results suggest that the WT (endogenous)/mutated (exogenous) PRLR ratio was permissive for constitutive activity (see also Fig 2 E, F). As earlier reported (Goffin et al., 2010), such a basal STAT5 activation downstream of PRLRI146L (the natural SNP) was difficult to detect in transient transfection (Fig 5A) adding important value to the use of Group 2 PRLR mutants to address the effects of constitutive PRLR signaling in a context of a breast cancer cell line. No obvious effect of I146X expression could be seen on basal Erk1/2 phosphorylation compared to non-stimulated parental cells, presumably because substantial activation of this pathway is intrinsically present in MCF-7 cells. Prolactin stimulation further increased STAT5 and Erk1/2 phosphorylation irrespective of the exogenous PRLR expressed. As

group 2 PRLR mutants are PRL-unresponsive (see Figs 2 and 3), the PRL effect most likely resulted from activation of the endogenous PRLRWT, which is expressed at high level in MCF-7 cells. Coincidentally, these observations confirmed that co-expression of PRLRI146D and PRLRWT did not inhibit the signaling capacity of the latter upon PRL stimulation (see also Fig 2 E,F).

In summary, the constitutive signaling activity of Group 2 mutants was maintained in this classical luminal breast cancer cell line. We therefore pursued our investigations by generating stable clones using PRLRI146D as the prototype of Group 2 PRLR mutants.

477

478

3.6. Constitutive PRLR signaling slows down MCF-7 cell proliferation

We then aimed to investigate the effect of PRLR constitutive signaling on MCF-7 cell proliferation. To that end, several clones and populations of stably transfected MCF-7 cells with plasmids encoding PRLRI146D (or PRLRWT as a control) were generated and then screened at early passages after G418 selection using PRLR expression and basal STAT5 activation as readouts (Fig S4). Expectedly, the basal STAT5 activity scaled with the level of (over-) expression of PRLRI146D, while no basal activation of this pathway was observed in cells stably (over-) expressing PRLRWT (Fig S4). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway has been shown to be activated by PRL in MCF-7 cells (Aksamitiene et al., 2011); however, no obvious PRLRI146D-induced activation of Akt over basal phosphorylation levels was detected in our clones (Fig. S4). Clones/populations d1 and d18 for PRLRI146D, and wtpop

And wt2 for PRLRWT, were selected for further studies based on similar high (d1, wtpop) versus low (d18, wt2) levels of PRLR over-expression. For clarity, these clones/populations were renamed 146Dhi (d1), 146Dlo (d18), WThi (wtpop) and WTlo (wt2).

The signaling characteristics described above were maintained over cell passages, although the level of pSTAT5 tended to slightly decrease with time; hence, it was often below the detection threshold in 146Dlo cells while it remained significantly elevated in 146Dhi cells (Fig 5B,C). Supporting these data, elevated levels of SOCS2 (a typical STAT5 target) were observed in 146Dhi clone only (Fig 5D). Interestingly, the 146Dlo clone showed strong basal activation of Erk1/2 that was in fact similar to that observed in MDA-MB231 cells which are known to exhibit elevated levels of Erk1/2 phosphorylation in routine cultures (Fig 5B, C). None of these pathways were (over-) activated in WTlo and WThi cells

clearly demonstrating that the elevated basal levels in 146Dhi and 146Dlo clones resulted from expression of PRLRI146D.

We then performed proliferation assays under various experimental conditions including two serum concentrations (1 or 10%) and presence/absence of PRL (1 μ g/ml added at T0h and T48h), using cell numeration after 48h and 96h as the readout (Fig 6). In all experimental conditions, WTlo cells behaved similarly to parental cells, indicating that neither increased PRLRWT expression nor G418 addition altered MCF-7 cell proliferation. Prolactin modestly stimulated the growth of parental MCF-7 cells after 96h in 1% serum (Figs 6A versus C, and Fig S5). As previously reported (Biswas and Vonderhaar, 1987), this effect was not observed in medium containing 10% FCS (Fig 6B versus D). Repeatedly, 146Dlo cells grew at much slower rates than all other clones, irrespective of serum concentration or of PRL addition (Fig 6 and Fig S5). Similar observation applied to 146Dhi clone in starved conditions (Fig 6A); however, proliferation of this clone remained sensitive to the presence of PRL (Fig S5) or FCS (Fig 6A versus B). Taken together, these data indicated that constitutive PRLRI146D signaling did not promote MCF-7 cell proliferation, and could even decrease it in some conditions.

3.7. Constitutive STAT5 and Erk1/2 signaling participate in MCF-7 cell proliferation

We then tried to elucidate the molecular mechanisms discriminating the different behaviors of the MCF-7 clones. First, we analyzed their responsiveness to acute PRL stimulation using cells starved for 24h monitoring STAT5 and Erk1/2 phosphorylations as readouts (Fig 7A).

As observed in transient transfections (Fig 5A), PRLRWT-expressing cells responded well to PRL stimulation with respect to STAT5 activation. The elevated basal level of pSTAT5 was further enhanced by PRL stimulation in the 146Dhi clone, confirming that the presence of PRLRI146D does not prevent ligand-induced triggering of the endogenous PRLR. This finding was fully confirmed using the 146Dlo clone, although the latter exhibited a pattern of STAT5 activation (phospho/total ratio) that was very similar to that observed in parental cells due to the absence of detectable basal STAT5 phosphorylation in this clone (see above). For any clone, no obvious effect of PRL could be detected on Erk1/2 activation in these experimental conditions.

To determine the role of constitutive PRLR signaling in cell proliferation, we then used kinase inhibitors to target Jak2 (AG490), the tyrosine kinase upstream of STAT5 activation, or MEK1/2 (U0126), the serine/threonine kinases upstream Erk1/2. Treatments lasted for 24h (Fig 7B). The addition of DMSO (vehicle) did not modify the clone-specific

pattern of basal STAT5 phosphorylation; however, the differences in Erk1/2 phosphorylation noticed in routine culture conditions (Fig. 5B,C) appeared to be less marked in the presence of DMSO. Inhibition of Jak2 activity by AG490 decreased - though did not completely abolish - STAT5 phosphorylation in 146Dhi clone. Of note, a concomitant increase of Erk1/2 phosphorylation was observed in all clones in response to AG490, reminiscent of earlier observations (Nouhi et al., 2006). The inhibitor U0126 totally abolished Erk1/2 activation in all clones, without detectable effects on STAT5 signaling.

Having shown the effects of these inhibitors on intrinsically activated signaling cascades, we then looked at their impact on cell proliferation (Fig 7C). Cell numeration was performed after 48h incubation with either inhibitor to limit toxic effects, but also because at this time the intrinsic proliferation of each clone is not yet different (differences are seen after 96h, see Fig 6). While the Jak2 inhibitor failed to affect proliferation in the WTlo and 146Dlo clones (which both failed to exhibit STAT5 activation), the Erk1/2 inhibitor significantly decreased the number of living cells in the 146Dlo clone, and had intermediary effect in the WTlo clone ($p=0.06$) supporting the role of basal Erk1/2 signaling in MCF-7 proliferation and/or resistance to apoptosis when STAT5 is not activated (Fig 7B). Surprisingly, none of the inhibitors altered proliferation of the 146Dhi clone (Fig 7C). Based on signaling studies showing that at least one of these pathways remained highly activated under treatment with either inhibitor (Fig 7B), this suggests that each pathway can to some extent compensate for the down-regulation of the other.

3.8. Constitutive PRLR signaling does not alter MCF-7 cell phenotype

Prolactin-induced PRLR signaling has been proposed to maintain/induce an epithelial-like phenotype of breast cancer cells at the expense of a mesenchymal-like phenotype (Sultan et al., 2005; Nouhi et al., 2006; Sultan et al., 2008). We therefore used q RT-PCR to measure the levels of expression of typical mesenchymal (vimentin) and epithelial (E-cadherin and cytokeratins 18/19) markers in the different MCF-7 clones (Fig. 8). While levels of keratins 18/19 were unchanged, an increase in E-cadherin expression was observed in PRLRI146D clones. Concomitantly, a slight increase in vimentin expression was observed, although absolute levels remained far below that observed in mesenchymal MDA-MB231 cells. These data indicate that MCF-7 cells expressing PRLRI146D maintained their luminal character, in good agreement with the absence of obvious morphological change (data not shown).

3.9. PRLRI146D expression does not impact on MDA-MB-231 cell behavior

Since PRLR signaling has been proposed to maintain/induce breast cancer cell differentiation, we suspected that the lack of strong effect of PRLRI146D expression in MCF-7 cells could be related to the already well-differentiated (luminal) phenotype of this cell line. Thus, we aimed to repeat the experiments described in Figures 5-8 using the mesenchymal-like MDA-MB-231 cell line. As shown in Figure 9A, transient expression of any Group 2 PRLR mutant in MDA-MB-231 resulted in basal STAT5 phosphorylation. In agreement with the undetectable levels of PRLR expressed in MDA-MB-231 cells, PRL stimulation had a very weak effect on STAT5 phosphorylation as a very low increase in pSTAT5 was detected only after film over-exposure (Fig S6A, first two lanes). The intrinsically elevated levels of Erk1/2 activation were unchanged in all clones, irrespective of PRL addition. After G418 selection, we could only select few stable clones exhibiting detectable levels of PRLR variants; they were referred to as 146Dhi, WTmed, 146Dmed, or WTlo based on PRLR levels (Fig. 9B). In comparison to the MCF-7 clone 146Dhi, the levels of constitutive or PRL-induced STAT5 activation observed in all MDA-MB-231 clones were much lower (Fig S6A). Cell proliferation assays performed under the same conditions as described for MCF-7 cells failed to show any significant effect of PRLRI146D (or PRLRWT) expression or of PRL stimulation (Fig S6B-E). The MAPK inhibitor U0126 efficiently inhibited Erk1/2 phosphorylation resulting in significant reduction of MDA-MB231 cell proliferation, irrespective of the exogenous PRLR expressed (Fig 9C). Similar results were observed using the Jak2 inhibitor AG490. Taken together, these data suggest that these inhibitors affected intrinsic pathways of MDA-MB231 cells that are independent of PRLRI146D expression. Finally, we showed that the levels of E-cadherin were slightly increased in PRLRI146D-expressing cells compared to parental MDA-MB231 cells, although absolute levels remained >500 fold below that observed in the luminal MCF-7 cell line (Fig 9D). Concomitantly, vimentin was also increased compared to parental MDA-MB231 cells, but this effect was not specific to the expression of PRLRI146D as it was also observed in the WTmed clone. Together, these data indicated that MDA-MB231 cells expressing PRLRI146D maintained their mesenchymal character, in good agreement with the absence of obvious morphological change (data not shown).

4. Discussion

The first take-home message of the present study is that position 146 plays a central role in directing intrinsic properties of the PRLR, including ECD folding, PRL-responsiveness, and ligand-independent activity of the receptor. Various PRLR mutants exhibiting

constitutive activity in reconstituted cell models have been generated in the past. All involved large deletions within the ECD, e.g. deletion of the entire D2 domain (also called S2) (Gourdou et al., 1996; Tan et al., 2008) or deletion of the nearly-entire ECD (Lee et al., 1999). Since deletion of the D1 domain (also called S1) failed to have similar impact on receptor bioactivity, these findings taken together suggest that one of the roles of the D2 domain is to exert structural constraints preventing the pre-formed PRLR homodimer to trigger intracellular signaling, as suggested earlier (Dagil et al., 2012). However, due to the high impact of these deletions on receptor integrity, such mutational approaches were not appropriate to identify the structural features (residues) that were important in maintaining fundamental receptor properties such as folding and ligand binding capacity. Our previous report by Dagil et al. (2012) clearly showed the central role of Ile146 in this matter, since even the very conservative I-to-L mutation was able to disrupt the equilibrium between the off- and on-states. Using more disruptive substitutions, our current study confirmed and further emphasized these findings. Strikingly, the mutation-specific structural disturbances reported here were not only at the expense of PRL responsiveness, but also concomitantly promoted ligand-independent activity, most likely due to receptor misfolding (Table 2). These data further support that one of the seminal functions of the folded D2 domain is to maintain the receptor in its off-state, and identify Ile146 as a major regulator of this fundamental property.

It is therefore highly likely that structural alterations of PRLR-ECD at least in part are responsible for the PRL-insensitivity of Group 2 PRLRs observed in all cell lines used in this study. In addition, it is also possible that receptor misfolding interferes with receptor trafficking and export to the cell membrane. Our experiments using PRLbiot cannot discriminate between these two possibilities that are not mutually exclusive. Dedicated experiments are needed to elucidate the mechanism(s) underlying the PRL insensitivity of these PRLR mutants. Similarly, the structural mechanisms by which I146X mutation-induced structural alterations of PRLR-ECD/D2 (or D2/ECD deletion) result in constitutive signaling are currently unknown. As shown in Figure 1B, Ile146 from both receptor moieties are close to the receptor dimer interface (site 3). The importance of site 3 in controlling receptor activity has been suggested from one of our recent studies showing that mutations of residues belonging to this interface altered the ability to form a ternary complex with PRL (Van Agthoven et al., 2010). The impact of these mutations on the ECD structure and signaling activity of full-length PRLR are under study. One can hypothesize that structural alteration/deletion of the ECD could modify the relative

orientation of both intracellular domains and thereby trigger signaling with a mutation-specific qualitative and quantitative pattern, as this was elegantly suggested for a GHR mutant harboring mutations affecting the F'G' loop in the ECD, which resulted in the impairment of Erk1/2 signaling without effecting Jak2/STAT5 signaling (Rowlinson et al., 2008). In this respect, it is interesting to note that the ratio of Jak2/STAT5 and Erk1/2 signaling varied depending on the clones that were analyzed and this did not appear to be cell line-dependent (Fig. 3B-D and Fig. 5B,C). This suggests that either very subtle differences in the misfolding of the ECD can lead to preferential activation of one signaling cascade over the others, and/or that external parameters (e.g. other membrane proteins) may contribute differently to the signaling outcome by these mutated PRLRs.

We previously reported that PRLRI146L was responsive to PRL (Bogorad et al., 2008) and was able to form heterodimers with PRLRWT (Tallet et al., 2011). Although evidence is lacking to suggest reciprocal interference of these two receptors with respect to their functional properties (e.g. dominant-negative or dominant-positive effects), the activities of such heterodimers remains to be experimentally explored. The present study revealed that the basal activity of PRLRI146D was quenched in a dose-dependent manner by co-expression of PRLRWT (Fig 2F). The reverse did not appear to be true since over-expression of PRLRI146D did not decrease PRL-induced activity via PRLRWT (Fig 2F, 5A, 7A), most likely reflecting the

higher affinity for PRLRWT homodimers. Alternatively, these results could also indicate that PRLRI146D and PRLRWT can form heterodimers that are devoid of basal activity, but are responsive to PRL stimulation. Clearly, further experiments are necessary to address these hypotheses and to elucidate the subtle relationship that may exist between the PRLRI146D/PRLRWT ratio and the resulting basal/PRL-induced activity.

Mutations in various cytokine receptors have been reported to lead to constitutive activity. These mutations were experimentally engineered or identified in human diseases. The R129C mutation in the murine EPO receptor (EPOR) forces disulfide-linked receptor homo- dimerization (Watowich et al., 1992), an effect that was also observed when other surrounding residues were mutated to cysteine (Yoshimura et al., 1990; Watowich et al., 1994). Another example involves the I374N mutation that was engineered into the common α c of human IL-3/IL-5/GM-CSF receptor complexes, also leading to ligand-independent signaling activity (Jenkins et al., 1995; Jenkins et al., 1996). Gain-of-function somatic mutations in gp130, the common α c of the IL-6 receptor subfamily, were recently identified in inflammatory hepatocellular adenomas (Rebouissou et al., 2009); these small

in-frame deletions (e.g. deletion from Tyr186 to Tyr190 referred to as gp130 $\square$ YY) resulted in ligand- independent signaling activity (Sommer et al., 2012). PRLRI146L is another example of a naturally occurring cytokine receptor variant exhibiting ligand-independent activity (Bogorad et al., 2008). Remarkably, EPORR129C, $\square$ cI374N, gp130 $\square$ YY, and PRLRI146L all involve mutations affecting the receptor ECD, and strikingly, they are located in the D2 domain of cognate CRH domains. Furthermore, Ile374 in $\square$ c is topologically equivalent to Ile146 in PRLR with respect to folded ECDs (Fig S7) strongly suggesting that common mechanisms leading to ligand-independent receptor activation could be shared by cytokine receptors despite their phylogenetic distances (Boulay et al., 2003).

In Ba/F3 cells, Group 2 PRLRI146X mutants (Table 1) promoted cell autonomous growth as earlier reported for PRLRI146L (Bogorad et al., 2008). Previous studies have used the Ba/F3 cell line to support the oncogenic potency of constitutive STAT5 signaling associated with nuclear targeting of the GHR (Conway-Campbell et al., 2007). Despite the fact that no significant STAT5 over-activation could be detected in stable populations expressing PRLRI146N or PRLRI146R, these two variants were nevertheless able to support sustained Ba/F3 cell growth. Of note, proliferation of Ba/F-PRLRI146D in starvation medium (1% FCS) was consistently higher compared to Ba/F-PRLRI146N and Ba/F-PRLRI146R (Fig 3B), although this did not reach statistical significance. This suggests that Erk1/2 and STAT5 pathways cooperate to propagate this cell line, which is good agreement with former reports indicating that Erk1/2 signaling sustains survival while STAT5 promotes proliferation of these cells (Onishi et al., 1998; Walker et al., 1998).

In contrast to parental Ba/F3 cells, MCF-7 cells are responsive, but not dependent on cytokine signaling for survival/growth. However, based on the data discussed above, we initially expected that stable expression of the most active of all I146X mutants generated in this study (PRLRI146D) could boost cell proliferation. Obviously, this was not the case irrespective of the signaling pathway that was preferentially activated in the various MCF-7 clones (STAT5 in clone 146Dhi or Erk1/2 in clone 146Dlo). At best, cell proliferation was similar to that of parental cells, as observed for 146Dhi in 10% FCS or in the presence of PRL; at worst, it was significantly lower as exemplified by the 146Dlo clone, irrespective of culture conditions. The outcome of these proliferation and signaling studies involving kinase inhibitors is that a minimal threshold of STAT5 or Erk1/2 activation needs to be achieved to ensure cell growth, as nicely illustrated by the inhibitor-

insensitivity of clone 146Dhi in proliferation assays (Fig. 7B,C). Previous reports further support the cooperation of both pathways in MCF-7 cell growth; on the one hand, Erk1/2 was shown to promote MCF-7 cell proliferation (Acosta et al., 2003), which nicely agrees with the growth-inhibitory effect of U0126 inhibitor in clone 146Dlo (Fig 7B). On the other hand, expression of a constitutively active form of STAT5A resulted in increased cell number that was mainly attributed to the anti-apoptotic properties of this pathway (Tang et al., 2010), while STAT5B was shown to be required for ER-mediated MCF-7 cell proliferation (Fox et al., 2008). Over-activation of Erk1/2 upon pharmacological inhibition of Jak2 was previously observed in PRL-stimulated MCF-7 and T47D, another ER⁺ breast cancer cell line (Nouhi et al., 2006). However, others reported opposite observations, i.e. abolition of Erk1/2 phosphorylation after AG490 treatment of PRL-stimulated T47D cells (Aksamitiene et al., 2011). Using various pharmacological inhibitors, the latter group suggested that PRL-induced activation of Erk1/2 in breast cancer cell lines was dependent on PI3-kinase, the latter being controlled by Jak2, Src family kinases, and FAK (Aksamitiene et al., 2011). Further studies are needed to determine whether these intracellular regulations also apply to constitutively active gain-of-function PRLR variants compared to hormone-triggered receptors.

The second important conclusion of this study is that PRLRI146D failed to promote cell proliferation and to markedly alter the epithelial and mesenchymal phenotypes of MCF-7 and MDA-MB231 breast cancer cells, respectively. These findings deserve to be put into the pathophysiological context. Besides older studies that focused on the proliferative potency of PRL on breast cancer cells (Biswas and Vonderhaar, 1987; Ginsburg and Vonderhaar, 1995), more recent papers have highlighted the role of this hormone as a regulator of cell differentiation. In particular, PRL-triggered intracellular signaling was proposed to promote homotypic cell adhesion and to reverse EMT; by the use of genetic and pharmacological tools, these effects could be attributed to the Jak2/STAT5 signaling cascade (Nouhi et al., 2006; Sultan et al., 2005; Sultan et al., 2008). These studies showed the ability of PRL/Jak2/STAT5 to prevent various features known to participate in cancer progression and largely supported the conclusions of clinical studies highlighting the good prognosis of STAT5 phosphorylation in breast cancer patients (Nevalainen et al., 2004; Peck et al., 2011). Interestingly, the group of S. Ali showed that increased Erk1/2 and Smad signaling resulting from Jak2 inhibition ultimately promoted EMT and invasion (Nouhi et al., 2006). Based on these findings, it would be interesting to determine whether predominant Erk1/2 signaling in the 146Dlo clone correlates with increased invasiveness;

the absence of marked phenotypic changes as determined by analyzing cell morphology and typical EMT markers (Fig. 8) does not argue in favor of such a hypothesis. Another finding reported by Ali's group is that the restoration of PRLR/JAK2 signaling in MDA-MB231 cells suppressed their mesenchymal phenotype, as highlighted by decreased vimentin expression. Using the same cell line, we did not observe such an effect as all stable clones displayed increased vimentin expression irrespective of the exogenous PRLR expressed (Fig. 9D). Although a concomitant rise in E-cadherin expression was observed, the absolute level remained very low compared to MCF-7; together, these findings do not support the acquisition of a luminal phenotype. The lack of clear effect of PRLRI146D expression on breast cancer cell phenotype may result from the relatively modest level of STAT5 activation observed in our clones (Fig. 9B) and/or may reflect differences with experimental protocols used by Ali's group (we investigated long-term effects using stable clones while these authors analyzed short-term effects using transient transfections).

PRLRI146L has so far been identified as a heterozygous SNP in patients presenting with benign (Bogorad et al., 2008; Courtilot et al., 2010) or malignant (Canbay et al., 2004) breast tumors. The use of MCF-7 allowed us to reconstitute the heterozygous context since these cells express a fairly high amount of PRLRWT ($\approx 7,000/\text{cell}$), in contrast to MDA-MB231 cells that provided a model of homozygous expression of exogenous PRLR. Our results do not support a major impact of constitutive PRLR signaling in these two classical breast cancer cell lines representing opposite breast cancer cell phenotypes. One should keep in mind that our data were obtained using PRLRI146D as a molecular mimicry of PRLRI146L. Although this choice was made to amplify the potential consequences of constitutive PRLR signaling while avoiding interference with PRL from any source (cell-secreted, serum), quantitative (and possibly qualitative) differences in the activation of signaling pathways downstream PRLRI146D versus PRLRI146L may constitute a limit in extrapolating our results to the natural variant. Importantly, we also note that the structural consequences of the mutations were distinctly different. Hence, complementary analyses are still needed to fully delineate the actual impact of permanent PRLR signaling (and specifically of PRLRI146L) in a breast cancer cell background. For example, this study did not address to which extent some of the parameters that are known to modulate PRLR signaling in breast cancer cells, e.g. autocrine PRL expression, receptor turnover, or PRLR isoform ratio (Goffin et al., 2005; Clevenger et al., 2003; Meng et al., 2004), could impact the biology of constitutively active PRLRs, or vice versa. Finally, it remains to be determined whether constitutively active PRLR variants could initiate breast

tumorigenesis, as observed when PRL is over-expressed in mouse mammary gland (Rose-Hellekant et al., 2003), or if they could cooperate with oncogenes to favor tumor initiation, as shown for the constitutively active Jak2V617F mutant (Caffarel et al., 2012). Such issues require the development of an animal model dedicated to the study of PRLRI146L in vivo effects, which is currently in progress in our laboratory.

Acknowledgements

The authors are grateful to Signe A. Sjørup for generation of mutant plasmids, and to Lucila Sackmann Sala for help with statistical analyses. Emanuela Marcantoni is thanked for help in generating I146X plasmids.

Funding support

This work was supported in part by grants from the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-07-PCVI-0029, VG, IB and PE), the University Paris Descartes (n°990 UMRS 845/2011/02, VG & IB), the Fondation de France (n° 2011-00020359, VG), the Fondation

ARC pour la Recherche sur le Cancer (n° SFI 20101201635, VG) the Ligue contre le cancer (RS11/75-26; IB), the Danish Cancer Society (BBK), The Danish Research Councils for health and disease (09-072179; 12-125862; BBK) and the Novo Nordic Foundation (BBK).

CZ and IC are recipients of doctoral fellowships from the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie and from the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (for CZ).

Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

References

- Acosta,J.J., Munoz,R.M., Gonzalez,L., Subtil-Rodriguez,A., Dominguez-Caceres,M.A., Garcia-Martinez,J.M., Calcabrini,A., Lazaro-Trueba,I., and Martin-Perez,J. (2003). Src mediates prolactin-dependent proliferation of T47D and MCF7 cells via the activation of focal adhesion kinase/Erk1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Mol. Endocrinol.* 17, 2268-2282.
- Aksamitiene,E., Achanta,S., Kolch,W., Kholodenko,B.N., Hoek,J.B., and Kiyatkin,A. (2011). Prolactin-stimulated activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases is controlled by PI3-kinase/Rac/PAK signaling pathway in breast cancer cells. *Cell Signal.* 23, 1794-1805.

Bazan,J.F. (1990). Structural design of molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6934-6938.

Bernichtein,S., Jeay,S., Vaudry,R., Kelly,P.A., and Goffin,V. (2003a). New Homologous Bioassays for Human Lactogens Show That Agonism or Antagonism of Various Analogs Is a Function of Assay Sensitivity. *Endocrine*. 20, 177-190.

Bernichtein,S., Kayser,C., Dillner,K., Moulin,S., Kopchick,J.J., Martial,J.A., Norstedt,G., Isaksson,O., Kelly,P.A., and Goffin,V. (2003b). Development of pure prolactin receptor antagonists. *J. Biol. Chem.* 278, 35988-35999.

Binder,C., Lafayette,A., Archibeque,I., Sun,Y., Plewa,C., Sinclair,A., and Emkey,R. (2008). Optimization and utilization of the SureFire phospho-STAT5 assay for a cell-based screening campaign. *Assay. Drug Dev. Technol.* 6, 27-37.

Biswas,R. and 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.

Bogorad,R.L., Courtillot,C., Mestayer,C., Bernichtein,S., Harutyunyan,L., Jomain,J.B., Bachelot,A., Kuttann,F., Kelly,P.A., Goffin,V., and Touraine,P. (2008). Identification of a gain-of-function mutation of the prolactin receptor in women with benign breast tumors. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 14533-14538.

Boulay,J.L., O'Shea,J.J., and Paul,W.E. (2003). Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity*. 19, 159-163.

Brooks,A.J., Dai,W., O'Mara,M.L., Abankwa,D., Chhabra,Y., Pelekanos,R.A., Gardon,O., Tunny,K.A., Blucher,K.M., Morton,C.J., Parker,M.W., Sieracki,E., Gambin,Y., Gomez,G.A., Alexandrov,K., Wilson,I.A., Doxastakis,M., Mark,A.E., and Waters,M.J. (2014). Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science* 344, 1249783.

Brooks,C.L. (2012). Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr. Rev.* 33, 504-525.

Broutin,I., Jomain,J.B., Tallet,E., Van Agthoven,J., Raynal,B., Hoos,S., Kragelund,B.B., Kelly,P.A., Ducruix,A., England,P., and Goffin,V. (2010). Crystal structure of an affinity-matured prolactin complexed to its dimerized receptor reveals the topology of hormonebinding site 2. *J. Biol. Chem.* 285, 8422-8433.

Brown,R.J., Adams,J.J., Pelekanos,R.A., Wan,Y., McKinsty,W.J., Palethorpe,K., Seeber,R.M., Monks,T.A., Eidne,K.A., Parker,M.W., and Waters,M.J. (2005). Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 814-821.

Caffarel,M.M., Zaragoza,R., Pensa,S., Li,J., Green,A.R., and Watson,C.J. (2012). Constitutive activation of JAK2 in mammary epithelium elevates Stat5 signalling, promotes alveologenesis and resistance to cell death, and contributes to tumourigenesis. *Cell Death. Differ.* 19, 511- 522.

Canbay,E., Degerli,N., Gulluoglu,B.M., Kaya,H., Sen,M., and Bardakci,F. (2004). Could prolactin receptor gene polymorphism play a role in pathogenesis of breast carcinoma? *Curr. Med. Res. Opin.* 20, 533-540.

Clevenger,C.V., Furth,P.A., Hankinson,S.E., and Schuler,L.A. (2003). The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr. Rev.* 24, 1-27.

Conway-Campbell,B.L., Wooh,J.W., Brooks,A.J., Gordon,D., Brown,R.J., Lichanska,A.M., Chin,H.S., Barton,C.L., Boyle,G.M., Parsons,P.G., Jans,D.A., and Waters,M.J. (2007). Nuclear targeting of the growth hormone receptor results in dysregulation of cell proliferation and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 13331-13336.

Courtillot,C., chakhtoura,Z., Bogorad,R., Genestie,C., Bernichtein,S., Badachi,Y., Janaud,G., Akakpo,J.P., Bachelot,A., Kuttenn,F., Goffin,V., and Touraine,P. (2010). Characterization of 856 two constitutively active prolactin receptor variants in a cohort of 95 women with multiple 857 breast fibroadenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 95, 271-279.

Dagil,R., Knudsen,M.J., Olsen,J.G., O'Shea,C., Franzmann,M., Goffin,V., Teilum,K., Breinholt,J., and Kragelund,B.B. (2012). The WSXWS Motif in Cytokine Receptors Is a Molecular Switch Involved in Receptor Activation: Insight from Structures of the Prolactin Receptor. *Structure.* 20, 270-282.

De Vos,A.M., Ultsch,M., and Kossiakoff,A.A. (1992). Human growth hormone andextracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255, 306-312.

Delaglio,F., Grzesiek,S., Vuister,G.W., Zhu,G., Pfeifer,J., and Bax,A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol. NMR* 6, 277-866 293.

Fox,E.M., Bernaciak,T.M., Wen,J., Weaver,A.M., Shupnik,M.A., and Silva,C.M. (2008). Signal transducer and activator of transcription 5b, c-Src, and epidermal growth factor receptor signaling play integral roles in estrogen-stimulated proliferation of estrogen receptor- positive breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 22, 1781-1796.

Gadd,S.L. and Clevenger,C.V. (2006). Ligand-independent dimerization of the human prolactin receptor isoforms: functional implications. *Mol. Endocrinol.* 20, 2734-2746.

Ginsburg,E. and Vonderhaar,B.K. (1995). Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Res.* 55, 2591-2595.

Glasow,A., Horn,L.C., Taymans,S.E., Stratakis,C.A., Kelly,P.A., Kohler,U., Gillespie,J., Vonderhaar,B.K., and Bornstein,S.R. (2001). Mutational analysis of the PRL receptor gene in human breast tumors with differential PRL receptor protein expression. *J. Clin. Endocrinol.* 878 *Metab* 86, 3826-3832.

Glezer,A., Soares,C.R., Vieira,J.G., Giannella-Neto,D., Ribela,M.T., Goffin,V., and Bronstein,M.D. (2006). Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 91, 1048-1055.

Goffin,V., Bernichtein,S., Touraine,P., and Kelly,P.A. (2005). Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocr. Rev.* 26, 400-422.

Goffin,V., Bogorad,R.L., and Touraine,P. (2010). Identification of gain-of-function variants of the human prolactin receptor. *Methods Enzymol.* 484, 329-355.

Goffin,V., Kinet,S., Ferrag,F., Binart,N., Martial,J.A., and Kelly,P.A. (1996). Antagonistic properties of human prolactin analogs that show paradoxical agonistic activity in the Nb2 bioassay. *J. Biol. Chem.* 271, 16573-16579.

Gourdou,I., Gabou,L., Paly,J., Kermabon,A.Y., Belair,L., and Djiane,J. (1996). Development of a constitutively active mutant form of the prolactin receptor, a member of the cytokine receptor family. *Mol. Endocrinol.* 10, 45-56.

Hennighausen,L. and Robinson,G.W. (2008). Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes Dev.* 22, 711-721.

Hu,Z.Z., Meng,J., and Dufau,M.L. (2001). Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *J. Biol. Chem.* 276, 41086-41094.

Jenkins,B.J., Bagley,C.J., Woodcock,J., Lopez,A.F., and Gonda,T.J. (1996). Interacting residues in the extracellular region of the common beta subunit of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin (IL)-3, and IL-5 receptors involved in constitutive activation. *J Biol Chem.* 271, 29707-29714.

Jenkins,B.J., D'Andrea,R., and Gonda,T.J. (1995). Activating point mutations in the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors suggest the

involvement of beta subunit dimerization and cell type-specific molecules in signalling. *EMBO J* 14, 4276-4287.

Lee,R.C., Walters,J.A., Reyland,M.E., and Anderson,S.M. (1999). Constitutive activation of the prolactin receptor results in the induction of growth factor-independent proliferation and constitutive activation of signaling molecules. *J. Biol. Chem.* 274, 10024-10034.

Lee,S.A., Haiman,C.A., Burt,N.P., Pooler,L.C., Cheng,I., Kolonel,L.N., Pike,M.C., Altshuler,D., Hirschhorn,J.N., Henderson,B.E., and Stram,D.O. (2007). A comprehensive analysis of common genetic variation in prolactin (PRL) and PRL receptor (PRLR) genes in relation to plasma prolactin levels and breast cancer risk: the multiethnic cohort. *BMC. Med Genet.* 8, 72.

Liu,W. and Brooks,C.L. (2011). Functional impact of manipulation on the relative orientation of human prolactin receptor domains. *Biochemistry* 50, 5333-5344.

Mandrup,S., Hojrup,P., Kristiansen,K., and Knudsen,J. (1991). Gene synthesis, expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of the recombinant bovine acyl-CoA-binding protein. *Biochem. J.* 276 (Pt 3), 817-823.

Manhes,C., Kayser,C., Bertheau,P., Kelder,B., Kopchick,J.J., Kelly,P.A., Touraine,P., and Goffin,V. (2006). Local over-expression of prolactin in differentiating mouse mammary gland induces functional defects and benign lesions, but no carcinoma. *J. Endocrinol.* 190, 271-285.

Meng,J., Tsai-Morris,C.H., and Dufau,M.L. (2004). Human prolactin receptor variants in breast cancer: low ratio of short forms to the long-form human prolactin receptor associated with mammary carcinoma. *Cancer Res.* 64, 5677-5682.

Mong,F.Y., Kuo,Y.L., Liu,C.W., Liu,W.S., and Chang,L.C. (2011). Association of gene polymorphisms in prolactin and its receptor with breast cancer risk in Taiwanese women. *Mol. Biol. Rep.* 38, 4629-4636.

Nevalainen,M.T., Xie,J., Torhorst,J., Bubendorf,L., Haas,P., Kononen,J., Sauter,G., and Rui,H. (2004). Signal transducer and activator of transcription-5 activation and breast cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* 22, 2053-2060.

Nouhi,Z., Chughtai,N., Hartley,S., Cocolakis,E., Lebrun,J.J., and Ali,S. (2006). Defining the role of prolactin as an invasion suppressor hormone in breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 931 1824-1832.

Nyante,S.J., Faupel-Badger,J.M., Sherman,M.E., Pfeiffer,R.M., Gaudet,M.M., Falk,R.T., Andaya,A.A., Lissowska,J., Brinton,L.A., Peplonska,B., Vonderhaar,B.K., Chanock,S., Garcia-Closas,M., and Figueroa,J.D. (2011). Genetic variation in PRL and PRLR, and

relationships with serum prolactin levels and breast cancer risk: results from a population-based case-control study in Poland. *Breast Cancer Res* 13, R42.

O'Sullivan,L.A., Liongue,C., Lewis,R.S., Stephenson,S.E., and Ward,A.C. (2007). Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease

1. *Mol. Immunol.* 44, 2497-2506.

Olsen,J.G. and Kragelund,B.B. (2014). Who climbs the tryptophan ladder? On the structure and function of the WSXWS motif in cytokine receptors and thrombospondin repeats. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 337-341.

Onishi,M., Nosaka,T., Misawa,K., Mui,A.L., Gorman,D., McMahon,M., Miyajima,A., and Kitamura,T. (1998). Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol. Cell Biol.* 18, 3871-3879.

Peck,A.R., Witkiewicz,A.K., Liu,C., Stringer,G.A., Klimowicz,A.C., Pequignot,E.,Freydin,B., Tran,T.H., Yang,N., Rosenberg,A.L., Hooke,J.A., Kovatich,A.J., Nevalainen,M.T., Shriver,C.D., Hyslop,T., Sauter,G., Rimm,D.L., Magliocco,A.M., and Rui,H. (2011). Loss of nuclear localized and tyrosine phosphorylated Stat5 in breast cancer predicts poor clinical outcome and increased risk of antiestrogen therapy failure. *J. Clin. Oncol.* 29, 2448-2458.

Qazi,A.M., Tsai-Morris,C.H., and Dufau,M.L. (2006). Ligand-Independent Homo- and Hetero-Dimerization of Human Prolactin Receptor Variants: Inhibitory Action of the Short Forms by Heterodimerization. *Mol. Endocrinol.* 20, 1912-1923.

Rebouissou,S., Amessou,M., Couchy,G., Poussin,K., Imbeaud,S., Pilati,C., Izard,T., Balabaud,C., Bioulac-Sage,P., and Zucman-Rossi,J. (2009). Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature* 457, 200-204.

Rose-Hellekant,T.A., Arendt,L.M., Schroeder,M.D., Gilchrist,K., Sandgren,E.P., and Schuler,L.A. (2003). Prolactin induces ERalpha-positive and ERalpha-negative mammary cancer in transgenic mice. *Oncogene* 22, 4664-4674.

Ross,R.J.M., Esposito,N., Shen,X.Y., Von Laue,S., Chew,S.L., Dobson,P.R.M., Postel-Vinay,M.C., and Finidori,J. (1997). A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Mol. Endocrinol.* 11, 265-273.

Rowlinson,S.W., Yoshizato,H., Barclay,J.L., Brooks,A.J., Behncken,S.N., Kerr,L.M., Millard,K., Palethorpe,K., Nielsen,K., Clyde-Smith,J., Hancock,J.F., and Waters,M.J. (2008). An agonist-induced conformational change in the growth hormone receptor determines the choice of signalling pathway. *Nat. Cell Biol.* 10, 740-747.

Sommer,J., Effenberger,T., Volpi,E., Waetzig,G.H., Bernhardt,M., Suthaus,J., Garbers,C., Rose-John,S., Floss,D.M., and Scheller,J. (2012). Constitutively active mutant gp130 receptor protein from inflammatory hepatocellular adenoma is inhibited by an anti-gp130 antibody that specifically neutralizes interleukin 11 signaling. *J. Biol. Chem.* 287, 13743-13751.

Sultan,A.S., Brim,H., and Sherif,Z.A. (2008). Co-overexpression of Janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 5a promotes differentiation of mammary cancer cells through reversal of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Sci.* 99, 272-279.

Sultan,A.S., Xie,J., LeBaron,M.J., Ealley,E.L., Nevalainen,M.T., and Rui,H. (2005). Stat5 promotes homotypic adhesion and inhibits invasive characteristics of human breast cancer cells. *Oncogene* 24, 746-760.

Tallet,E., Fernandez,I., Zhang,C., Salsac,M., Gregor,N., Ayoub,M.A., Pin,J.P., Trinquet,E., and Goffin,V. (2011). Investigation of Prolactin Receptor Activation and Blockade Using Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Front. Endocrin* 2, 29.

Tan,D., Huang,K.T., Ueda,E., and Walker,A.M. (2008). S2 deletion variants of human PRL receptors demonstrate that extracellular domain conformation can alter conformation of the 984 intracellular signaling domain. *Biochemistry* 47, 479-489.

Tan,D., Johnson,D.A., Wu,W., Zeng,L., Chen,Y.H., Chen,W.Y., Vonderhaar,B.K., and Walker,A.M. (2005). Unmodified prolactin (PRL) and S179D PRL-initiated bioluminescence resonance energy transfer between homo- and hetero-pairs of long and short human PRL 988 receptors in living human cells. *Mol. Endocrinol.* 19, 1291-1303.

Tang,J.Z., Zuo,Z.H., Kong,X.J., Steiner,M., Yin,Z., Perry,J.K., Zhu,T., Liu,D.X., and Lobie,P.E. (2010). Signal transducer and activator of transcription (STAT)-5A and STAT5B differentially regulate human mammary carcinoma cell behavior. *Endocrinology* 151, 43-55.

Teilum,K., Hoch,J.C., Goffin,V., Kinet,S., Martial,J.A., and Kragelund,B.B. (2005). Solution 993 structure of human prolactin. *J. Mol. Biol.* 351, 810-823. 994

Trott,J.F., Hovey,R.C., Koduri,S., and Vonderhaar,B.K. (2003). Alternative splicing to exon 995 11 of human prolactin receptor gene results in multiple isoforms including a secreted prolactin-binding protein. *J. Mol. Endocrinol.* 30, 31-47.

Tworoger,S.S., Eliassen,A.H., Zhang,X., Qian,J., Sluss,P.M., Rosner,B.A., and Hankinson,S.E. (2013). A 20-year prospective study of plasma prolactin as a risk marker of breast cancer development. *Cancer Res.* 73, 4810-4819.

Vaclavicek,A., Hemminki,K., Bartram,C.R., Wagner,K., Wappenschmidt,B., Meindl,A., Schmutzler,R.K., Klaes,R., Untch,M., Burwinkel,B., and Forsti,A. (2006). Association of prolactin and its receptor gene regions with familial breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 91, 1513-1519.

Van Agthoven,J., Zhang,C., Tallet,E., Raynal,B., Hoos,S., Baron,B., England,P., Goffin,V., and Broutin,I. (2010). Structural characterization of the stem-stem dimerization interface between prolactin receptor chains complexed with the natural hormone. *J. Mol. Biol.* 404, 112-126.

Varghese,B., Swaminathan,G., Plotnikov,A., Tzimas,C., Yang,N., Rui,H., and Fuchs,S.Y. (2010). Prolactin inhibits activity of pyruvate kinase M2 to stimulate cell proliferation. *Mol. Endocrinol.* 24, 2356-2365.

Wagner,K.U. and Rui,H. (2008). Jak2/Stat5 signaling in mammaryogenesis, breast cancer initiation and progression. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 13, 93-103.

Walker,F., Kato,A., Gonez,L.J., Hibbs,M.L., Pouliot,N., Levitzki,A., and Burgess,A.W. (1998). Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinase-defective epidermal growth factor receptors results in cell survival but not proliferation. *Mol. Cell Biol.* 18, 7192-7204.

Watowich,S.S., Yoshimura,A., Longmore,G.D., Hilton,D.J., Yoshimura,Y., and Lodish,H.F. (1992). Homodimerization and constitutive activation of the erythropoietin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 2140-2144.

Watowitch,S.S., Hilton,D.J., and Lodish,H.F. (1994). Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerization. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3535-3549.

Wennbo,H., Gebre-Medhin,M., Gritli-Linde,A., Ohlsson,C., Isaksson,O.G., and Tornell,J. (1997). Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 100, 2744-2751.

Xie,Y.L., Hassan,S.A., Qazi,A.M., Tsai-Morris,C.H., and Dufau,M.L. (2009). Intramolecular disulfide bonds of the prolactin receptor short form are required for its inhibitory action on the function of the long form of the receptor

1. *Mol. Cell Biol.* 29, 2546-2555.

Yoshimura,A., Longmore,G., and Lodish,H.F. (1990). Point mutation in the exoplasmic domain of the erythropoietin receptor resulting in hormone-independent activation and tumorigenicity. *Nature* 348, 647-649.

Figure Legends

Fig. 1. Ile146 is near the PRLR homodimer interface (site 3)

(A) Three-dimensional structure representation of the 2:1 rPRLR/hPRL complex (PDB accession code 3EW3) (Van Agthoven et al., 2010). The two receptors (PRLR1 and PRLR2), are represented in yellow and green, respectively, and their D1- and D2-domains are indicated. The three inter-molecular interaction sites (sites 1 and 2 between PRL and each receptor, site 3 between the two receptors) are indicated. Ile146 is represented in red space filling atoms. (B) Perpendicular orientation (viewed from the membrane) of the receptor- receptor interface zoomed in on the D2 domain highlighting the position of Ile146. Residues located at less than 4Å from I146 are represented in sticks and labeled.

Fig. 2. Bioactivity of I146X PRLR mutants in HEK 293 cells.

Cells were transiently transfected using expression vectors encoding hPRLRWT or I146X mutants (as indicated), with (A, B, F) or without (C-E) the LHRE-luciferase reporter plasmid. (A) Starved cells were stimulated for 24h using a range of hPRL concentrations. For each mutant, luciferase values (means $\pm$ s.e.m, n=3 in triplicate) were normalized to the unstimulated condition. Values obtained at the highest PRL concentrations were compared by One-way ANOVA (see Material and Methods for symbols). (B) The basal levels of luciferase activity of each mutant (means $\pm$ s.e.m, n=3-6 in triplicate) are expressed as fold change compared to hPRLRWT. The horizontal line highlights mutants displaying >2 fold increased basal activity compared to hPRLRWT. (C) Starved cells were stimulated using 1µg/mL hPRL (15 min), then total PRLR (1A2B1 mAb), phosphorylated and total STAT5 were analyzed by immunoblotting. (D) Starved cells expressing the PRLR as indicated were stimulated as in C using 1µg/mL hPRL or hPRLbiot; PRL-receptor complexes were subsequently precipitated from cell lysates using streptavidin beads (SA beads) and identified using H300 antibody. Immunoblots of PRLR and pSTAT5 on total lysates served as controls. (E) Cells were co- transfected using different ratios of plasmids encoding hPRLRWT, a HA-tagged form of the latter (WTHA, displaying slower electrophoretic mobility), or hPRLRI146D (0, 1 and 2 indicate the quantity of plasmids in µg/P60 well). Starved cells were stimulated or not (1µg/mL, 15 min) then pSTAT5, total STAT5 and PRLR were analyzed by immunoblot. (F) Cells transfected with different ratios of hPRLRWT and hPRLRI146D encoding plasmids (as

indicated) were stimulated or not with PRL (1 μ g/mL) then luciferase activity was measured 24h later.

Fig. 3. Bioactivity of Group 2 I146X PRLR mutants in Ba/F3 cells (populations #3)

(A) Proliferation assays (WST-1 reagent) were performed over 3 days in medium containing 10% or 1% FCS, with or without addition of PRL (means $\pm$ s.e.m, n=3-4 in triplicate). In both serum conditions, PRL had significant effect in Ba/F-hPRLRWT cells only (Two-way ANOVA, symbol $\square$). In the absence of PRL, cells expressing either mutant grew significantly faster compared to Ba/F-hPRLRWT in 10% FCS (One-Way ANOVA, symbol $\square$). (B) Starved 1077 Ba/F3 cells expressing hPRLRWT or either Group 2 mutant were treated with 1 μ g/mL hPRL (15min), then phosphorylated and total STAT5 and Erk1/2 and total PRLR (1A2B1 clone) were analyzed by immunoblotting. (C) Densitometric analysis of 5 independent immunoblotting experiments is shown (mean $\pm$ s.e.m.). Values obtained for STAT5 (symbols $\square$) and Erk1/2 (symbols $\square$) were analyzed separately by One-way ANOVA and differences are expressed with respect to hPRLRWT. (D) Basal levels of STAT5 and Erk1/2 activity were determined for each cell populations using semi-quantitative SureFire[®] pSTAT5 or pErk1/2 homogeneous assay (AlphaScreen[®] technology) and compared by One-Way ANOVA

Fig. 4. Structural analyses of I146X PRLR-D2 domains Far-UV CD spectra of hPRLR-D2WT (solid line), hPRLR-D2I146D (dotted line), hPRLR-1088 D2I146G (dashed line), and hPRLR-D2I146N (dash-dot line). The intense positive ellipticity at 230 nm observed for hPRLR-D2WT arises from aromatic exciton couplings from the edge-to-face orientation of the indole rings of the WS motif, characteristic of the receptor off-state (Dagil et al., 2012).

Fig. 5. Constitutive signaling of Group 2 I146X PRLR mutants is maintained in MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were transiently transfected using expression vectors encoding hPRLRWT or I146X mutants as indicated. Transfected cells were starved overnight then stimulated using 1 μ g/mL PRL (15 min). Phosphorylated and total STAT5 and Erk1/2 were analyzed by immunoblotting. (B) Parental MCF-7 and MDA-MB231 and stably transfected cells expressing PRLRI146D (146Dhi, 146Dlo) or PRLRWT (WTlo, WThi) were analyzed in routine culture medium (FCS 10%) with respect to PRLR expression (1A2B1 mAb), phosphorylated and total STAT5 and Erk1/2. (C) Densitometric analysis of 3 independent immunoblotting

Experiments are shown (mean $\pm$ s.e.m.). Values were obtained by One-way ANOVA and are represented in comparison to parental MCF-7 cells for STAT5, and to clone 146Dlo for

Erk1/2. (D) The relative mRNA expression of SOCS2 in cell clones compared to parental MCF-7 cells was assessed by qRT-PCR from two independent experiments performed in duplicate. Symbols: Par: parental cells; MDA: MDA-MB231 cells. Arrows identify ligand-independent activation of STAT5 or Erk1/2.

Fig. 6. Proliferation assays of MCF-7 cells stably expressing PRLRI146D

The proliferation of parental MCF-7 and stably transfected cells expressing PRLRI146D (146Dhi, 146Dlo) or PRLRWT (WTlo) was analyzed in 4 conditions (1% versus 10% FCS, +/- PRL) for the times indicated, always starting with 150,000 cells per well. In each condition, comparison of the MCF-7 clones versus parental cells for a given time of proliferation was performed by one-way ANOVA involved.

Fig. 7. Impact of PRL and kinase inhibitors on intracellular signaling and proliferation of MCF-7 cells stably expressing PRLRWT or PRLRI146D

(A) Stably transfected MCF-7 cells expressing PRLRI146D (146Dhi, 146Dlo) or PRLRWT (WTlo, WThi) were starved overnight then stimulated using 1 μ g/mL PRL (15 min). Phosphorylated and total STAT5 and Erk1/2 were analyzed by immunoblotting. (B) These MCF-7 clones were incubated for 24h (B) or 48h (C) in the presence of AG490, U0126 or DMSO (vehicle) then the impact of inhibitors on constitutive STAT5 and Erk1/2 signaling (B) and cell proliferation (C) was analyzed compared to the DMSO condition.

Fig. 8. Expression of phenotypic markers in MCF-7 cells stably expressing PRLRWT or 1127 PRLRI146D. The relative mRNA expression of Vimentin, E-cadherin and cytokeratins 18/19 in MCF-7 cell clones compared (normalized) to parental MCF-7 cells (all in growth medium) was assessed by qRT-PCR from two independent experiments performed in duplicate. MDA-MB231 cells were used as a mesenchymal control (these cells express high amounts of vimentin while E-cadherin expression was virtually undetectable).

Fig. 9. Constitutive expression of PRLRWT or PRLRI146D in MDA-MB231 cells (A) MDA-MB231 cells were transiently transfected using expression vectors encoding hPRLRWT or I146X mutants as indicated. Transfected cells were starved overnight then stimulated with 1 μ g/mL PRL (15 min). Phosphorylated and total STAT5 and Erk1/2 were analyzed by immunoblotting. (B) Parental and stably transfected MDA-MB231 cells expressing PRLRI146D (146Dhi, 146Dmed) or PRLRWT (WTlo, WTmed) were analyzed in routine culture medium (FCS 10%) with respect to PRLR expression (1A2B1 mAb), phosphorylated and total STAT5. (C) WTmed and I146Dhi clones were incubated for 48h in the presence of AG490, U0126 or DMSO (vehicle) then cell proliferation was analyzed

compared to the DMSO condition. The impact of U0126 on Erk1/2 phosphorylation is shown for both clones. (D) The relative mRNA expression of E-cadherin and vimentin in cell clones compared (normalized) to parental MDA-MB231 cells was assessed by qRT-PCR from two independent experiments performed in duplicate. Note that the level of vimentin mRNA in parental MDA-1147 MB231 was >1,000 fold higher compared to parental MCF-7 cells used as a control of 1148 luminal phenotype.

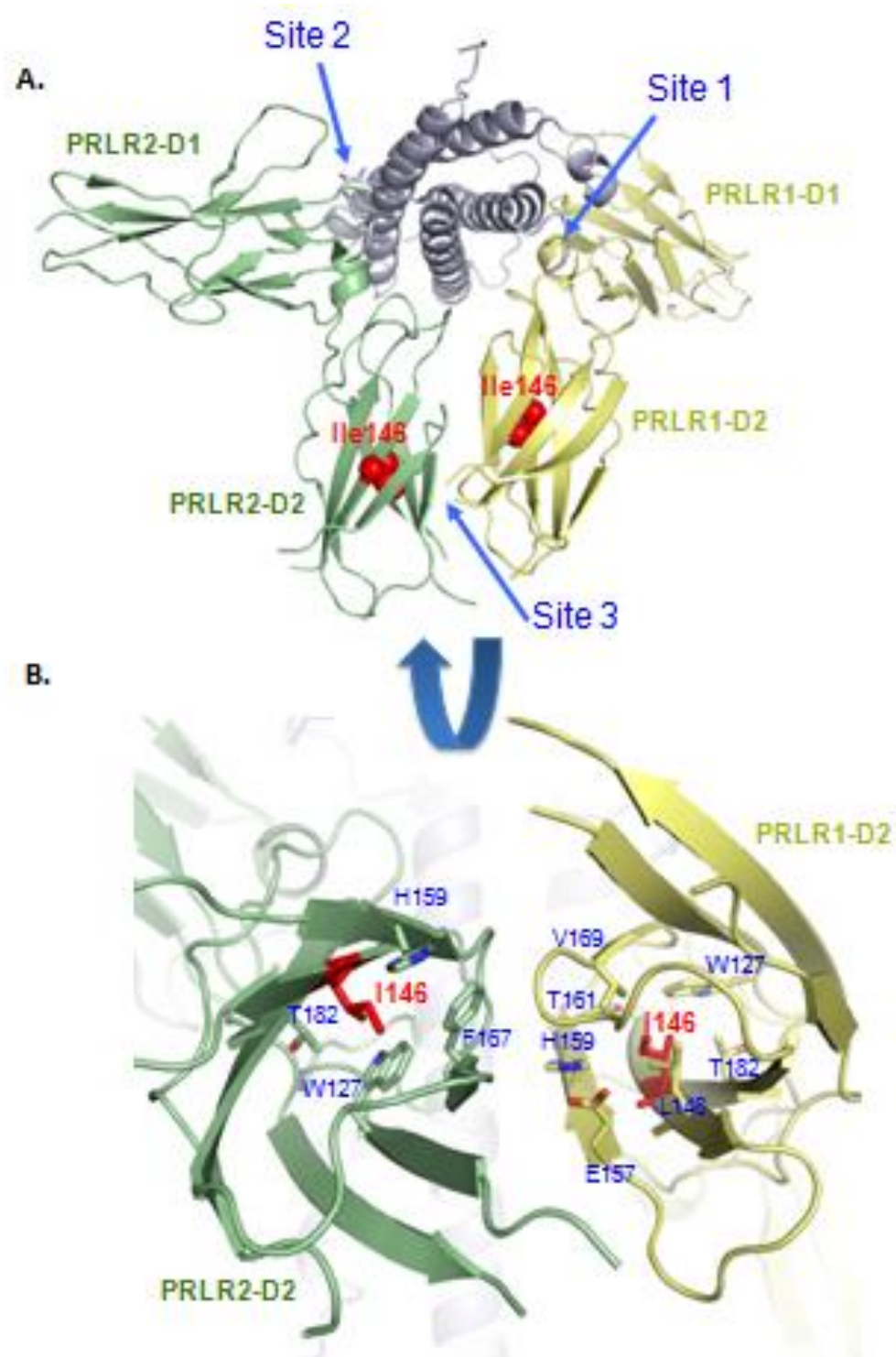


Figure 1

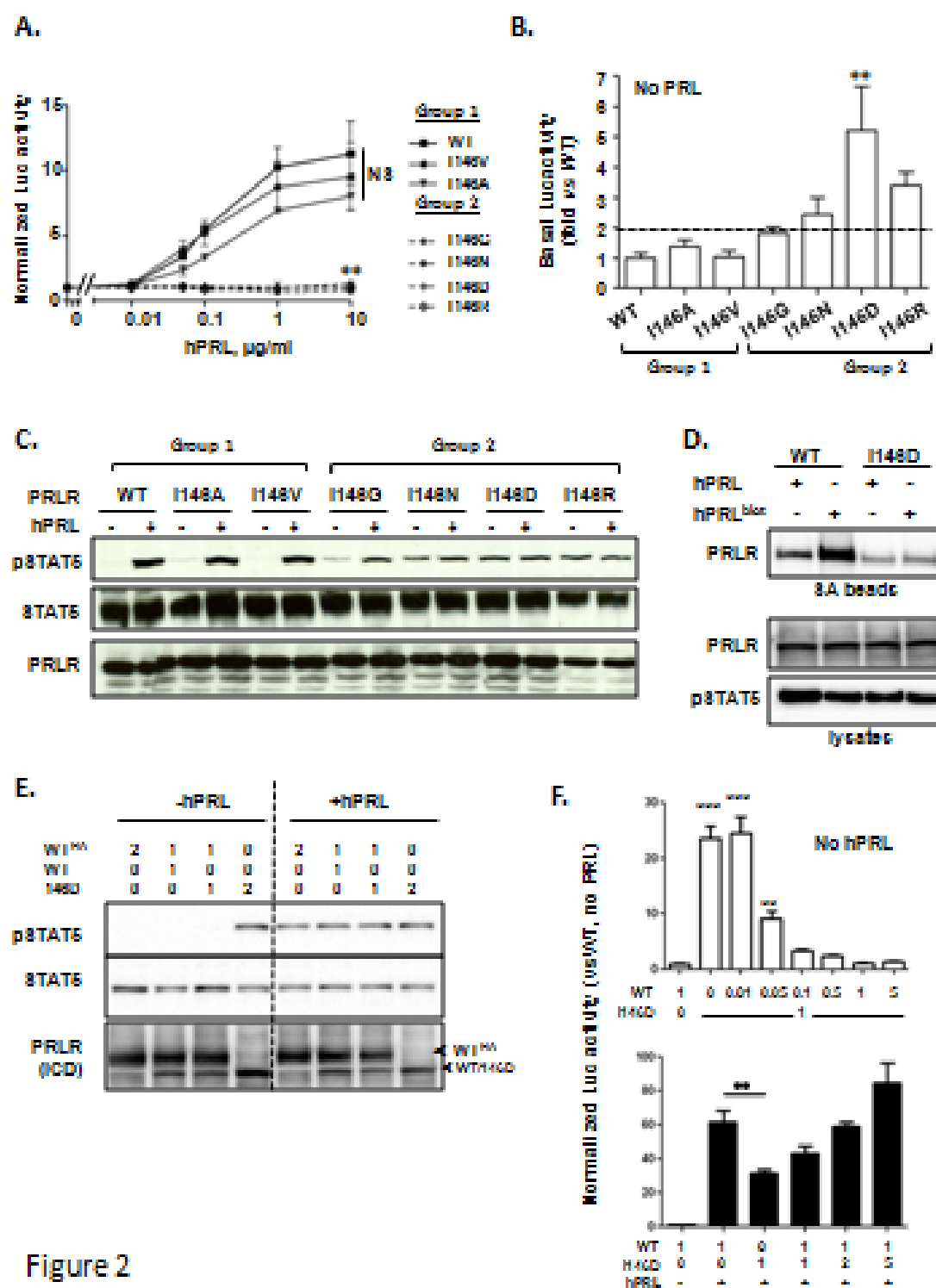
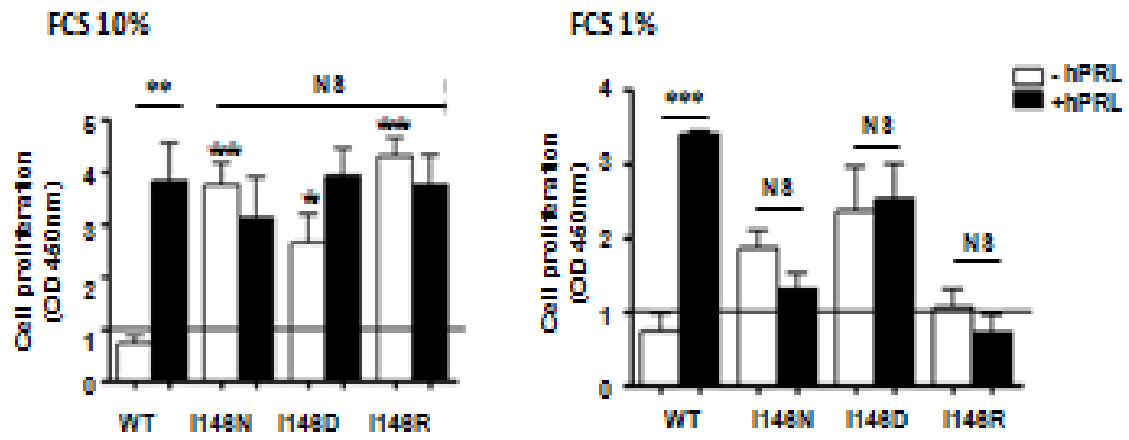
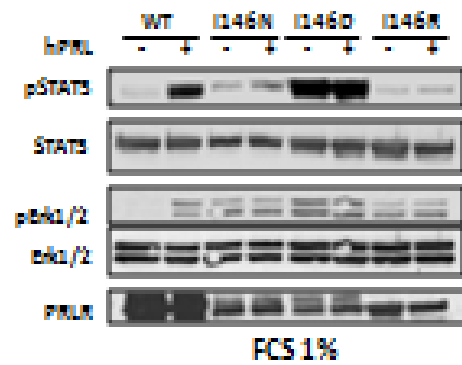


Figure 2

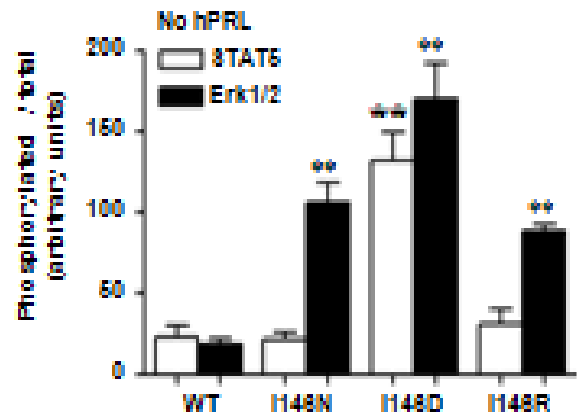
A. Proliferation



B. Signaling



C. Densitometry



D. Alphascreen[®]

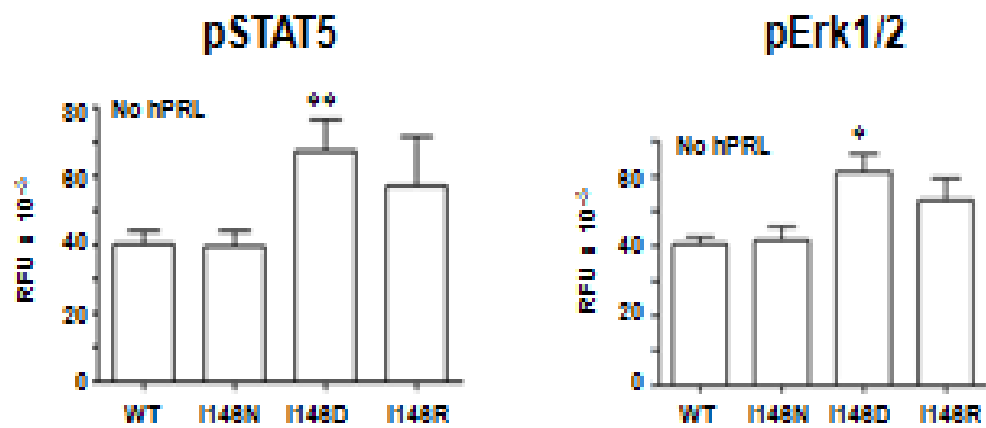


Figure 3

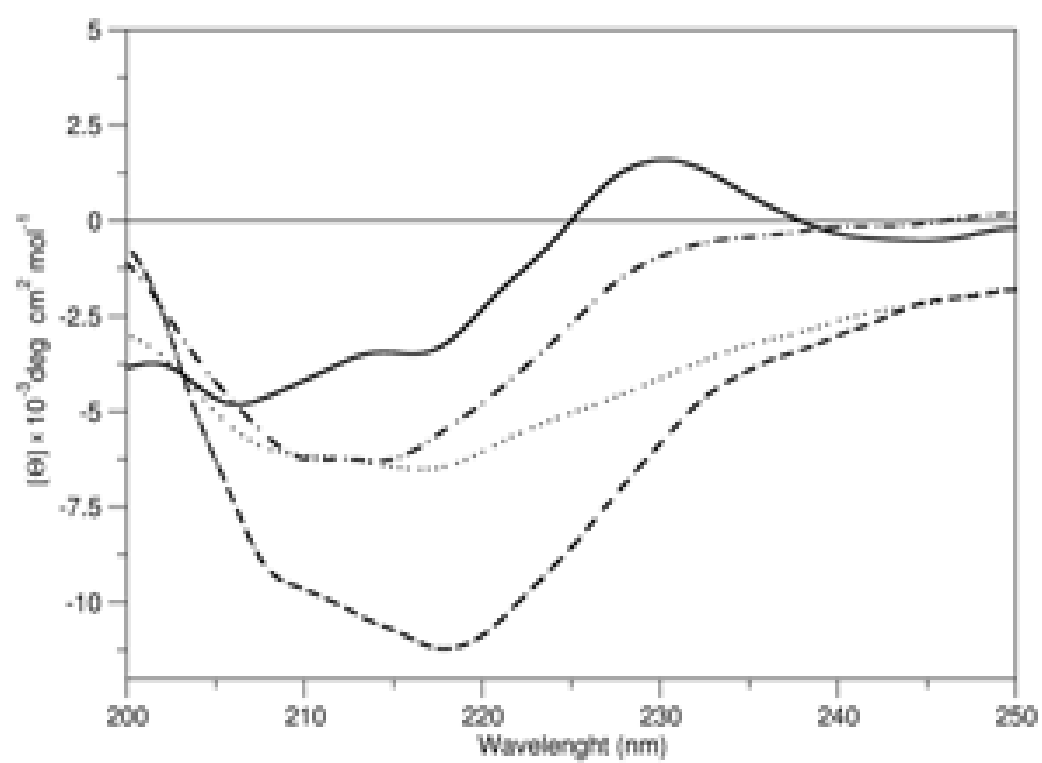
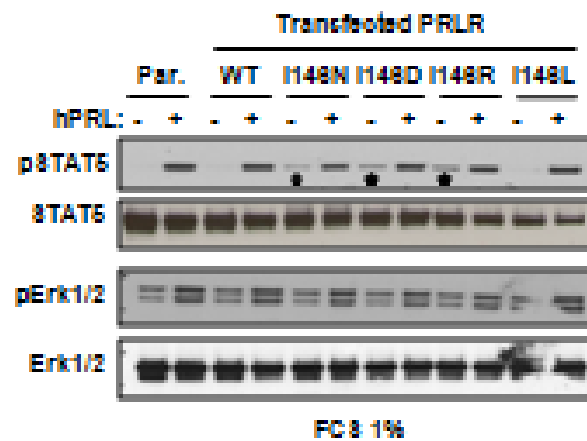
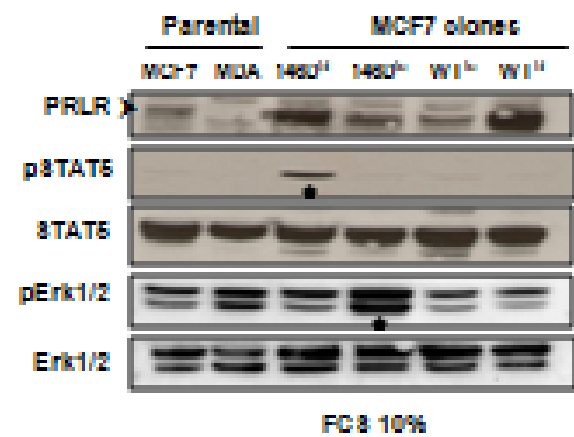


Figure 4

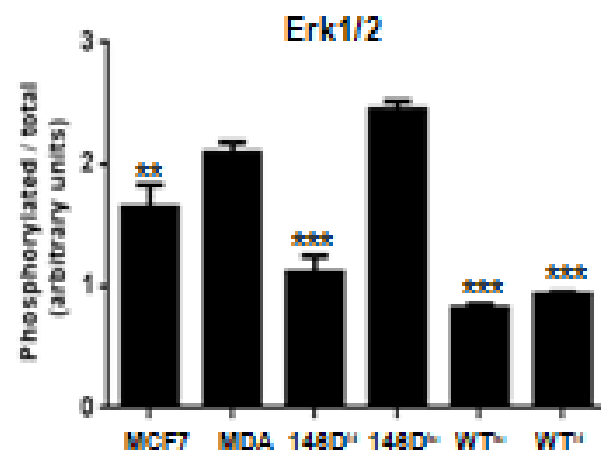
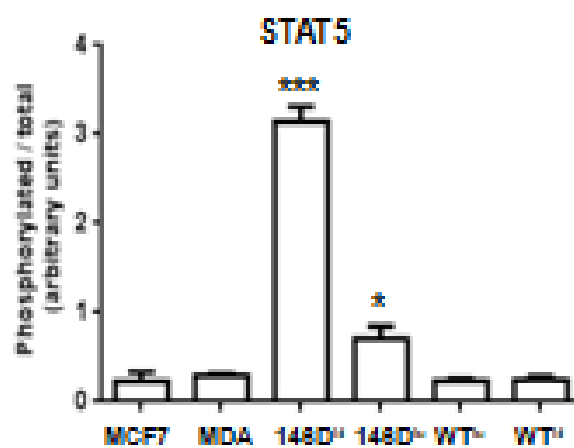
A. Transient transfections



B. Stable transfections



C. Densitometry



D. SOCS2

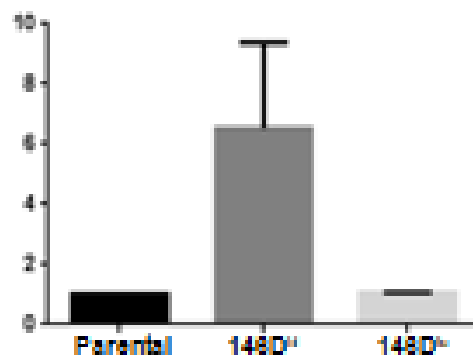
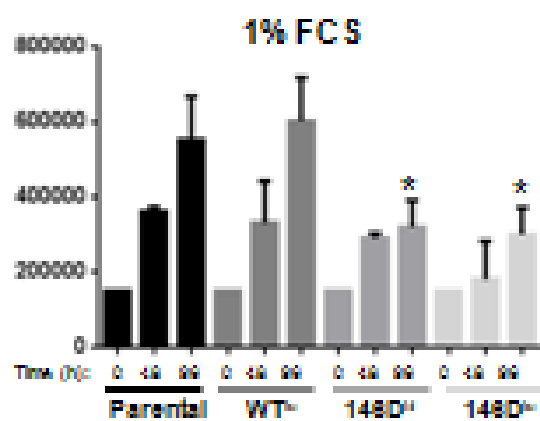
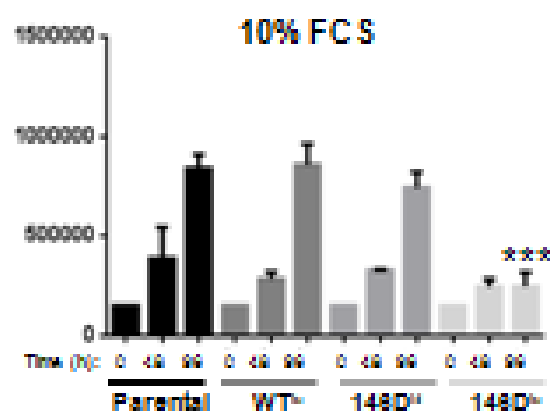


Figure 5

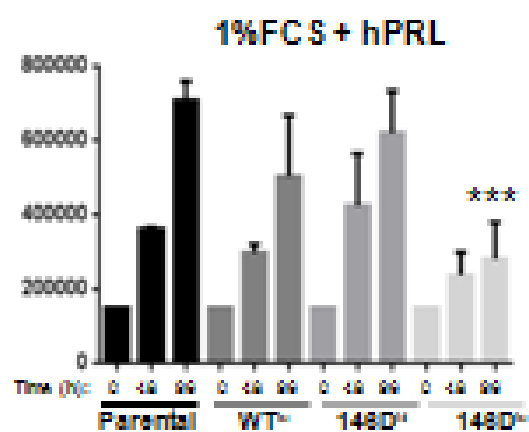
A.



B.



C.



D.

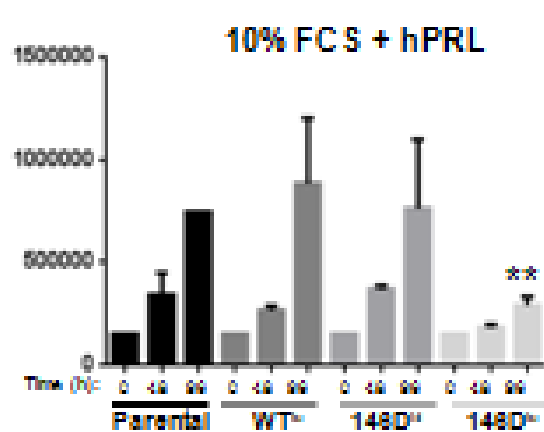
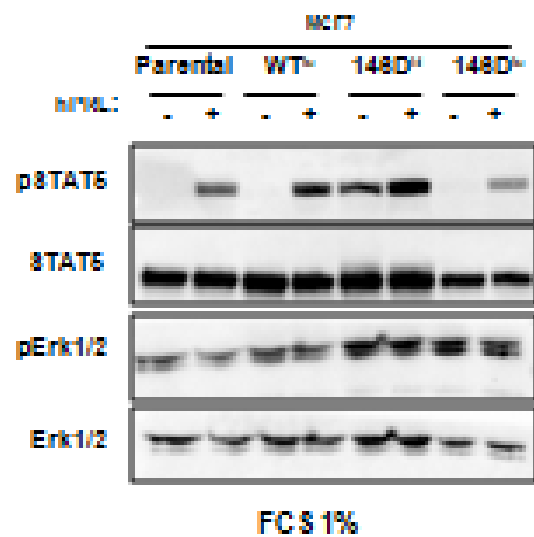
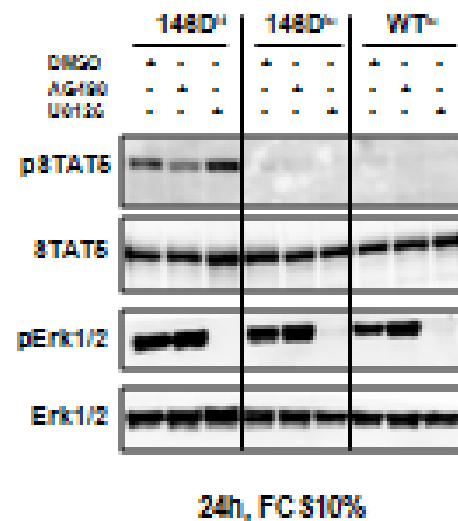


Figure 6

A. PRL responsiveness



B. Kinase inhibitors



C. Effect of kinase inhibitors on cell proliferation

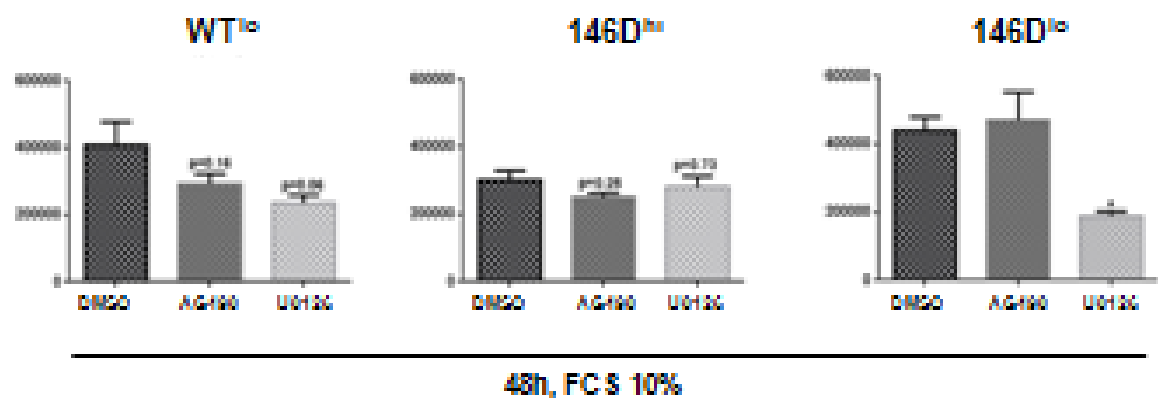


Figure 7

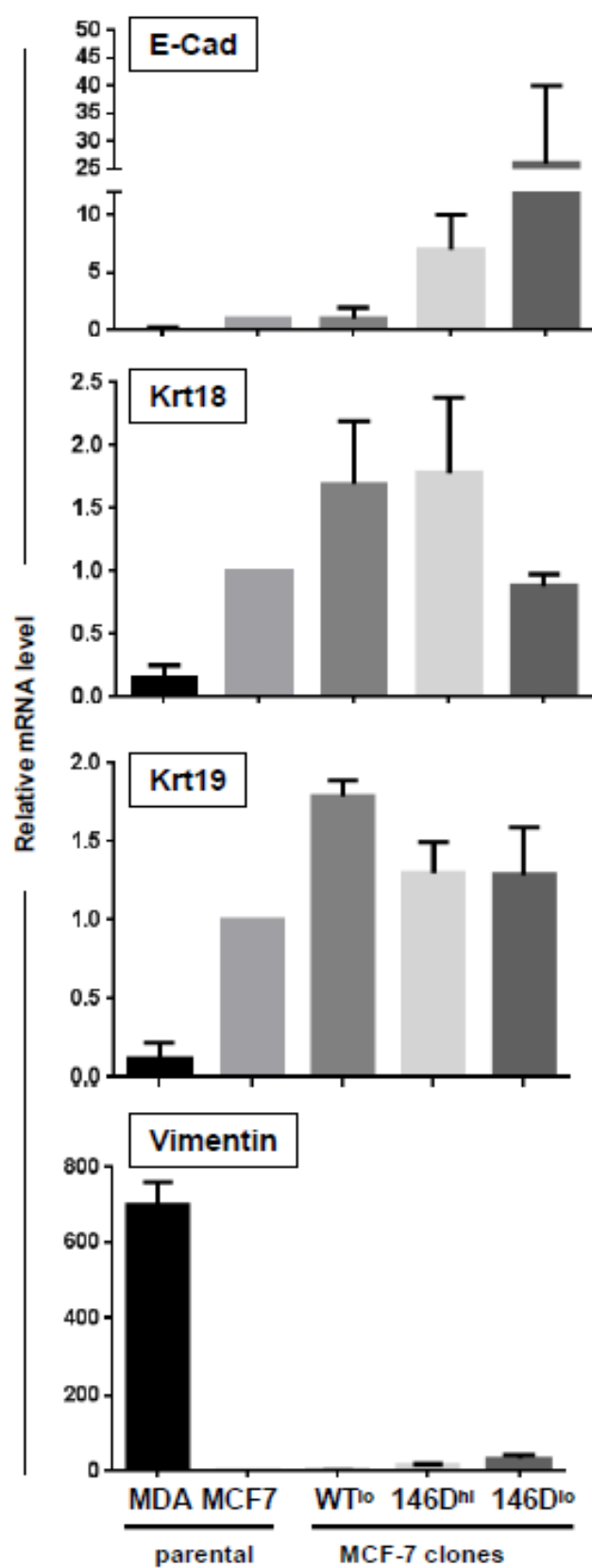
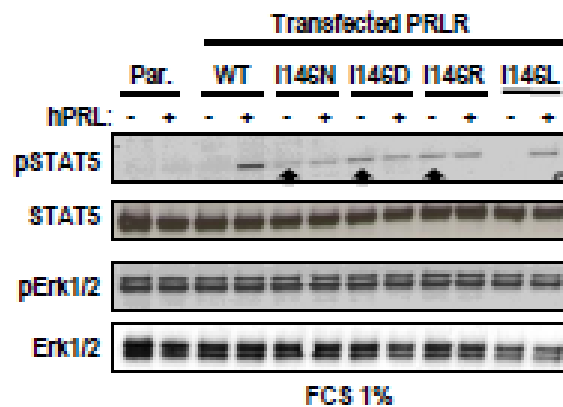
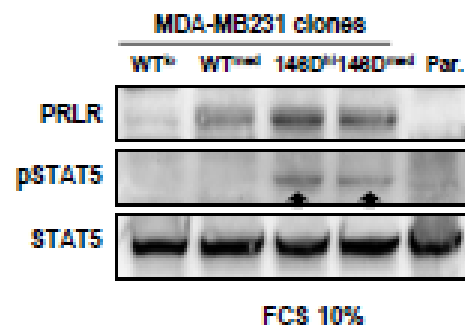


Figure 8

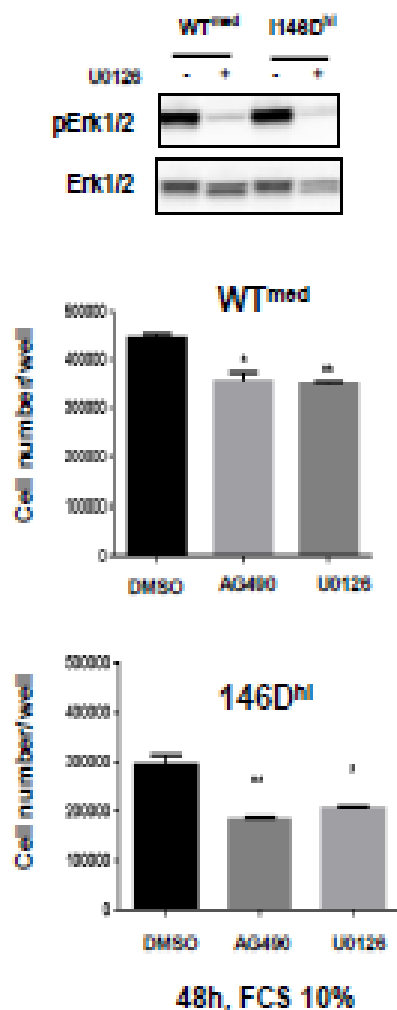
A. Transient transfections



B. Stable transfections



C. Effect of kinase inhibitors



D. Phenotypic markers

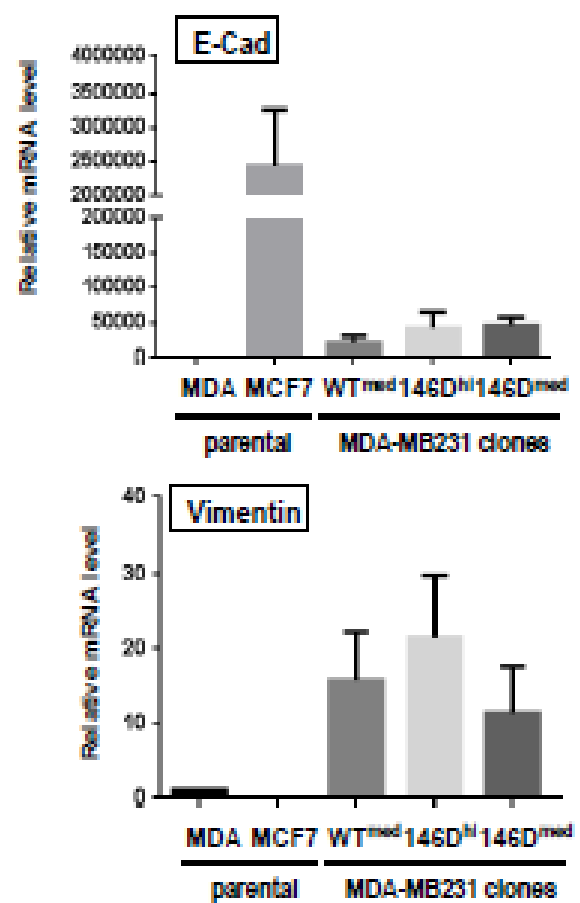


Figure 9

Supplemental Figures

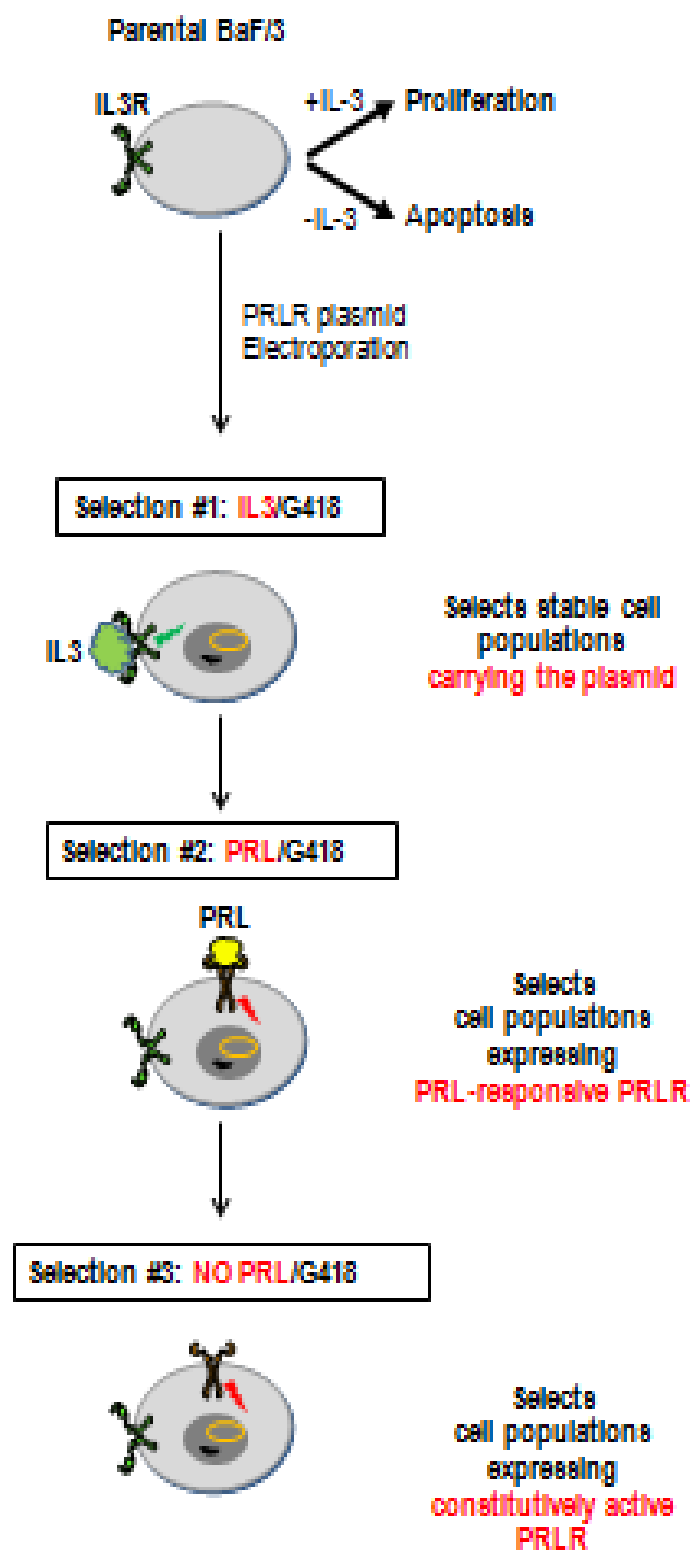


Fig S1

Screening of stably transfected Ba/F3 cells (population #1)

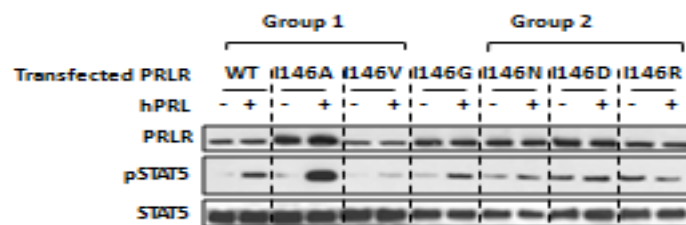


Fig S2

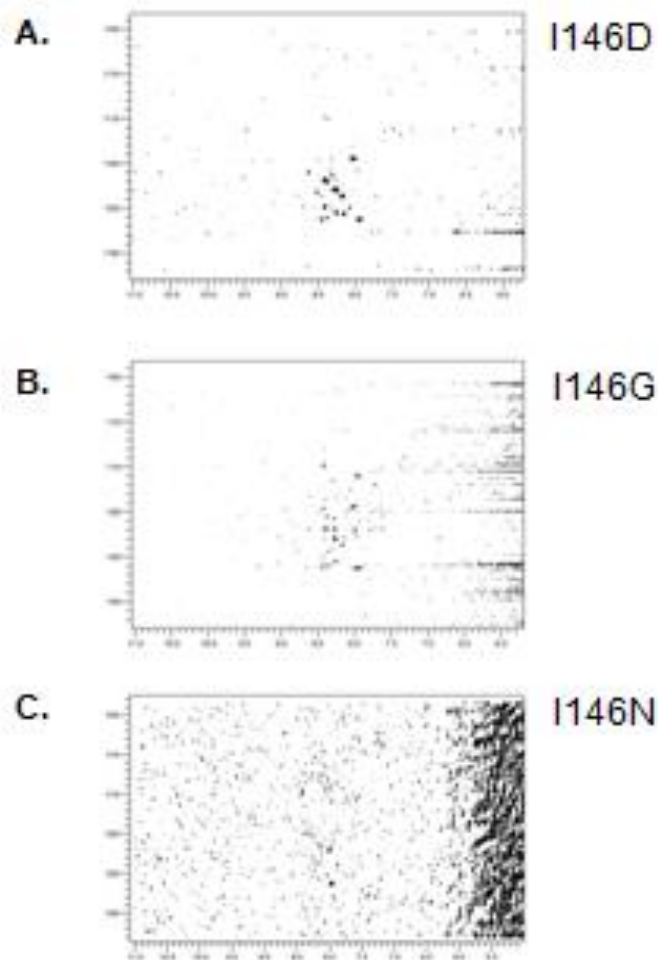


Fig S3

Screening of stably transfected MCF-7 clones and populations

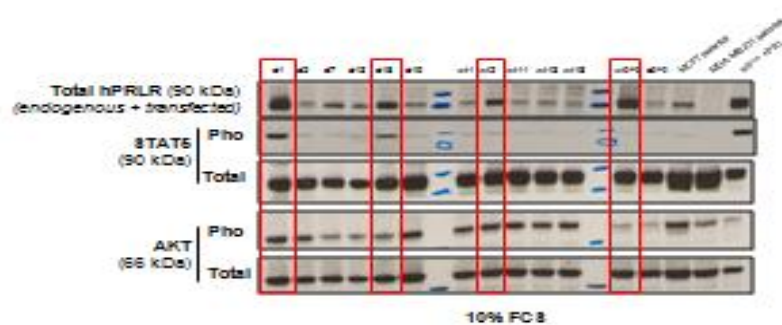
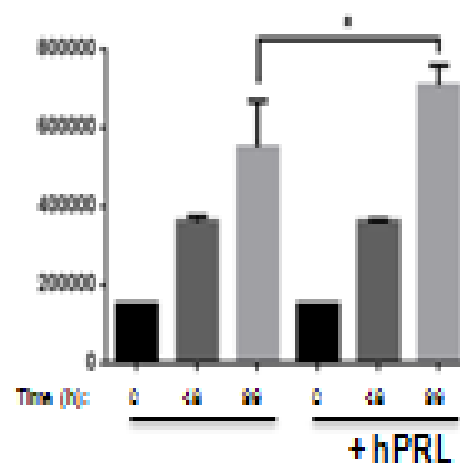


Fig S4

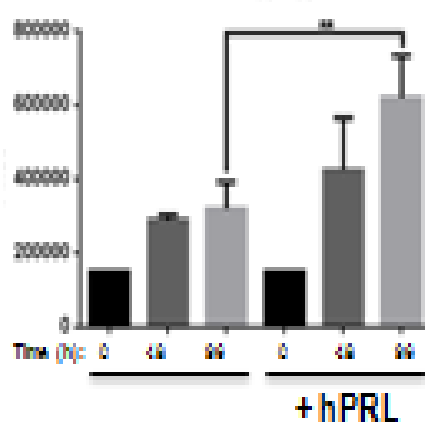
PRL-responsiveness of MCF-7 stable clones

1%FCS

Parental cells



clone 146D^{hP}



clone 146D^{lo}

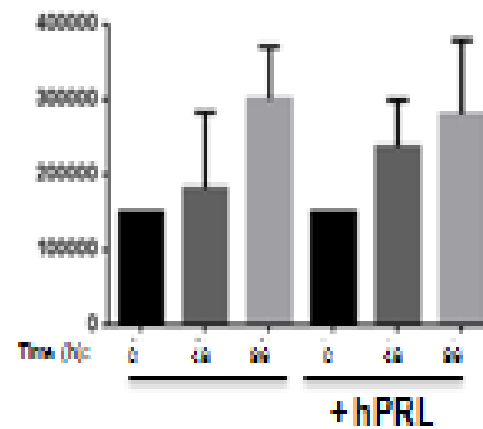


Fig S5

MDA-MB-231 clones

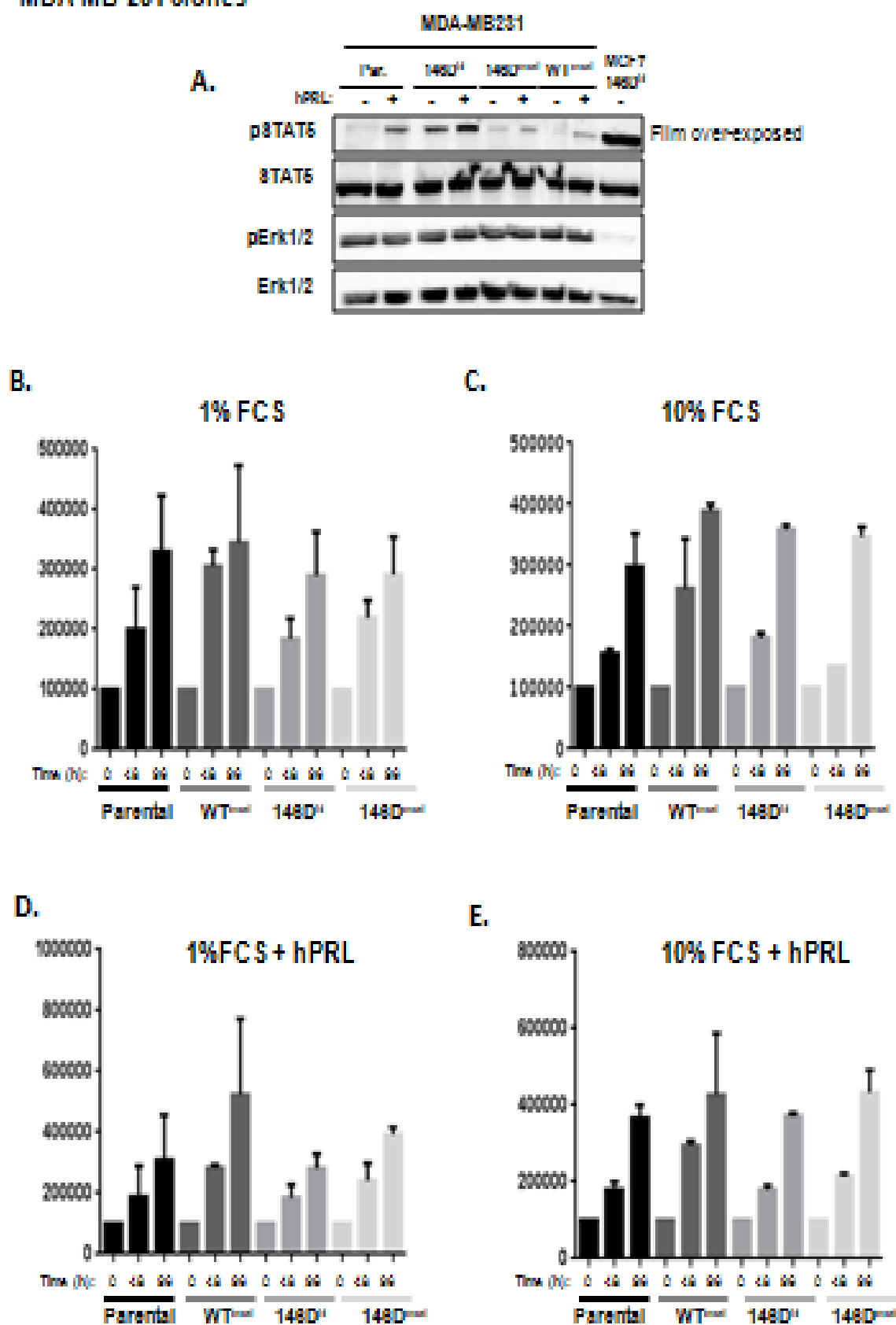


Fig S6

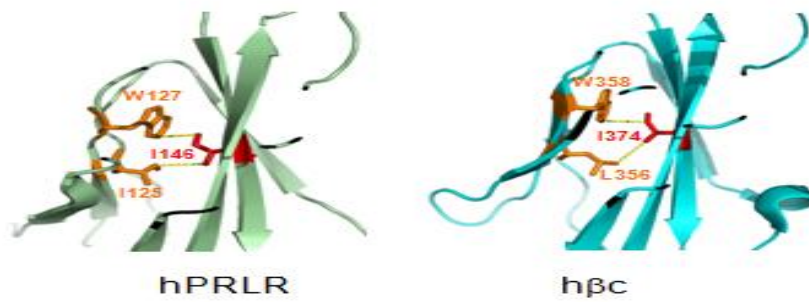


Fig S7

Legends to Supplemental Figures

Fig. S1. Process of iterative selection of Ba/F3 populations #1, #2 and #3 transfected with WT or mutated PRLR-encoding plasmids

This selection scheme was applied to Ba/F3 cells expressing I146X PRLR mutants.

Fig. S2. Screening of Ba/F3 populations #1 stably transfected with WT or mutated PRLR-encoding plasmids

As usually observed, stably transfected cells exhibit variable levels of PRLR expression until they undergo selection #2 (substitution of PRL for IL-3 as the growth factor). Accordingly, pSTAT5 levels were also highly variable in Group 1 mutants in response to PRL .

Fig. S3. ¹H,¹⁵N-HSQC spectra of I146X variants

A) hPRLR-D2I146D

B) hPRLR-D2I146G

C) hPRLR-D2I146N

Fig. S4. Screening of MCF-7 cells stably transfected with WT or PRLR-I146X encoding plasmids

The levels of PRLR expression and of STAT5 activation were used to select the clones identified by red boxes (see main text for details). Parental MCF-7 (7,000 PRLR/cells), MDA-MB231 (PRLR undetectable) and population wtpop stimulated with PRL (for strong STAT5 phosphorylation) were used as controls.

Fig. S5. PRL responsiveness of MCF-7 stable clones

These data are identical to those presented in main Fig 6 but here are expressed to emphasize the effect of PRL for each clone. As shown, d18 cells do not respond to PRL.

Fig. S6. PRL responsiveness and proliferation of MDA-MB-231 stable clones

(A) Stably transfected cells expressing PRLRI146D or PRLRWT were starved overnight then stimulated using 1µg/mL PRL (15 min). Phosphorylated and total STAT5 and Erk1/2 were analyzed by immunoblotting. (B-E) The proliferation of parental and stably transfected MDA-MB 231 cells expressing either receptor was analyzed in 4 conditions (1% versus 10% FCS, +/- PRL) for the times indicated, always starting with 150,000 cells per well. In each condition, comparison of the stable clones versus parental cells for a given time of proliferation was performed by one-way ANOVA involved. There was no significant difference between any conditions.

Fig. S7. Structural comparison of D2 domains from hPRLR and the common beta chain of the IL-3/IL-5 cytokine receptor subfamily

This panel shows that Ile146 (PRLR) and Ile374 (□c) are at homologous positions in the folded CRH domains of cognate ECDs. In both receptors, substitution of Asn for the natural Leu generated a receptor exhibiting ligand-independent activity.

Table 1
Survival of BalF Cell Populations at Each Selection Step

Populations (selection)		#1	#2	#3
Supplemented Growth Factor		IL-3	hPRL	I
Group 1	WT	+	+	-
	I146A	+	+	-
	I146V	+	(-) ¹	-
	I146G	+		+/-
Group 2	I146N	+	➡	+
	I146D	+		+
	I146R	+		+

¹likely due to Insufficient PRLR expression in population #1

Génération des souris Knock-in **hPRLR-I146L et hPRLR-wt**

Afin de pouvoir évaluer les effets du PRLR humain I146L chez la souris, nous avons choisi de générer deux souris transgéniques ; l'une devant exprimer le récepteur humain muté I146L et l'autre devant exprimer le récepteur humain WT dans les mêmes proportions, ces dernières souris servant de contrôle aux premières.

Ces deux modèles de souris exprimant le PRLR humain (I146L ou wt) ont été générés en étroite collaboration avec la plateforme de Recombinaison Homologue de l'Institut Cochin (Paris) et au sein de notre Laboratoire par le Dr Sophie Bernichtein qui en avait assuré le design avant mon arrivée.

La stratégie choisie est le **knock-in** conditionnel réalisé par recombinaison homologue. Cette stratégie permettant l'insertion d'un gène i) en une seule copie et ii) à un site ciblé, cela nous a permis de reproduire ce qui se passe chez les patientes qui sont hétérozygotes pour la mutation hPRLR-I146L (Courtilot et al.,2010).

Pour réaliser le knock-in, le site d'insertion choisi a été Rosa 26 ; il s'agit d'un site couramment utilisé en transgénèse, situé sur le chromosome 6 du génome de la souris. il permet une insertion du transgène sans générer de phénotypes particuliers observables (Soriano et al.,1999 ; Mao et al.,1999)

1. Description du transgène

La construction du transgène inséré chez la souris pour créer un modèle murin exprimant le récepteur humain de la prolactine (I146L ou wt) a été réalisé à la plateforme de Cochin. Ce vecteur est décrit dans la Figure III.1 ci-dessous.



Figure III.1 : Construction du transgène

Rosa Bras 3'et 5'

Bras d'homologie 3' et 5' qui permettent de cibler la région où le transgène va s'intégrer (site Rosa 26).

Cassette Hygromycine

- **pA-Hygro-PGK** : ADNc codant pour la résistance à l'hygromycine, permettant ainsi la sélection des cellules ES ayant intégré le transgène lors de la première étape de génération du modèle knock-in.
- **Séquences FRT**: ces séquences entourent le gène de résistance à l'hygromycine sous l'action d'une enzyme appelée «Flippase» (FLP), la cassette Hygro sera excisée afin d'éviter toute interférence avec les phénotypes des animaux portant le transgène d'intérêt.

Promoteur PGK

Ce promoteur (d'origine murine) induit une expression ubiquiste des séquences codantes qu'il contrôle. Dans notre cas, il va donc induire l'expression ubiquiste de la β -galactosidase, et ensuite dans les tissus où la Cre recombinase aura été exprimée (voir ci-dessous), celle du hPRLR (wt ou I146L).

Cassette LacZ

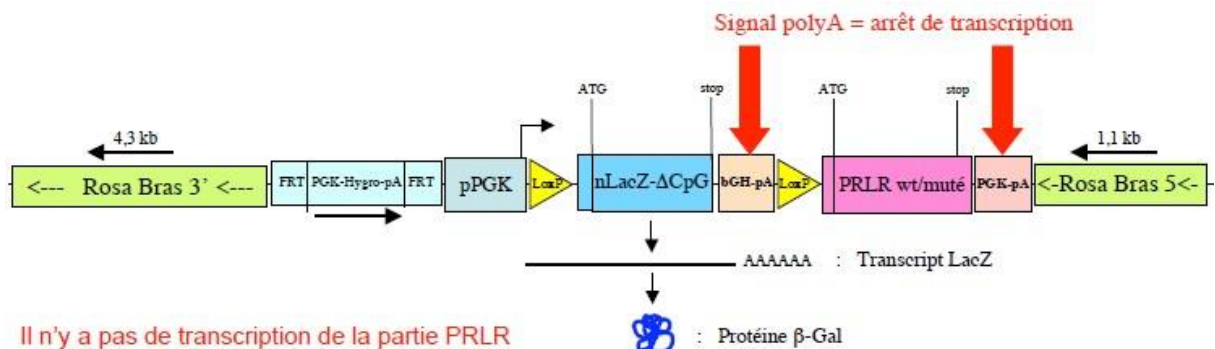
- **Séquences LoxP** : la cassette LacZ est entourée par deux séquences LoxP et pourra donc être excisée sous l'action de l'enzyme Cre recombinase (Figure II.2 ci-dessous).
- **nLacZ-ΔCpG**: ADNc codant pour la β -galactosidase, qui joue deux rôles ici:
 - ✓ Il constitue un gène rapporteur permettant de vérifier que le promoteur PGK est bien fonctionnel dans les différents tissus de la souris avant action de la Cre.
 - ✓ Son deuxième rôle est de permettre à la séquence codante du hPRLR (I146L ou wt) d'être exprimée de façon conditionnelle : l'ADNc lacZ possède un signal de polyadénylation (pA) qui va arrêter la transcription, le hPRLR ne sera donc pas exprimé si la cassette LacZ n'est pas délétée. C'est pourquoi celle-ci est entourée

de séquences LoxP. Ainsi elle sera excisée dans les tissus qui exprimeront la cre recombinase, induisant dans ces tissus l'expression de l'ADNc du hPRLR à partir du promoteur PGK.

Cassette hPRLR

- **PRLR wt/muté :** l'ADNc codant pour l'isoforme longue (598 a.a.) du hPRLR sauvage ou I146L (Boutin et al.,1989). Ce choix a été fait car l'effet de la mutation I146L n'a été jusqu'ici caractérisée que sur l'isoforme longue (Bogarad et al.,2008 ; Courtillot et al.,2010).
- **PGK-pA :** le signal de polyadénylation qui permettra la mise en place de la queue poly-A sur l'ARN messager issu de la transcription du transgène PRLR.

A.



B.

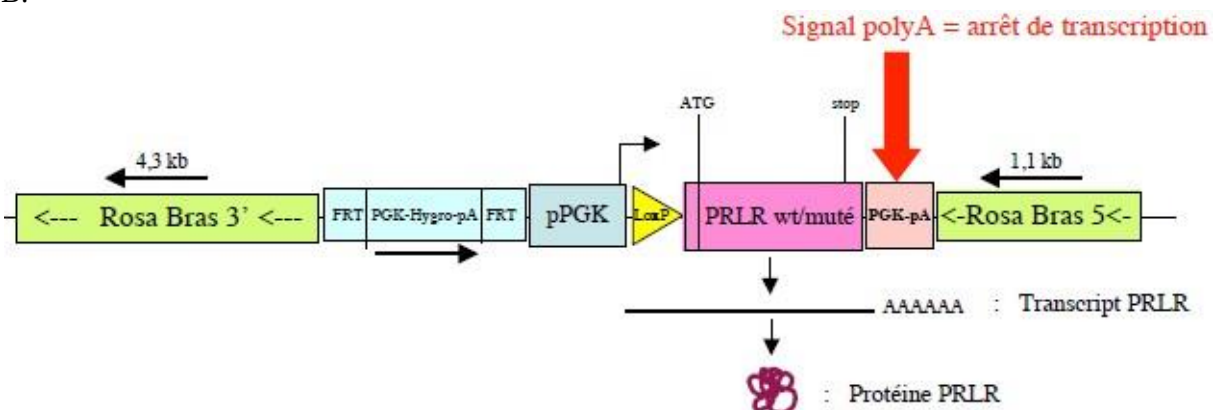


Figure III.2: Action de la Cre recombinase

A. Le promoteur PGK régule l'expression de l'ADNc LacZ et induit l'expression de l'enzyme β -galactosidase ; le hPRLR n'est normalement pas exprimé à ce stade.

B. Après l'action de la Cre recombinase la cassette LacZ est excisée afin de permettre au promoteur PGK d'induire l'expression du hPRLR.

2. Validation de la construction in vitro

2.1 Expression des hPRLR

Les deux constructions hPRLR wt et hPRLR I146L, insérées dans un vecteur eukaryote nous ont été fournies par la plateforme de Cochin afin d'être validées *in vitro*. Elles ont été transfectées transitoirement dans des cellules HEK293 (dont les niveaux endogènes de PRLR sont indétectables) selon les protocoles décrits dans le manuscrit présenté dans la première partie des résultats (Zhang, Cherifi et al, en révision).

Comme le montre la Figure II.3A, en présence de la cassette LacZ, l'expression du hPRLR exogène (wt ou I146L) est indétectable. Par contre, l'activité β -Gal est bien observée (Figure III.3B). Après délétion de la cassette LacZ (Δ LacZ) suite à l'addition de protéine Cre dans le milieu de culture, l'expression du PRLR exogène devient détectable, contrairement à l'activité β -Gal qui disparaît.

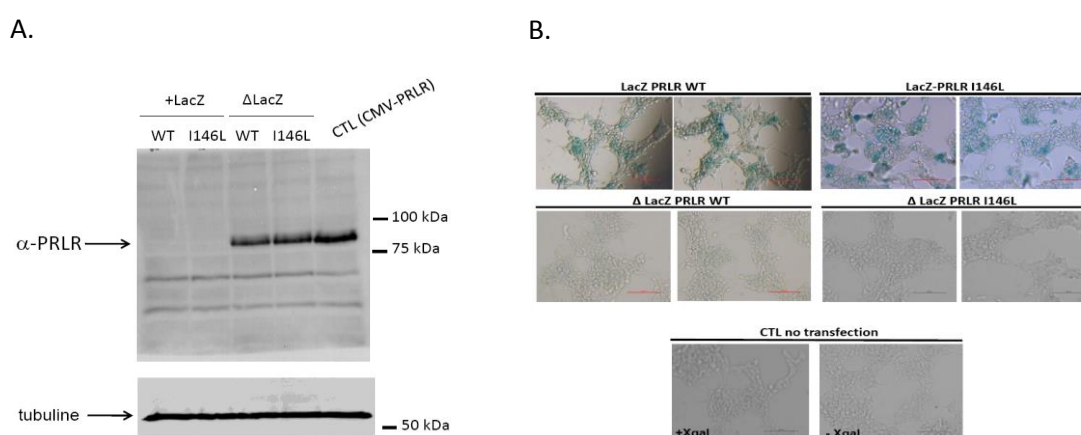


Figure III.3 : Validation des constructions in vitro (expression)

A. Transfection transitoire de cellules HEK293 avec les différentes constructions wt et I146L avant (+LacZ) ou après (Δ LacZ) délétion de la cassette LacZ. Une transfection avec notre plasmide de référence pcDNA3-hPRLR (promoteur CMV) a été réalisée en contrôle. Un dépôt de 65 μ g de lysat total a ensuite été analysé pour chaque condition par immunoblot avec un anticorps anti-PRLR (Invitrogen). La tubuline est utilisée comme contrôle de dépôt. B. Dans la même expérience, une partie des cellules transfectées a été utilisée pour réaliser un test d'activité enzymatique de la β -galactosidase en présence de substrat X-gal.

2.2 Activité biologique des hPRLR

Nous avons ensuite validé l'activité biologique du hPRLR codé par le transgène. Toujours selon les procédures décrites dans notre manuscrit (Zhang, Cherifi et al en révision), nous avons réalisé des transfections transitoires de cellules HEK293 avec les différentes constructions wt et I146L (+ et –LacZ) et le gène rapporteur LHRE-luciférase (comportant des éléments de liaison à Stat5 en amont du gène rapporteur luciférase). Nous avons également analysé l'activation (phosphorylation) de Stat5 par immunoblot. En accord avec l'expression du hPRLR (voir ci-dessus), l'activité biologique induite par la PRL est observée pour les deux récepteurs seulement après excision de la cassette LacZ (Figure III.4A). Bien qu'une légère phosphorylation de Stat5 soit observée pour le hPRLR-I146L en absence de stimulation par la PRL (Figure III.4B), celle-ci n'est pas retrouvée dans le test luciférase. Comme rapporté précédemment (Bogorad et al., 2008), l'activité constitutive du PRLR-I146L est rarement observée dans des conditions d'expression transitoire.

Il est important de noter que dans ces expériences *in vitro*, les niveaux d'expression protéique et d'activité induite par la PRL sont similaires pour les deux constructions, suggérant que la comparaison des lignées de souris knock-in qui seront générées permettra bien de refléter les éventuels effets du PRLR-I146L versus PRLR-wt

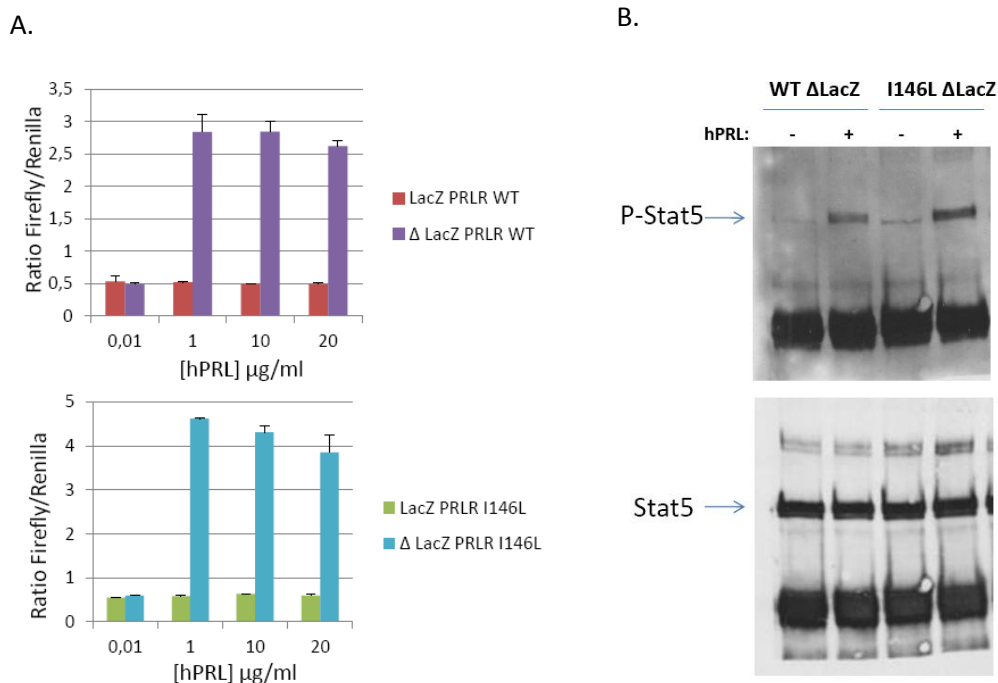


Figure III.4 : Validation de la construction in vitro (activité)

A. Test d'activité du gène rapporteur LHRE-luciférase dans les cellules HEK exprimant de manière transitoire les constructions hPRLR-wt ou I146L avant ou après délétion de la cassette LacZ. B. Analyse par immunoblot de la phosphorylation de Stat5 sur la tyrosine C-terminale après immunoprécipitation de la protéine Stat5 à partir de 1 mg de lysat cellulaire. Le blot Stat5 total sert de contrôle de chargement.

2.3 L'expression du hPRLR perturbe-t-il l'activation du PRLR de souris?

Nous avons aussi voulu écarter l'hypothèse d'une interférence possible entre le récepteur transgénique humain et le récepteur endogène de la souris (mPRLR), par exemple via une hétérodimérisation moléculaire humain/souris pouvant perturber la signalisation de ce dernier, et de ce fait induire des phénotypes qui seraient erronés, attribués à l'expression et/ou l'activité intrinsèque du transgène humain.

Pour répondre à cette question, nous avons co-transfecté des cellules HEK293 avec des plasmides codant pour le mPRLR et le gène rapporteur LHRE-luciférase, en présence ou non d'un plasmide codant pour le PRLR humain. Nous avons ensuite stimulé ces cellules avec de la PRL de souris (qui n'active pas le hPRLR) (Utama et al., 2006), puis nous avons mesuré 24 heures plus tard l'activation de Stat5 par le test luciférase. Les résultats obtenus sur la Figure III.5 montrent que le fait d'exprimer le hPRLR ne perturbe pas la capacité de la mPRL à activer la voie de signalisation mPRLR/Stat5.

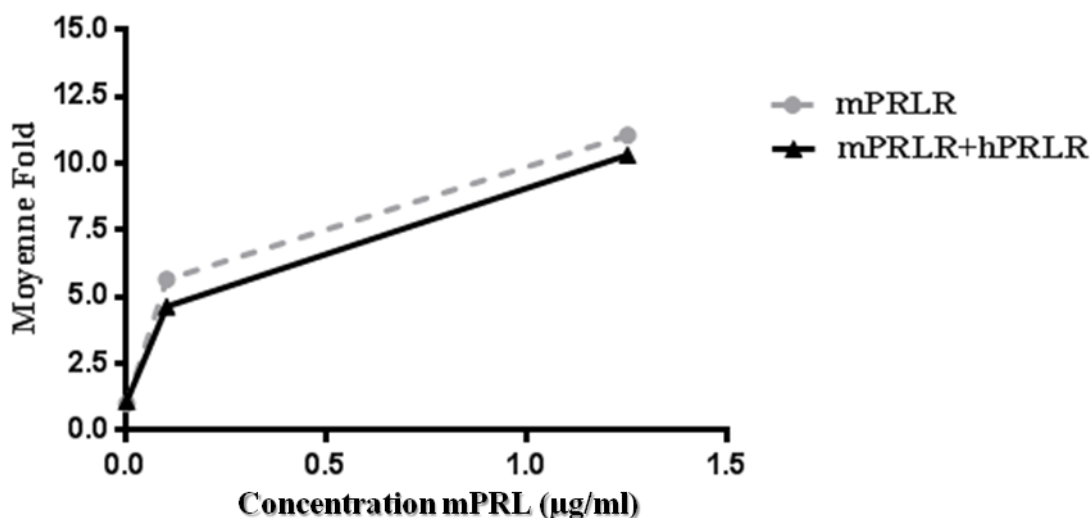


Figure III.5: Co-expression des PRLR humains et murins dans des cellules HEK293

Ratio mPRLR-hPRLR 1 :1

3. Génération des souris transgéniques

Le transgène a été injecté par électroporation dans des cellules ES, les cellules ayant intégré le transgène ont été sélectionnées sur milieu sélectif (hygromycine) puis amplifiées. Après vérification de l'intégration du transgène par une combinaison de digestions enzymatiques de l'ADN génomique des clones sélectionnés, ceux donnant un résultat positif ont été injectés dans des embryons, implantés ensuite dans des souris pseudo-gestantes. Les souris issues de l'implantation (N0) ayant intégré le transgène ont ensuite été croisées avec des souris exprimant l'enzyme FLP afin d'éliminer la cassette de sélection (voir Table III.1). Ces étapes ont été réalisées par la plateforme de recombinaison de l'Institut Cochin.

La plateforme nous a donc transmis des souris 'knock-in' possédant la construction d'intérêt déletée pour la cassette de sélection hygromycine (N1). Ces souris ont alors été croisées avec des souris C57BL/6 afin d'éliminer l'enzyme FLP (N2) dans le but d'éviter l'apparition de phénotypes dus à la présence d'éléments du transgène pouvant interférer avec les phénotypes des souris et de commencer les croisements nécessaires à l'obtention d'un fond génétique pur.

Les souris ainsi obtenues ont été croisées avec une souche de souris de fond C57BL/6 exprimant la Cre recombinase. Nous avons opté pour la **PGK-Cre** pour effectuer les croisements car cette souris exprime la Cre recombinase de façon ubiquitaire (Lallemand et al.; 1998) avec transmission

germinale lorsque le transgène est porté par la mère (expression chez la mère dès le stade embryonnaire diploïde). Nous avons choisi cette souris par rapport à une souris exprimant la Cre dans un tissu donné (en l'occurrence la glande mammaire) dans le but principal de reproduire le caractère germinale de la mutation rencontrée chez l'Homme et aussi d'avoir la possibilité d'analyser des tissus-cibles de la PRL autres que la glande mammaire qui est au centre de mon projet de thèse.

Les souris PGK-PRLR-I146L/PGK-Cre et PGK-hPRLR-wt/PGK-Cre ont été ensuite croisées avec des souris C57BL/6 afin d'éliminer la recombinaison Cre. Il est à noter qu'ainsi les premières souris présentant les génotypes à étudier ont été obtenues après plus d'un an de croisements successifs. Les souris ont ensuite été croisées pour les générations suivantes avec des souris C57BL/6. L'ensemble des études présentées dans la suite de ce chapitre ont été effectuées sur des animaux de la génération N4 afin de limiter les effets induits par des fonds génétiques différents sur le phénotype.

Génération	Dénomination	Croisement	Hygro	FLP	Cre	LacZ	PRLR
N0			+	-	-	+	-
N1	hPRLR I146L/WT Δ Hygro	N0 x FLP	-	+	-	+	-
N2	hPRLR I146L/WT Δ Hygro/FLP ^{-/-}	N1 x C57BL/6	-	-	-	+	-
N3	hPRLR-I146L ^{Cre} /WT ^{Cre}	N2 x PGK-Cre	-	-	+	-	+
N4	hPRLR I146L/WT	N3 x C57BL/6	-	-	-	-	+
N5 (N6,...)	hPRLR I146L/WT	N4 x C57BL/6	-	-	-	-	+
Homozygotes	hPRLR-I146L/WT	N4xN4					+/+

Table III.1: Générations successives de souris Knock-in avec leur profil d'expression des transgènes.

La couleur rouge représente la conséquence recherchée de chaque croisement.

4. Validations et caractérisation moléculaire du modèle

4.1 Génotypage

Le génotypage des souris obtenues lors des différents croisements a nécessité la mise au point de différentes PCR permettant de visualiser :

- la délétion du transgène codant pour la Flippase
- la présence ou non du transgène Cre,
- la présence ou non du transgène LacZ en recherchant la présence ou l'absence de la séquence continue PGK-hPRLR (I146L ou wt). Cette PCR permet de définir si la cassette LacZ a ou non été déléetée suite à l'action de la protéine Cre (figure III.6).

L'hétérozygotie ou l'homozygotie pour le transgène d'intérêt. Pour cela, nous avons développé une PCR permettant de détecter la présence de l'allèle sauvage Rosa26. Ainsi les animaux présentant un résultat négatif de cette PCR et un résultat positif de la PCR PGK-hPRLR précédemment décrite sont homozygotes pour le transgène hPRLR alors que les animaux présentant des PCR Rosa26 et PGK-hPRLR positives sont hétérozygotes pour hPRLR. Ces différentes PCR ont été réalisées à partir d'ADN génomique de queue de souris en utilisant les amorces décrites dans la section Matériels et Méthodes selon les protocoles décrits dans la même section.

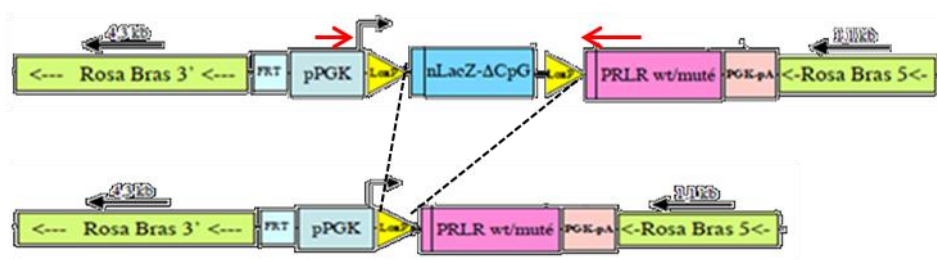


Figure III.6 : Emplacement des amorces (en rouge) pour la PCR permettant la délétion de la cassette LacZ ou non après l'action de la protéine Cre.

A partir de la génération N4, nous avons vérifié que la délétion par la Cre du transgène LacZ s'effectuait bien dans les tissus d'intérêts. Pour cela, nous avons effectué la PCR PGK-hPRLR (I146L ou wt) sur les ADN génomiques de ces tissus obtenus après sacrifice des animaux. La Figure III.7 montre l'exemple du tissu mammaire pour lequel la PCR montre une amplification du transgène PGK-hPRLR dans le tissu mammaire comme dans la queue de souris. Il y a donc bien eu recombinaison homologue dans ces tissus conduisant à la délétion du transgène LacZ permettant à la séquence hPRLR d'être directement sous le contrôle du promoteur PGK. Le même résultat a été obtenu pour les autres tissus testés, notamment le foie, la prostate ou encore le rein, confirmant l'action de la PGK-Cre sur un large spectre de tissu. Ce résultat nous a permis de valider que le génotypage à partir de l'ADN de la queue de souris reflétait toujours celui de la glande mammaire et pouvait donc être utilisé en routine pour sélectionner les souris d'intérêt.

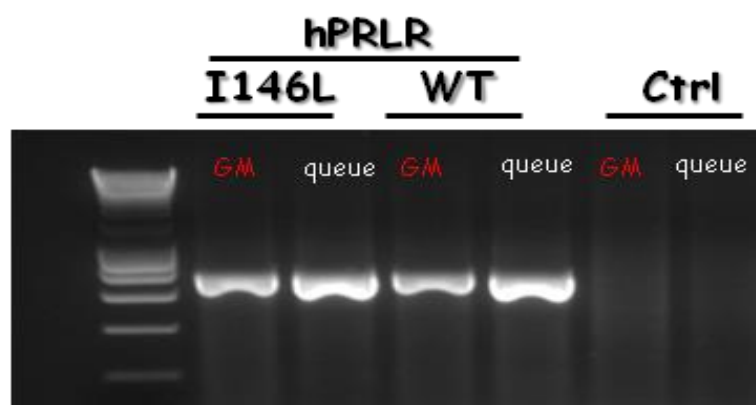


Figure III.7 : Détection des transgènes hPRLR-I146L et hPRLR-wt dans l'ADNg de la glande mammaire . Des souris sauvages ont été utilisées en contrôle (CTRL)

4.2 Expression de l'ARNm du hPRLR (qRT-PCR)

Nous avons ensuite vérifié que la délétion de la cassette LacZ suite à l'action de la Cre-recombinase permettait l'expression du transgène d'intérêt, soit hPRLR-I146L, soit hPRLR-wt. Nous avons donc analysé l'expression de l'ARNm du transgène hPRLR dans différents organes (glande mammaire, prostate, foie, rein et rate). Ces validations ont été réalisées sur des souris de génotype N4 âgées de 3 mois.

L'expression du transgène hPRLR-I146L a été recherchée par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques de la forme humaine du PRLR. Ainsi, l'expression du transgène a été détectée dans les différents organes des souris transgéniques exprimant la Cre, mais pas dans les mêmes organes de

souris contrôles portant la construction mais n'exprimant pas la Cre (N2). Pour estimer les niveaux d'expression du transgène, nous avons utilisé comme contrôles la lignée cellulaire MDA-MB231 qui exprime très faiblement le hPRLR (comme montré dans notre manuscrit soumis (Zhang, Cherifi et al) et la lignée MCF-7 qui l'exprime à un niveau relativement élevé, estimé à 7.000 molécules de PRLR/cellule (Bogorad et al., 2008).

Ainsi nous montrons que :

- l'ARN du PRLR ne s'exprime que suite à l'action de la Cre,
- l'ARN hPRLR est exprimé dans tous les tissus testés,
- le niveau d'expression du hPRLR est variable en fonction des tissus,
- que la glande mammaire des souris transgéniques (N4) exprime l'ARN codant pour hPRLR à un niveau comparable à celui obtenu pour les cellules MCF-7 (figure III.8). Des résultats équivalents ont été obtenus pour les souris exprimant les formes I146L et wt du hPRLR.

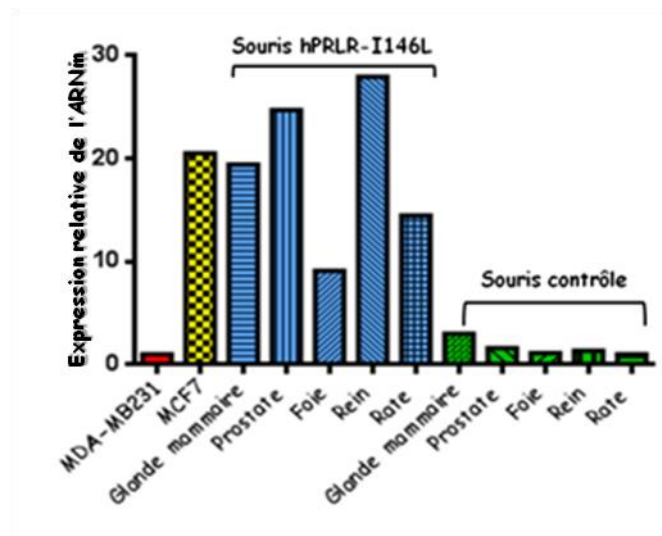


Figure III.8 : Détection de l'ARNm du transgène hPRLR-I14L dans différents organes de souris âgées de 3mois.

4.3 Expression de la protéine (immunoblot)

Nous avons ensuite recherché l'expression de la protéine hPRLR dans la glande mammaire des souris transgéniques (hPRLR-I146L et hPRLR-wt). De la même façon que pour rechercher l'expression des ARNm, nous avons pris comme contrôle positif d'expression protéique la lignée cellulaire MCF7 et comme contrôle négatif la lignée MDA-MB231; une souris sauvage a également servi de contrôle négatif afin de montrer que l'anticorps utilisé est bien spécifique de la protéine hPRLR et ne croise pas avec le récepteur de souris (mPRLR). Par Western blot, Figure III.9, nous détectons une bande migrant à ~89 kDa correspondant à la protéine hPRLR (détectée dans les cellules MCF-7 et non dans les cellules MDA-MB231) à la fois chez les souris portant les constructions des formes wt ou I146L du hPRLR. Cette bande n'est détectée qu'au stade de trace chez la souris contrôle C57BL/6 qui pourrait correspondre au récepteur endogène. Ainsi nous montrons que les souris portant la construction d'intérêt et exprimant la Cre présentent une expression protéique du hPRLR dans la glande mammaire. Cette mise en évidence de l'expression protéique du hPRLR a nécessité de nombreuses mises au point du fait du manque de spécificité des anticorps hPRLR disponibles comme le prouve la bande de faible intensité détectée pour l'échantillon de souris servant de contrôle négatif.

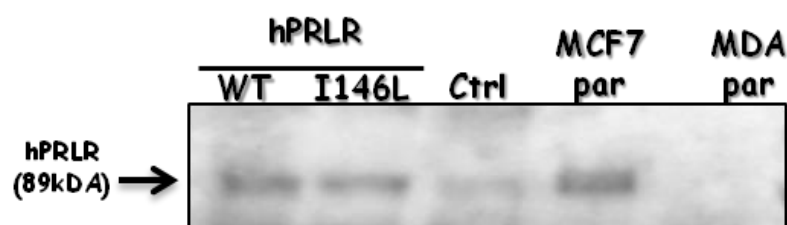


Figure III.9 : Expression de la protéine hPRLR dans la glande mammaire des souris transgéniques hPRLR-I146L et hPRLR-wt âgées de 12 mois (génération N4)

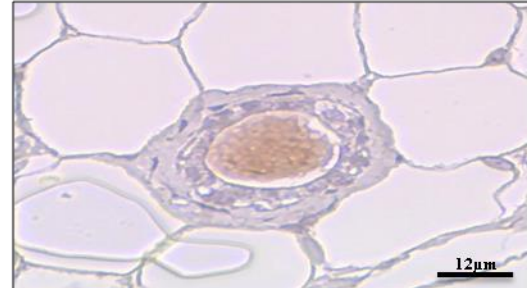
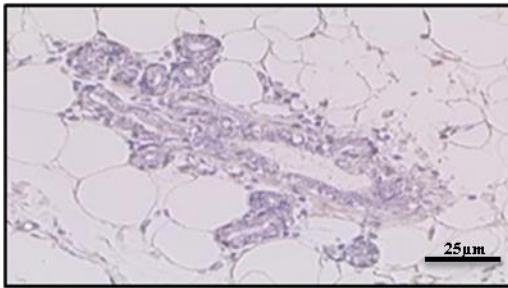
4.4 Mise en évidence et localisation de l'expression du hPRLR-I146L et wt par immunohistochimie

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence l'expression des protéines hPRLR-I146L et hPRLR-wt par immunohistochimie sur coupe de tissu mammaire. En effet, la glande mammaire étant constituée de plusieurs types cellulaires (adipocytes, cellules stromales et cellules épithéliales), cette technique devait nous permettre de visualiser leur expression dans chaque compartiment cellulaire. De même que pour le Western blot, nous avons pris comme contrôle

négatif une souris sauvage afin de tester la spécificité de l'anticorps utilisé vis-à-vis du hPRLR. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure III.10. Après avoir testé plusieurs anticorps commerciaux, nous avons choisi de travailler avec celui qui a été développé et qui nous a été donné par la firme Novartis. Après avoir vérifié que l'anticorps ne croisait pas avec le PRLR murin (Figure III.10A), nous avons pu mettre en évidence l'expression du hPRLR-I146L et du hPRLR-wt respectivement chez les souris transgéniques exprimant le hPRLR-I146L ou le hPRLR-wt (Figure III.10 B et C). Cependant, en fonction des souris et ce indépendamment de la construction (hPRLR-I146L ou hPRLR-wt), nous avons observé des différences de marquages. Certaines souris présentant un marquage plutôt épithélial (Figure III.10C), d'autres un marquage plutôt stromal (Figure III.10B) et enfin certaines présentant une expression adipocytaire (Figure III.10D gauche flèches noires). Nous avons aussi mis en évidence qu'au sein d'une même glande mammaire certains acini présentaient un marquage contrairement à d'autres (Figure III.10D droite flèche rouge versus noire). Ces résultats suggèrent donc un certain degré d'hétérogénéité d'expression du transgène hPRLR dans la glande mammaire entre souris transgéniques, mais aussi au sein de la même glande mammaire. Ceci pourrait refléter un mosaïcisme de transmission, d'expression ou d'action de la protéine Cre entre animaux et/ou au sein de la glande mammaire, et/ou un mosaïcisme d'expression du hPRLR à partir du promoteur PGK.

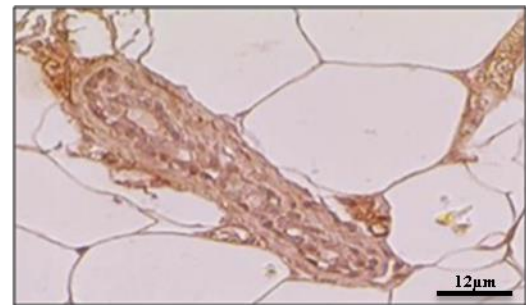
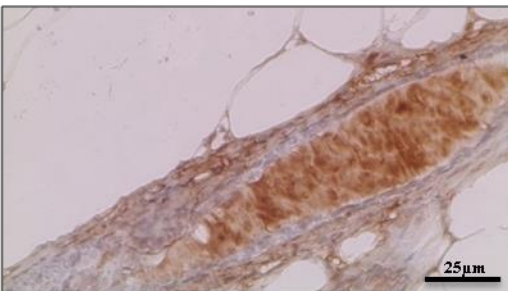
Souris CTRL (sauvage)

A



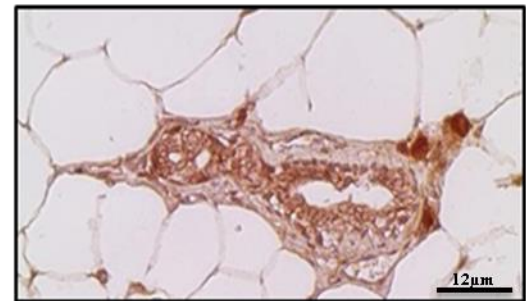
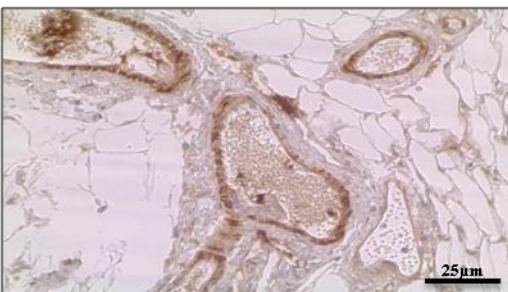
Souris hPRLR-WT

B



Souris hPRLR-I146L

C



D

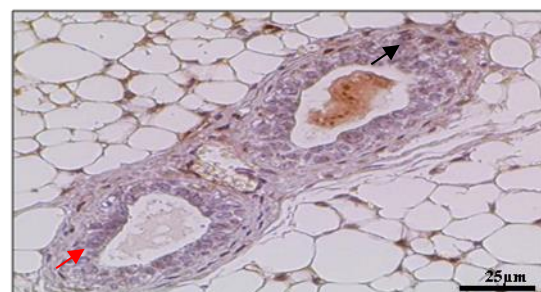
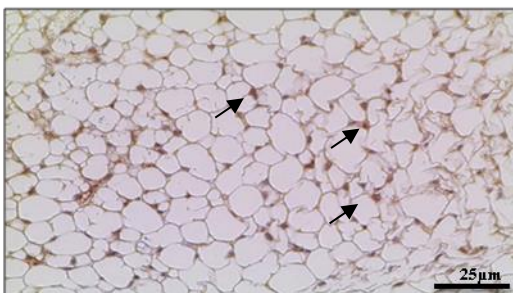


Figure III.10 : Détection du hPRLR-I146L et hPRLR-wt dans des glandes mammaires de souris de 12 mois. Ce marquage a été validé sur trois souris pour chaque génotype. (Images de gauche prises au x20 et celles de droite au x40, sauf pour la ligne D où c'est au x20)

4.5 Activation de la voie de signalisation PRL : mise en évidence de l'activation de Stat5

Le variant hPRLR-I146L présentant in vitro une activité constitutive conduisant à l'activation de Stat5, nous avons voulu tester celle-ci dans la glande mammaire de nos souris transgéniques exprimant le transgène I146L en prenant comme contrôle celles exprimant la forme wt du hPRLR. Les résultats obtenus par Western blot n'étant pas concluant (anticorps utilisé pas assez sensible et spécifique) nous avons utilisé la technique d'immunohistochimie sur coupe de tissu mammaire à l'aide d'un anticorps anti-phospho-Stat5 validé pour cette technique au laboratoire, comme l'atteste le marquage nucléaire obtenu sur coupe de glande mammaire de souris ayant reçu préalablement une injection de PRL (Figure III.11A). Ce marquage est spécifique puisqu'une souris contrôle non stimulée à la PRL et exprimant la forme sauvage du récepteur humain ne présente pas de marquage (Figure III.11). Nous avons ensuite recherché une activation de Stat5 dans les souris exprimant le PRLR-I146L. Nous avons analysé plus de 10 souris âgées de 3 à 12 mois, sans jamais constater de manière claire un marquage nucléaire (Figure III.11C).

Nos deux contrôles négatifs et positifs d'activation de Stat5 étant convaincants (Figure III.11.A et B), l'absence de marquage Stat5 phosphorylé dans la glande mammaire des souris exprimant le hPRLR-I146L, suggère que ce dernier n'a pas la capacité, in vivo, d'activer constitutivement cette voie de signalisation à des niveaux détectables. Ce résultat est en bon accord avec ceux obtenus in vitro, montrant l'activité constitutive submaximale du récepteur I146L (Bogorad et al., 2008).

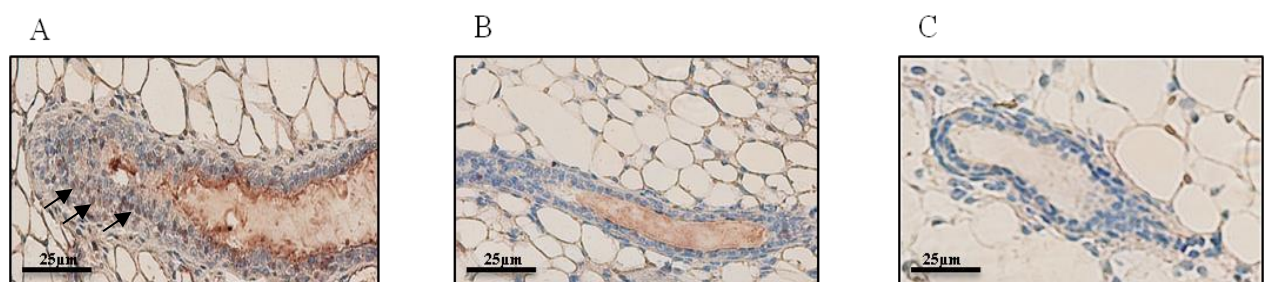


Figure III.11 : Détection de l'activation de Stat5 dans des glandes mammaires de souris de 12 mois exprimant le hPRLR-I146L (Images prises au x20). La figure III.11A, représente notre contrôle positif pour le marquage de pStat5 (glande mammaire d'une souris contrôle stimulée à la PRL humaine), la figure III.11B représente une souris contrôle non stimulée à la PRL et n'exprimant pas de hPRLR et la figure III.11C représente une souris exprimant le variant hPRLR-I146L.

5. Caractérisation phénotypique des souris

5.1 Analyse globale des souris transgéniques

Afin de déterminer si l'expression ubiquiste des hPRLR I146L et wt avait un impact sur le phénotype des souris, nous avons analysé différents paramètres chez les souris hPRLR-I146L/Cre et hPRLR-wt/Cre et les avons comparées à des souris n'exprimant pas la Cre et/ou à des souris sauvages. Par ailleurs nous nous sommes attachés à comparer plus précisément les souris hPRLR-I146L/Cre et les souris hPRLR-wt/Cre afin de définir d'éventuels phénotypes associés au variant I146L. En effet, la PRL de souris n'activant pas le PRLR humain (Utama et al., 2009), la comparaison des souris knock-in pour le hPRLR-I146L versus hPRLR-wt (génération N4) de ces deux souris permet d'identifier les phénotypes éventuels résultant spécifiquement de l'expression intrinsèque du récepteur muté et ainsi d'éviter tout phénotype qui résulterait uniquement d'un effet intrinsèque de la transgénèse.

Ainsi nous avons déterminé que l'expression du hPRLR variant ou sauvage n'affectait pas la viabilité des animaux, quel que soit le sexe. En effet, nous avons obtenu des naissances de femelles et de mâles dans des proportions mendéliennes classiques de manière reproductible.

Nous avons étudié la reproduction des animaux transgéniques à partir de croisements de i) souris mâles transgéniques et souris femelles sauvages, ii) souris femelles transgéniques et mâles sauvages, ou encore iii) souris mâles transgéniques et souris femelles transgéniques. Pour tous les types de croisements énumérés nous avons observé la naissance de portées en moyenne de ~8 animaux avec une répartition 50/50 entre mâles et femelles, équivalente à ce que nous obtenons dans notre animalerie pour des croisements entre animaux sauvages. Par ailleurs, nous n'avons pas détecté de défaut d'allaitement de la progénie des mères exprimant le hPRLR variant ou sauvage. Nous n'avons pas détecté de décès post-naissance dans une plus grande proportion que pour des animaux sauvages, ni de défaut de croissance significatif mesuré en analysant le poids des bébés tous les 3 jours de la naissance au sevrage (J21 post-naissance). L'ensemble de ces données nous permet de conclure que l'expression des transgènes hPRLR variant et sauvage n'affecte pas la reproduction, la viabilité embryonnaire et post-natale, ainsi que l'allaitement.

La PRL ayant aussi été décrite comme favorisant la croissance et la prolifération de certains tissus, pouvant même provoquer chez la souris l'apparition de lésions pré-cancéreuses (prostate) voire cancéreuses (glande mammaire), nous avons voulu savoir si l'expression du PRLR-I146L pouvait

provoquer de tels phénotypes dans les tissus où il est exprimé. Pour répondre à cette question nous avons analysé :

- le poids des animaux hPRLR I-146L, hPRLR-wt et sauvages
- le poids de différents organes afin de définir un ratio poids de l'organe/poids du corps (organes prélevés: glande mammaire, prostate, foie, rein, rate, muscle squelettique, pancréas, cerveau, intestin, poumon)
- l'histologie de ces organes à partir de coupes de tissus après coloration hémalum/éosine.

Pour chaque génotype, l'ensemble de ces paramètres a été déterminé pour des animaux âgés de 3 mois, 6 mois et 12 mois. Un exemple des résultats obtenus pour les animaux de 12 mois sont présentés dans le tableau ci-dessus (tableau III.2). L'analyse des résultats montre que l'expression du variant I146L du hPRLR, comparée à celle du hPRLR-wt, n'a pas d'incidence ni sur le poids des animaux de 12 mois ni sur le ratio poids de l'organe/poids total et cela, quel que soit l'organe analysé au même âge. Les analyses faites sur les animaux plus jeunes de 3 et 6 mois (non présentés) donnent les mêmes résultats. Ainsi, nous pouvons conclure que l'expression du variant I146L ne provoque pas d'hyperplasie des différents organes analysés.

Génotype	Age	Poids organe [gr]	Poids GM [gr]	Poids Foie [gr]	Poids Rein [gr]	Poids Rate [gr]	poids Cœur [gr]	Poids Poumon [gr]
I146L/Crè	12 mois	40,61	0,57	1,53	0,17	0,1	0,19	0,18
		(pO/ps)*100	1,41	3,76	0,41	0,3	0,47	0,45
wt/Crè	12 mois	33	0,39	1,33	0,13	0,1	0,15	0,16
		(pO/ps)*100	1,18	4,04	0,39	0,2	0,46	0,47
CTRL	12 mois	37,74	0,42	1,72	0,14	0,1	0,18	0,16
		(pO/ps)*100	1,12	4,57	0,36	0,3	0,47	0,43

Tableau III.2 : Poids de souris et des différents organes prélevés ainsi que le ratio poids de l'organe/poids du corps (organes prélevés: glande mammaire, foie, rein, rate, cœur, poumon)

L'analyse histologique des différents tissus prélevés a été réalisée avec la collaboration d'un anatomo-pathologiste. Cette analyse n'a pas mis en évidence une quelconque anomalie tissulaire (architecture, inflammation, nodule tumoral, fibrose, densité cellulaire, ...) chez les animaux exprimant le variant I146L par rapport aux animaux exprimant le hPRLR-wt ou aux animaux sauvages, et cela en étudiant des animaux âgés de 3, 6 et 12 mois. Je reviendrai plus en détail sur l'histologie de la glande mammaire dans le chapitre suivant traitant spécifiquement de ce tissu.

L'ensemble de cette analyse suggère donc que l'expression du PRLR-I146L n'a pas d'incidence sur la croissance, l'homéostasie de taille et la prolifération pour les tissus testés.

5.2 Analyse phénotypique de la glande mammaire

Suite à cette analyse globale des animaux, je me suis focalisée sur l'étude phénotypique de leur glande mammaire. Comme nous l'avons déjà mentionné, les femelles exprimant le hPRL-I146L ne présentent pas de défaut d'allaitement ; l'absence de défaut fonctionnel de la glande suggère donc que le hPRLR variant n'affecte pas de manière notable la différenciation alvéolaire lors de la gestation et la lactopoïèse au cours de l'allaitement. De même, les femelles exprimant le variant hPRLR-I146L peuvent avoir plusieurs gestations et allaiter leurs progénitures successives avec le même succès que des femelles exprimant le hPRLR-wt ou des femelles sauvages (suivi sur 3 cycles gestation-mise bas-allaitement), suggérant ainsi que l'expression du variant I146L n'affecte pas non plus la phase d'involution de la glande mammaire suite au sevrage des petits. Nous avons donc focalisé notre étude sur l'impact que pourrait avoir l'expression du variant I146L sur le développement et l'homéostasie de la glande mammaire chez la femelle vierge.

Pour effectuer les analyses nous avons généré des groupes de souris femelles vierges issues de la génération N4 et les avons analysées à 3 âges différents (3 mois, 6 mois et 12 mois; $n \geq 5$ par groupe et par génotype).

L'analyse histologique de la glande mammaire et les immunohistochimies ou immunofluorescences ont été systématiquement faites sur la glande mammaire droite (#4) tandis que l'analyse du tissu entier monté (whole mount) a été systématiquement réalisée sur la glande mammaire symétrique.

5.3 Analyse histologique de la glande mammaire

5.3.1 Whole mounts

L'analyse des 'whole mounts' de glandes mammaires issues des souris hPRLR-I146L montrent que ces souris ne développent pas de tumeurs (Figure III.12). Ce résultat corrobore celui obtenu par analyse histologique sur coupe de tissu après coloration hémalum/éosine (Figure III.13). La coloration au rouge carmin des canalicules montre uniquement chez certaines femelles âgées de 12 mois exprimant le variant I146L (3/7) de manière qualitative un branchement canaliculaire moins dense (Figure III.12C gauche) que chez les souris exprimant la forme sauvage du récepteur humain ou chez les souris sauvages. Ce phénotype n'est pas retrouvé chez des animaux plus

jeunes suggérant que l'expression du variant I146L pourrait provoquer une atrophie précoce de la glande mammaire chez la femelle vierge. L'involution de la glande mammaire liée à l'âge est un processus évoqué dans la littérature (Radisky et al., 2009), toutefois la très faible bibliographie sur ce sujet notamment chez la souris ne nous a pas permis d'étayer plus notre analyse de ce phénomène. La pénétrance incomplète de ce phénotype pourrait quant à elle être la conséquence de la différence d'expression du variant I146L dans la glande mammaire que nous avons pu mettre en évidence par immunohistochimie entre animaux et même au sein d'une même glande chez un animal.

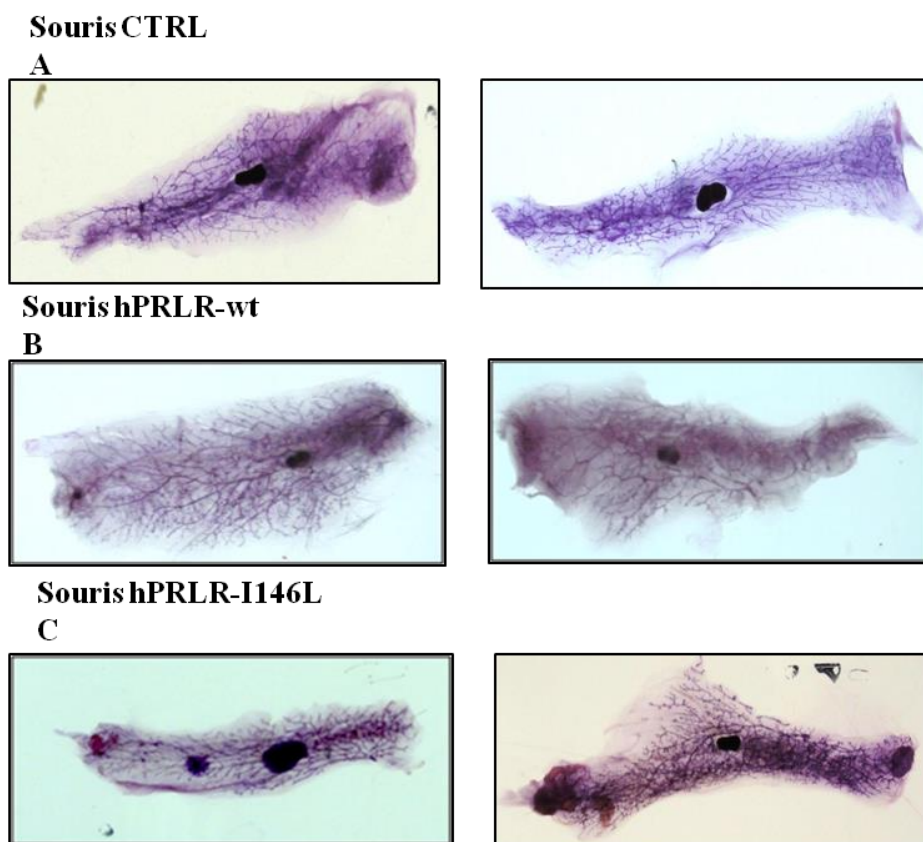
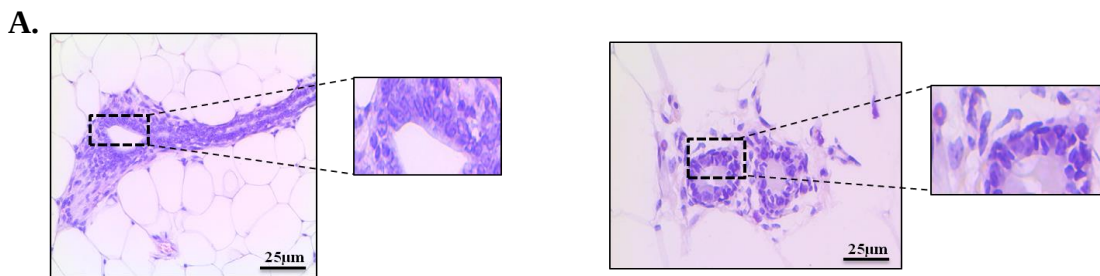


Figure III.12: Whole mount de glandes mammaires de souris de 12mois
(Souris contrôles, hPRLR-wt et hPRLR-I146L)

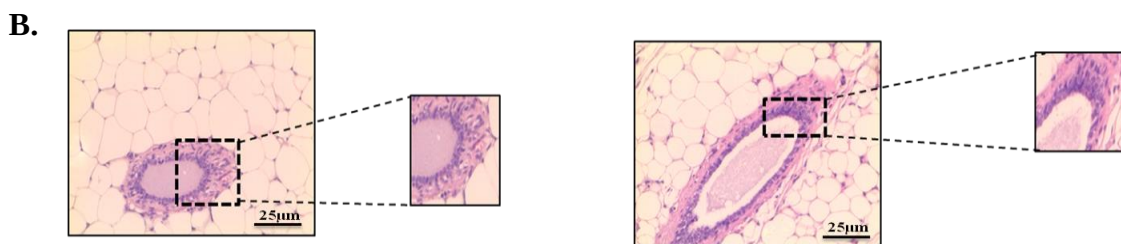
5.3.2 Coupes histologiques

L'analyse histologique qualitative suggère, quant à elle, que chez certaines femelles exprimant le hPRLR-I146L (4/6) la bicouche épithéliale mammaire serait moins développée, ce qui se traduit par une bicouche cellulaire discontinue et moins épaisse que chez les souris contrôles (Figure II.13). Ces observations n'ont été observées que chez les souris âgées de 12 mois, mais cette 'atrophie' épithéliale n'a pas systématiquement été observée chez les animaux présentant un défaut de 'branching' de la glande (analyse whole mount) décrit précédemment. L'hétérogénéité observée entre animaux exprimant le hPRLR-I146L peut avoir les mêmes causes que celle observée pour le défaut de branchement canaliculaire. Nous avons fait les mêmes observations à partir de souris de générations N5 et N6, suggérant que le fond génétique n'intervient pas ou peu dans ces différences phénotypiques.

Souris CTRL



Souris hPRLR-wt



Souris hPRLR-I146L

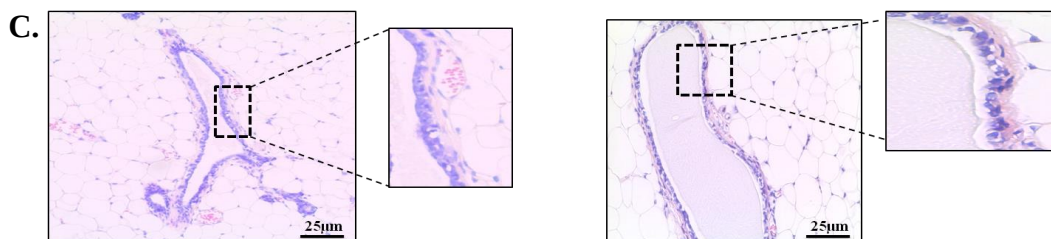


Figure III.13 : Analyse histologique de l'épithélium mammaire de souris de 12 mois

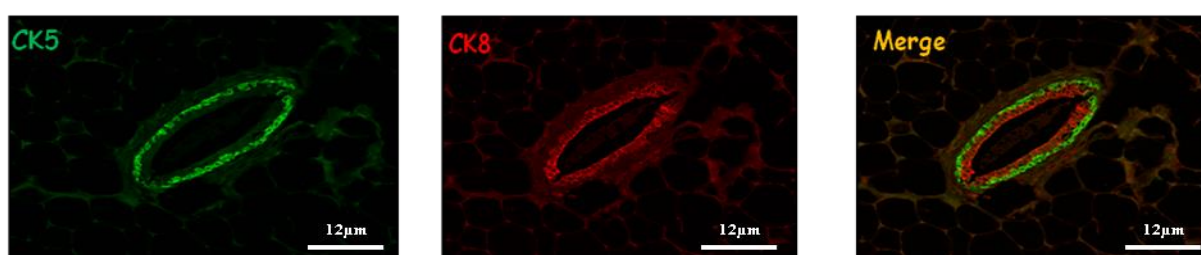
(Images prises au x20)

5.3.3 Immunofluorescence

Suite à l'observation d'une bicouche épithéliale présentant des caractéristiques 'anormales' chez certains animaux exprimant le hPRLR-I146L de 12 mois, nous avons voulu caractériser plus finement l'épithélium des alvéoles mammaires de ces souris. Pour cela nous avons effectué un co-marquage de la cytokératine 5 (CK5), exprimée spécifiquement par les cellules basales ou myoépithéliales, et de la cytokératine 8 (CK8) exprimée spécifiquement par les cellules luminales de la glande mammaire (Figure III.14). Cette figure montre un exemple représentatif des résultats obtenus. Pour certaines souris exprimant le hPRLR-I146L, nous avons observé un marquage membranaire CK5 intense et homogène révélant la présence d'une couche continue de cellules myoépithéliales pour toutes les alvéoles de glandes mammaires analysées (marquage équivalent à celui obtenu pour les souris contrôles exprimant le hPRLR-WT ou pour les souris sauvages, du même âge). Par contre, nous avons observé spécifiquement pour certaines alvéoles (7/9) chez certaines souris exprimant le hPRLR-I146L (2/5) un marquage CK8 membranaire discontinu et de faible intensité. Ce défaut de marquage n'a jamais été retrouvé chez les souris servant de contrôle. Ce résultat suggère que l'expression du hPRLR-I146L pourrait interférer avec la différenciation des cellules luminales, puisque l'expression de la cytokératine 8, marqueur de différenciation typique de ces cellules, semble altérée.

Souris CTRL

A



Souris hPRLR-I146L

B

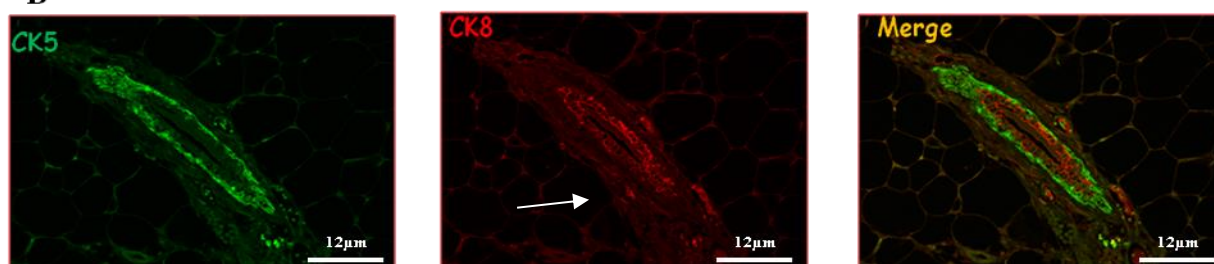


Figure III.14 : Caractérisation de la glande mammaire par immunofluorescence. Marquage CK5 et CK8 sur glandes mammaires de souris contrôle et hPRLR-I146L de 12 mois (Images prises au x40)

DISCUSSIONS
ET
PERSPECTIVES

Ce projet de thèse a été initié dans la foulée d'un travail mené par notre laboratoire en étroite collaboration avec le Service d'Endocrinologie adulte de la Pitié Salpêtrière, qui avait permis d'identifier dans une étude clinique le hPRLR-I146L comme étant le premier variant fonctionnel naturel du PRLR (Bogorad et al., 2008). Cette étude clinique menée sur 95 patientes présentant une polyadénomatose mammaire (PAM) et 200 sujets contrôles avait montré que le variant I146L était retrouvé chez quatre patientes versus aucun contrôle ($p < 0,05$), suggérant une association possible avec la pathologie. Cette association possible était d'autant plus suggérée par le fait que des études cellulaires avaient pu montrer que le PRLR-I146L possédait une activité constitutive, indépendante de la PRL. Néanmoins, la relation de causalité n'était nullement établie, d'autant que l'activité de ce récepteur variant était sub-maximale. Dans ce contexte, nous avons donc essayé de répondre à la question du rôle potentiel de la signalisation constitutive induite par un récepteur muté dans la physiopathologie mammaire. Nous avons utilisé deux modèles expérimentaux : l'un est un modèle animal knock-in qui devait nous permettre d'évaluer l'effet du PRLR-I146L sur une glande mammaire saine ; l'autre consistait à l'introduire dans des cellules cancéreuses mammaires en culture afin de voir son effet dans un contexte tumoral avéré.

I. Développement du modèle animal

Dans le but d'essayer de comprendre quel pourrait être l'impact d'une signalisation constitutive du récepteur à la prolactine dans le développement mammaire, nous avons généré en collaboration avec la plateforme de recombinaison homologue de Cochin deux modèles de souris Knock-In conditionnel pour le PRLR humain. Ces deux modèles sont des souris transgéniques pour le variant hPRLR-I146L et celles transgéniques pour le hPRLR-wt, ces dernières nous ayant servi de contrôle pour les souris hPRLR-I146L, pour s'assurer que les phénotypes potentiellement obtenus sont bien dus à l'expression intrinsèque du variant hPRLR-I146L et non à la transgénése elle-même.

La génération de ce modèle knock-in a nécessité plusieurs choix stratégiques en amont, qui ont été faits après de nombreuses discussions avec les scientifiques de la plateforme de recombinaison homologue. Nous avons d'abord choisi le promoteur PGK pour diriger l'expression de notre transgène hPRLR après excision de la cassette LacZ. Le choix de ce promoteur a été dicté par deux objectifs. D'une part, il existe assez peu de données sur les éléments de réponse du promoteur du PRLR humain (Hu et al., 2002) donc choisir un fragment de ce promoteur physiologique comme promoteur de notre séquence transgénique (ce qui était notre première intention) aurait été

risqué vu que nous n'avions pas de recul sur son efficacité réelle dans l'absolu, de surcroît *in vivo*. D'autre part, nous souhaitions éviter d'avoir une expression supra-physiologique du transgène comme c'est souvent le cas avec certains promoteurs viraux tel que le promoteur CMV, ce qui aurait pu fausser l'interprétation de l'impact réel du PRLR-I146L sur la physiopathologie de nos souris. Dans ce contexte, le promoteur ubiquitaire PGK s'est avéré un choix *a priori* raisonnable, confirmé par l'analyse des niveaux d'expression du transgène dans la glande mammaire suggérant des niveaux similaires à ceux retrouvés dans une lignée tumorale mammaire luminaire (MCF-7). Enfin, ce promoteur PGK permettait une expression du transgène virtuellement dans tous les tissus (dont la glande mammaire), en bon accord avec la distribution physiologique du PRLR dans l'organisme (Bogorad et al., 2008). Nous avons ensuite dû faire le choix de la souris Cre qui allait permettre l'excision du gène rapporteur LacZ, et donc déterminer les tissus dans lesquels notre transgène d'intérêt serait potentiellement exprimé. Ce projet de thèse étant focalisé sur la glande mammaire, notre choix aurait pu se porter sur des souris dont l'expression de la Cre recombinase est contrôlée par un promoteur d'expression mammaire, tels que β -lactoglobuline (BLG-Cre) (Selbert et al., 1998), WAP (Wagner KU et al., 1997) ou encore mouse mammary tumor virus (MMTV-Cre) (Wagner et al., 1997 ; Wagner et al., 2001). Ces modèles présentent néanmoins certains inconvénients. En effet, les promoteurs issus de gènes codant pour des protéines du lait sont activés en mi-/fin de gestation et lactation (Wagner KU et al., 1997 ; Selbert et al., 1998 ; Manhes et al., 2006); l'impact fonctionnel des transgènes n'est donc pas analysable en dehors de cette fenêtre physiologique spécifique. Par ailleurs, le promoteur MMTV est loin d'être spécifique à la glande mammaire, en effet il permet une expression dans d'autres tissus tel que les glandes salivaires, les vésicules séminales et la peau (Hennighausen et al., 1995), ce qui rend cette souris MMTV-Cre parfois difficile à utiliser. Dans la mesure où l'expression du PRLR-I146L chez les patients est supposée être similaire à celle du récepteur sauvage, à savoir présente dans une grande diversité de tissus, le choix stratégique du Laboratoire s'est porté sur la souris PGK-Cre (Lallemand et al 1998). Au-delà de se rapprocher du large pattern d'expression physiologique du PRLR, le choix de ce promoteur ubiquiste présentait un avantage "économique" pour le Laboratoire puisque nous allions pouvoir avoir une première idée de l'impact systémique du PRLR-I146L en réalisant l'analyse phénotypique de plusieurs tissus-cibles de la PRL sur une seule et même lignée de souris transgénique. La particularité de cette souris PGK-Cre est que l'enzyme Cre-recombinase agit au stade deux cellules. En effet, lorsqu'elle est portée par une souris femelle, elle a une transmission germinale, ce qui nous a permis de nous débarrasser du gène Cre-recombinase pour les autres croisements étant donné que l'excision du gène rapporteur LacZ aura été effectuée à un stade très précoce de l'embryogénèse (voir Tableau III.3 dans les Résultats).

Après avoir généré les souris qui expriment nos transgènes d'intérêt (hPRLR-I146L et hPRLR-wt), nous avons pu générer le nombre d'animaux suffisant pour chaque âge et chaque génotype en vue des analyses phénotypiques ; il est à noter que cette étape nous a pris beaucoup de temps vu le nombre de croisements que nous avons dû effectuer pour obtenir les souris débarrassées des transgènes FLP et Cre-recombinase (voir Tableau III.3 dans la section Résultats). Afin de valider notre modèle de souris transgéniques, nous avons d'abord voulu mettre en évidence l'expression du transgène hPRLR (I146L et wt) par immunoblot et en immunohistochimie. Nous avons rencontré quelques problèmes avec l'anticorps utilisé en routine au Laboratoire (Prolactin Receptor (ECD) Mouse Monoclonal Antibody, clone 1A2B1, Zymed-Invitrogen). Dans une étude récente portant sur des échantillons normaux et tumoraux de glande mammaire humaine, cet anticorps a été décrit comme étant le plus spécifique pour détecter le hPRLR par rapport à plusieurs autres anticorps commerciaux reconnaissant en plus, voire exclusivement, d'autres protéines que le hPRLR. Même s'il ne génère pas de bruit de fond, l'anticorps Zymed présente cependant une faible affinité pour le hPRLR, conduisant à des niveaux de marquage assez faibles en immunohistochimie, en effet, une étude utilisant l'anticorps Zymed en immunohistochimie a montré que sur 160 adénocarcinomes mammaires seul quatre ont été détectés positifs pour l'expression du hPRLR (Galsgaard et al., 2009). Nous avons donc décidé d'utiliser un autre anticorps fourni par Novartis dans le cadre de leur programme de développement d'anticorps thérapeutiques (Damiano et al., 2013). Cet anticorps validé en interne par l'équipe de Damiano nous a permis de mettre en évidence l'expression du hPRLR dans la glande mammaire de nos souris transgéniques. Néanmoins, nos résultats indiquent qu'il existe des différences d'expression du transgène entre souris transgéniques, mais aussi un mosaïcisme au sein d'un même tissu, voire d'un type cellulaire au sein d'une même glande. Ce mosaïcisme pourrait rendre compte de la pénétrance incomplète des phénotypes histologiques de la glande mammaire observés chez la souris exprimant le hPRLR-I146L.

Après la validation de l'expression du récepteur hPRLR (I146L et wt) chez la souris, nous avons voulu mettre en évidence l'activation constitutive du variant hPRLR-I146L en détectant la phosphorylation de Stat5 dans la glande mammaire des souris exprimant le variant hPRLR-I146L par immunohistochimie. Nous n'avons pas pu mettre en évidence clairement cette activation de Stat5, ceci est probablement dû à une activation qui est sous le seuil de détection et donc qui ne peut pas être mise en évidence par l'anticorps anti-Stat5 (Phospho-Stat5 (Tyr694) (C11C5) Rabbit mAb) utilisé en routine au laboratoire. Cette observation ouvre évidemment beaucoup de questions dans la mesure où nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que la signalisation en aval

du PRLR est activée dans les souris exprimant le hPRLR-I146L, notamment dans la glande mammaire. Nous y reviendrons plus loin.

L'analyse phénotypique globale de nos souris n'a pas révélé d'altération systémique flagrante, aucune des caractéristiques fondamentales comme la durée de vie, la croissance ou encore la fertilité ne semblant altérée quel que soit le génotype. Par ailleurs, aucun des tissus étudiés (cœur, rein, rate, poumons, prostate) n'a révélé d'anomalie morphologique ou histologique reproductible. Nous avons diagnostiqué un hépatocarcinome chez une souris de 3 mois exprimant le hPRLR-I146L ; néanmoins, cette observation ponctuelle ne permet pas de conclure à une quelconque causalité du récepteur muté sur ce développement pathologique.

L'analyse des glandes mammaires des souris qui expriment le variant hPRLR-I146L nous a permis d'observer quelques phénotypes relativement mineurs, tels qu'une atrophie de la couche épithéliale mammaire, un 'branching' perturbé sur certaines glandes et une couche luminale moins marquée que dans les souris contrôles (sauvage et PRLR-wt). Cette atrophie progressive de l'épithélium mammaire a déjà été observée chez des souris âgées de 18 mois et pas avant (Radisky et al., 2009), or nous, nous avons détecté ce phénotype essentiellement chez des souris âgées de 12 mois sans qu'il y ait une pénétrance complète : nous supposons que cela pourrait être dû au mosaïcisme d'expression du transgène évoqué plus haut.

L'hétérogénéité d'expression tissulaire du hPRLR (wt et I146L) rend d'autant plus difficile l'interprétation des résultats obtenus que ceux-ci ne sont que des modifications mineures de l'histologie de la glande mammaire. De plus, nous avons émis l'hypothèse que ce manque de phénotypes flagrants pouvait aussi être dû au niveau d'activité intrinsèque insuffisant du variant hPRLR-I146L dans le tissu mammaire (ainsi que sur les autres tissus étudiés). Afin de magnifier ces modifications histologiques, nous avons croisé entre eux des animaux hétérozygotes pour le hPRLR-I146L (et avons fait de même avec les animaux exprimant le récepteur humain sauvage) afin de générer des souris homozygotes pour le transgène, et ce afin que le transgène soit exprimé en plus grande quantité que chez les animaux hétérozygotes. Ces expériences sont toujours en cours afin de confirmer nos observations préliminaires. Néanmoins, après sélection des premières femelles homozygotes pour le hPRLR-I146L, nous n'avons pu mettre en évidence une aggravation des phénotypes histologiques mammaires observés chez les animaux hétérozygotes du même âge.

Comme décrit dans l'Introduction, d'autres modèles de souris présentant une sur-activation de la signalisation PRL systémique ou spécifiquement mammaire ont été décrits. Ceux-ci incluent la sur-expression de PRL endocrine (Wennbo et al., 1997) ou locale (Rose-Hellekant et al., 2003 ; Manhes et al., 2006) ou encore l'expression d'un PRLR muté gain-de-fonction (Gourdou et al., 1996). Ce dernier modèle est le plus proche du nôtre dans la mesure où il s'agit d'une activation "autonome" (indépendante du ligand). Il a été montré que les souris vierges qui expriment ce mutant tronqué de son domaine extracellulaire avaient un développement accéléré de leur glandes mammaires avec une augmentation du nombre de structures ductales et alvéolaires. Pendant la gestation, ces souris ont des structures ductales et alvéolaires plus développées que chez les souris contrôles, n'ont pas la capacité d'allaiter et l'involution de leurs glandes mammaires est perturbée. Aucun de ces phénotypes n'a été retrouvé dans notre modèle de souris knock-in pour le variant hPRLR-I146L, cela est probablement dû à l'activité constitutive de notre variant hPRLR-I146L qui est submaximale, or le PRLR muté gain-de-fonction généré et décrit par Gourdou et son équipe en 1996 montre une activité constitutive plus importante que celle de notre variant naturel. En effet ce mutant gain de fonction présente une activation plus élevée que celle obtenue lorsqu'il le hPRLR wt est stimulé avec de la PRL (Gourdou et al 1996). Cette différence de niveau d'activation peut expliquer pourquoi nous n'observons pas les mêmes phénotypes chez nos souris exprimant le hPRLR-I146L comparé à ce qui observé chez les souris exprimant le PRLR muté gain-de-fonction (Gourdou et al 2004).

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus montre que les souris transgéniques générées par knock-in dans le locus Rosa-26 expriment le récepteur hPRLR I146L ou WT dans l'ensemble des tissus testés, au niveau ARN et protéique. Ce modèle est donc très certainement un bon modèle murin pour étudier les effets réels du variant hPRLR-I146L. Pour autant, l'activité constitutive du récepteur variant n'a pu être mise en évidence par la recherche d'une activation de la phosphorylation de Stat5. Ceci suggère donc que soit cette activité constitutive observée in vitro n'est pas transposable au contexte in vivo chez la souris, soit elle est d'un niveau inférieur au seuil de détection de la méthode utilisée pour tenter de la mettre en évidence. La présence de phénotypes mammaires, même mineurs, dans les souris PRLR-I146L pencherait en faveur de la seconde hypothèse.

A l'avenir, il sera nécessaire pour mieux comprendre le rôle de l'expression du hPRLR-I146L dans notre modèle de souris d'effectuer des investigations plus poussées visant notamment à recouper les différentes observations histologiques que nous avons faites pour une même souris, voire une

même glande mammaire, voire un même acinus mammaire, dans le but de corrélér phénotype et expression du transgène, et ce afin de s'affranchir le plus possible du mosaïcisme d'expression du transgène. Le manque d'anticorps commercial fiable pour localiser clairement le hPRLR par immunohistochimie est un handicap certain pour atteindre un tel objectif. Par ailleurs, il sera intéressant de confirmer un rôle du variant hPRLR-I146L dans la physiologie des cellules luminales de la glande mammaire. Pour cela il pourra être envisagé de purifier ces cellules par tri pour étudier leur différenciation (analyse de différents marqueurs), leur taille et leur capacité proliférative. Au-delà de l'analyse plus poussée des souris actuellement disponibles, deux perspectives d'évolution du modèle peuvent être envisagées. D'une part, bien que les données cellulaires réalisées en HEK293 suggèrent que cette expression du récepteur humain n'interfère pas avec la signalisation de récepteur murin, il serait intéressant à l'avenir de croiser nos souris knock-in avec des souris PRLR-KO (Ormandy et al., 1997) afin d'avoir un modèle totalement humanisé pour le PRLR. D'autre part, même si les phénotypes potentiellement induits par le PRLR-I146L restent très mineurs, on ne peut pas écarter qu'il puisse, en collaboration avec certains oncogènes, participer aux processus de pathogenèse mammaire. Ceci est abordé dans le paragraphe suivant.

II. Rôle de la signalisation prolactine dans la tumorigenèse mammaire

La PRL a un rôle très important dans le développement de la glande mammaire et la lactation, comme le démontre les phénotypes de souris PRLR-KO dont le développement rudimentaire de la glande mammaire ne permet aucune lactation fonctionnelle (Kelly et al., 2002). Cela dit, l'implication de la signalisation PRL dans la tumorigenèse mammaire reste encore assez mal comprise, voire controversée.

Si on fait le récapitulatif de ce qui est décrit sur la littérature sur le sujet, il a été montré par certains auteurs que la PRL avait une activité proliférative sur diverses lignées cellulaires tumorales dérivant de cellules épithéliales de glande mammaire humaine ou de souris (Vonderhaar et al., 1999 ; Goffin et al., 1999 ; Llovera et al., 2000). Cette propriété implique diverses cascades de signalisation, dont la voie canonique Jak2/Stat5, ainsi que les voies MAPK ou Akt (Brockman et al., 2002 ; Llovera et al., 2000), une autre étude montre que lorsque la protéine Jak2 est activée de façon constitutive dans des cellules épithéliales mammaires de souris, cela augmente la signalisation de Stat5, augmente la prolifération et la résistance à la mort cellulaire (Caffarel et al., 2012).

In vivo, lorsque les souris déficientes pour la PRL (ou son récepteur) sont croisés avec des modèles de souris développant des tumeurs mammaires génétiquement induites, cela donne comme résultat une augmentation du délai d'apparition de ces tumeurs, suggérant un rôle promoteur de la signalisation du PRLR dans le développement tumoral (Vomachka et al., 2000 ; Oakes et al., 2007 ; Arendt et al., 2008). Les souris transgéniques exprimant le mutant Jak2 constitutivement activé augmentant ainsi la signalisation de Stat5, cela favorise l'alvéogenèse, durant la gestation et inhibe la regression post-lactation et de manière ultime, contribue à la tumorigenèse mammaire (Caffarel et al., 2012).

Il a été rapporté aussi que les souris transgéniques sur-exprimant la PRL de manière systémique développent spontanément des adénocarcinomes mammaires entre 11 et 15 mois (Wennbo et al., 1997). Ce phénotype a été retrouvé chez des souris surexprimant spécifiquement la PRL dans la glande mammaire (Rose-Hellekant et al., 2003).

Chez l'Homme l'implication de la PRL dans la tumorigenèse mammaire est beaucoup moins claire. L'association d'altérations génétiques (mutations, polymorphismes) de la PRL ou de son récepteur avec la pathologie a été étudiée au travers de quelques études relativement récentes. Certaines d'entre elles n'ont rien trouvé (Glasow et al., 2001), alors que d'autres ont proposé une association possible avec certains SNP (single nucleotide polymorphism) du gène PRLR, localisés majoritairement dans des régions non codantes (Vaclavicek et al., 2006 ; Lee et al., 2007 ; Mong et al., 2011). Aucune donnée fonctionnelle n'est cependant venue soutenir ces études d'association.

Les taux circulants de PRL sont aussi considérés comme étant un facteur de risque du cancer du sein (Hankinson et al., 1999). Menée dans le cadre de la Nurse Health Study (30.000 femmes), l'étude initiale portait sur 306 cas de cancer du sein diagnostiqués sur 5 années de suivi. Les auteurs ont proposé que les femmes présentant un taux de PRL dans le quartile supérieur de la normale ont un risque de développer un cancer du sein plus élevé comparé aux femmes avec un taux de PRL dans le quartile inférieur. Cette étude peut maintenant se reposer sur un suivi de 20 ans, qui a confirmé les premières observations même si l'ampleur du risque a été revue à la baisse (1.3 – 1.5) (Tworoger et al., 2013). Toutes ces études suggèrent donc que la PRL jouerait un rôle dans la progression tumorale mammaire.

Cependant, il existe une autre vision des choses. Diverses études montrent que dans la glande mammaire, les effets de la voie PRLR/Stat5 sur la prolifération/survie sont indissociables des effets sur la différenciation cellulaire (Hennighausen et al., 2008). En effet, Stat5 est un facteur de transcription qui va activer différents gènes, dont ceux codant pour les protéines du lait, marqueurs

de différenciation luminale par excellence. D'ailleurs, les souris Stat5A-KO et PRLR-KO présentent des phénotypes mammaires très similaires, soulignant le caractère indissociable de cette voie de signalisation.

Des travaux de recherche récents menés sur des lignées tumorales mammaires *in vitro* suggèrent que l'activation de Stat5 pourrait avoir un rôle dans le maintien des cellules dans un état différencié. En 2005 Sultan et al avaient suggéré que Stat5 est en réalité un facteur suppresseur de tumeurs mammaires de par son action inhibitrice de l'invasion et de la progression métastatique mise en évidence dans des modèles cellulaires. Il est suggéré que l'activation de la voie PRL/Stat5 empêcherait la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), phénomène induisant la dédifférenciation des cellules cancéreuses, favorisant ainsi leur capacité d'invasion (Sultan et al., 2008). La théorie qui suggère que la signalisation PRL/Jak2/Stat5 pourrait aussi avoir un rôle "protecteur" dans le cancer du sein a été démontrée par l'équipe de Suhad Ali. En effet, lorsque cette voie est activée dans une lignée de cellules tumorales mammaires peu différenciées présentant un phénotype mésenchymateux (MDA-MB231), elle exerce un rôle de suppresseur d'invasion en stimulant la différenciation cellulaire (Nouhi et al., 2006 ; Sultan et al., 2008). Une autre expérience, qui cette fois-ci est réalisée sur des cellules tumorales mammaires différenciées (T47D) montre que l'inhibition de la PRL autocrine dans ces cellules a conduit à un phénotype plus mésenchymateux et une augmentation des propriétés d'invasion (Nouhi et al., 2006). L'hypothèse émise ici est donc que dans le cancer du sein, la PRL jouerait le rôle suppresseur d'invasion et de métastases. Cette hypothèse est en corrélation avec des observations faites chez l'Homme. L'activation de Stat5 a été proposée comme un facteur de bon pronostique chez des patients ayant un cancer du sein (Peck et al., 2011). Au vu de toutes ces informations, il semblerait que l'implication de la PRL dans la tumorigénèse mammaire diffère selon le stade de développement du cancer mammaire.

Il est intéressant de confronter nos propres résultats à cette dualité fonctionnelle de la voie PRL/Stat5 nouvellement suggérée dans la Littérature. Dans nos modèles cellulaires décrits dans le manuscrit (Zhang, Cherifi et al en révision), nous avons choisi d'utiliser deux lignées de cellules tumorales mammaires humaines très différentes. La lignée MCF-7 est bien différenciée, et la lignée MDA-MB231, à l'inverse, qui est très peu différenciée. Le principe de nos expériences a été d'exprimer un récepteur constitutif dans ces cellules et d'étudier ses éventuels effets sur leur état de différenciation, leur prolifération et leur caractère invasif. Comme nous l'avons indiqué plus haut l'activité du PRLR-I146L est clairement sub-maximale. Donc afin d'étudier spécifiquement les effets liés à l'activité constitutive intrinsèque d'un hPRLR muté, nous avons tiré parti d'un mutant

PRLR-I46D (isoleucine--> acide aspartique) qui a été généré par le laboratoire. Ce mutant qui présente la double particularité d'être constitutivement activés mais, au contraire du PRLR-I146L, de ne plus répondre à la PRL.

Nous avons généré des clones stables MCF7 et MDA-MB231 exprimant ce mutant I146D, malgré l'activité constitutive de ce mutant, nous n'avons pas eu d'effet ni sur la prolifération cellulaire, ni sur l'expression des marqueurs de l'EMT. Notre message est que le PRLR-I146D utilisé ici comme prototype de PRLR constitutivement actif n'a pas réussi à promouvoir la prolifération ou modifier le phénotype épithélial des cellules MCF-7 ni le phénotype mésenchymateux des MDA-MB231, contrairement à ce qui a été démontré dans la littérature et qui suggère que la signalisation intracellulaire déclenchée par la PRL permet de promouvoir l'adhésion cellulaire homotypique et d'inverser l'EMT (Nouhi et al, 2006; Sultan et al, 2005; Sultan et al, 2008). Nous pensons donc que l'absence d'effet prolifératif clair du à ce variant PRLR-I146D ne va pas en faveur d'un rôle sur la progression tumorale.

En conclusion, que ce soit dans le modèle animal exprimant le variant naturel PRLR-I146L, ou dans les modèles cellulaires exprimant le variant PRLR-I146D choisi pour son activité constitutive plus marquée que le PRLR-I146L, nous n'avons pas pu mettre en évidence un impact important de la signalisation constitutive du PRLR sur les cellules mammaires saines ou tumorales. Une chose apparaît clairement : le PRLR-I146L n'est pas un oncogène et est donc incapable, à lui seul de transformer une cellule mammaire. Comme évoqué plus haut, on ne peut pas écarter la possibilité qu'il coopère (ou interfère) dans certains contextes spécifiques avec des oncogènes et module ainsi le devenir de tumeurs mammaires. A ce propos, il est intéressant de mentionner l'étude clinique PROLACSEIN qui fut lancée dans la foulée des premiers résultats décrits à l'entame de cette Discussion. Cette étude clinique avait pour but i) de vérifier les résultats précédemment obtenus en augmentant le nombre de patientes PAM (n=71), ii) d'élargir la cohorte contrôle (n=525), et enfin iii) d'ajouter un bras "cancer" (n=115) à l'étude de prévalence du PRLR-I146L. Cette étude non encore publiée se termine et a permis d'atteindre les conclusions suivantes : i) l'allèle I146L a été cette fois retrouvé dans la population contrôle, et ii) sa prévalence n'est pas significativement différente entre les trois cohortes, même s'il y a une tendance à le retrouver moins fréquemment dans le bras cancer (~3%) et plus fréquemment dans le bras PAM (~10%) en comparaison de la population contrôle (~6%). Ces données tendraient à confirmer l'absence de potentiel oncogénique du PRLR-I146L, tout en préservant un rôle potentiel dans le développement de la pathologie bénigne. Ces deux conclusions, certes encore fragiles, ne sont pas en désaccord avec nos résultats

expérimentaux ne montrant aucun phénotype malin dans les glandes mammaires de nos souris PRLR-I146L ni une plus grande agressivité des lignées tumorales exprimant le PRLR-I146D.

Comme perspectives, il serait donc intéressant de croiser les souris transgéniques PRLR-I146L avec des souris exprimant un oncogène fort tel que Wnt (Wong et al., 1994) ou WAP-TAg (Li et al., 2000) afin de voir si l'expression de ce variant hPRLR-I146L module d'une manière ou d'une autre les phénotypes tumoraux de la glande mammaire.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aksamitiene E, Achanta S, Kolch W, Kholodenko BN, Hoek JB, Kiyatkin A.** (2011). Prolactin-stimulated activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases is controlled by PI3-kinase/Rac/PAK signaling pathway in breast cancer cells. *Cell Signal.*:1794-805.
- Alexander WS, Hilton DJ.** (2004). The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol.*;22:503-29.
- Arendt LM, Schuler LA.** (2008). Transgenic models to study actions of prolactin in mammary neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1:29-40.
- Asselin-Labat ML1, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC, Hartley L, Robb L, Grosveld FG, van der Wees J, Lindeman GJ, Visvader JE.** (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol.* 2:201-9.
- Ben-Jonathan N1, Hnasko R.** (2001) .Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev.* 6:724-63.
- Bogorad RL, Courtillot C, Mestayer C, Bernichtein S, Harutyunyan L, Jomain JB, Bachelot A, Kuttenn F, Kelly PA, Goffin V, Touraine P; Benign Breast Diseases Study Group.** (2008) Identification of a gain-of-function mutation of the prolactin receptor in women with benign breast tumors. *Proc Natl Acad Sci* 38:14533-8.
- 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. *Endocr Rev.* 3:225-68.
- Boutin JM1, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA.** (1988).Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell.* 1:69-77.
- Boutin JM, Edery M, Shirota M, Jolicoeur C, Lesueur L, Ali S, Gould D, Djiane J, Kelly PA.** (1989). Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells.*Mol Endocrinol.* 9:1455-61.
- Brandebourg T, Hugo E, Ben-Jonathan N.** (2007). Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions. *Diabetes Obes Metab* 4:464-76.
- Briskin C, Park S, Vass T, Lydon JP, O'Malley BW, Weinberg RA.** (1998).A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Nat* 9:5076-81.
- Briskin C.** (2002). Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis.*J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1:39-48.
- Briskin C1, O'Malley B.** (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*12:a003178.
- Brockman JL, Schroeder MD, Schuler LA.** (2002). PRL activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/Stat pathway. *Mol Endocrinol.* 4:774-84.

Brown RJ, Adams JJ, Pelekanos RA, Wan Y, McKinstry WJ, Palethorpe K, Seeber RM, Monks TA, Eidne KA, Parker MW, Waters MJ. (2005). Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat Struct Mol Biol.*9:814-21.

Canbay E, Degerli N, Gulluoglu BM, Kaya H, Sen M, Bardakci F. (2004). Could prolactin receptor gene polymorphism play a role in pathogenesis of breast carcinoma? *Curr Med Res Opin.* 4:533-40.

Chen CC, Stairs DB, Boxer RB, Belka GK, Horseman ND, Alvarez JV, Chodosh LA. (2012). Autocrine prolactin induced by the Pten-Akt pathway is required for lactation initiation and provides a direct link between the Akt and Stat5 pathways. *Genes Dev.*19:2154-68

Chi Zhang, Ibtissem Cherifi, Mads Nygaard, Gitte W. Haxholm, Roman Bogorad, Marie Bernadet, Patrick England, Isabelle Broutin, Birthe B. Kragelund, Jacques-Emmanuel Guidotti, Vincent Goffin.(2014). Residue 146 Regulates Prolactin Receptor Folding, Basal Activity and Ligand-Responsiveness: Potential Implications in Breast Tumorigenesis "En révision pour *Molecular and Cellular Endocrinology*".

Clapp C, Aranda J, González C, Jeziorski MC, Martínez de la Escalera G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab.* 8:301-7.

Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. (2003). The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev.*1:1-27.

Clevenger CV. (2003). Role of prolactin/prolactin receptor signaling in human breast cancer. *Breast Dis.;* 18:75-86.

Cohen LE, Wondisford FE, Radovick S. (1996). Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 3:523-40.

Coss D, Kuo CB, Yang L, Ingleton P, Luben R, Walker AM. (1999). Dissociation of Janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 5 activation after treatment of Nb2 cells with a molecular mimic of phosphorylated prolactin. *Endocrinology.* 11:5087-94.

Courtillot C, Chakhtoura Z, Bogorad R, Genestie C, Bernichtein S, Badachi Y, Janaud G, Akakpo JP, Bachelot A, Kuttenn F, Goffin V, Touraine P; Benign Breast Diseases Study Group. (2010). Characterization of two constitutively active prolactin receptor variants in a cohort of 95 women with multiple breast fibroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1:271-9.

Couse JF1, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER alpha-knockout mouse. *Endocrinology.*4613-21.

Damiano JS, Rendahl KG, Karim C, Embry MG, Ghoddusi M, Holash J, Fanidi A, Abrams TJ, Abraham.(2013). Neutralization of prolactin receptor function by monoclonal antibody

LFA102, a novel potential therapeutic for the treatment of breast cancer. *Mol Cancer Ther.* Mar 3:295-305.

Eaton NE, Reeves GK, Appleby PN, Key TJ. (1999). Endogenous sex hormones and prostate cancer: a quantitative review of prospective studies. *Br J Cancer* 7:930-4.

Fata JE, Chaudhary V, Khokha R. (2001). Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle. *Biol Reprod.* 3:680-8.

Forus A, Sørli T, Børresen-Dale AL, Myklebost O. (2001). Microarray technology--potential in cancer research. *Tidsskr Nor Laegeforen*; 21:2498-503.

Gadina M, Hilton D, Johnston JA, Morinobu A, Lighvani A, Zhou YJ, Visconti R, O'Shea JJ. (2001). Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol.* 3:363-73.

Gala RR1, Rillema JA. (1995)..Evaluation of prolactin-like activity produced by concanavalin-A stimulated mouse splenocytes. *Life Sci.* 18:1683-700.

Galsgaard ED, Rasmussen BB, Folkesson CG, Rasmussen LM, Berchtold MW, Christensen L, Panina S. (2009). Re-evaluation of the prolactin receptor expression in human breast cancer. *J Endocrinol.* 1:115-28

Glasow A, Horn LC, Taymans SE, Stratakis CA, Kelly PA, Kohler U, Gillespie J, Vonderhaar BK, Bornstein SR. (2001). Mutational analysis of the PRL receptor gene in human breast tumors with differential PRL receptor protein expression *J Clin Endocrinol Metab.*8:3826-32.

Goffin V, Struman I, Mainfroid V, Kinet S, Martial JA. (1994). Evidence for a second receptor binding site on human prolactin. *J Biol Chem* 51:32598-606.

Goffin V, Kelly PA.(1996). Prolactin and growth hormone receptors. *Clin Endocrinol.*3:247-55.

Goffin V, Bouchard B, Ormandy CJ, Weimann E, Ferrag F, Touraine P, Bole-Feysot C, Maaskant RA, Clement-Lacroix P, Edery M, Binart N, Kelly PA.(1998). Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Ann N Y Acad Sci.*1;840:498-509.

Goffin V, Touraine P, Pichard C, Bernichtein S, Kelly PA. (1999).Should prolactin be reconsidered as a therapeutic target in human breast cancer? *Mol Cell Endocrinol.* 1-2:79-87.

Gourdou I, Gabou L, Paly J, Kermabon AY, Belair L, Djiane J. (1996). Development of a constitutively active mutant form of the prolactin receptor, a member of the cytokine receptor family. *Mol Endocrinol.* 1:45-56.

Gourdou I, Paly J, Hue-Beauvais C, Pessemesse L, Clark J, Djiane J. (2004). Expression by transgenesis of a constitutively active mutant form of the prolactin receptor induces premature abnormal development of the mouse mammary gland and lactation failure. *Biol Reprod.*3:718-28.

Hankinson, S. E., et al. (1999). Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *J.Natl.Cancer Inst.*7: 629-34.

Hennighausen L, Wall RJ, Tillmann U, Li M, Furth PA.(1995). Conditional gene expression in secretory tissues and skin of transgenic mice using the MMTV-LTR and the tetracycline responsive system. *J Cell Biochem.*4:463-72.

Hennighausen L, Robinson GW. (2001). Signaling pathways in mammary gland development. *Dev Cell.*4:467-75.

Hennighausen, L. and G. W. Robinson. (2008). Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes Dev.* 22.6: 711-21.

Horseman ND, Yu-Lee LY.(1994).Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocr Rev.* 5:627-49.

Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K. (1997). Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J.*23:6926-35.

Hu Y1, Russo I, Ao X, Russo J. (1997). Mammary-derived growth inhibitor (MDGI) cloned from human breast epithelial cells is expressed in fully differentiated lobular structures. *Int J Oncol.*1:5-11.

Ihle JN. (1996). STATs and MAPKs: obligate or opportunistic partners in signaling. *Bioessays.* 2:95-8.

Kelly PA, Bachelot A, Kedzia C, Hennighausen L, Ormandy CJ, Kopchick JJ, Binart N. (2002). The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development. *Mol Cell Endocrinol* 1-2:127-31.

Kinzler KW, Vogelstein B. (1997). Cancer-susceptibility genes, gatekeepers and caretakers. *Nature.*6627:761, 763.

Krege JH1, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O.(1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl .*26:15677-82.

Leav I, Merk FB, Lee KF, Loda M, Mandoki M, McNeal JE, Ho SM. (1999). Prolactin receptor expression in the developing human prostate and in hyperplastic, dysplastic, and neoplastic lesions. *Am J Pathol.* 3:863-70.

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 JAK2. *J Biol Chem.*19:14021-6.

Lee, S. A., et al. (2007). A comprehensive analysis of common genetic variation in prolactin (PRL) and PRL receptor (PRLR) genes in relation to plasma prolactin levels and breast cancer risk: the multiethnic cohort." *BMC.Med Genet.*8 : 72.

Li M, Lewis B, Capuco AV, Laucirica R, Furth PA. (2000). WAP-TAg transgenic mice and the study of dysregulated cell survival, proliferation, and mutation during breast carcinogenesis. *Oncogene.* 8:1010-9

Lindeman GJ, Wittlin S, Lada H, Naylor MJ, Santamaria M, Zhang JG, Starr R, Hilton DJ, Alexander WS, Ormandy CJ, Visvader J.(2001). SOCS1 deficiency results in accelerated mammary gland development and rescues lactation in prolactin receptor-deficient mice. *Genes Dev.*13:1631-6.

Llovera M, Touraine P, Kelly PA, Goffin V. (2000). Involvement of prolactin in breast cancer: redefining the molecular targets. *Exp Gerontol.*1:41-51.

Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.*18:2266-78.

Lyons WR. (1958). Hormonal synergism in mammary growth.*Proc RSoc Lond B Biol Sci* 149:303-25.

Mallepell S1, Krust A, Chambon P, Briskin C. (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Nat* 2196-201.

Manhès C1, Kayser C, Bertheau P, Kelder B, Kopchick JJ, Kelly PA, Touraine P, Goffin V. (2006). Local over-expression of prolactin in differentiating mouse mammary gland induces functional defects and benign lesions, but no carcinoma. *J Endocrinol.* 2:271-85.

Mao X, Fujiwara Y,Orkin SH.(1999). Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 9:5037-42.

McManaman JL, Palmer CA, Anderson S, Schwertfeger K, Neville MC. (2004). Regulation of milk lipid formation and secretion in the mouse mammary gland. *Adv Exp Med Biol.* 554:263-79.

Médecine Thérapeutique Endocrinologie & Reproduction, Volume 2, numéro 4, Juillet -Août 2000.

Mong FY, Kuo YL, Liu CW, Liu WS, Chang LC. (2011). Association of gene polymorphisms in prolactin and its receptor with breast cancer risk in Taiwanese women. *Mol Biol Rep.*7:4629-36.

Nagasawa H, Yanai R. (1977). Mammary growth and function and pituitary prolactin secretion in female nude mice *Acta Endocrinol.*4:794-802

- Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Nurmi M, Martikainen PM, Harkonen PL.** (1997). Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J Clin Invest.*
- Newey PJ, Gorvin CM, Cleland SJ, Willberg CB, Bridge M, Azharuddin M, Drummond RS, van der Merwe PA, Klenerman P, Bountra C, Thakker RV.** (2013). Mutant prolactin receptor and familial hyperprolactinemia. *N Engl J Med.*21:2012-20.
- Nicola NA, Nicholson SE, Metcalf D, Zhang JG, Baca M, Farley A, Willson TA, Starr R, Alexander W, Hilton DJ.** (1999). Negative regulation of cytokine signaling by the SOCS proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*;64:397-404.
- Nicoll CS, Blair SM, Nichols CW Jr, Russell SM, Taylor M.** (1972). Prolactin and growth hormone levels in serum from cavernous sinus of rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 6:1087-90.
- Nouhi Z, Chughtai N, Hartley S, Cocolakis E, Lebrun JJ, Ali S.**(2006). Defining the role of prolactin as an invasion suppressor hormone in breast cancer cells. *Cancer Res.* 3:1824-32.
- Oakes SR, Robertson FG, Kench JG, Gardiner-Garden M, Wand MP, Green JE, Ormandy CJ, Binart N, Kelly PA.** (1997). Mammary gland development in prolactin receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.*4:355-64.
- Oakes SR, Robertson FG, Kench JG, Gardiner-Garden M, Wand MP, Green JE, Ormandy CJ.** (2007). Loss of mammary epithelial prolactin receptor delays tumor formation by reducing cell proliferation in low-grade preinvasive lesions. *Oncogene.*4:543-53. Epub 2006 Jul 24.
- Pezet A, Buteau H, Kelly PA, Ederly M.**(1997). The last proline of Box 1 is essential for association with JAK2 and functional activation of the prolactin receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2:199-208.
- Reis-Filho JS1, Simpson PT, Gale T, Lakhani SR.** (2005). The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization. *Pathol Res Pract.*11:713-25.
- Rose-Hellekant TA, Arendt LM, Schroeder MD, Gilchrist K, Sandgren EP, Schuler LA.** (2003). Prolactin induces ERalpha-positive and ERalpha-negative mammary cancer in transgenic mice. *Oncogene.*30:4664-74.
- Sakakura T1, Kusano I, Kusakabe M, Inaguma Y, Nishizuka Y.** (1987). **Biology of mammary fat pad in fetal mouse: capacity to support development of various fetal epithelia in vivo.** *Development.* 3:421-30.
- Selbert S, Bentley DJ, Melton DW, Rannie D, Lourenço P, Watson CJ, Clarke AR.** (1998). Efficient BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland. *Transgenic Res.*5:387-96.
- Sternlicht MD.**2006. **Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis.** *Breast Cancer Res.*1:201.

- Simpson K1, Coombs T, Avery A.** (2005). Introducing the health of the nation outcomes scales into undergraduate nurse preparation: opportunities for development - a pilot project. *Nurse Educ Pract.* 2:97-102.
- Soares MJ, Konno T, Alam SM.** (2007). The prolactin family: effectors of pregnancy-dependent adaptations. *Trends Endocrinol Metab.* 3:114-21.
- Soriano P.** (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* 1:70-1.
- Stattin P, Rinaldi S, Stenman UH, Riboli E, Hallmans G, Bergh A, Kaaks R.** (2001). Plasma prolactin and prostate cancer risk: A prospective study. *Int J Cancer.* 3:463-5.
- Svensson LA, Bondensgaard K, Nørskov-Lauritsen L, Christensen L, Becker P, Andersen MD, Maltesen MJ, Rand KD, Breinholt J.** (2008). Crystal structure of a prolactin receptor antagonist bound to the extracellular domain of the prolactin receptor. *J Biol Chem.* 27:19085-94.
- Sultan AS, Xie J, LeBaron MJ, Ealley EL, Nevalainen MT, Rui H.** (2005). Stat5 promotes homotypic adhesion and inhibits invasive characteristics of human breast cancer cells. *Oncogene.* 5:746-60.
- Sultan, A. S., H. Brim, and Z. A. Sherif.** (2008). Co-overexpression of Janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 5 promotes differentiation of mammary cancer cells through reversal of epithelial-mesenchymal transition." *Cancer Sci.* 2 : 272-79.
- Tallet E, Fernandez I, Zhang C, Salsac M, Gregor N, Ayoub MA, Pin JP, Trinquet E, Goffin V.** (2011). Investigation of prolactin receptor activation and blockade using time-resolved fluorescence resonance energy transfer. *Front Endocrinol.* 2:29. 10.3389.
- Teilum K, Hoch JC, Goffin V, Kinet S, Martial JA, Kragelund BB.** (2005). Solution structure of human prolactin. *J Mol Biol.* 4:810-23.
- Touraine, Goffin.** (2005). *Physiologie de la prolactine.* EMC 10-017-M-10
- Tworoger SS, Eliassen AH, Rosner B, Sluss P, Hankinson SE.** (2004). Plasma prolactin concentrations and risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer Res.* 18:6814-9.
- Tworoger SS, Eliassen AH, Sluss P, Hankinson SE.** (2007). A prospective study of plasma prolactin concentrations and risk of premenopausal and postmenopausal breast cancer. *J Clin Oncol.* 12:1482-8.
- Tworoger SS, Eliassen AH, Zhang X, Qian J, Sluss PM, Rosner BA, Hankinson SE.** (2013). A 20-year prospective study of plasma prolactin as a risk marker of breast cancer development. *Cancer Res.* 15:4810-9.
- Utama FE, LeBaron MJ, Neilson LM, Sultan AS, Parlow AF, Wagner KU, Rui H.** (2006). Human prolactin receptors are insensitive to mouse prolactin: implications for xenotransplant modeling of human breast cancer in mice. *J Endocrinol.* 3:589-601.

Utama FE, Tran TH, Ryder A, LeBaron MJ, Parlow AF, Rui H. (2009). Insensitivity of human prolactin receptors to nonhuman prolactins: relevance for experimental modeling of prolactin receptor-expressing human cells. *Endocrinology*. 4:1782-90.

Vaclavicek A, Hemminki K, Bartram CR, Wagner K, Wappenschmidt B, Meindl A, Schmutzler RK, Klaes R, Untch M, Burwinkel B, Försti A. (2006). Association of prolactin and its receptor gene regions with familial breast cancer. *Clin Endocrinol Metab*.4:1513-9

Van Amerongen R, Bowman AN, Nusse R. (2012). Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/ β -catenin-responsive stem cells in the mammary gland. *Cell Stem* .05.023.

Vomachka AJ, Pratt SL, Lockefer JA, Horseman ND. (2000). Prolactin gene-disruption arrests mammary gland development and retards T-antigen-induced tumor growth. *Oncogene*.8:1077-84.

Vonderhaar BK. (1999). Prolactin involvement in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*.3:389-404.

Visvader JE. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev*.1849509.

Wagner KU, Wall RJ, St-Onge L, Gruss P, Wynshaw-Boris A, Garrett L, Li M, Furth PA, Hennighausen L.(1997). Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res*. 21:4323-30.

Wagner KU, McAllister K, Ward T, Davis B, Wiseman R, Hennighausen L. (2001). Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice. *Transgenic Res*.6:545-53.

Walton KD, Wagner KU, Rucker EB, Shillingford JM, Miyoshi K, Hennighausen L.(2001). Conditional deletion of the bcl-x gene from mouse mammary epithelium results in accelerated apoptosis during involution but does not compromise cell function during lactation. *Mech Dev* 2:281-93.

Waters MJ, Brooks AJ. (2011). Growth hormone receptor: structure function relationships. *Horm Res Paediatr*.1:12-6.

Waters MJ, Brooks AJ, Chhabra Y. (2014). A new mechanism for growth hormone receptor activation of JAK2, and implications for related cytokine receptors. *JAKSTAT*.10:4161.

Wennbo H, Gebre-Medhin M, Gritli-Linde A, Ohlsson C, Isaksson OG, Törnell J.(1997). Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice. *J Clin Invest*.11:2744-51.

Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP. (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol*.9:6278-86.

Résumé

Le lien entre la prolactine (PRL) et la tumorigenèse mammaire est soutenu par de nombreux arguments expérimentaux, cliniques et épidémiologiques. Cependant, aucune mutation des gènes de la PRL ou de son récepteur (PRLR) n'a jamais été identifiée dans le contexte du cancer du sein. En 2008, notre Laboratoire a identifié le premier polymorphisme gain-de-fonction du PRLR chez des patients présentant une forme rare de tumeur mammaire bénigne (polyadénomatose mammaire). En effet, la seule substitution de l'isoleucine 146 par une leucine dans le domaine extracellulaire du PRLR lui confère une activité de signalisation basale plus élevée que le PRLR sauvage. Dans le cadre de ma thèse, nous avons essayé de déterminer expérimentalement quelles pouvaient être les conséquences de l'expression d'un PRLR constitutivement activé dans une cellule mammaire saine ou tumorale.

Pour ce faire, nous avons utilisé deux approches complémentaires. D'une part, nous avons généré deux modèles de souris knock-in ayant intégré une seule copie du PRLR humain, muté (I146L) ou sauvage (en contrôle). Nous avons ensuite analysé les phénotypes mammaires de ces souris à différents âges. Nous n'avons observé aucun développement tumoral, indiquant que le PRLR-I146L n'est pas un oncogène. Néanmoins, les glandes mammaires des souris âgées présentent certaines anomalies histologiques suggérant une interférence possible du PRLR muté avec la différenciation mammaire. L'analyse de ces phénotypes doit être poursuivie pour en déterminer l'ampleur exacte et les mécanismes potentiels.

D'autre part, nous avons réalisé une étude *in vitro* en utilisant des cellules tumorales mammaires humaines. Une étude parallèle au Laboratoire ayant permis de montrer que la substitution I146D conduisait à une activité constitutive plus forte que le polymorphisme naturel I146L, nous avons généré des clones stables de deux lignées tumorales mammaires humaines exprimant le PRLR-I146D. Malgré une signalisation constitutive démontrée, l'expression de ce PRLR muté ne procure aucun avantage sélectif aux cellules tumorales en termes de prolifération, ni ne modifie leur phénotype histologique (Zhang, Cherifi et al, en révision).

En conclusion, notre travail a permis de montrer que la seule expression d'un variant gain-de-fonction du PRLR est insuffisante pour transformer une cellule mammaire saine, ou pour favoriser la prolifération de cellules mammaires tumorales.

Abstract

The link between prolactin (PRL) and mammary tumorigenesis is supported by many experimental, clinical and epidemiologic data. However, mutations on the gene coding for PRL or its receptor (PRLR) have never been identified in the context of breast cancer. In 2008, our Laboratory identified the first gain-of-function polymorphism of the PRLR in patients presenting with a rare form of benign mammary tumors (mammary polyadenomatosis). Indeed, the one-residue substitution of isoleucine 146 by a leucine in the extracellular domain of the PRLR conferred a higher basal activity than that of the wild-type PRLR. Within the framework of my thesis, we have tried to determine the consequences of expressing a constitutively active PRLR in a healthy or cancerous mammary cell.

With this aim, we have used two complementary approaches. On one hand, we generated two models of knock-in mice carrying only one copy of the mutated (I146L) or wild-type (as control) human PRLR. We then analyzed the mammary phenotypes of these mice at various ages. We did not observe any tumor development, indicating that the PRLR-I146L is not an oncogene. Nevertheless, the mammary glands of old mice presented certain histological anomalies suggesting a possible interference of the mutated PRLR with normal mammary differentiation. The analysis of these phenotypes must continue to determine their extent and the potential underlying mechanisms.

On the other hand, we carried out an *in vitro* study using human breast cancer cell lines. A parallel study in the Laboratory had showed that the I146D substitution led to a stronger constitutive activity of the PRLR than the natural I146L polymorphism. Thus, we generated stable clones of two human breast cancer cell lines expressing the PRLR-I146D. In spite of its constitutive activity, the expression of PRLR-I146D did not result in any selective advantage for tumor cells in terms of proliferation, nor did it modify their histological phenotype (Zhang, Cherifi et al., in revision).

In conclusion, our work has shown that the expression of a gain-of-function mutation in the PRLR is insufficient to transform a healthy mammary cell, or to enhance the proliferation of mammary cancer cells.