UNIVERSITÉ PARIS SUD
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

Discipline : Endocrinologie Cellulaire et Moléculaire

Ecole Doctorale Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie

présentée et soutenue publiquement par

Julien AUFFRET

Le 07 décembre 2012

Titre :

Impact des hormones lactogènes sur la cellule ß pancréatique et l'adipocyte

Directeur de thèse : Dr Nadine BINART

JURY :

Monsieur Michael SCHUMACHER	:	Président
Madame Anne-Françoise BURNOL	:	Rapporteur
Monsieur Bertrand BLONDEAU	:	Rapporteur
Monsieur Claude FOREST	:	Examinateur
Madame Nadine BINART	:	Directeur de thèse

« Il est plus facile de briser un atome
que de briser un préjugé »

Albert Einstein

«Nous devons être le changement
que nous voulons voir dans le monde»

Mahatma Gandhi

A tous ceux que j'aime,

En particulier mon père,
Qui m'a offert des racines et des ailes.

Remerciements

Je remercie les différents membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.
Madame Anne-Françoise Burnol et Monsieur Bertrand Blondeau, qui ont bien voulu étudier et juger ce travail de thèse en acceptant la lourde charge de rapporteur.
Monsieur Michael Schumacher, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.
Monsieur Claude Forest, qui a bien voulu être examinateur.

Je remercie les personnes m'ayant accompagné durant la réalisation de ce projet de recherche.

Nadine Binart
Merci de m'avoir guidé sur un sujet aussi passionnant qu'est l'impact du récepteur de la prolactine sur le métabolisme.
Merci de m'avoir associé à de nombreuses collaborations, congrès nationaux et internationaux, et permis de rencontrer des scientifiques de renom, toujours passionnés et ouverts. Ils ont participé comme toi, à mon éducation de chercheur. Je te remercie aussi pour la relecture de ce manuscrit.

Marc Lombès
Merci pour ton aide, ton soutien et les réflexions constructives, notamment dans l'analyse de mes résultats y compris ceux non conformes à mes attentes. Merci pour ton enthousiasme qui m'a toujours rempli d'encouragement.

Bruno Fève
Merci pour ton apport, ta parfaite connaissance de la biologie et ton humilité. Ta présence et ta proximité m'ont apporté énormément sur le plan de la recherche comme sur le plan humain. Les quelques échanges que nous avons eu sur tes voyages, et notamment l'Inde, m'ont fait prendre conscience de la nécessité d'adopter en tant que chercheur une posture alliant rigueur scientifique, mais aussi humanité et ouverture d'esprit.

Jamileh Movassat,
Merci pour ton aide lors de mes premiers pas dans l'immunohistochimie et le partage de tes connaissances sur le pancréas. Merci pour ton soutien et ton optimisme. Tes appuis m'ont doté de volonté et de persévérance. L'association « PRISME » que tu as créé et développé, malgré tes nombreuses autres responsabilités, montre tes nombreuses qualités humaines. Je suis ravi d'avoir pu apprendre à tes côtés.

Cécile Tourrel-Cuzin,
Merci pour ta prévenance et ta disponibilité. J'ai été ravi que nous puissions continuer à travailler ensemble après mon stage de Master 1 sous ta direction. Je te remercie aussi de m'avoir appris la technique d'isolement d'îlots de Langerhans.

Christophe Magnan et Raphael Denis,
Merci pour votre aide précieuse sur l'analyse de la balance énergétique de notre murin. Votre amabilité a rendu cette collaboration très agréable.

Pierre-Yves Marie, Sylvain Poussier et Fatiha Maskali,
Merci pour votre accueil chaleureux au sein du CHU Nancy qui a rendu notre collaboration productive et très sympathique.

To Mickael Freemark
Thanks for your euthusiasm and helpful constructive criticism about our projects.

Sandra Guilmeau,
Merci de m'avoir gracieusement donné des échantillons de muqueuses stomacales de souris et de t'être rendue disponible pour partager tes connaissances.

A mi Jimena, gracias por todo. Tu eres una persona unica que inspira confianza y con quien puedo decir todo lo que pienso. Espero que podriamos continuar a hacer investigaciones juntos porque me recordaria siempre los buenos y (muy) divertidos momentos de trabajo. Ademas, ojala que la distancia que existe entre nos dos pais no nos evitaramos a vernos. Nunca lo olvidas, mi casa es tu casa y puedes venir cuando lo que quieres !

Je remercie tous les membres de la Binart's team, les actuels comme les plus anciens, dont la présence a contribué à ce que ces années se déroulent dans les meilleures conditions.

Justine,
Merci pour l'explication des techniques du laboratoire dès mon arrivée dans l'unité. Merci aussi pour ton écoute et ta disponibilité. Je te souhaite beaucoup de réussite dans la suite de ta thèse qui s'annonce, j'en suis certain, être un grand succès... Et pleins de bonheur pour les merveilleux moments qui t'attendent.

Nadège,
Merci pour ta franchise et la pertinence de tes remarques sur l'ensemble de mes travaux. Je te souhaite une très bonne continuation dans la recherche.

Valérie Bernard
Merci pour ton excellente joie de vivre.

Nathalie Servel,
Merci pour ton assistance technique dès mon arrivée au laboratoire.

Et tous les stagiaires : Audrey, Charlotte, Mélody, Christine et Marie-Christelle

Je remercie également les personnes de l'U693

Say Viengchareun
Merci pour l'aide que tu m'as apportée durant ces années, ton soutien, tes conseils judicieux et la relecture de ce manuscrit. Même si je n'arrive pas encore à manier l'art qu'utilise un disciple japonais pour montrer tout le respect à son « Maître », Sache que le mien à ton égard est profond car tu es pour moi un modèle à atteindre. Reçois toute mon amitié. Et encore un grand Merci pour tout !

Giulia,
Merci pour ton amitié, ton écoute, ta gentillesse, ta sensibilité et ta joie de vivre. Tu es une personne exceptionnelle. Je te remercie de m'avoir fait découvrir Venise. Merci de m'avoir ouvert à ton univers car cela m'a permis de rencontrer des gens fabuleux que sont Elena, Sara Zum, Francesca, Chiara, Benedetta, Enrico, Matteo, Giovanna G, Cori, Orsola, Diana, Giovanni, Giovanna C, Sara B, Augustin. Viva Italia !!! (Et à très bientôt à Milan...)

Vixra,
Un grand merci pour ta précieuse aide sur toutes les expériences réalisées ensemble et dans la bonne humeur. Le mot « gentillesse » est celui qui te décrirait le mieux. Merci pour ton écoute !

Larbi,
Merci pour les bons moments passés ensemble, tes précieux conseils. On reste en contact !

Claudia,
Merci pour ta gentillesse et ta franchise. Perdre mon badge deux fois en un mois m'a vite fait prendre conscience de ces traits de caractère que j'apprécie beaucoup chez toi. J'espère que l'on continuera à se voir.

Un grand merci à Damien, Jérôme F, Jérôme N, Jérôme B, Audrey et Ingrid, Anne-Lise, Ségo, Manou, Catherine, Junaid, Adela, Lavinia, Bruno, Séverine, Luigi, Nathalie, Hugues, Anne, Géri et Luc pour tous les bons moments passés ensemble, scientifiques et autres.

Meriem,
Merci pour la qualité de ton travail au laboratoire qui nous a permis de travailler dans d'excellentes conditions. J'apprécie énormément ta gentillesse et je te souhaite tout le bonheur que tu mérites.

Je remercie Sylvie Brailly-Tabard, Romain et Laetitia pour leur confiance dans l'élaboration des travaux dirigés (TD) et des examens y afférents. Ces activités ont participé à la consolidation de mes apprentissages. Bref, une expérience très enrichissante, tant sur le plan professionnel que sur le plan humain. Encore merci.

Remerciements

Je remercie tous les membres de la faculté qui ont contribué à améliorer le cadre de mon travail au quotidien.

Sophie Berissi et Nathalie Ba,
Merci de votre immense travail sur la coupe des pancréas et des tissus adipeux me permettant ainsi de progresser rapidement.

Stéphane et Céline, pour vous être occupé de l'animalerie. Grâce à vous, nous avons pu réussir de nombreuses expériences.

Au personnel du service de la scolarité, et particulièrement Monia Boujedidi, qui a montré une grande disponibilité et une grande patience en m'apportant les réponses aux nombreuses questions que je pouvais lui poser.

Au personnel de la sécurité de la faculté et Madame Ho pour leur gentillesse et leur accueil chaleureux lors de mes venues au laboratoire pendant les weekends et jours fériés.

Au personnel du CROUS du Kremlin-Bicêtre qui m'ont servi de manière quasi-illimitée les plats chauds tous les midis me fournissant ainsi les substrats énergétiques nécessaires pour le bon déroulement d'une longue journée laborantine.

Je remercie Margaux, Merlin, Julien, Lola, Jeff, Cathie, Hermine et Grégoire de la BSSN's (BioSigne Student Network) Team. La création de notre association doctorante a été une expérience formidable. Vous avez su contribué à sa réussite tout en y apportant votre bonne humeur et votre sens de l'humour. Merci pour tous ces bons moments (Beer Club entre autre)… Et « Longue vie à BSSN ! ».

Je remercie toutes les personnes de Necker (au temps où notre laboratoire y résidait), et qui ont largement participé à l'excellente ambiance : Latif, Cécile H, Ghislaine, Virginie, Isabelle, Catherine, Roman, Zeina, Mylène, Gaëlle, Caroline, Phanie, Chi, Marie, Estelle, Ganna, Ivan, Céline C, Mila.

Enfin, je remercie mes proches de leur soutien continuel.

A tous mes amis les plus proches
Fabien (Fabichoux), Christophe (Chrissichoux), Raphaël (Raphachon), Grégoire (Grégou), Chloé, Nicolas (Ours), Cathy, Monia (Mo), Maryam (ma choupinette) et Elise C.
Merci pour votre présence dans les moments les plus forts, les bons comme les mauvais.
Merci pour votre confiance !

Et tous ceux pour qui le temps m'a manqué. Je les remercie pour leur confiance et leur amitié
Seb, Flo, Julien V, Laurent, Karen, Agathe, Mélinda, Farida, Kahina, Elise M, Francique, Delli, Régi, Wafette, Caroline, Marie, Claire, Léïla, Claudio, Céline, Julien P, Benoit, Michaela, Erika, Julian.

A ma famille
Merci de votre soutien et de l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

A mon père,
Merci Papa pour tout le soutien, les conseils et les encouragements que tu n'as jamais cessé de me donner pendant toutes ces années. C'est en partie grâce à toi que j'en suis arrivé là ! J'ai vraiment de la chance d'avoir un père aussi formidable que toi !

Avant propos

Ce manuscrit de thèse présente l'étude effectuée sur l'impact de la signalisation des hormones lactogènes sur la cellule β pancréatique et l'adipocyte.

Notre équipe s'intéresse principalement au rôle des hormones lactogènes sur la reproduction et la lactation. Néanmoins, un certain nombre de données de la littérature ont suggéré que ces hormones participaient également à la régulation du métabolisme glucido-lipidique en ciblant directement les organes-clé impliqués dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Un nouvel axe de recherche a donc été développé pour mieux comprendre le rôle de la signalisation de la prolactine sur les adipocytes et la cellule β pancréatique.

Les articles décrivant l'impact des hormones lactogènes sur les adipocytes, dans des conditions physiologiques normales et pendant la gestation, nous ont conduits à analyser le rôle de cette signalisation dans des conditions pathologiques. Nous avons donc étudié les conséquences d'un régime obésogène sur un modèle de souris dont le gène du récepteur de la prolactine a été invalidé (Ormandy et al., 1997). En effet, une étude menée précédemment au laboratoire montrait que ces souris présentaient une altération de la masse des cellules β pancréatiques associée à une intolérance au glucose. Nous avons donc voulu savoir comment la prolactine modulait l'ontogenèse de la cellule β. Pour ce faire, nous avons développé deux axes de recherche, d'une part sur le développement du pancréas de ce modèle murin lors des adaptations périnatales et d'autre part, sur le rôle de la prolactine sur le développement d'ébauches pancréatiques de rat Goto-Kakizaki, un modèle spontané de diabète de type II.

Ce manuscrit commence par une introduction divisée en trois parties. La première partie décrit les données générales sur la prolactine, son récepteur ainsi que ses principaux effets physiologiques. Il décrit également notre modèle d'étude déficient en récepteur de la prolactine. La deuxième partie rapporte le rôle et la fonction des tissus adipeux blancs et bruns et décrit les acteurs moléculaires impliqués dans la détermination et la différenciation de l'adipocyte blanc. La troisième partie comporte un rappel sur le pancréas et plus particulièrement sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de la cellule β pancréatique ainsi que des acteurs moléculaires participant à la sécrétion des vésicules

d'insuline. Ces deux dernières parties font le point sur les connaissances actuelles attribuées à la prolactine sur les différents types cellulaires. Les résultats de cette thèse sont présentés en deux parties. La première partie présente une publication démontrant que l'absence de signalisation de la prolactine participe à l'émergence d'adipocytes présentant des compétences thermogéniques dans les dépôts adipeux blancs sous des conditions obésogènes. La deuxième partie étudie le rôle de la signalisation de la prolactine sur l'ontogenèse de la cellule β pancréatique (article en cours de soumission). Chaque article est précédé d'une justification des approches expérimentales, et est suivi d'une présentation de résultats supplémentaires ainsi que d'une discussion, focalisée sur les limites et les perspectives de ces résultats expérimentaux. Enfin, une discussion générale sur l'ensemble de travail de thèse clôt ce manuscrit.

Table des matières

Remerciements 1

Avant propos 6

Table des matières 8

Table des illustrations 12

Liste des abréviations 13

PARTIE I. Introduction 17

I. La prolactine et les hormones lactogènes placentaires 17

A/ Les hormones lactogènes 17

1- Structure et synthèse de la prolactine 17

2- Régulation de la sécrétion hypophysaire de prolactine 18

3- Hormones lactogènes placentaires et gestation 20

B/ Le récepteur et les voies de la signalisation de la prolactine 21

1- Structure et isoformes du récepteur de la prolactine 21

2- Activation du récepteur de la prolactine. 22

3- Les voies de la signalisation empruntées par la prolactine 22

C/ Rôles physiologiques de la prolactine 24

1- Mammogenèse et lactation 24

2- Reproduction 25

3- Métabolisme et comportement alimentaire 26

D/ La souris déficiente en récepteur de la prolactine 32

1- Le modèle d'étude 32

2- Phénotype de la souris R $PRL^{-/-}$ 32

II. Les tissus adipeux 35

A/ Localisation et spécificité des différents dépôts adipeux 35

1- Localisation des dépôts adipeux bruns 36

2- Localisation des dépôts adipeux blancs 36

B/ Détermination et différenciation des adipocytes blancs 37

1- Détermination adipocytaire blanche 37

2- Les facteurs de transcription-clé de l'adipogenèse blanche 38

C/ Fonctions du tissu adipeux 41

1- Lipolyse et lipogenèse 41

2- Fonction endocrine 42

3- La thermogenèse, une spécificité du tissu adipeux brun 44

D/ Différenciation des adipocytes bruns et beiges 48

1- Origines des précurseurs des adipocytes 48

2- Différenciation des adipocytes bruns 48

3- Différenciation des adipocytes beiges 51

E/ Mécanismes centraux et périphériques participant au « beiging » 54

1- Axe neurosympathique hypothalamo-adipocytaire 54

2- Mécanisme périphérique 55

F/ Rôles de la prolactine sur les tissus adipeux 55

1- Adipogenèse 56

2- Métabolisme lipidique 57

3- Production et sécrétion d'adipokines 57

4- Production de PRL par l'adipocyte 58

5- Tissu adipeux brun et thermorégulation 59

III. Le pancréas 61

A/ Structure et fonction 61

B/ Développement du pancréas et différenciation cellulaire 62

1- Endoderme et fusion des bourgeons pancréatiques 62

2- Facteurs de transcription impliqués dans la néogenèse des cellules β 62

C/ Plasticité des cellules β pancréatiques 63

1- Prolifération 63

2- Apoptose 64

3- Néogenèse et transdifférenciation cellulaire 65

4- Taille cellulaire 65

D/ Fonction insulino-sécrétrice de la cellule β pancréatique 66

1- Les étapes proximales 66

2- Les étapes distales 67

E/ Rôles de la prolactine sur la cellule β 67

1- Impact de la prolactine sur la plasticité cellulaire 68

2- Impact de la prolactine sur la sécrétion d'insuline 69

Objectifs du travail 71

PARTIE II. Impact d'un régime obésogène sur la balance énergétique des souris invalidées pour le R PRL 75

I. Justification des approches expérimentales 75

Article 1 : **Beige differentiation of adipose depots in mice lacking prolactin receptor protects against high-fat-diet-induced obesity.** Julien Auffret, Say Viengchareun, Nadège Carré, Raphaël G. P. Denis, Christophe Magnan, Pierre-Yves Marie, Adeline Muscat, Bruno Fève, Marc Lombès, and Nadine Binart. ***Faseb Journal* 26, 3728–3737 (2012)**

II. Résumé de l'article n°1 78

III. Résultats supplémentaires, discussion et perspectives 79

A/ Quel est le lien entre l'absence du récepteur de la prolactine et un régime gras dans l'émergence des adipocytes beiges ? 79

1- Les protéines de la famille E2F : les partenaires de pRb impliqués dans la détermination adipocytaire. 79

2- Modulation de l'expression des facteurs E2F et de la formation du complexe E2F/pRb sous régime gras ? 80

3- Emergence d'adipocytes beiges : un phénomène dépôt-spécifique ? 81

B/ Prise alimentaire 82

C/ Absorption des macronutriments 83

1- Phénotype intestinal chez les souris R PRL$^{-/-}$? 83

2- Phénotype hépatique chez les souris R PRL$^{-/-}$? 84

3- Phénotype de la fraction exocrine du pancréas chez les souris R PRL$^{-/-}$ 84

D/ Régulation du métabolisme glucidique 85

PARTIE III. Rôles de la signalisation de la prolactine sur l'ontogenèse et la fonctionnalité de la cellule β pancréatique ? 89

I. Justification des approches expérimentales 89

A/ Rôle de la signalisation de la PRL sur l'ontogenèse de la cellule β 89

1- Le rat Goto-Kakizaki 89

2- La souris déficiente en R PRL 90

B/ Rôle de la signalisation de la PRL sur la fonctionnalité de la cellule β pancréatique chez la souris adulte. 91

Article 2 : Defective PRL Signaling Impairs Pancreatic β cell Development during Perinatal Period in Rodents. Julien Auffret, Yves Mathieu, Cécile Tourrel-Cuzin, Nadège Carré, Mohamad Alawieh, Bernard Portha, Marc Lombès, Jamileh Movassat and Nadine Binart. **American Journal of Physiology (En préparation)**

II. Résumé de l'article n°2 93

III. Résultats supplémentaires, discussions et perspectives 95

A/ Rôle de la signalisation de la PRL sur l'ontogenèse du pancréas le jour de naissance.95

1- Phénotype exocrine..... 95

2- Phénotype endocrine 95

B/ PRL et fonction insulinosécrétrice de la cellule β chez la souris adulte 98

1- Les étapes proximales de la sécrétion d'insuline 98

2- Les étapes distales de la sécrétion d'insuline..... 99

Conclusion générale et perspectives 103

Références bibliographiques 108

Annexes 132

Article 3 : Prolactin signaling mechanisms in ovary. Justine Bouilly, Charlotte Sonigo, Julien Auffret, Geula Gibori, Nadine Binart. **Molecular and Cellular Endocrinology 356 80–87 (2012)**

Article 4 : Prolactin regulates anterior pituitary cell renewal during estrous cycle. Ferraris Jimena, Zarate Sandra, Jaita Gabriela, Boutillon Florence, Bernadet Marie, Auffret Julien, Ogando Mora, Seilicovich Adriana, Binart Nadine, Goffin Vincent, Pisera Daniel. **American Journal of Physiology (En cours de soumission)**

Table des illustrations

Figure 1 : La prolactine, du gène à la protéine
Figure 2 : Régulation de la sécrétion hypophysaire de prolactine
Figure 3 : Profil des concentrations plasmatiques de la prolactine et des hormones lactogènes placentaires au cours de la gestation chez la rate
Figure 4 : Structure des différentes isoformes du récepteur de la prolactine
Figure 5 : Structure du complexe (1 :2) formé entre la prolactine et le domaine extracellulaire du récepteur
Figure 6 : Voies de signalisation de la prolactine
Figure 7 : Les différentes étapes du développement de la glande mammaire après la naissance
Figure 8 : Régulation de la prise alimentaire au niveau du système nerveux central
Figure 9 : Localisation des différents dépôts adipeux chez la souris
Figure 10 : Détermination et différenciation de l'adipocyte blanc
Figure 11: Lipogenèse et lipolyse de l'adipocyte blanc
Figure 12: Les principales adipokines et cytokines du tissu adipeux blanc chez la souris
Figure 13 : Fonction thermogénique de la protéine UCP1 dans la phosphorylation oxydative
Figure 14 : Localisation des différents tissus adipeux bruns fonctionnels chez l'Homme
Figure 15: PRDM16 et la cascade moléculaire impliquée dans la différenciation adipocytaire brune
Figure 16 : Apparition d'adipocytes thermo-compétents au sein des dépôts blancs chez la souris acclimatée au froid
Figure 17 : Différenciation des adipocytes bruns, blancs et beiges
Figure 18 : Structure du pancréas et de l'îlot de Langerhans
Figure 19 : Schéma de la différenciation des progéniteurs pancréatiques en cellules endocrines
Figure 20 : Modification de la masse des cellules β en conditions physiologiques et pathologiques
Figure 21 : Signalisation de la voie mTOR
Figure 22 : Sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique en réponse au glucose
Figure 23 : Masse du foie et du pancréas des souris R $PRL^{+/+}$ et R $PRL^{-/-}$ à la fin des différents régimes
Figure 24 : Profil de la glycémie des souris soumises à un régime standard ou enrichi en lipides
Figure 25: Phénotype du pancréas exocrine chez les souris R $PRL^{-/-}$
Figure 26 : Augmentation de la masse β chez les souris R $PRL^{-/-}$
Figure 27 : Augmentation de la masse α/δ chez les souris R $PRL^{-/-}$
Figure 28 : Altération de la sécrétion d'insuline chez les souris R $PRL^{-/-}$

Liste des abréviations

20α HSD : 20-α Hydroxystéroïde Deshydrogénase
ACC : Acétyl-Coa Carboxylase
ADD1/SREBP1c : Adipocyte Determination and Differentiation factor 1/Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c
AdipoR : Adiponectin Receptor
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine Diphosphate
AgRP : Agouti Related Peptide
AMPc : Adénosine Mono-Phosphate cyclique
AMPK : AMPc-activated protein Kinase
ARC : Noyau arqué
ARNm : Acide RiboNucléique messager
Arx : Aristaless related homeobox
ATP : Adénosine TriPhosphate
ALAT : ALanine AminoTransférase
ASAT : ASpartate AminoTransférase
ATGL : Adipose Triglyceride Lipase
BDNF : Hypothalamic Brain-Derived Neurotrophic Factor
bHLH-LZ : basic Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper
BMP : Bone Morphogenic Precursor
BRITE : BRown In briTE
CCK : CholesCystoKinine
C/EBP : CCAAT/Enhancer-Binding Protein
CDK : Cyclin Dependent Kinase
CDKi : Cyclin Dependent Kinase inhibitor
CHO : Chinese Hamster Ovary
CREB : cAMP Response Element-Binding protein
DAG : Diacylglycérol
DMH : Région dorsomédiale
En1 : Engrailed-1
$FADH_2$: Flavine Adénine Dinucléotide
FAS : Fatty Acid Synthase
FDG : Fluorodéoxyglucose
FNDC5 : Fibronectin type III Domain Containing 5
FOXC2 : Forkhead box protein C2
FOXO3 : Forkhead box O3
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
FSH : Follicule Stimulating Hormone
G6P : Glucose 6 Phosphatase
GALT : Galactose-1-phosphate uridyl transferase
GH : Growth Hormone
GHS-R : GH receptor secretagogue
GK : Goto-Kakizaki
GLUT : Glucose Transporter
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
GOAT : O-Acyl Transferase
GSK3β : Glycogen Synthase kinase 3β

HDAC1 : Histone Deacetylase
HL-60 : Human promyelocytic leukemia cells
HNE : Trans-4-hydroxyl-2nonenal
HNF : Hepatic Nuclear Factor
HoxC9 : Homeobox C9
HSL : Hormone Sensitive Lipase
IBMX : 3-isobutyl-1methylxanthine
IGF2 : Insulin Growth Factor 2
IL : Interleukine
IRS : Insulin Receptor Substrate
Isl1 : Islet 1
Jak2 : Janus Kinase 2
JuNK : c-Jun-N-Terminal
LH : Luteinizing Hormone
LHR : LH Receptor
LPL : Lipoprotéine Lipase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MC4-R : Melanocortin 4 Receptor
MCK : Muscle Creatine Kinase
MGL : Monoglyceride Lipase
MRF4 : Myogenic Regulatory Factor 4
mTOR : mammalian Target OF Rapamycin
Munc18 : Mammalian uncoordinated-18
Myf5 : Myogenic Factor 5
MyHC : Myosin Heavy Chain
MyoD : Myogenic Differentiation
$NADH,H^+$: Nicotidamine adénine dinucléotide
NeuroD1 : Neurogenic Differentiation 1
Ngn3 : neurogenin 3
NPY : Neuropeptide Y
Ntcp : cotransporteur NA^+/taurocholate
Pax4 : Paired box gene 4
PKA : Protéine Kinase A
PKB : Protéine Kinase B
PP : Polypeptide pancréatique
PDE3B : Phosphodiesterase 3B
PDK1 : Phosphatidylinositol 3 Dependent Kinase 1
PDX1 : Pancreatic and Duodenal homeobox 1
PEPCK : Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase
PET-Scan : tomographie par émission de positons
PGC1α : Peroxysome Proliferator-Activated Receptor γ, coactivator 1α
PHDA : Periventricular-Hypophysial Dopaminergic
PI3K : Phosphoinositide 3 Kinase
Pit-1 : Pituitary-specific transcription factor 1
PPARγ : Peroxysome Proliferator-Activated Receptor γ
pRb : Protéine du Rétinoblastome
PRDM16 : PR domain containing 16
PRL : Prolactine
PTF1a : Pancreatic Transcription Factor 1a
Prv : Pseudorage
PVN : Paraventriculaire

PYY :	Peptide Y3-36
R PRL :	Récepteur de la Prolactine
RIP140 :	Receptor-Interacting Protein 140
ROS :	Reactive Oxygen Species
RXR :	Récepteur de l'acide rétinoïque
S6K :	S6 Kinase
SERCA :	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium
SH2 :	Src Homology protein 2
SNAP 25 :	Synaptosomal-associated protein 25
SNARE :	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SNC :	Système Nerveux Central
SOCS :	Suppressor Of Cytokine Signaling
STAT :	Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF :	Stroma Vascular Fraction
Synt 1a :	Syntaxin 1a
TBARS :	Acide thiobarbiturique
TBX1 :	T-Box 1
TG :	Triglycérides
TGF-β :	Tumour Growth Factor β.
THDA :	Tubero-Hypophysial Dopaminergic
TIDA :	Hypothalamic Tubero-Infundibular Dopaminergic
TMEM26 :	Transmembrane protein 26
TNFα :	Tumor Necrosis Factor α
TRPV6 :	Transient Receptor Potential Vanilloid 6
TRH :	Thyrotropin-Releasing Hormone
TWIST1 :	Twist-related protein 1
UCP1 :	Uncoupling Protein 1
UGT :	UDP-glucuronosyltransférase
VAMP :	Vesicle-Associated Membrane Protein
VDCC :	Voltage-dependent calcium channel
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor
VIP :	Vasoactive Intestinal Peptide
ZFP423 :	Zinc Finger Protein factor 423

Partie I

Introduction

PARTIE I. Introduction

I. La prolactine et les hormones lactogènes placentaires

A/ Les hormones lactogènes

La prolactine (PRL), au même titre que les hormones placentaires lactogènes (PL), appartient au groupe des hormones lactogènes. La PRL, majoritairement synthétisée et secrétée par les cellules lactotropes de l'antéhypophyse, exerce plus de 300 effets biologiques notamment sur le développement de la glande mammaire et la lactation mais aussi sur la reproduction, l'osmorégulation, la croissance et le développement, le comportement maternel, l'immunorégulation (Bole-Feysot et al., 1998).

1- Structure et synthèse de la prolactine

La structure de la PRL est proche de celle de l'hormone de croissance (GH) ainsi que des PL. Cette similarité structurelle résulterait de la duplication d'un gène ancestral, il y a environ 400 millions d'années (Cooke et al., 1981). Chez l'Homme, le gène de la *PRL* est localisé sur le chromosome 6. La taille du gène est de 10 Kbp et est composé de 5 exons et de 4 introns. L'ADN complémentaire (ADNc) de la PRL humaine (914 nucléotides) contient une phase ouverte de lecture de 681 nucléotides qui code une pré-hormone de 227 acides aminés (Cooke et al., 1981). Chez l'Homme et le rongeur, le clivage protéolytique d'un fragment de 28 acides aminés donne naissance à une hormone de 199 acides aminés et de masse moléculaire de 23 kDa. La détermination de la structure tridimensionnelle de la PRL a permis de montrer qu'elle est composée de 4 hélices α où les hélices 1 et 4 sont parallèles entre-elles et antiparallèles aux deux autres (Keeler et al., 2003). Chez presque toutes les espèces, la PRL est constituée d'une unique chaîne polypeptidique, de 199 acides aminés, qui contient 6 cystéines permettant la formation de 3 ponts disulfures. La première se situe dans la partie N-terminale non hélicoïdale de la protéine entre les cystéines 4 et 11. La deuxième, entre les cystéines 58 et 174, lie de manière covalente la région N-terminale avec la région C-terminale limitant ainsi le changement conformationnel de la protéine. La troisième se situe entre les cystéines 191 et 199 et limite le mouvement de la partie

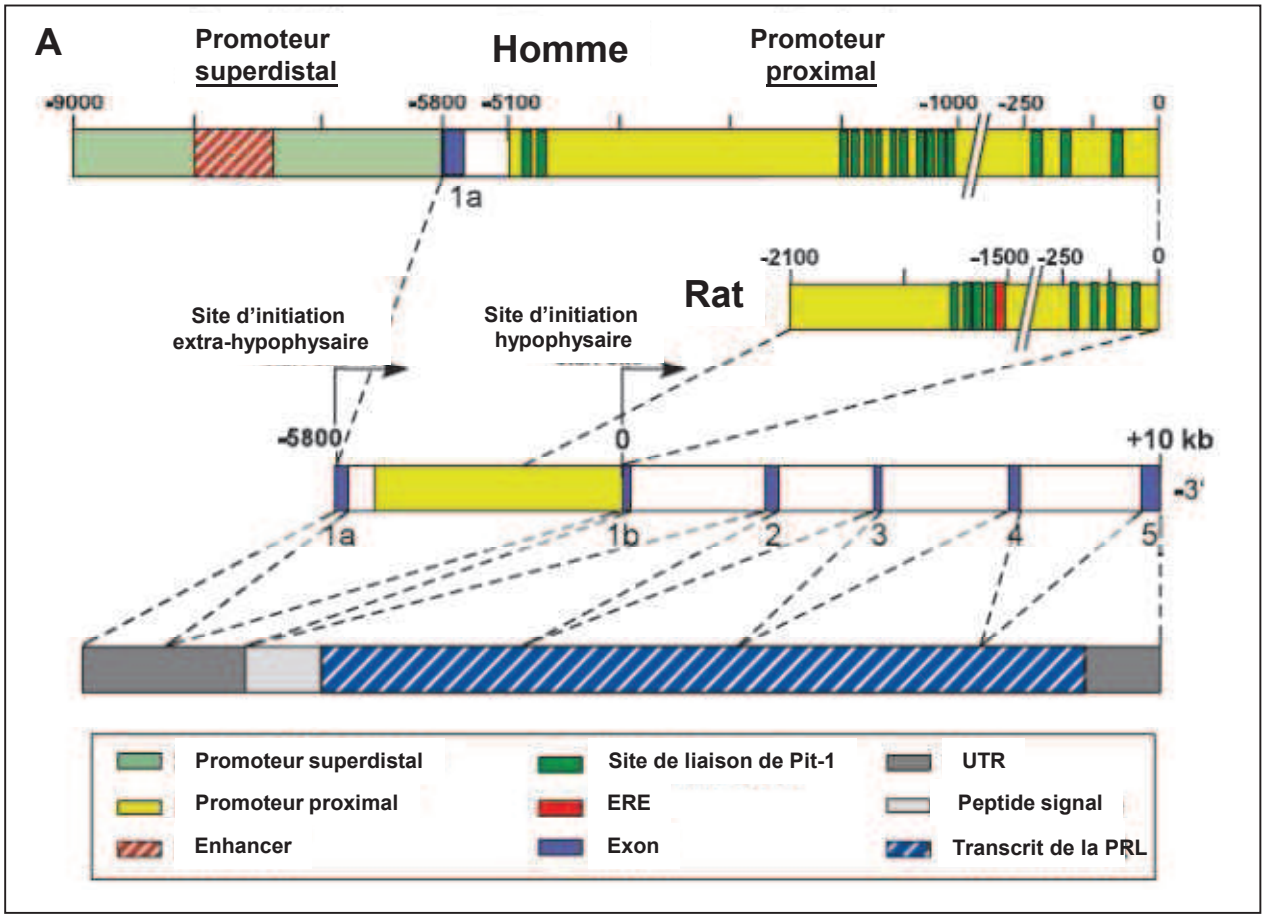


Figure 1: La prolactine, du gène à la protéine

Représentation des promoteurs du gène de la prolactine chez l'Homme et le rat ainsi que du transcrit humain de la PRL. Les flèches désignent les sites d'initiation de la transcription pour le promoteur proximal hypophysaire et superdistal extra-hypophysaire. Les promoteurs humains et murins diffèrent en taille et contiennent des sites de liaison pour le facteur de transcription Pit-1. Dans les deux espèces, la région codante contient 5 exons qui s'étendent sur environ 10 Kbp. La transcription du gène produit des transcrits dont la séquence codant pour la protéine est identique mais diffère au niveau de la région 5' UTR. Le transcrit de la PRL extra-hypophysaire est 150 pb plus long que le transcrit hypophysaire. Un peptide signal codant pour 28 à 30 résidus se trouve en aval de la région UTR, suivi par le transcrit de la PRL.

D'après *Nira Ben-Jonathan et al., Endocrine Reviews (2008)*

C-terminale. Les hélices 1 et 2 sont connectées entre elles par les résidus 44 à 77 alors que les hélices 3 et 4 le sont par les résidus 138 à 160 (Brooks, 2012).

La PRL subit des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, la phosphorylation ou bien encore un clivage protéique qui donne naissance à une forme courte de 16 kDa, appelée également vasoinhibine jouant un rôle anti-angiogénique (Clapp et al., 2006; Arnold et al., 2010; Nguyen et al., 2006).

Outre la production par les cellules lactotropes de l'antéhypophyse, d'autres sites extra-hypophysaires comme la decidua, les glandes lacrymales, les lymphocytes circulants ou encore les adipocytes, produisent une PRL locale pouvant jouer un rôle autocrine/paracrine. La transcription du gène de la *PRL* est régulée par deux promoteurs distincts (Figure 1). Le premier, appelé promoteur proximal et couvrant 5,1 Kbp en amont du site de transcription de l'exon1b, contient de nombreux sites de liaison pour Pit-1 (Pituitary-specific transcription factor 1), un facteur de transcription spécifique de l'hypophyse impliqué dans la prolifération des cellules lactotropes et somatotropes. Contrairement à celui de l'Homme, le promoteur proximal murin contient un élément de réponse aux œstrogènes. Le promoteur distal, appelé également promoteur extra-hypophysaire, couvre quant à lui 3,2 Kbp en amont du site de transcription de l'exon1a. Le promoteur proximal et le promoteur distal contrôlent la transcription du gène de la *PRL* dans l'hypophyse et dans les sites extra-hypophysaires respectivement (Bole-Feysot et al., 1998; Goffin et al., 2002; Ben-Jonathan et al., 2007).

La régulation de la transcription du gène de la *PRL* et le contrôle de sa sécrétion hypophysaire sont des mécanismes essentiels à la modulation de la concentration plasmatique de cette hormone.

2- 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 du gène de la *PRL* est essentiellement d'origine hypothalamique et périphérique dans une moindre mesure. La dopamine, sécrétée par les neurones dopaminergiques hypothalamiques, en est le principal régulateur. D'autres

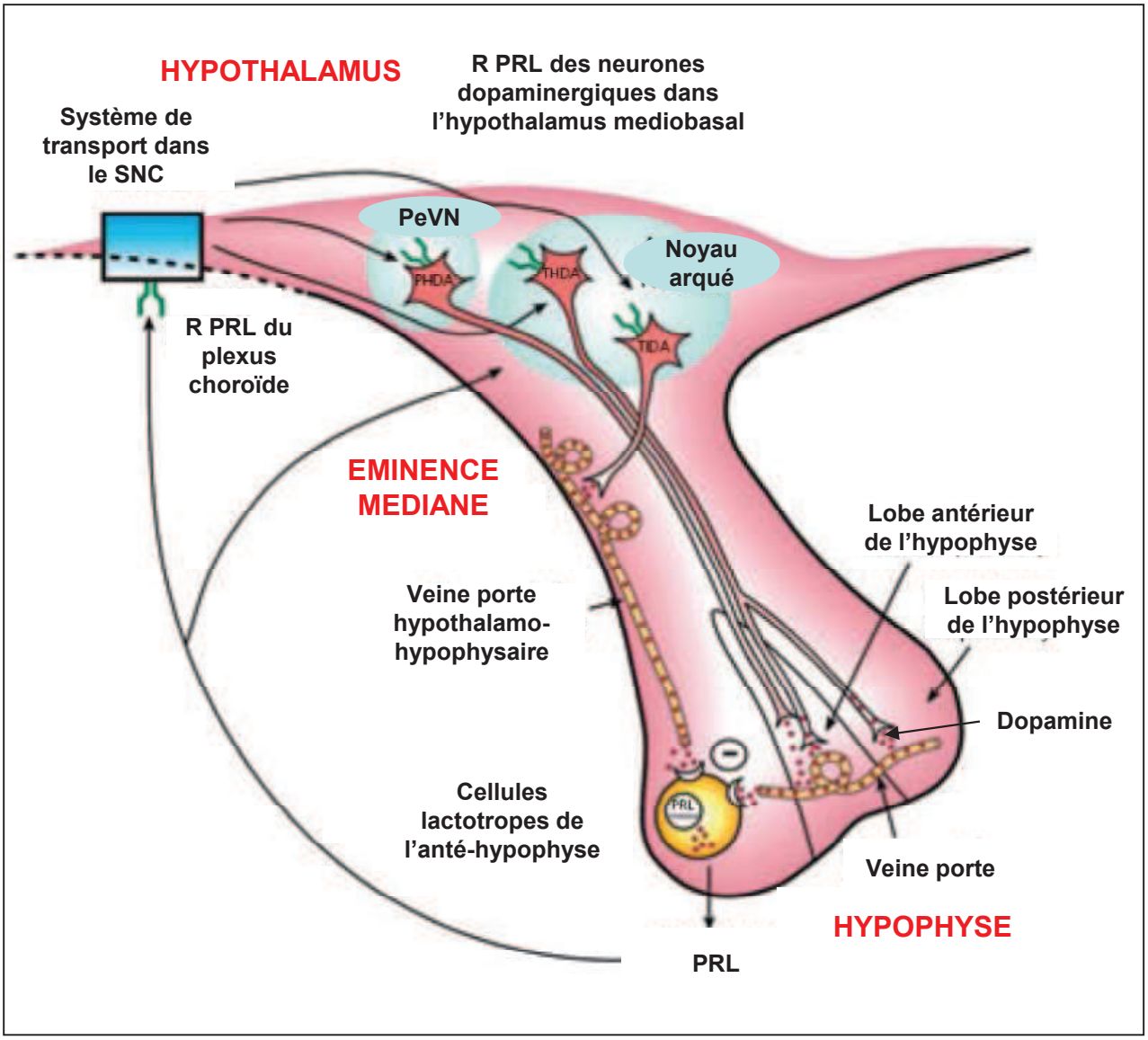


Figure 2: Régulation de la sécrétion hypophysaire de prolactine

Chez le rongeur, l'activation du R PRL (vert) des neurones TIDA, THDA et PHDA (rouge) de l'hypothalamus provoque la sécrétion de dopamine dans les veines portes, entraînant un rétrocontrôle négatif de la sécrétion de PRL par les cellules lactotropes de l'antéhypophyse (jaune).

D'après *Z. B. Andrews, Journal of Neuroendocrinology (2005)*

facteurs comme la TRH (TSH releasing hormone), le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), l'angiotensine II ou encore les œstrogènes sont au contraire stimulateurs.

La dopamine est l'inhibiteur principal de cette sécrétion. Chez le rongeur, la production principale de dopamine a lieu dans les neurones TIDA (Hypothalamic Tubero-Infundibular Dopaminergic) mais existe aussi dans les neurones PHDA (Periventricular-Hypophysial Dopaminergic) et THDA (Tubero-Hypophysial Dopaminergic) du noyau arqué. En revanche, seuls les neurones TIDA qui ont été mis en évidence chez l'Homme, ont un rôle dans la modulation de la sécrétion de PRL. La PRL augmente la sécrétion de dopamine provoquant ainsi une boucle de régulation négative sur sa propre sécrétion (Figure 2). D'autre part, d'autres facteurs comme les opioïdes, la sérotonine et l'angiotensine II empêchent la sécrétion de dopamine. Ainsi, certains régulateurs non dopaminergiques régulent indirectement la sécrétion de PRL en modulant celle de la dopamine. En revanche, d'autres régulateurs agissent directement sur les cellules lactotropes. Les neurones à TRH (Thyrotropin-releasing Hormone), situés dans le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus, secrètent la TRH qui se lie à son récepteur et activent, contrairement à la dopamine, l'entrée de calcium provoquant la migration des vésicules de PRL à la membrane plasmique et la libération de son contenu dans le milieu extracellulaire. Des régulations, autres que celles décrites dans le système nerveux central, existent. La production intestinale de VIP agit également sur la sécrétion de PRL des cellules lactotropes par des mécanismes similaires à ceux de la TRH. Les œstrogènes favorisent également cette sécrétion en contrôlant la prolifération des cellules lactotropes et l'augmentation de l'expression du gène *PRL* (Ben-Jonathan and Hnasko, 2001; Soares, 2004; Andrews, 2005; Ben-Jonathan et al., 2007; Soares et al., 2007).

Les situations physiologiques d'élévation de la PRL sont en premier lieu la grossesse et l'allaitement alors que les concentrations plasmatiques normales oscillent entre 15 et 25 ng/ml. Au fur et à mesure de la grossesse, les concentrations plasmatiques de PRL s'élèvent et peuvent 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 et s'élèvent en réponse à la succion en cas d'allaitement.

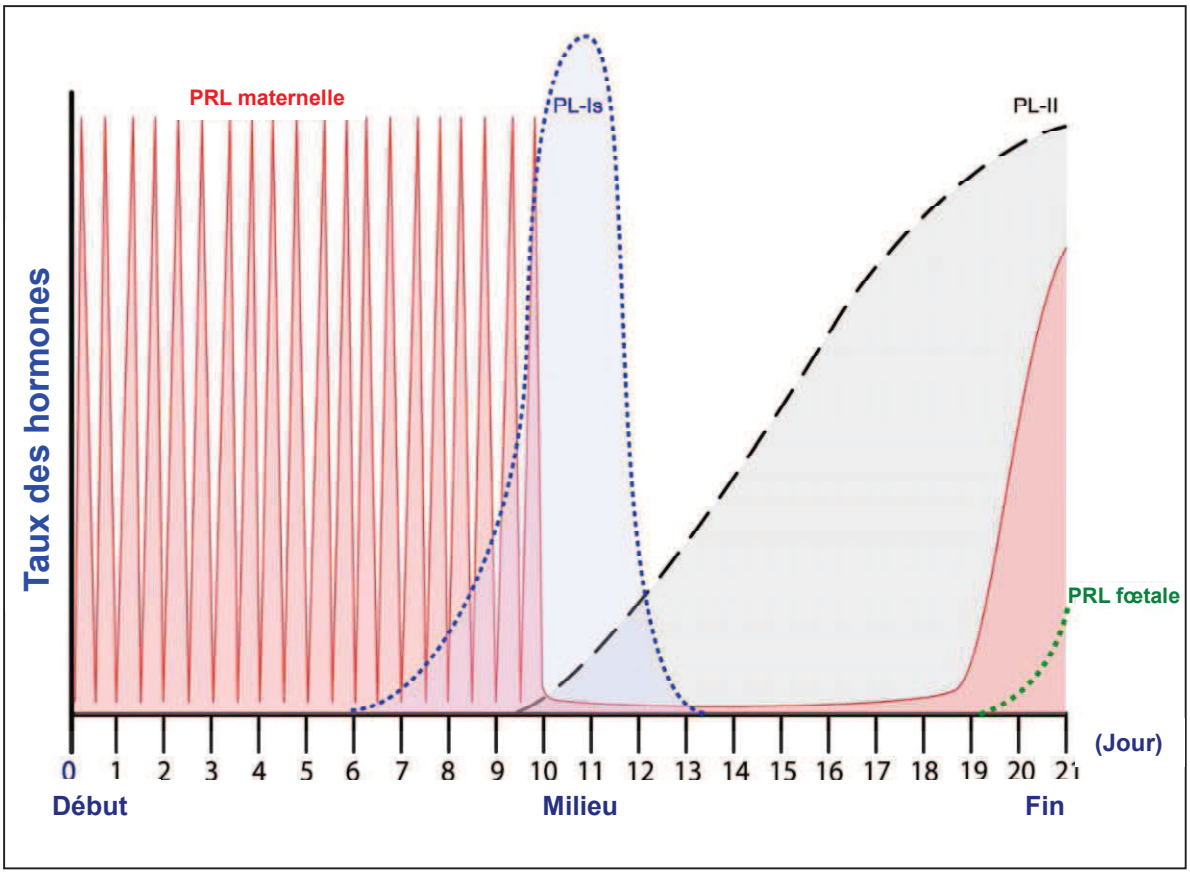


Figure 3: Profil des concentrations plasmatiques de la prolactine et des hormones lactogènes placentaires au cours de la gestation chez la rate

Le début de gestation est marqué par deux pics quotidiens de PRL (rouge) produits par l'antéhypophyse. A partir du jour 6e de la gestation, les PL-Is (bleu), produites par le placenta, augmentent pour atteindre un maximum au milieu de la gestation et disparaître autour du jour 13. Cette augmentation des PL-Is provoque une réponse dopaminergique par les neurones TIDA qui diminuent la sécrétion hypophysaire de PRL. Dès le jour 10, les PL-IIs (noir) augmentent jusqu'au terme de la gestation. La PRL maternelle, juste avant le terme de la gestation, et la PRL fœtale (vert) sont détectables à partir du 19e jour de la gestation.

D'après *Michael J. Soares Reproductive Biology and Endocrinology (2004)*

Les adénomes hypophysaires sécrétant la PRL, ou prolactinomes, représentent la cause la plus fréquente des hyperprolactinémies. L'hyperprolactinémie est définie par une élévation de la concentration plasmatique de la PRL. L'hyperprolactinémie peut être responsable d'un déficit gonadotrope, d'une infertilité, d'une galactorrhée ou être asymptomatique. Les symptômes secondaires à l'hyperprolactinémie sont un motif fréquent de consultation en endocrinologie, gynécologie ou médecine de la reproduction (Crosignani, 2006).

L'ablation de la tumeur ou bien l'administration de bromocriptine ou de cabergoline, des agonistes du récepteur dopaminergique D2 inhibant la sécrétion de PRL, chez des patients hyperprolactinémiques rééquilibre la concentration sérique de cette hormone (Melmed et al., 2011).

3- Hormones lactogènes placentaires et gestation

Lors de la gestation, afin de garantir les conditions adéquates pour le développement de l'embryon, l'organisme de la mère subit des modifications du métabolisme glucido-lipidique résultant en partie d'une modification du statut hormonal. Le placenta se forme par la prolifération et de la différenciation des cellules trophoblastiques, cellules entourant le blastocyste dès le début du développement embryonnaire, et permet les échanges des nutriments et d'oxygène. Chez les rongeurs en gestation, la première partie de la gestation est marquée par deux pics quotidiens réguliers de PRL. Puis au 11e jour de la gestation, les cellules trophoblastiques produisent et secrètent plusieurs hormones lactogènes appelées respectivement PL-I et PL-II (Soares, 2004; Soares et al., 2007).

Les concentrations de PL-I atteignent un pic au 11e jour puis sont progressivement remplacées par celles des PL-II (Figure 3). Les PL induisent une production importante de dopamine dans les neurones TIDA, ce qui bloque la sécrétion de PRL et provoque alors une diminution de ses concentrations plasmatiques. La PRL du fœtus de souris commence à être détectée à partir du 17e jour de développement embryonnaire (E17) (Slabaugh et al., 1982). A la parturition, les concentrations de PL s'effondrent mais la lutéolyse du corps jaune modifie le rapport œstrogènes/progestérone qui potentialise alors la sécrétion de PRL hypophysaire. Les concentrations élevées de PRL participent alors au développement

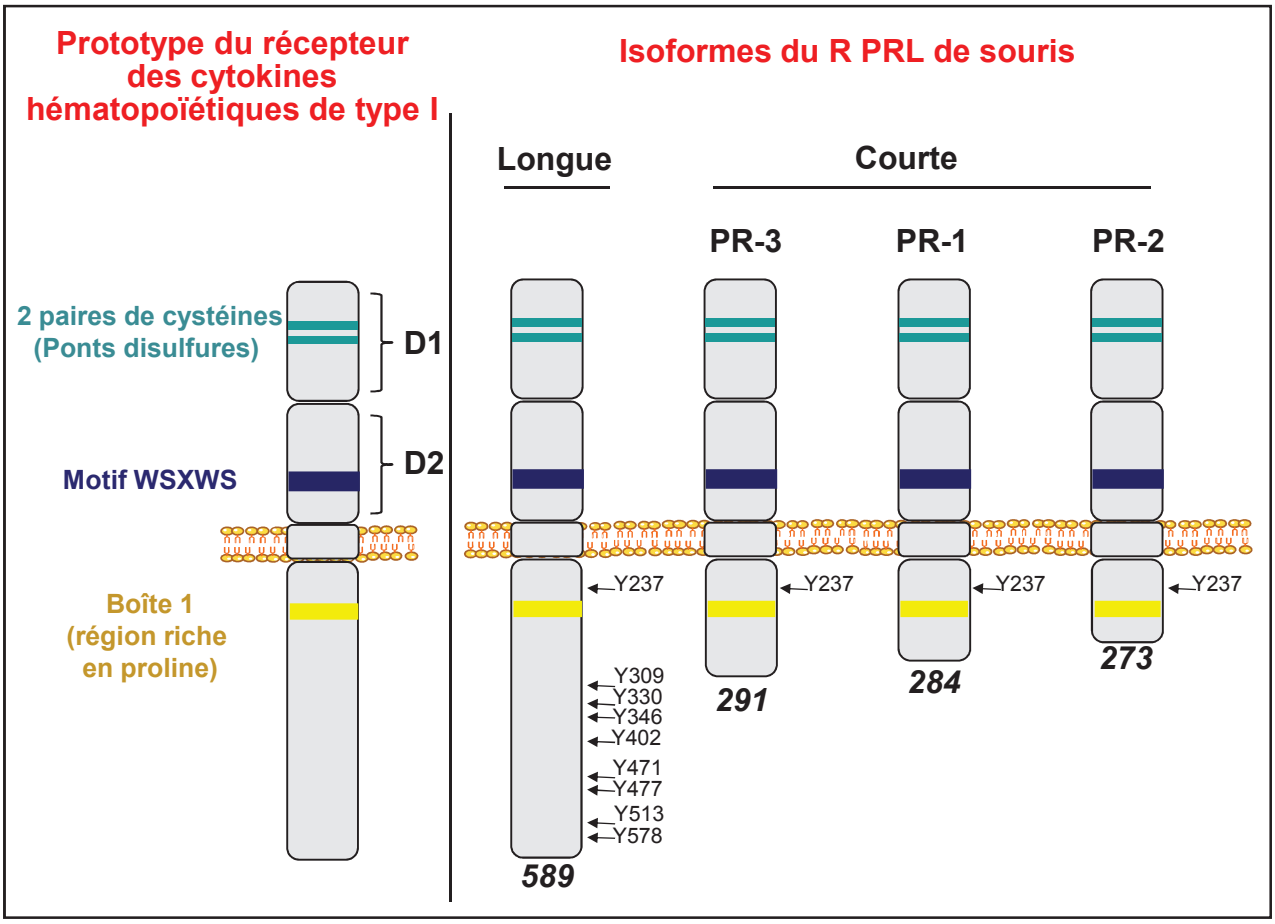


Figure 4: Structure des différentes isoformes du récepteur de la prolactine de souris

Comme tous les récepteurs de cytokines hématopoïétiques de type I, le R PRL possède deux paires de cystéines (bleu clair) et un motif WSXWS (bleu foncé) situés respectivement dans le domaine D1 et D2 de la partie extracellulaire. Une boîte 1 riche en prolines située dans le domaine intracellulaire (jaune) est un motif très conservé de cette famille de récepteur. La transcription du gène du *r prl*, présent sur le chromosome 5 chez la souris, par épissage alternatif conduit à la production de 4 isoformes présentant des différences de taille de la partie intracellulaire. Chez la souris, Il existe une isoforme longue (Longue) ainsi que 3 isoformes courtes (PR-1, PR-2 et PR-3) du R PRL.

Adapté de *Justine Bouilly et al., Molecular and Cellular Endocrinology (2012)*

terminal de la glande mammaire et à l'initiation de la lactation (Soares, 2004; Ben-Jonathan et al., 2007; Soares et al., 2007).

Bien que la synthèse et la sécrétion de PRL et des PL aient lieu à différents stades et se fassent par des tissus différents, leur homologie structurelle permet d'activer un récepteur unique : Le récepteur de la prolactine (R PRL).

B/ Le récepteur et les voies de la signalisation de la prolactine

1- Structure et isoformes du récepteur de la prolactine

Le récepteur de la prolactine (R PRL) est classé dans la super famille des récepteurs des cytokines hématopoïétiques de type 1. Le gène codant pour le R PRL est composé de 13 exons et génère, après sa transcription et traduction une protéine transmembranaire (Bole-Feysot et al., 1998). Comme tous les récepteurs des cytokines hématopoïétiques de type 1, Le R PRL contient 4 motifs très conservés :

• La partie extracellulaire est composée de deux domaines de fibronectine de type III appelés respectivement D1 et D2.
• Deux paires de cystéines dans le domaine D1 permettant la formation de ponts disulfures.
• La présence d'un motif WS (séquence Trp-Ser-x-Trp-Ser) dans le domaine D2.
• Une région riche en prolines, appelé boîte 1, située près de la membrane dans la partie intracellaire (Bole-Feysot et al., 1998).

Le R PRL a été cloné pour la première fois en 1988 à partir d'ADN complémentaire issu de foie de rat (Boutin et al., 1988). En revanche, le clonage du récepteur humain a montré des divergences de taille au niveau de la partie intracellulaire du récepteur (Boutin et al., 1989). Plusieurs isoformes résultent de l'épissage alternatif du transcrit primaire. Ces différentes isoformes diffèrent par la longueur et la composition de leur domaine intracellulaire et portent ainsi l'appellation courte et longue respectivement en fonction de leur taille (Figure 4). Une forme intermédiaire a été décrite chez le rat. Le nombre d'isoformes varie en fonction des espèces. Chez la souris, il a été décrit l'existence d'une isoforme longue et de trois isoformes courtes de structures très proches (Ben-Jonathan et

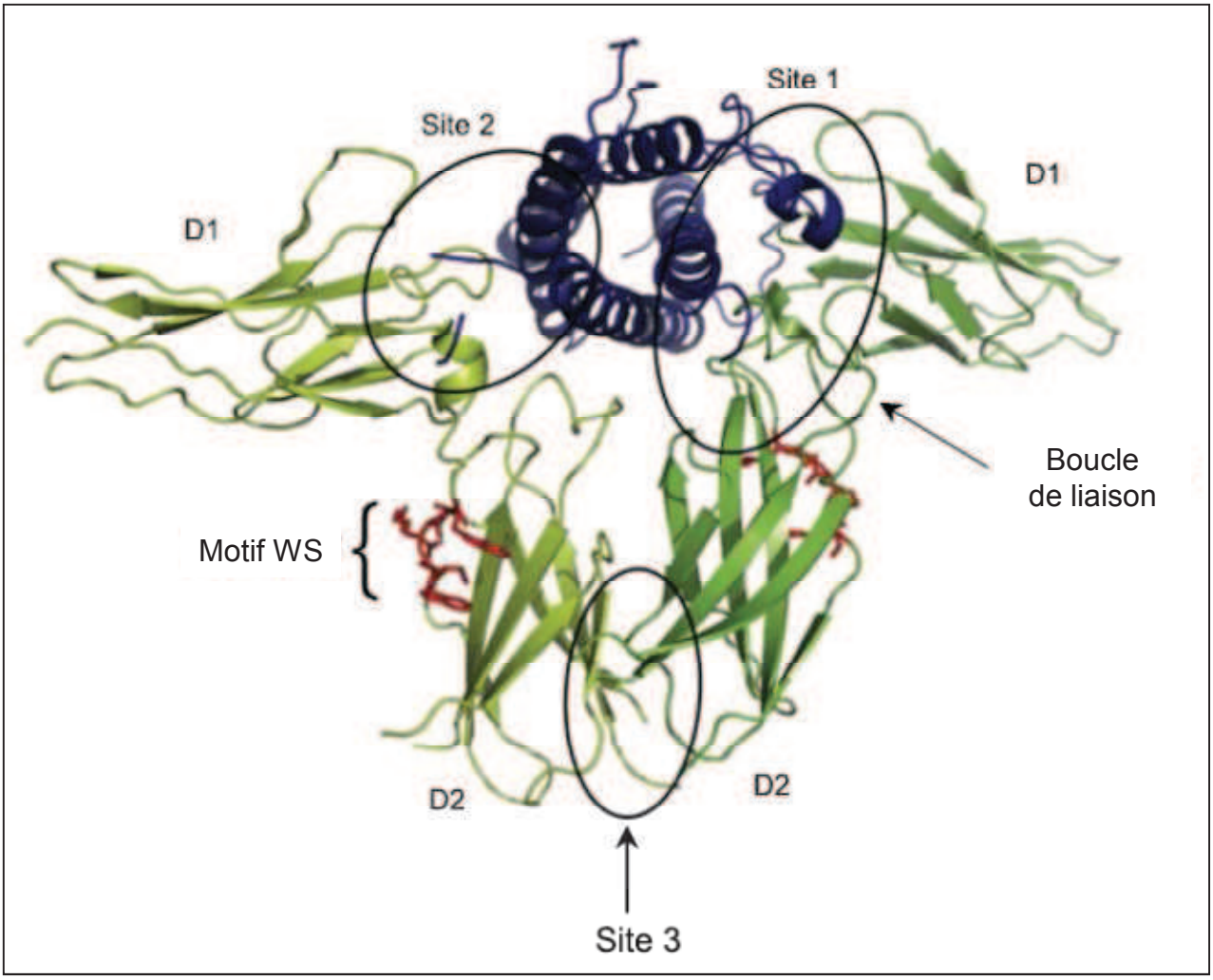


Figure 5: Structure du complexe (1:2) formé entre la prolactine et le domaine extracellulaire du récepteur.

Chaque domaine extracellulaire du R PRL (vert) est composé de deux domaines de fibronectine de type III, D1 et D2 et d'un motif WS (rouge). La liaison de la PRL (bleu) a lieu de manière séquentielle. Une première interaction a lieu entre un monomère du R PRL et son ligand au niveau du site 1 suivi d'une deuxième interaction avec un deuxième monomère au niveau du site 2. La liaison du ligand au récepteur conduit à une interaction entre les deux monomères du R PRL (site 3).

D'après *Dagil R.et al., Structure (2012)*

al., 2007; Binart et al., 2010). La forme longue du R PRL, contenant 589 résidus incluant le domaine extracellulaire, est généralement la forme la plus exprimée (Brooks, 2012).

2- Activation du récepteur de la prolactine.

La PRL se lie à une forme dimérisée du R PRL présent à la membrane plasmique des cellules (Tallet et al., 2011). La PRL contient deux sites de liaisons appelés site 1 et site 2 (Figure 5). La liaison de la PRL à son récepteur s'effectue de manière séquentielle puisque la première interaction entre le ligand et un monomère du récepteur s'effectue *via* le site 1. Le transfert d'énergie par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) a permis de déterminer que la liaison du récepteur au site 1 de la PRL induit un changement conformationnel du ligand (Voorhees and Brooks, 2010). Ensuite, une deuxième interaction s'effectue entre un deuxième monomère de R PRL et le site 2 de la PRL dont la glycine en position 129 a été décrite comme capitale pour cette interaction. Les constantes de dissociation du site 1 et 2 sont respectivement de 6,5 nM et 32,9 µM, ce qui pourrait expliquer que la liaison de la PRL au récepteur se fait toujours *via* le site 1 puis le site 2 (Jomain et al., 2007). La liaison du ligand au récepteur entraîne une troisième interaction, appelée site 3, entre les deux monomères du R PRL *via* des cystéines en position 184, 225 et 242. La formation d'un complexe stœchiométrique H1 :R2 (1 hormone : 2 récepteurs) provoque une modification conformationnelle du récepteur suivi de son activation et celle de plusieurs voies de signalisation par le biais de sa partie intracellulaire (Brooks, 2012).

3- Les voies de la signalisation empruntées par la prolactine

La transmission du signal se fait alors par trois voies essentielles qui entraineront la transcription des gènes cibles (Figure 6). Le R PRL ne possédant pas d'activité kinase intrinsèque, cette activité a lieu par l'intermédiaire de kinases de la famille des Jak (Janus kinase). La liaison du ligand au récepteur est nécessaire afin que la modification conformationnelle de la partie intracellulaire du récepteur induite par cette liaison permette à Jak2 de phosphoryler les résidus tyrosine de la queue intracellulaire du récepteur. Ces phosphorylations entraînent alors la création de sites de liaison de protéines pour des membres de la famille possédant un motif SH2 (Src Homology protein 2). Les facteurs de

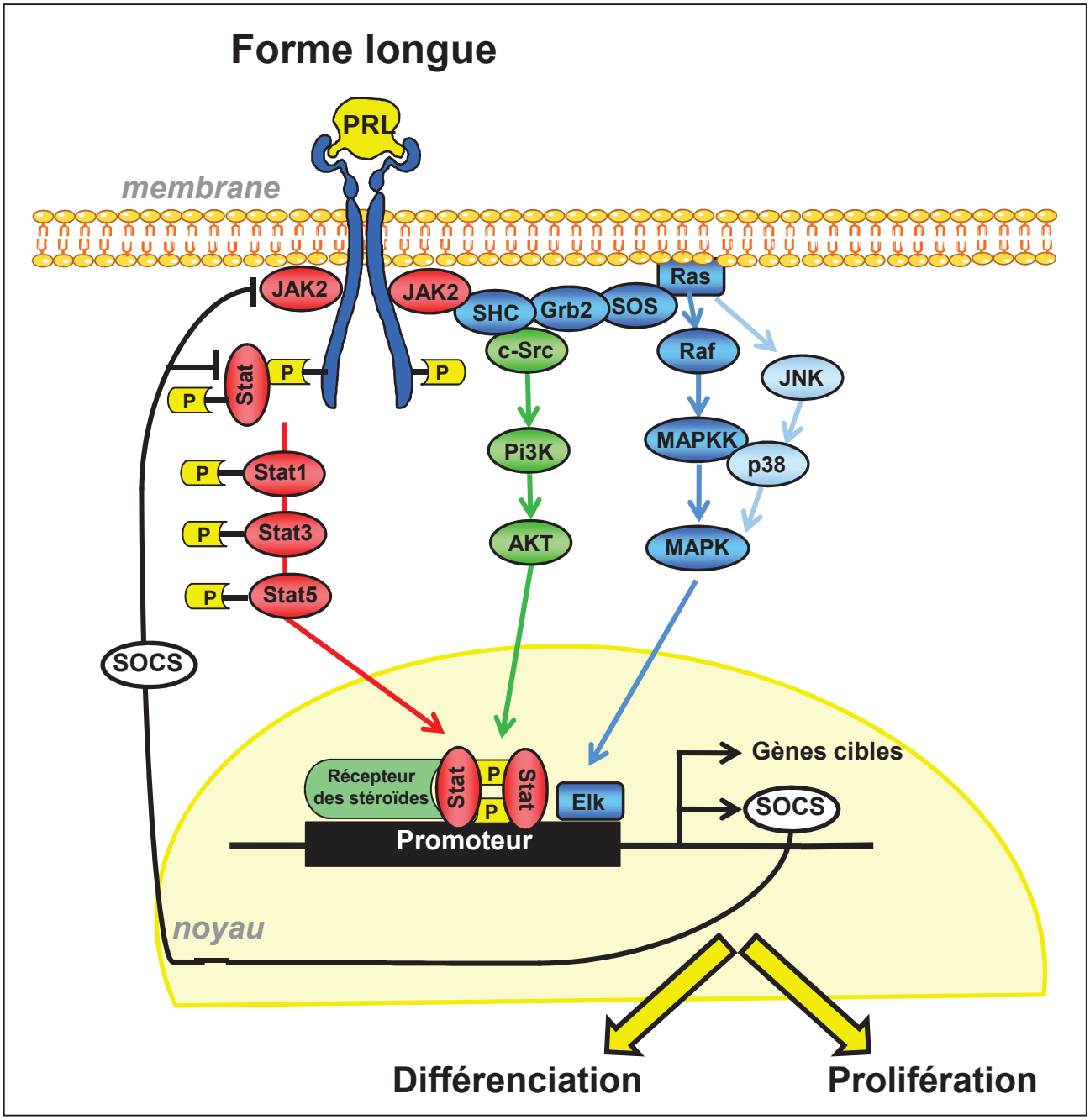


Figure 6: Voies de signalisation du récepteur de la prolactine

La liaison de la PRL à son récepteur active les voies de signalisation JAK/STAT (rouge), PI3K/Akt (vert) et MAPK (bleu). Les protéines de la famille des SOCS (blanc) inhibent la signalisation de la PRL en se liant directement sur les protéines Jak ou Stat en hibitant la voie de signalisation.

Adapté de *Justine Bouilly et al. Molecular Cellular and Endocrinology (2012)*

transcription à domaine SH2 STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) 1, 3 et principalement 5a et 5b sont alors phosphorylés par Jak2. Cette modification covalente des facteurs STAT entraîne alors leur homodimérisation *via* leur domaine SH2, leur translocation dans le noyau et la transcription des gènes cibles. Les facteurs STAT peuvent également former des complexes avec les récepteurs des hormones stéroïdes, notamment celui des glucocorticoïdes qui agit comme un co-activateur sur la transcription des gènes cibles de la signalisation PRL (Stöcklin et al., 1996; Stoecklin et al., 1999). La transmission du signal est finement régulée par les protéines SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling), dont l'expression est régulée positivement par la voie Jak/STAT. Ces protéines à domaine SH2 peuvent se lier à la protéine Jak2 empêchant la transmission du signal aux protéines STAT. SHP1 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1) est une tyrosine phosphatase qui inhibe la signalisation Jak/STAT en interagissant directement avec Jak2 puis en déphosphorylant les résidus tyrosine (Jiao et al., 1996). Récemment, il a été montré que PI3kinase enhancer-A (PIKEA) s'associait directement avec STAT5 et le R PRL et participait à la transcription des gènes cibles *via* l'activation de STAT5a (Chan et al., 2010). Même si la voie Jak/STAT est la voie classique de la signalisation de la prolactine, d'autres voies impliquant d'autres protéines à domaine SH2, comme le complexe Grb2/Sos, ont été décrites (Ben-Jonathan et al., 2007; Binart et al., 2010).

Le complexe Grb2/Sos active Ras, une protéine à activité GTPasique intrinsèque, qui active ensuite la cascade de signalisation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) *via* le recrutement et l'activation de Raf à la membrane plasmique. L'activation de Ras entraîne également l'activation 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 aussi sous l'appellation PKB (Protein Kinase B), une sérine/thréonine kinase, et permet alors son activation par la PDK1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1) (Ben-Jonathan et al., 2007; Binart et al., 2010).

Grâce à l'activation de ces différentes voies de signalisation qui permettent la transcription des gènes cibles, la PRL et les PL jouent de nombreux rôles physiologiques.

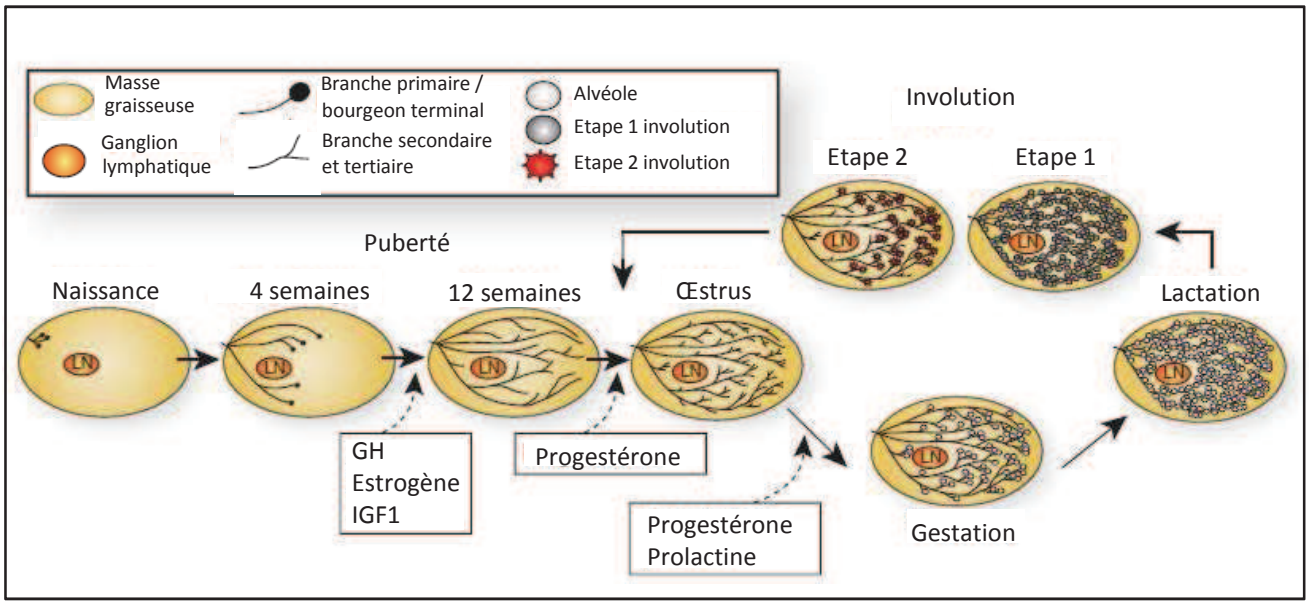


Figure 7: Les différentes étapes du développement de la glande mammaire après la naissance

De la naissance jusqu'à la puberté (4 semaines chez la souris), la glande mammaire est composée d'un système canalaire rudimentaire et connaît une croissance isométrique. A la puberté, sous l'influence de divers facteurs de croissance (GH, IGF1 et oestrogènes), le système canalaire se développe en un réseau plus complexe où de nombreuses ramifications (branches secondaires) sont observées (12 semaines). Lors des différents cycles œstraux chez la souris vierge, la progestérone permet l'élongation des courtes branches tertiaires, dont chaque extrémité se termine par des lobules. Ce n'est que lors de la gestation que les alvéoles se développent sous l'influence essentielle de la PRL. A la lactation, la PRL stimule la production de lait. A la fin de la lactation, la glande mammaire involue jusqu'au stade initial avant la gestation.

D'après *Hector Macias and Lindsay Hinck. WIRESs Developmental Biology (2012)*

C/ Rôles physiologiques de la prolactine

Toutes les fonctions biologiques de la PRL sont classées en différentes catégories (Bole-Feysot et al., 1998). La PRL joue des rôles majeurs sur la mammogenèse et la lactation, la reproduction chez les rongeurs, et le métabolisme.

1- Mammogenèse et lactation

En 1928, Striker et Gruter découvrent qu'un facteur provenant du lobe antérieur de l'hypophyse est capable d'induire une montée laiteuse chez la lapine. Cinq années plus tard, l'équipe de Riddle montre que ce facteur induit également la production de lait dans le jabot de pigeonne, l'équivalent de la glande mammaire chez les mammifères. Le nom « prolactine » est alors donné à ce facteur en raison de son rôle lactogénique (Bole-Feysot et al., 1998). Ce n'est qu'en 1970 que la PRL et la GH sont décrites comme deux protéines bien distinctes (Friesen et al., 1970). Le rôle de la prolactine est alors mieux décrit et le premier dosage radio-immunologique de cette hormone est mis au point en 1971 (Hwang et al., 1971). Aujourd'hui, les rôles de la PRL sur le développement de la glande mammaire (mammogenèse) ainsi que sur la lactation sont clairement décrits.

La glande mammaire se développe durant l'embryogenèse, la puberté, la gestation et la lactation (Figure 7).

Chez la souris, le développement des glandes mammaires débute à E10. Le compartiment épithélial et le stroma l'environnant proviennent de l'ectoderme et du mésoderme et constituent les deux compartiments cellulaires de la glande mammaire en développement. A la naissance, un réseau rudimentaire entoure les ganglions lymphatiques. Jusqu'à la puberté, la glande mammaire a une croissance isométrique. A la puberté, c'est-à-dire à partir de la 6e semaine chez la souris, les canaux galactophores se ramifient en plusieurs branches secondaires et se terminent en bourgeons principalement sous l'action des œstrogènes et de la GH. La progestérone, produite au cours des différents cycles œstraux, entraîne une ramification plus importante des canaux en branches tertiaires et permet le développement de structures lobulo-alvéolaires. Pendant la gestation, les concentrations élevées de PRL entraînent une différenciation et une prolifération massives des structures lobulo-alvéolaires. IGF2 (Insulin-like Growth Factor 2) est le médiateur

moléculaire de l'action de la PRL sur cette prolifération des cellules épithéliales (Brisken et al., 2002). Lors de la parturition, les concentrations élevées de PRL poursuivent le développement des structures lobulo-alvéolaires et stimulent la synthèse des protéines de lait. Le lait est ensuite excrétée sous l'action de l'ocytocine. Lors du sevrage, la glande mammaire involue par une apoptose importante des cellules épithéliales des structures lobulo-alvéolaires. Une deuxième étape d'involution de la glande mammaire est marquée par une modification importante de son architecture notamment par un remodelage de la matrice extracellulaire et une différenciation adipocytaire (Hennighausen and Robinson, 2001; McNally and Martin, 2011; Macias and Hinck, 2012).

2- Reproduction

Les ovaires produisent les hormones sexuelles (œstradiol et progestérone). La folliculogenèse est le processus permettant la maturation d'un follicule primordial en follicule de De Graaf. Elle est en partie stimulée par les hormones gonadotrophines, LH (luteinizing hormone) et FSH (Follicle Stimulating Hormone), produites par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse. Après l'ovulation et sous le contrôle principal de la LH, les cellules de la granulosa du follicule ovulé se transforment en cellules lutéales appelées corps jaune produisant la progestérone. Cette étape est la lutéinisation. Ce corps jaune se maintiendra en cas de gestation, dans le cas contraire, il involuera (Oktem and Urman, 2010).

La PRL n'agit pas sur la folliculogenèse mais module la production des hormones stéroïdes (Grosdemouge et al., 2003). Elle inhibe le catabolisme de la progestérone en inhibant la 20α-hydroxystéroïde deshydrogénase (20α-HSD) (Albarracin et al., 1994). Par ailleurs, elle module l'expression du récepteur de la LH dans le corps jaune (Gibori and Richards, 1978). La PRL joue également un rôle proliératif, de survie et est pro-angiogénique sur cette structure (Binart et al., 2010). La surexpression de la forme courte du R PRL chez la souris entraîne une répression de l'expression de FOXO3 (Forkhead box O3) et de GALT (Galactose-1-phosphate uridyl transferase), une enzyme impliquée dans le métabolisme du galactose. Même si la forme longue du R PRL est la forme majoritairement exprimée dans l'ovaire, ces données suggèrent que la forme courte pourrait aussi jouer un rôle important

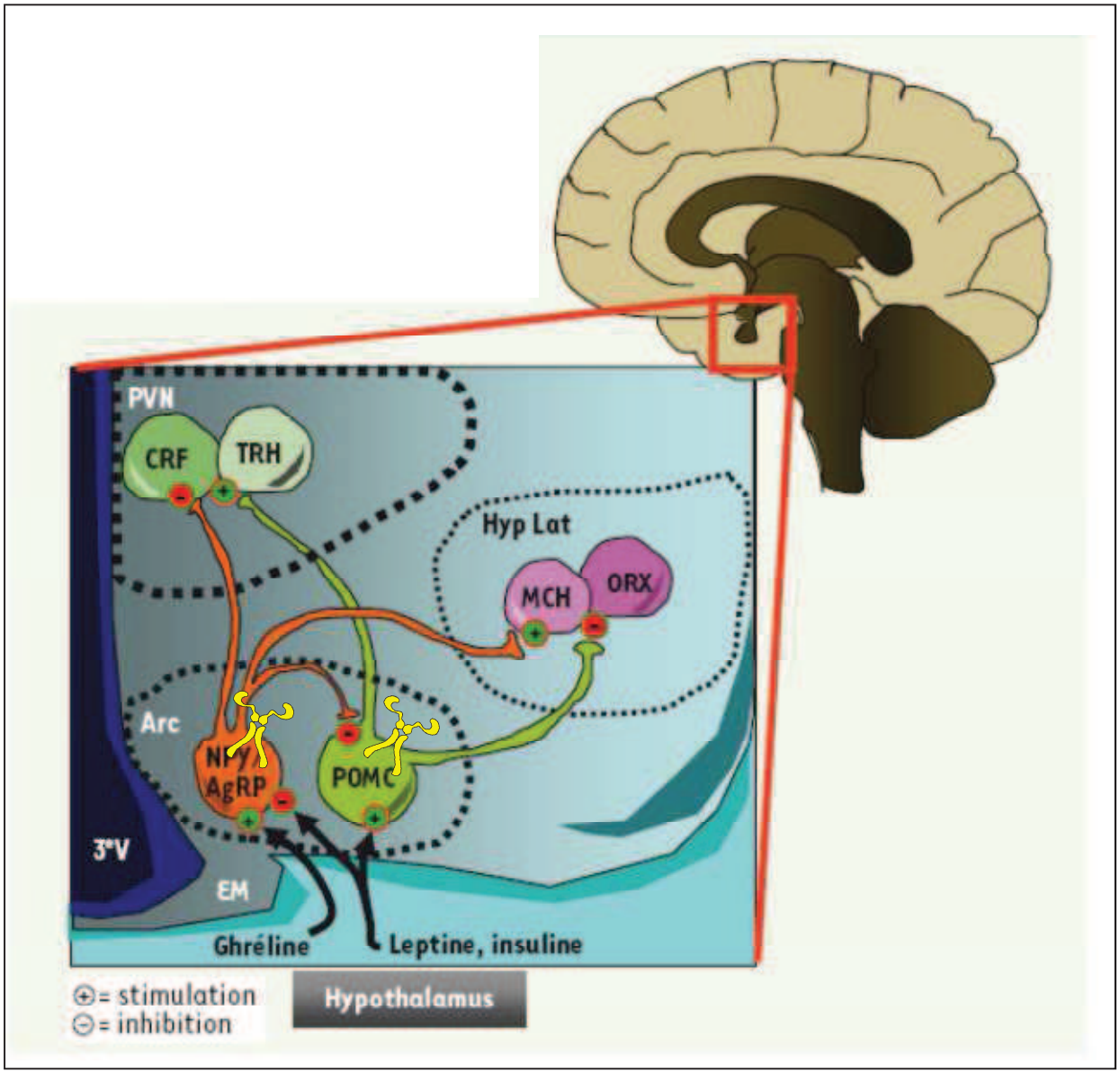


Figure 8: Régulation de la prise alimentaire au niveau du système nerveux central

Situé à la base de l'hypothalamus, accolé au troisième ventricule (3^{e}V) et près de l'éminence médiane (EM), le noyau arqué (Arc) de l'hypothalamus contient des neurones orexigènes qui synthétisent le Neuropeptide Y (NPY) et *l'agouti-related protein* (AgRP), et les neurones anorexigènes à pro-opiomélanocortine (POMC) qui fabriquent notamment l'α-*melanocyte stimulating hormone* (α-MSH). Ces deux populations neuronales interagissent entre elles de manière antagoniste et projettent des afférences vers des neurones d'autres régions de l'hypothalamus, comprenant le noyau paraventriculaire (PVN) ou le noyau de l'hypothalamus latéral (Hyp Lat). Au sein de ces structures les neurones NPY/AgRP et POMC exercent une action opposée sur d'autres populations neuronales-clé dans la régulation de la balance énergétique comme les neurones à *Corticotropin-releasing factor* (CRF) et *Thyrotropin-releasing hormone* (TRH) du PVN, et les neurones Orexines A et B (ou hypocrétines) et *Melanin-concentrating hormone* (MCH) de l'Hyp Lat. Le R PRL (jaune) s'exprime dans les neurones NPY/AgRP et POMC permettant un contrôle de la prise alimentaire via la régulation transcriptionnelle des peptides anorexigènes et orexigènes.

D'après Serge Luquet, Medecine/sciences (2008)

sur la fonction ovarienne (Halperin et al., 2008). En effet, le modèle de la souris n'exprimant que la forme longue du récepteur démontre qu'à la fois les deux isoformes du récepteur sont indispensables à la fonction ovarienne (Le et al., 2012).

Le rôle de la PRL sur l'ovaire est bien établi chez les rongeurs. En revanche, chez la femme, son rôle reste discutable, à l'exception de la situation pathologique de l'hyperprolactinémie dans laquelle on retrouve une infertilité liée à une altération de l'axe gonadotrope. On pensait que les concentrations élevées de prolactine altéraient la pulsatilité des neurones à GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) situés dans l'hypothalamus, or très peu de neurones à GnRH expriment le récepteur de la prolactine. Notre équipe a montré que le mécanisme pouvait être relayé par les neurones à kisspeptine puissants stimulateurs de la GnRH. L'hyperprolactinémie induite chez des souris provoque une anovulation et une baisse de l'expression de kisspeptine au niveau hypothalamique, ce qui est rétabli par des injections quotidiennes de kisspeptine suggérant un rôle majeur du R PRL dans le contrôle de l'axe gonadotrope et de la fertilité à travers les neurones kisspeptines (Sonigo et al., 2012).

3- Métabolisme et comportement alimentaire

Depuis cette dernière décennie, une attention particulière a été portée sur les effets de la PRL sur le métabolisme. Des données anciennes montraient une élévation du poids corporel chez des patients atteints d'hyperprolactinémie (Greenman et al., 1998). Des données récentes attribuent un rôle manifeste de la PRL sur la régulation de la prise de poids *via* des effets au niveau du système nerveux central (SNC) mais aussi périphérique sur le foie, le pancréas et le tissu adipeux (Ben-Jonathan et al., 2007; Woodside, 2007).

La prise alimentaire

Le contrôle de la prise alimentaire fait intervenir des mécanismes complexes à la fois au niveau du système nerveux central et au niveau périphérique.

Régulations par le système nerveux central

La régulation de la prise alimentaire est un mécanisme complexe faisant intervenir de nombreux signaux périphériques relayés au niveau du SNC (Figure 8) renseignant ainsi le statut nutritionnel de l'organisme (Luquet and Magnan, 2009). Les études entreprises afin de

décrypter le rôle de la PRL sur la régulation de la prise alimentaire se sont tournées principalement sur son impact au niveau du système nerveux central. Les nombreux résultats de la littérature plaident en faveur d'un rôle orexigène de la PRL.

L'injection quotidienne de PRL ovine pendant 10 jours chez la rate augmente la prise alimentaire jusqu'à 20% comparée à celle des animaux contrôles (Gerardo-Gettens et al., 1989). Lors de la gestation et de la lactation, périodes correspondant à des concentrations élevées d'hormones lactogènes circulantes, la prise alimentaire augmente afin de répondre aux besoins énergétiques de l'organisme (Woodside, 2007). Ainsi, l'analyse de coupes de cerveau de rate en lactation par hybridation *in situ* a montré que le R PRL s'exprimait dans les neurones produisant le neuropeptide orexigène Y (NPY) majoritairement dans la région dorsomédiale (DMH) et dans quelques neurones du noyau arqué de l'hypothalamus (ARC) (Chen and Smith, 2004). L'injection de PRL dans le noyau paraventriculaire (PVN) de rate vierge augmente significativement l'expression de *npy* et est corrélée à l'augmentation de la prise alimentaire suggérant un rôle direct de la PRL sur la prise alimentaire (Sauvé and Woodside, 2000). Par ailleurs, l'équipe de David Grattan a montré par hybridation *in situ*, que la forme longue du R PRL s'exprime dans les neurones pro-opiomélanocortine (POMC) qui produisent le précurseur du peptide anorexigène, l'α-MSH (α-Melanocyte Stimulating Hormone) (Kokay and Grattan, 2005). Par ailleurs, l'hyperprolactinémie induite chez des rats par une greffe de cellules hypophysaires sous la capsule rénale induit une diminution significative de l'expression de *pomc* (Tong and Pelletier, 1992). Ainsi l'action orexigène de la PRL serait renforcée par une régulation négative de l'expression des peptides anorexigènes. Néanmoins, d'autres éléments de la littérature proposent une désensibilisation de la voie de signalisation du récepteur la leptine par celle du R PRL (Roy et al., 2007). La leptine est une hormone anorexigène qui inhibe l'activité des neurones NPY/AgRP et favorise celle des neurones POMC (Luquet and Magnan, 2009).

Pendant la gestation, les concentrations plasmatiques de leptine augmentent et sont accompagnées d'une élévation de la prise alimentaire suggérant une résistance de sa signalisation. Le récepteur de la leptine et celui de la PRL, colocalisés dans les neurones NPY du PVN (Roy et al., 2007), agissent respectivement par la voie de signalisation Jak/STAT induisant l'expression de SOCS-3, protéine stoppant le signal de cette voie. L'activation par la PRL de la voie Jak/STAT conduit à l'augmentation de l'expression de SOCS-3 qui stopperait la

signalisation de la leptine et augmenterait ainsi la prise alimentaire (Auernhammer et al., 2000). Mais la mesure *in vitro* de la phosphorylation de STAT3 après incubation de la leptine sur la lignée cellulaire CHO (Chinese Hamster Ovary), co-transfectée de manière stable avec les deux récepteurs, ne montre aucune différence significative lorsque ces cellules ont été pré-incubées avec la PRL suggérant que la PRL ne participe pas directement à la résistance à la leptine (Roy et al., 2007). Récemment, il a été montré que la PRL diminue la translocation de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique, ce qui l'empêcherait de jouer son rôle anorexigène sur les neurones NPY/AgRP et POMC. (Trujillo et al., 2011).

L'ensemble de ces résultats établit que la PRL a des propriétés orexigènes sur les neurones du SNC sans que les mécanismes soient clairement démontrés.

Régulations périphériques

Parallèlement aux effets centraux, des données de la littérature ont montré que des peptides produits par l'estomac et l'intestin régulent aussi la prise alimentaire.

La ghréline est une protéine de 28 acides aminés sécrétés principalement par l'estomac et la partie supérieure de l'intestin. Une acylation sur la sérine en position 3 par la GOAT (O-acyl transferase*)* est nécessaire pour que cette protéine traverse la paroi hématoencéphalique et se fixe sur le GHR-S (GH receptor secretagogue) (Murphy and Bloom, 2006). Les neurones NPY/AgRP relaient ce message orexigène puisque la délétion du gène codant pour NPY et AgRP (Agouti related peptide) chez la souris conduit à une perte des propriétés oréxigènes de la ghréline (Chen et al., 2004).

La cholescystokinine (CCK) est une protéine anorexigène. L'apport de lipides et de protéines dans la lumière intestinale conduit à sa sécrétion par les entérocytes. Son signal anorexigène est relayé jusqu'au noyau du tractus solitaire (NTS) par le nerf vague.

Le peptide Y3—36 (PYY) est sécrété par les cellules endocrines L tapissant l'iléon et le colon lors d'un apport calorique. Sa liaison avec le récepteur NPY Y2 (Y2R), exprimé dans le noyau arqué de l'hypothalamus, entraine une diminution significative de l'expression de NPY. Ses effets anorexigènes ont pu être confirmés chez l'Homme puisqu'une infusion à des concentrations postprandiales entraine une diminution de la satiété et une diminution de plus de 30% de la prise alimentaire en 24 heures (Batterham et al., 2002).

Bien que le R PRL s'exprime le long de tractus gastro-intestinal (Ouhtit et al., 1994), aucune étude n'a tenté d'étudier le rôle de la signalisation de la PRL et l'expression de ces peptides.

Foie

L'utilisation d'oligonucléotides spécifiques de la forme longue et courte du R PRL a permis de montrer par PCR que l'expression de la forme courte dans le foie chez la souris est majoritaire (Matsuda and Mori, 1996). L 'expression de R PRL augmente dans des explants de foie humain lors de fibrose et de cirrhose, dans les cellules épithéliales du canal biliaire et dans les hépatocytes altérés par la fibrose (Simon-Holtorf et al., 2006). Des expériences d'immunomarquage réalisées sur des coupes de foetus de rat a permis de montrer que l'expression du R PRL dans les hépatocytes pouvait sensiblement changer sur une courte période, et qu'un pic d'expression du R PRL est observé à E17 (Freemark et al., 1997). La PRL joue un rôle établi sur la fonction hépatique notamment sur le développement de cet organe, le cycle entéro-hépatique et sur les enzymes du métabolisme.

Le foie de souris transgéniques surexprimant la forme humaine de la GH présente une forte prolifération des hépatocytes. Or, la GH humaine peut lier à la fois le R PRL et le récepteur de la GH de rongeurs (Cunningham et al., 1990), des hépatocytes ont donc été isolés à partir de foie de rats âgés de 20 jours puis cultivés en présence de PRL ou de GH. De manière très intéressante, la culture d'hépatocytes avec la PRL présente une prolifération plus importante qu'avec la GH (Vergani et al., 1994). Une étude récente montre qu'une injection de PRL, avant une hépatectomie partielle chez le rat adulte, améliore la régénération du foie par une augmentation de la prolifération des hépatocytes et par une meilleure différenciation de ces cellules *via* une augmentation de la liaison entre les facteurs de transcription HNF (Hepatic Nuclear Factor) 1, 3 et 4 à l'ADN (Olazabal et al., 2009). L'hépatectomie partielle chez des rats provoque également une augmentation des concentrations sériques de PRL et est corrélée à une activation de la PKC dans la partie restante du foie (Buckley et al., 1987). Il a été ensuite montré que la PRL active de manière dose et temps dépendant cette protéine kinase (Buckley et al., 1988). La régulation de la PKC par la PRL se fait *via* la formation de diacylglycérol, un lipide de la membrane plasmique activant PKC (Buckley and Buckley, 1991). Par ailleurs, l'activation de PKC par la PRL induit la

prolifération des hépatocytes (Crowe et al., 1991). La PRL a aussi des effets anti-apoptotiques bien décrits. Lors de la cytolyse, de nombreuses enzymes initialement présentes dans le cytoplasme des hépatocytes sont libérées dans la circulation sanguine. Le dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT) et de l'aspartate aminotransférase (ASAT), enzymes impliquées dans le transfert des fonctions amines entre molécules, constituent les marqueurs des dommages causés au foie. A partir de foie de lapin incubé dans une solution Ringer, l'administration de PRL dans la solution ralentit le relargage de l'ALAT et de l'ASAT dans le milieu (Ryszka et al., 2004). Des résultats similaires obtenus à partir de foie de porc suggèrent que la PRL aurait des effets anti-apoptotiques sur les hépatocytes (Dolinska et al., 2011; Ryszka et al., 2011). L'ensemble de ces données confère à la PRL un effet hépatique démontré.

La PRL module également l'activité de nombreuses enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme glucido-lipidique. En effet, l'injection de PRL ovine chez des fœtus de rats augmente l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) hépatique (Machida et al., 1990). Par ailleurs, la PRL semble exercer des effets opposés selon le stade de développement puisque l'addition de PRL dans des culture d'hépatocytes provenant de rats âgés de 5 jours diminue significativement de 20 % l'activité de la LPL (Julve et al., 1996). A partir d'hépatocytes isolés de rat, l'addition de PRL augmente l'activité de la glycogène phosphorylase a, une enzyme responsable de la dégradation du glycogène, *via* une augmentation intracellulaire de la concentration de Ca^{2+} (Villalba et al., 1991).

Les hépatocytes produisent des acides biliaires sécrétés dans l'intestin pour participer à la digestion des macronutriments. Ces acides biliaires sont ensuite transportés par la veine porte jusqu'au foie où ils sont réabsorbés puis recyclés. Des données de la littérature montrent que certains facteurs du cycle entéro-hépatique sont modulés par la PRL suggérant un rôle indirect de la PRL sur la digestion des macronutriments. Les hépatocytes isolés à partir de rate en parturition et mis en culture avec de la PRL captent de manière dose-dépendante plus de taurocholate, un sel biliaire, qu'en absence de cette hormone (Ganguly et al., 1993). La PRL augmente l'expression et l'activité du cotransporteur NA^{+}/taurocholate (ntcp) hépatique, cotransporteur exprimé à la membrane basolatérale de l'hépatocyte qui permet le captage du taurocholate (Ganguly et al., 1994; Liu et al., 1995). La culture d'hépatocytes de rat et de cellules HepG2, une lignée d'hépatocytes humains

provenant d'un carcinome, préalablement transfectés avec la forme longue de R PRL met en évidence l'augmentation transcriptionnelle de ce cotransporteur par la PRL *via* la phosphorylation de STAT5a et STAT5b (Cao et al., 2001a). Pourtant durant la gestation, au moment où la concentration plasmatique des hormones placentaires lactogènes est élevée, aucune modification transcriptionnelle de *ntcp* n'est observée (Ganguly et al., 1993). Il a ainsi pu être mis en évidence que *via* le récepteur ERα les œstrogènes, dont les concentrations sériques sont également élevées durant la gestation, répriment l'augmentation de ntcp induite par la PRL (Cao et al., 2004a). L'excrétion de sels biliaires par l'hépatocyte est également affectée par la PRL puisque le foie provenant de rates ovariectomisées ayant subi une infusion de PRL présente aussi une augmentation de l'expression génique de la pompe d'exportation des sels biliaire (Bsep) (Cao et al., 2001b). L'UDP-glucuronosyltransférase (UGT), une enzyme présente dans le foie, est responsable de la conversion des xénobiotiques et endobiotiques en molécules non toxiques facilitant leur transport puis leur excrétion dans la bile (Burchell et al., 1991). Des rates ovariectomisées traitées avec différentes doses de PRL ont une augmentation dose-dépendante de l'expression et du Vmax de l'activité de l'UGT (Luquita et al., 1996). L'étude menée sur l'impact transcriptionnel de la PRL sur les différentes isoformes de UGT a révélé que la PRL augmentait l'expression génique et protéique de l'isoforme 1A6 (Luquita et al., 2001).

En agissant directement sur le comportement alimentaire et le foie, la PRL module le métabolisme et la balance énergétique. Cette hormone agit également sur le métabolisme énergétique en régulant la fonctionnalité de la cellule β du pancréas et celle de l'adipocyte. Nous verrons ultérieurement et de manière plus approfondie le rôle qu'elle joue sur ces deux types cellulaires.

D/ La souris déficiente en récepteur de la prolactine

1- Le modèle d'étude

Dans le passé, de nombreux modèles animaux avaient été mis au point pour décrypter le rôle de la PRL. 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 un nanisme chez ces souris (Li et al., 1990). Mais, 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 non négligeable de PRL par les tissus extra-hypophysaires. Un modèle de souris déficient en PRL a été développé par l'équipe américaine de Nelson D. Horseman mais ne permet pas d'éliminer entièrement la signalisation de la PRL puisque les PL jouent un rôle majeur dans le développement *via* le R PRL durant la gestation (Horseman et al., 1997). En 1996, notre laboratoire a été le premier à créer un modèle de souris déficientes en R PRL. 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 du messager aboutit à une protéine tronquée et non fonctionnelle. Ce modèle a contribué à mieux décrypter les effets propres de la signalisation PRL sur ses tissus cibles (CJ Ormandy et al., 1997).

2- Phénotype de la souris R PRL$^{-/-}$

Les premiers phénotypes décrits chez les souris femelles R PRL$^{-/-}$ étaient une absence totale de développement de la glande mammaire ainsi qu'une infertilité (CJ Ormandy et al., 1997). En effet, lors de la gestation, la progestérone, synthétisée et secrétée 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 R PRL 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. Le dosage de la progestérone chez les souris R PRL$^{-/-}$ a révélé des concentrations plasmatiques effondrées comparées à celles des souris contrôles (CJ Ormandy et al., 1997). L'addition de

progestérone chez ces souris rétablit totalement l'implantation des œufs fécondés mais ne parvient pas à rétablir le maintien de la gestation jusqu'à son terme (Binart et al., 2000).

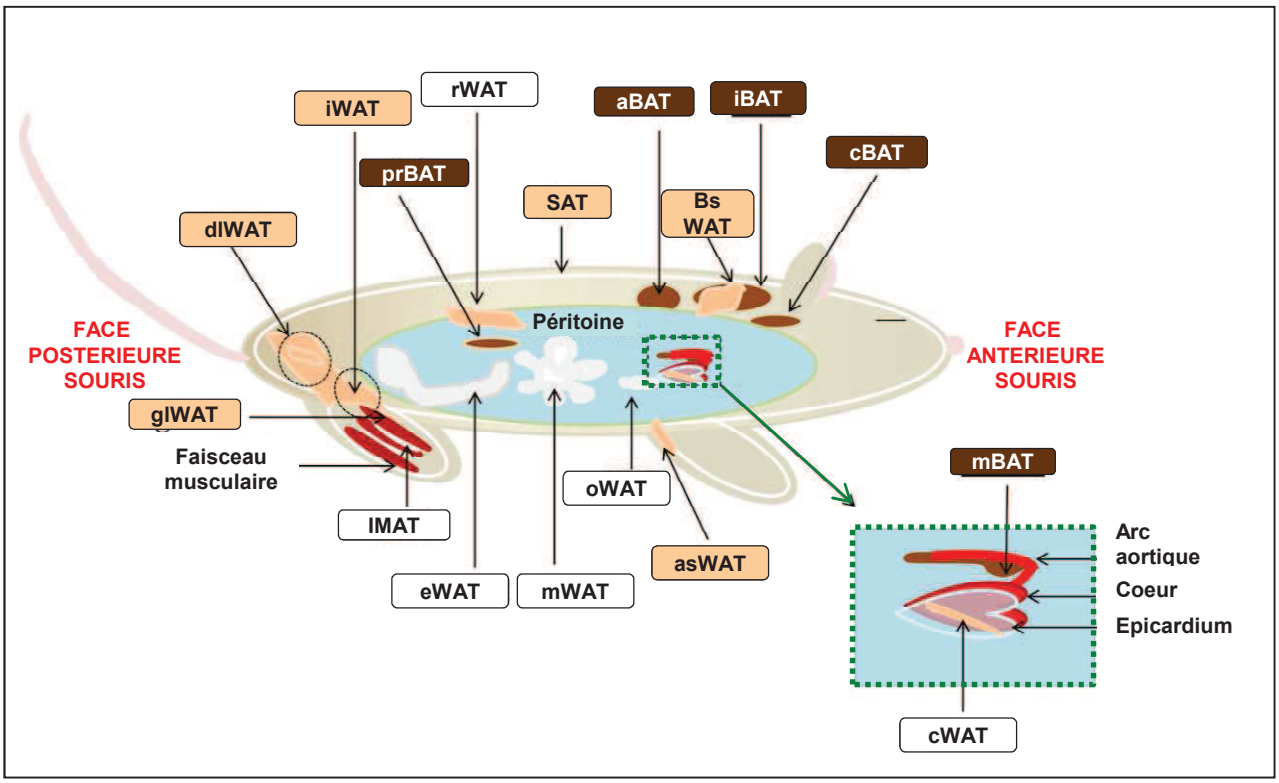
De manière très intéressante, notre laboratoire a montré une très forte mortalité de la première portée issue de souris R PRL$^{+/-}$, 24 heures après la mise bas. Les souriceaux sont déshydratés et une analyse du contenu gastrique montre l'absence de lait suggérant un défaut de la lactation des mères hétérozygotes pour le R PRL. Une analyse histologique de la glande mammaire prélevé sur des souris R PRL$^{+/-}$, 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 (CJ Ormandy et al., 1997).

Par ailleurs, une altération du comportement maternel chez les souris R PRL$^{+/-}$ (Lucas et al., 1998) a été mis en évidence. En 2003, une équipe canadienne a montré que les souris R PRL$^{+/-}$ ont un défaut de la prolifération des progéniteurs neuronaux dans la zone subventriculaire du prosencéphale ainsi qu'une altération de la migration des neurones vers le système olfactif durant la gestation expliquant en partie l'altération du comportement maternel précédemment observé (Shingo et al., 2003).

Les souris R PRL$^{-/-}$ présentent une altération osseuse. Une malformation des *calvariae*, os constituant le crâne, ainsi qu'une diminution de la densité osseuse mesurée par absorptiométrie ont été décrites. Le R PRL s'exprime seulement dans les ostéoblastes (mais pas dans les ostéoclastes), ces résultats suggèrent donc que l'action de la PRL sur les ostéoblastes est importante pour la formation et le maintien de la masse osseuse (Clément-Lacroix et al., 1999).

Un rôle immunorégulateur de la PRL avait été suspecté par des expériences sur des rats hypophysectomisés, où l'altération du système immunitaire pouvaient être rétablie par des injections de PRL (Bouchard et al., 1999). Les souris déficientes en R PRL ne présentent aucune différence tant sur la cellularité du thymus et de la rate que la composition en lymphocytes des organes lymphoïdes primaires et secondaires (Bouchard et al., 1999). A ce jour, les résultats controversés de la littérature ne permettent pas de définir un rôle clair et précis de la PRL dans l'immunorégulation.

La mesure de la concentration circulante de PRL chez les souris R $PRL^{-/-}$ révèle une augmentation (30 à 100 fois) par rapport à celle des souris sauvages. Deux facteurs contribueraient à développer cette hyperprolactinémie : un défaut dans le contrôle inhibiteur dopaminergique et une action anti-proliférative de la PRL sur les cellules lactotropes qui se traduit chez la souris R $PRL^{-/-}$ par l'apparition d'adénome hypophysaire (Schuff et al., 2002).



Tissus adipeux bruns	Tissus adipeux sous-cutanés	Tissus adipeux viscéraux
aBAT: axillaire	asWAT:sous-cutané antérieur	cWAT : cardiaque
cBAT: cervical	bsWAT: sous-cutané dorsal	eWAT: épididymaire
iBAT: interscapulaire	dlWAT: dorsolombaire	IMAT: intramusculaire
mBAT: mediastinal	glWAT: glutéal	mWAT: mésentérique
prBAT: périrénal	iWAT: inguinal	oWAT: omentale
	SAT: subdermique	rWAT: rétropéritoneal

Figure 9: Localisation des différents dépôts adipeux chez la souris

Il existe deux types de dépôts adipeux : bruns (encadrés marrons) et blanc. Les termes « sous cutanés » (encadrés rose saumon) et « viscéraux » (encadrés blancs) sont attribués généralement aux dépôts adipeux blancs selon leur localisation sous la peau ou plus en profondeur au niveau des organes. Les dépôts adipeux interscapulaires, inguinaux, épididymaires et rétropéritonéaux (surlignés en jaune) sont les dépôts les plus étudiés à ce jour.

D'après *Tomas B. Waldén, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab (2011)*

II. Les tissus adipeux

Les tissus adipeux sont composés principalement d'adipocytes et de la fraction stroma vasculaire constituée quant à elle de préadipocytes, de macrophages, de fibroblastes et aussi de cellules épithéliales. Il existe deux catégories de tissus adipeux classées en fonction de leur structure et de leurs rôles : les tissus adipeux blancs et bruns.

L'adipocyte blanc est une cellule dont la quasi-totalité est composée d'une gouttelette lipidique unique, son volume variant selon l'état nutritionnel de l'individu dans des conditions physiologiques. Après un repas, l'excès calorique est stocké principalement dans l'adipocyte sous forme de triglycérides (TG). Mais, lorsque l'apport calorique est inférieur aux dépenses énergétiques, les stocks de lipides préalablement formés sont libérés afin de rétablir l'équilibre de la balance énergétique. La lipogenèse et la lipolyse sont les deux processus de cette régulation (Large et al., 2004). La fonction endocrine de l'adipocyte contribue à réguler de nombreux paramètres métaboliques (Large et al., 2004; Lafontan and Langin, 2009).

Contrairement à l'adipocyte blanc, l'adipocyte brun contient de multiples gouttelettes lipidiques ainsi que de nombreuses mitochondries qui, par leur teneur riche en fer, confère une coloration brunâtre à la cellule (Frontini and Cinti, 2010). Bien que l'adipocyte brun soit une réserve énergétique importante de l'organisme et présente également une fonction endocrine, son rôle principal est la thermogenèse dite de « non frisson » par opposition à la production de chaleur assurée par le frissonnement musculaire. Le tissu adipeux brun est caractérisé par la présence d'un réseau dense de capillaires sanguins et de fibres nerveuses sympathique noradrénergiques (Cinti, 1999).

A/ Localisation et spécificité des différents dépôts adipeux

A ce jour, on dénombre près de 20 dépôts adipeux différents dont la localisation est étroitement liée à la fonction (Figure 9). L'apparition des différents dépôts a lieu de manière séquentielle et permet ainsi à l'organisme de s'adapter aux modifications environnementales au cours du développement et pendant l'âge adulte.

1- Localisation des dépôts adipeux bruns

Chez les mammifères, les premiers dépôts adipeux qui apparaissent sont bruns. Le tissu adipeux brun interscapulaire est le dépôt adipeux brun majoritaire de l'organisme. Il est composé de deux lobes symétriquement disposés entre les omoplates. Chez la souris, ce dépôt est observé dès E17. Ce tissu prolifère jusqu'au sevrage et des injections successives de BrdU aux 3e, 4e et 5e jours après la naissance révèlent au 10e jour que 65% des noyaux sont marqués au BrdU (Staszkiewicz et al., 2009). La formation de ce dépôt permet à l'organisme l'adaptation au froid après la naissance. D'autres dépôts adipeux bruns sont également présents. Le dépôt adipeux cervical est petit et se situe dans la cavité environnant les muscles du cou. Le dépôt axillaire est localisé sous l'omoplate au niveau intermusculaire alors que le tissu adipeux mediastinal est un dépôt intra-thoracique se situant près du coeur. Le dépôt périrénal enrobe le hile rénal, lieu où les artères entrent dans le rein et où les veines et les uretères en sortent (Frontini and Cinti, 2010; Waldén et al., 2012).

2- Localisation des dépôts adipeux blancs

Les dépôts adipeux blancs sont généralement classés en deux sous-groupes selon leur localisation viscérale (entourant les organes internes de l'organisme) ou sous-cutanée (sous la peau). Chez la souris, les dépôts inguinaux commencent à apparaître à la naissance alors que les dépôts viscéraux se développent seulement 10 jours plus tard (Kozak, 2011).

Dépôts sous-cutanés

Le dépôt inguinal (iWAT) est considéré comme le tissu adipeux sous-cutané le plus important de l'organisme en termes de masse. Il se situe au niveau dorsal et descend le long du bassin vers la cuisse du membre postérieur. Le dépôt sous-cutané antérieur (asWAT) se trouve dans les membres supérieurs, entre la peau et le segment inférieur du muscle postérieur. Le dépôt sous cutané dorsal (bsWAT) est à proximité du tissu adipeux brun interscapulaire et les dépôts glutéaux (gWAT) et dorso lombaires (dWAT) dans la région postérieure sont souvent assimilés au dépôt inguinal. Le dépôt adipeux subdermique (SAT) est une fine couche de tissu tapissant l'intérieur de la peau (Frontini and Cinti, 2010; Waldén et al., 2012).

Dépôts viscéraux

Le dépôt épididymaire (eWAT) est le plus imposant des dépôts viscéraux puisque sa masse est approximativement de 700 mg chez la souris. Il n'est présent que chez le mâle et s'apparente chez les femelles au dépôt péri-ovarien. Le dépôt omental (oWAT) est plus petit et borde la partie inférieure de l'estomac. Le dépôt cardiaque (cWAT) est, quant à lui, un mince tissu partant du ventricule gauche du cœur jusqu'à son sommet. Enfin, le dépôt mésentérique (mWAT) et le dépôt rétropéritonéal tapissent (rWAT) respectivement la surface de l'intestin et la paroi dorsale près des reins. Le dépôt adipeux intramusculaire (IMAT) est localisé entre les faisceaux musculaires (Frontini and Cinti, 2010; Waldén et al., 2012).

La formation de tous les tissus blancs, quelle que soit leur localisation, fait intervenir des processus de détermination et de différenciation qui sont communs.

B/ Détermination et différenciation des adipocytes blancs

Un régime conduisant au développement de l'obésité provoque une augmentation de la taille des adipocytes puis dans un deuxième temps à une augmentation du nombre de ces cellules (Faust et al., 1978). En mesurant dans les dépôts adipeux humains l'incorporation de ^{14}C dans l'ADN, causée par l'augmentation de la concentration atmosphérique de cet isotope lors des essais nucléaires effectués entre 1955 et 1963, il a été possible de déterminer que le taux de renouvellement des adipocytes chez l'Homme avoisinait les 10% par an (Spalding et al., 2008). La capacité d'adaptation et de renouvellement du tissu adipeux nécessite l'apparition de nouveaux adipocytes fonctionnels dont le processus est contrôlé par de nombreux acteurs moléculaires (Cristancho and Lazar, 2011).

1- Détermination adipocytaire blanche

La première étape de la différenciation adipocytaire consiste en la détermination des cellules souches mésenchymateuses multipotentes en adipoblastes puis en préadipocytes.

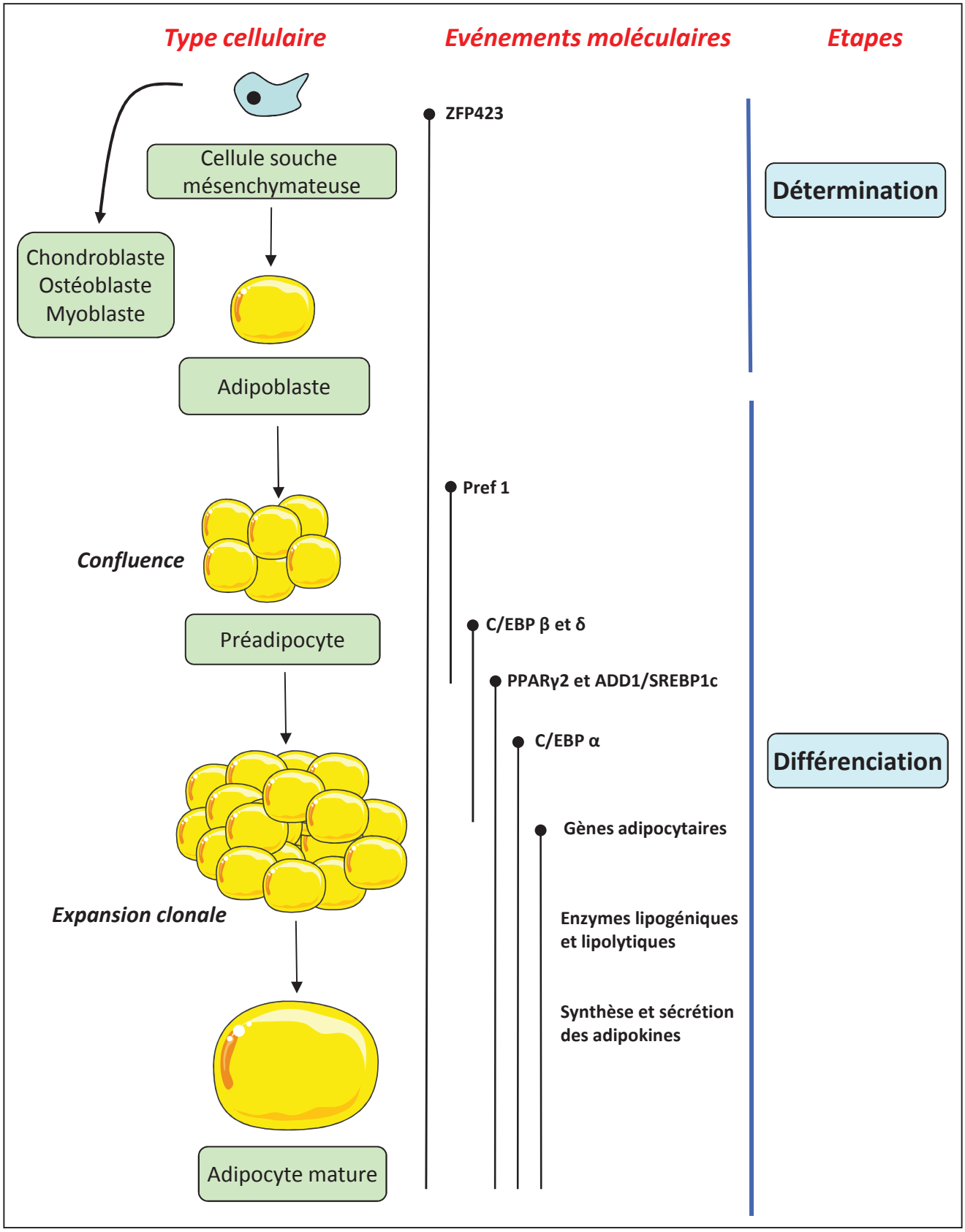


Figure 10: Détermination et différenciation de l'adipocyte blanc

La détermination des cellules souches mésenchymateuses en adipoblastes puis en préadipocytes s'effectue *via* l'expression de facteurs de transcription tels que ZFP423. La différenciation des préadipocytes en adipocytes matures, appelée également adipogenèse, est contrôlée par de nombreux facteurs de transcription et de corégulateurs tels que les C/EBP, PPARγ2 et ADD1/SREBP1c dont l'expression est finement régulée au cours de cette différenciation.

D'après *Bruno Fève, Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.(2005)*

Tous les adipocytes proviennent de ces cellules souches qui peuvent également donner naissance à des myoblastes, des chondroblastes et des ostéoblates (Tang et al., 2008). L'absence de modèle d'étude empêche de connaître l'ensemble des facteurs moléculaires impliqués dans cette détermination. Néanmoins, il a été montré récemment que ZFP423 (Zinc Finger Transcription factor 423) est essentiel à la détermination adipocytaire puisque l'induction de son expression dans des fibroblastes non-adipogéniques NIH-3T3 détermine ces cellules vers un lignage adipocytaire (Figure 10). De plus, ZFP423 est indispensable à la différenciation des cellules adipogéniques 3T3-L1. (Gupta et al., 2010).

Une fois engagés dans le lignage adipocytaire, les préadipocytes subissent une expansion clonale puis une différenciation terminale, appelée également adipogenèse, permettant la maturation des adipocytes et leur conférant des propriétés lipogéniques, lipolytiques et endocriniennes (Fajas, 2003). L'existence de nombreux modèles cellulaires tels que les cellules 3T3-L1 ou la culture primaire de préadipocytes issus de la fraction stromale vasculaire de dépôts adipeux a permis de découvrir les facteurs moléculaires impliqués dans la formation d'adipocytes matures fonctionnels.

2- Les facteurs de transcription-clé de l'adipogenèse blanche

L'adipogenèse est un processus complexe faisant intervenir de nombreux facteurs de transcription et de corégulateurs dont l'expression varie au cours du temps (Figure 10). Pref-1 (Preadipocyte factor 1) est une protéine codée par le gène *Dlk1*, exprimé spécifiquement dans le préadipocyte. Pref-1 active la voie des MAPK/Erk, permettant le maintien de l'expression de Sox9 (sex determining region Y-box 9), un facteur exprimé également dans le préadipocyte réprimant l'adipogenèse par l'inhibition des isoformes β et δ des CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBP). L'extinction de l'expression de Pref-1 est nécessaire pour l'initiation de la transcription des facteurs-clé de l'adipogenèse (Sul, 2009).

CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBP)

Les facteurs C/EBPs sont des facteurs de transcription qui se lient directement à l'ADN et interagissent avec d'autres partenaires *via* un motif « leucine zipper ». Trois isoformes de C/EBP (α, β, δ) sont des acteurs importants de l'adipogenèse (Yeh et al., 1995).

Au début de la différenciation terminale, l'augmentation de la concentration d'AMPc intracellulaire provoque la phosphorylation de CREB (cAMP response element-binding) qui se fixe ensuite sur les sites de liaison aux éléments CREB du promoteur proximal de C/EBPβ pour initier la transcription de ce gène (Yeh et al., 1995; Zhang et al., 2004). Les glucocorticoïdes régulent l'activité transcriptionnelle de ce gène en favorisant l'acétylation de ce dernier par l'histone acétyltransferase PCAF/GCN5 (Wiper-Bergeron et al., 2007). La phosphorylation de C/EBPβ sur la thréonine 188 par les MAPK ainsi que sur la sérine 184 et la thréonine 179 par GSK3β (Glycogen Synthase Kinase 3β) permet à ce facteur de transcription de se lier à l'ADN afin d'engager la transcription de gènes cibles comme *PPARγ et C/EBPα* (Park et al., 2004; Tang et al., 2004). l'expression ectopique de C/EBPβ dans des cellules NIH-3T3 convertit ces dernières en adipoblastes et déclenche la transcription de PPARγ démontrant le rôle crucial de C/EBPβ dans l'initiation de l'adipogenèse (Wu et al., 1995; Yeh et al., 1995). La plupart des souris déficientes en C/EBPβ et δ meurent à la naissance et les souris adultes survivantes présentent une diminution importante de la masse du tissu adipeux (Tanaka et al., 1997).

Les isoformes β et δ s'expriment précocement au cours de la différenciation terminale des préadipocytes alors que C/EBPα apparaît pendant les étapes tardives de l'adipogenèse (Yeh et al., 1995). C/EBPα est un facteur crucial de l'adipogenèse puisque la délétion de ce gène chez des souris entraine un défaut du stockage énergétique sous forme de lipides dans les tissus adipeux (Wang et al., 1995). Par ailleurs, il forme un complexe avec PPARγ qui contrôle l'expression des gènes impliqués dans la régulation de certains paramètres métaboliques comme la sensibilité à l'insuline (Wu et al., 1999).

Peroxysome Proliferative Activated Receptor γ (PPARγ)

En 1990, un nouveau récepteur nucléaire fut cloné à partir d'extraits hépatiques de souris. Son activation conduit à la prolifération des peroxysomes, organites cellulaires impliqués dans la détoxification de la cellule. Le nom de Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) lui fut alors attribué (Issemann and Green, 1990). Sa liaison sur les élements de réponse PPRE (peroxisome proliferator response element) nécessite une dimérisation avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR : retinoid X receptor) (Issemann et al., 1993). Certains lipides sont des ligands naturels de PPARγ (Tontonoz et al., 1998) . Il existe plusieurs

types de PPARs (α, β/δ et γ) exprimés de manière spécifique dans différents tissus (Berger and Moller, 2002).

En 1994, l'équipe de Bruce Spiegelman a montré que PPARγ2 était un récepteur nucléaire essentiel à l'adipogenèse s'exprimant spécifiquement dans l'adipocyte (Tontonoz et al., 1994). Des cellules souches embryonnaires murines déficientes pour ce gène sont incapables de se différencier en adipocytes matures comparé aux cellules contrôles. De plus des souris chimériques, obtenues par injection de cellules souches déficientes en PPARγ2 dans des blastocystes, présentent une altération majeure du développement de tous les dépôts adipeux (Rosen et al., 1999). L'utilisation de thiazolidinedione, une molécule hypoglycémiante, sur des cultures de cellules souches engage ces cellules vers un lignage adipocytaire. La démonstration que cette molécule peut se lier à PPARγ a permis de le définir comme un agoniste de ce récepteur (Lehmann et al., 1995). L'activité adipogénique de PPARγ2 est fortement liée à la formation de complexes avec d'autres récepteurs et corégulateurs et place ce récepteur nucléaire au carrefour important de l'adipogenèse. PPARγ2 peut s'hétérodimériser avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) (Kliewer et al., 1992) et interagir avec des corégulateurs tels que SRC-1 (Zhu et al., 1996) et CBP/p300 (Blanco et al., 1998) qui modulent son activité transcriptionnelle.

ADD1/SREBP1c

ADD1/SREBP-1c (Adipocyte Determination and Differentiation Factor 1/Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c) appartient à la famille des facteurs à motif bHLH-LZ (basic helix-loop-helix-leucine zipper). ADD1/SREBP-1c favorise l'expression de PPARγ2 et améliore son activité transcriptionnelle par la production d'un ligand endogène (Kim et al., 1998). Le complexe ADD1/SREBP se lie aux séquences spécifiques de l'ADN (5'-CANNTG-3'), appelées boîtes E, du promoteur de PPARγ et exerce une action trans-activatrice (Fajas et al., 1999). Ce facteur permet l'expression des enzymes lipogéniques telles que l'acétyl-coA Carboxylase (ACC) et la FAS (Fatty Acid Synthase). Dans les adipocytes de poulet, la surexpression d'ADD1/SREBP1c par infection d'un adénovirus stimule ces deux enzymes lipogéniques alors que la surexpression d'un dominant négatif d'ADD1/SREBP1c chez le porc diminue significativement leur expression (Gondret et al., 2001). L'expression spécifique de ces deux enzymes dans l'adipocyte est essentielle au stockage énergétique. De nombreux

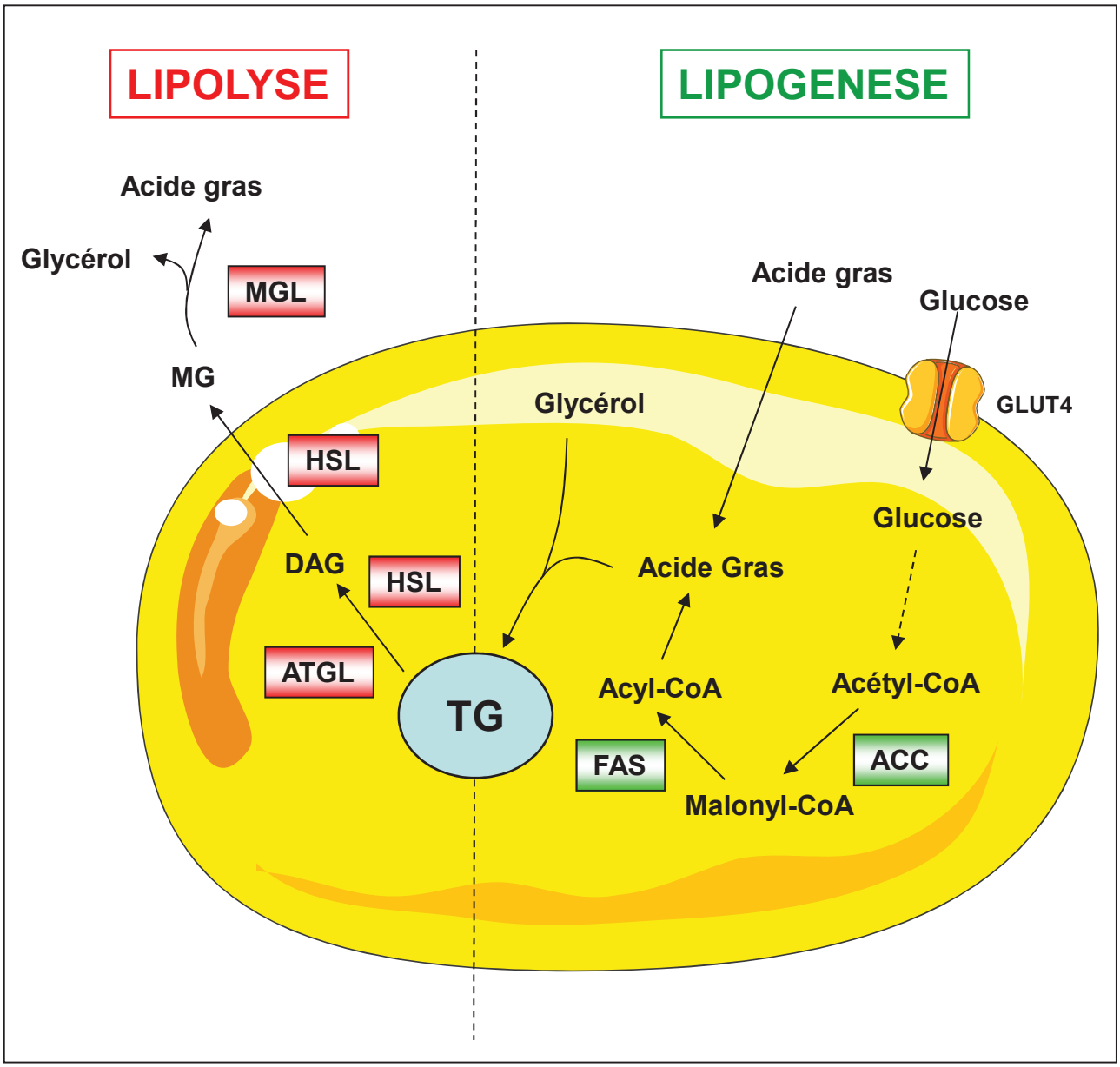


Figure 11: Lipogenèse et lipolyse de l'adipocyte blanc

Le tissu adipeux stocke l'excès énergétique sous forme de triglycérides (TG) à partir d'acides gras et de glucose par l'intérmédiaire d'enzymes impliquées dans la lipogenèse (vert) telles que FAS (Fatty Acid Synthase) et ACC (Acetyl-Coa carboxylase). Cette énergie peut être déstockée par la dégradation des TG via les enzymes de la lipolyse (rouge) telles que ATGL (Adipose Triglyceride Lipase), HSL (Hormone Sensitive Lipase) et MGL (Monoglyceride Lipase).

autres acteurs sont également impliqués dans le processus de différenciation adipocytaire (Cristancho and Lazar, 2011).

C/ Fonctions du tissu adipeux

1- Lipolyse et lipogenèse

Le statut nutritionnel ainsi que la variation des concentrations sériques d'hormones telles que le glucagon et l'insuline sont les principaux facteurs régulant la lipolyse et la lipogenèse (Large et al., 2004; Lafontan and Langin, 2009) (Figure 11).

Dans les conditions physiologiques, l'excès de glucose et d'acides gras apporté par l'alimentation est stocké sous forme de triglycérides majoritairement dans l'adipocyte. Ces processus, appelés lipogenèse et estérification des acides gras, se déroulent dans le foie chez l'Homme et ont lieu également dans l'adipocyte chez le rongeur. Une partie du glucose en excès entre dans l'adipocyte par le transporteur GLUT4 (Glucose Transporter 4). La dégradation du glucose par la glycolyse fournit l'acétyl-coA comme substrat nécessaire à la première réaction de la synthèse des acides gras effectuée par ACC. La FAS produit des acides gras par l'addition de groupements acétyl sur le malonyl-CoA formé préalablement par la réaction de l'ACC. Les micelles obtenues par la digestion des lipides provenant de l'alimentation vont s'associer aux protéines du réticulum endoplasmique de l'entérocyte pour former les chylomicrons. La LPL, s'exprimant à la paroi des cellules composant l'épithélium vasculaire notamment au niveau de l'adipocyte, hydrolyse les chylomicrons et d'autres lipoprotéines présentes dans la circulation sanguine. Ainsi, le passage des lipoprotéines à proximité des adipocytes induit une hydrolyse par les LPL et libère ainsi des acides gras qui seront immédiatement captés par l'adipocyte. Enfin, la formation de triglycérides se fait par l'addition de trois acides gras, synthétisés à partir d'acétyl-CoA ou venant directement des lipoprotéines, à une molécule de glycérol par une succession de réactions biochimiques (Large et al., 2004; Lafontan and Langin, 2009).

En période de jeûne, les TG prélablement formés sont hydrolysés en acide gras et en glycérol pour fournir l'énergie nécessaire aux tissus périphériques. Le diacylglycérol (DAG), formé par l'hydrolyse des TG par L'ATGL (Adipose Triglyceride Lipase), est séquentiellement

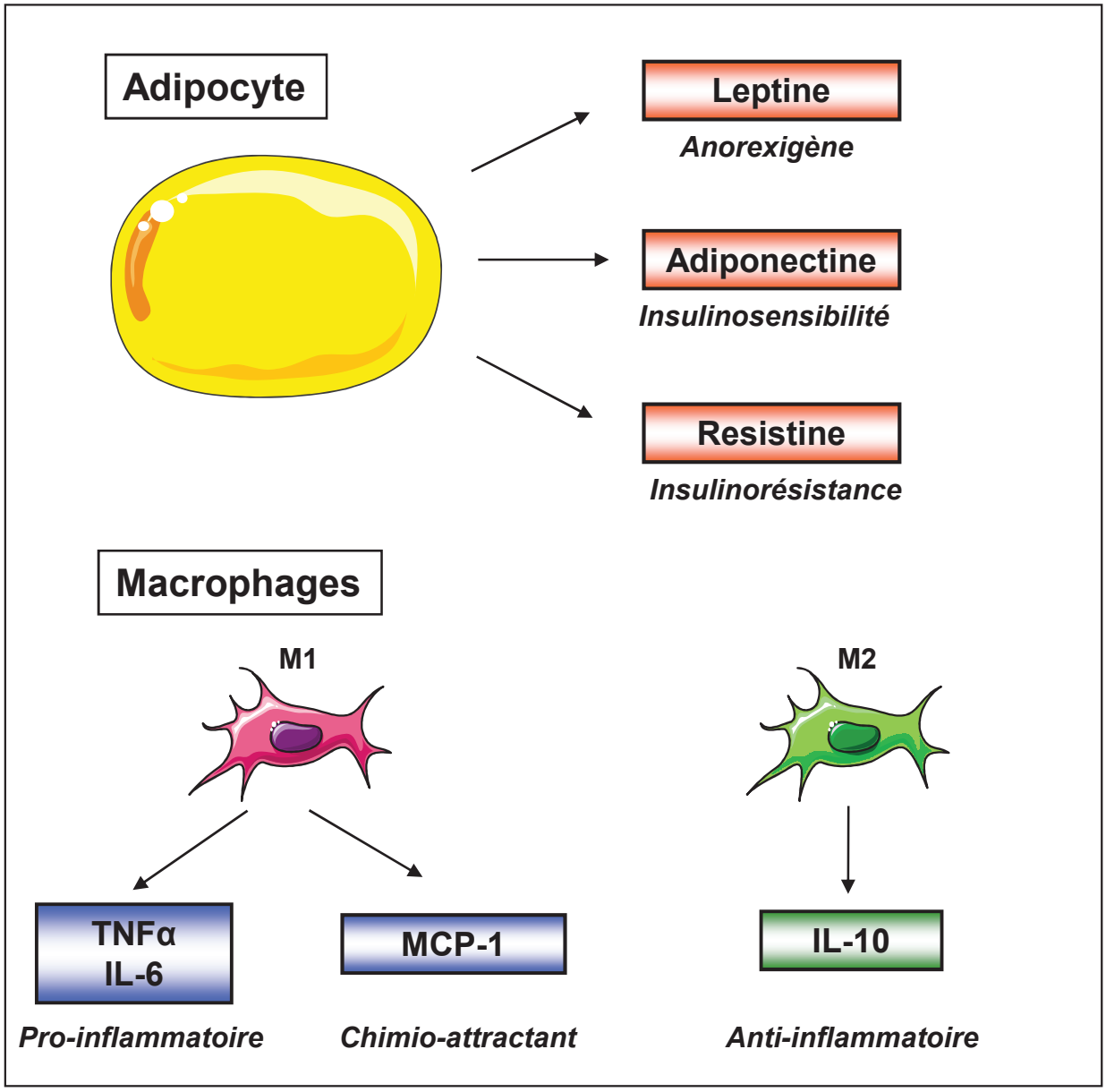


Figure 12: Les principales adipokines et cytokines du tissu adipeux blanc chez la souris

L'adipocyte produit et sécrète de nombreuses adipokines (rouge). La leptine est une hormone impliquée dans la régulation de la prise alimentaire. L'adiponectine et la résistine ont des effets antagonistes sur la signalisation de l'insuline. Les macrophages présents dans le tissu adipeux blanc produisent également de nombreuses molécules régulatrices de paramètres métaboliques. Les macrophages de type M1 produisent et sécrètent des cytokines pro-inflammatoire telles que TNFα et IL6 et une protéine impliquée dans le recrutement de macrophages appelée MCP-1 (Monocyte chimoattractant protein 1) (bleu). Les macrophages de type M2 produisent et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10 (vert).

catalysé par la lipase hormono-sensible (HSL) puis par la MGL (monoglycéride lipase) afin de libérer des acides gras libres et du glycérol. Les acides gras sont alors acheminés de l'adipocyte à la circulation sanguine et sont transportés, grâce à l'albumine, aux tissus périphériques pour y être oxydés ou bien estérifiés (Large et al., 2004; Lafontan and Langin, 2009) (Figure 11).

2- Fonction endocrine

L'adipocyte a longtemps été considéré uniquement comme une cellule stockant l'énergie de l'organisme. Dès 1959, il a été suggéré que le tissu adipeux avait une fonction endocrine. Des expériences de circulation croisée menées entre un rat rendu obèse, par une lésion hypothalamique, et un rat contrôle a montré que le rat contrôle avait une diminution de la prise alimentaire corrélée à un amaigrissement suggérant qu'un facteur plasmatique régulait la satiété (Hervey, 1959). Trente cinq ans plus tard, l'obtention de nouvelles données a permis de démontrer clairement que l'adipocyte jouait un rôle majeur sur le métabolisme grâce à la synthèse et à la sécrétion de peptides, appelés plus généralement adipokines (Figure 12).

Leptine

Friedman a montré, pour la première fois en 1994 chez la souris, que l'adipocyte était capable de secréter une hormone, la leptine (Zhang et al., 1994). Cette dernière fut décrite comme ayant un rôle anorexigène en agissant directement sur les noyaux arqués de l'hypothalamus. Son action sur la satiété et les mutations de cette protéine (Montague et al., 1997; Strobel et al., 1998) et de son récepteur (Clément et al., 1998) décrites quelques années plus tard chez l'Homme ont permis de démontrer son implication dans le développement de l'obésité. A l'issue de ces découvertes, l'adipocyte est maintenant aussi considéré comme une glande endocrine.

L'adiponectine

La découverte de l'adiponectine simultanément par 4 équipes indépendantes en utilisant différentes approches lui valut différentes appellations : AdipoQ, Acrp30, apM1 et GBP28 (Kadowaki and Yamauchi, 2005). Alors que le rôle physiologique de cette hormone était ignoré, il a été montré l'existence d'une corrélation négative entre les concentrations

plasmatiques d'adiponectine et la masse du tissu adipeux chez l'Homme et chez le rongeur (Hu et al., 1996). Grâce à la résolution de la structure de l'adiponectine, il a été montré que cette hormone s'homotrimérisait pour former un complexe protéique de 90 kDa (Shapiro and Scherer, 1998). La chute de la glycémie observée après une seule injection d'adiponectine recombinante chez la souris et l'amélioration de la signalisation de l'insuline sur des cultures d'hépatocytes en présence d'adiponectine suggéraient un rôle majeur de cette hormone dans l'insulinosensibilité (Berg et al., 2001). La diminution de la production hépatique de glucose par infusion d'adiponectine recombinante durant un clamp euglycémique ainsi que la diminution des enzymes de la néoglucogenèse G6P (Glucose 6 Phosphatase) et PEPCK (Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase) par cette hormone ont alors confirmé cette hypothèse (Combs et al., 2001). L'utilisation de thiazolidinediones, améliorant la sensibilité à l'insuline chez des patients obèses, augmente la production d'adiponectine (Maeda et al., 2001). Ce n'est seulement qu'en 2007, que les effets insulinosensibilisateurs de l'adiponectine *via* ses deux récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 ont été mis en évidence, ils dépendent de l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein Kinase) et d'une réduction de l'activité de la voie mTOR/S6K (Mammalian Target OF Rapamycin/S6 Kinase) (Wang et al., 2007).

La résistine

En 2001, la résistine, un nouveau peptide produit par les adipocytes humains et murins, a été découverte (Steppan et al., 2001) et une analyse par PCR quantitative a permis de montrer qu'elle s'exprimait chez l'Homme seulement dans les macrophages du tissu adipeux. En outre la roziglitazone, un autre agoniste de PPARγ, diminue l'expression de ce facteur (Patel et al., 2003). De plus, des souris obèses ont des concentrations circulantes élevées de résistine (Rajala et al., 2004). Les souris soumises à un régime gras pendant trois semaines développent une insulinorésistance accompagnée d'une augmentation de la production hépatique de glucose et de la résistine plasmatique comparée à celle des souris contrôles. La diminution de sa concentration plasmatique, par l'utilisation *in vivo* d'un oligonucleotide anti-sens , rétablit la sensibilité à l'insuline ainsi que la néoglucogenèse vers des valeurs similaires à celles des souris contrôles (Muse et al., 2004). Ces résultats sont aussi retrouvés chez des souris déficientes pour le gène codant pour la résistine. Ces souris présentent une activation hépatique de l'AMPK suggérant que la résistine exerce ses rôles

par une inhibition de cette protéine (Banerjee et al., 2004). La résistine pourrait participer à la résistance à la leptine puisqu'elle augmente la transcription de SOCS-3 dans les cellules 3T3-L1 (Steppan et al., 2005), ce qui a aussi été démontré dans les cellules épithéliales humaines (Pirvulescu et al., 2012).

Les macrophages présents dans le tissu adipeux participent à son inflammation notamment dans des conditions physiopathologiques comme l'obésité *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

Tumor Necrosis Factor-α (TNFα)

Cette cytokine de 26 kDa exprimée à la membrane des cellules peut être clivée par une métalloprotéase qui libère une forme soluble de TNFα de 17 kDa (Kriegler et al., 1988). L'analyse des différentes sous-populations cellulaires du tissu adipeux a montré que l'augmentation de la production de TNFα produit par le tissu adipeux au cours de l'obésité était principalement due à une infiltration macrophagique de type M1 (Weisberg et al., 2003). Cette cytokine altère la signalisation de l'insuline dans les cellules hépatiques, musculaires et adipeuses par l'activation de la sérine kinase JNK (c-Jun-N-terminal kinase), qui inhibe l'activité d'IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1) en la phosphorylant (Kanety et al., 1995).

Interleukine6 (IL-6)

L'IL-6 est une cytokine pléïotrope qui appartient à la famille des glycoprotéines 130 (gp130) et est essentiellement produite par les macrophages du tissu adipeux. Sa liaison au récepteur (IL-6R) conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation dont les voies Jak/STAT, PI3K/AKT et celle des MAPK. Elle est considérée comme un régulateur de la réaction inflammatoire stimulant les lymphocytes. De plus, elle est fortement impliquée dans la régulation homéostasique, notamment sur l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien et le métabolisme glucidique (Yamamoto and Rose-John, 2012).

3- La thermogenèse, une spécificité du tissu adipeux brun

Rôle de l'adipocyte brun

Bien que l'adipocyte brun stocke les lipides et secrète des adipokines, son rôle essentiel est de réguler la température de l'organisme en produisant de la chaleur. En 1976,

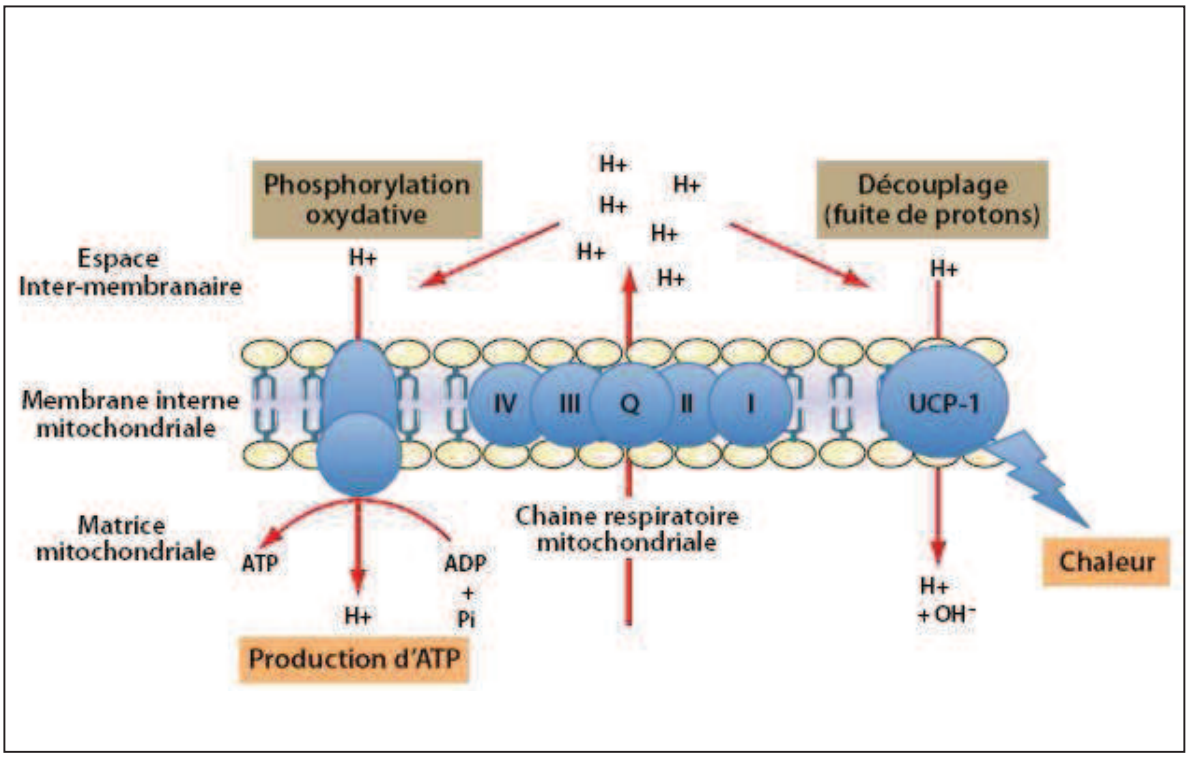


Figure 13: Fonction thermogénique de la protéine UCP1 dans la phosphorylation oxydative

Le catabolisme des cofacteurs $NADH,H^+$ et $FADH_2$ par la phosphorylation oxydative entraîne la formation d'un gradient électrochimique, entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale, dont l'énergie est transférée au complexe ATP synthase afin de produire de l'ATP. En revanche l'énergie se dissipe sous forme de chaleur en présence d'UCP1, une protéine découplant ce gradient électrochimique.

D'après *Bertrand Cariou , Médecine Clinique endocrinologie & diabète (2012)*

La découverte d'UCP1 (Uncoupling Protein 1), un canal à protons situé sur la membrane interne de la mitochondrie, a permis de mieux comprendre l'activité thermogénique des adipocytes bruns (Ricquier and Kader, 1976) (Figure 13). En absence d'UCP1, le catabolisme des cofacteurs $NADH,H^+$ (nicotinamide adénine dinucléotide) et $FADH_2$ (Flavine adénine dinucléotide), respectivement par le complexe I et II, situé sur la membrane interne de la mitochondrie, provoque une succession de réactions d'oxydo-réduction le long de la chaine respiratoire, et la formation d'un gradient électrochimique par le passage des protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire. Le complexe ATPase utilise cette force électrochimique pour former de l'ATP en présence d'ADP et de phosphate inorganique. La protéine de découplage UCP1 provoque une fuite des protons de l'espace intermembranaire jusqu'à la matrice de la mitochondrie. Les protons traversant ce canal ne peuvent plus transférer l'énergie électrochimique au complexe ATPase pour phosphoryler l'ADP, dissipant alors cette énergie sous forme de chaleur (Jarmuszkiewicz et al., 2010).

Activation du tissu adipeux brun

L'augmentation de l'activité thermogénique du tissu adipeux est principalement contrôlée par la sécrétion de catécholamines par les terminaisons nerveuses sympathiques activant les récepteurs adrénergiques β3 (β3-AR) présents sur la surface des adipocytes. Cette activation stimule l'expression d'UCP1 par l'activation de la voie de signalisation PKA (Bartness et al., 2010). Les nombreuses études visant à décrypter les mécanismes d'activation du tissu adipeux brun se sont principalement focalisées sur le dépôt interscapulaire ce qui a permis de mettre en évidence le rôle de l'innervation de ce tissu.

Le tissu adipeux brun possède un réseau important de fibres nerveuses catécholaminergiques. Afin de détecter leur origine, des hamsters sibériens ont subi des injections du virus de la pseudorage (PrV) dans le dépôt interscapulaire. Le PrV est un traceur rétrograde transneuronal viral puisqu'il commence son développement dans les terminaisons neuronales et poursuit sa multiplication *via* l'axone jusqu'au corps cellulaire. L'analyse immunohistochimique de différentes coupes de tissus d'hamster sibérien a permis de retrouver des neurones infectés dans la moelle épinière, le tronc cérébral, le mésencéphale, et le cerveau antérieur. Cela a ainsi démontré l'existence d'une

communication entre le SNC et le tissu adipeux brun (Bamshad et al., 1999). Des expériences complémentaires de marquage du virus et d'hybridation *in situ* pour le transcrit de MC4-R sur des coupes de cerveau d'hamster sibérien montrent que 70% des neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus marqués par le virus colocalisent avec une expression endogène du transcrit MC4R (Song et al., 2008). Une injection dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus d'un agoniste au MC4-R augmente la température du tissu adipeux brun interscapulaire (Brito et al., 2007). La dénervation chirurgicale de ce tissu adipeux brun empêche l'augmentation de l'expression d'UCP1 et de la biogenèse mitochondriale normalement observées lors d'une exposition au froid. Elle est partiellement restaurée par l'administration de norépinephrine. Cette augmentation de la masse et de l'activité thermogénique du tissu adipeux brun interscapulaire est observée lors d'un régime gras chez le rat et la dénervation de ce tissu abolit ces modifications (Rothwell and Stock, 1984). Ces résultats montrent l'importance de cette communication étroite entre le SNC et le tissu adipeux brun *via* les neurones MC4-R de l'hypothalamus dans le contrôle de l'activité du dépôt adipeux interscapulaire. Des immunomarquages pratiqués sur des coupes de dépôts adipeux bruns interscapulaires ciblant des marqueurs spécifiques de l'innervation sensitive ont montré la présence de fibres nerveuses sensitives dans ce dépôt ce qui pourrait former une boucle d'autorégulation de l'activité du dépôt (Lever et al., 1988). Très récemment, il a été mis en évidence chez des souris que les neurones gabaergiques du noyau arqué de l'hypothalamus contrôlaient l'activité thermogénique du tissu adipeux brun interscapulaire (Kong et al., 2012).

Néanmoins, l'activité neuronale ne semble pas être uniquement contrôlé par le SNC puisqu'un nouveau mécanisme indépendant de l'innervation du tissu adipeux brun a été découvert : l'exposition au froid des souris provoque une activation alternative des macrophages (type M2) présents dans ce tissu *via* IL-4, qui secrètent ensuite des catécholamines induisant l'expression de gènes impliqués dans la thermogenèse par les adipocytes (Nguyen et al., 2011).

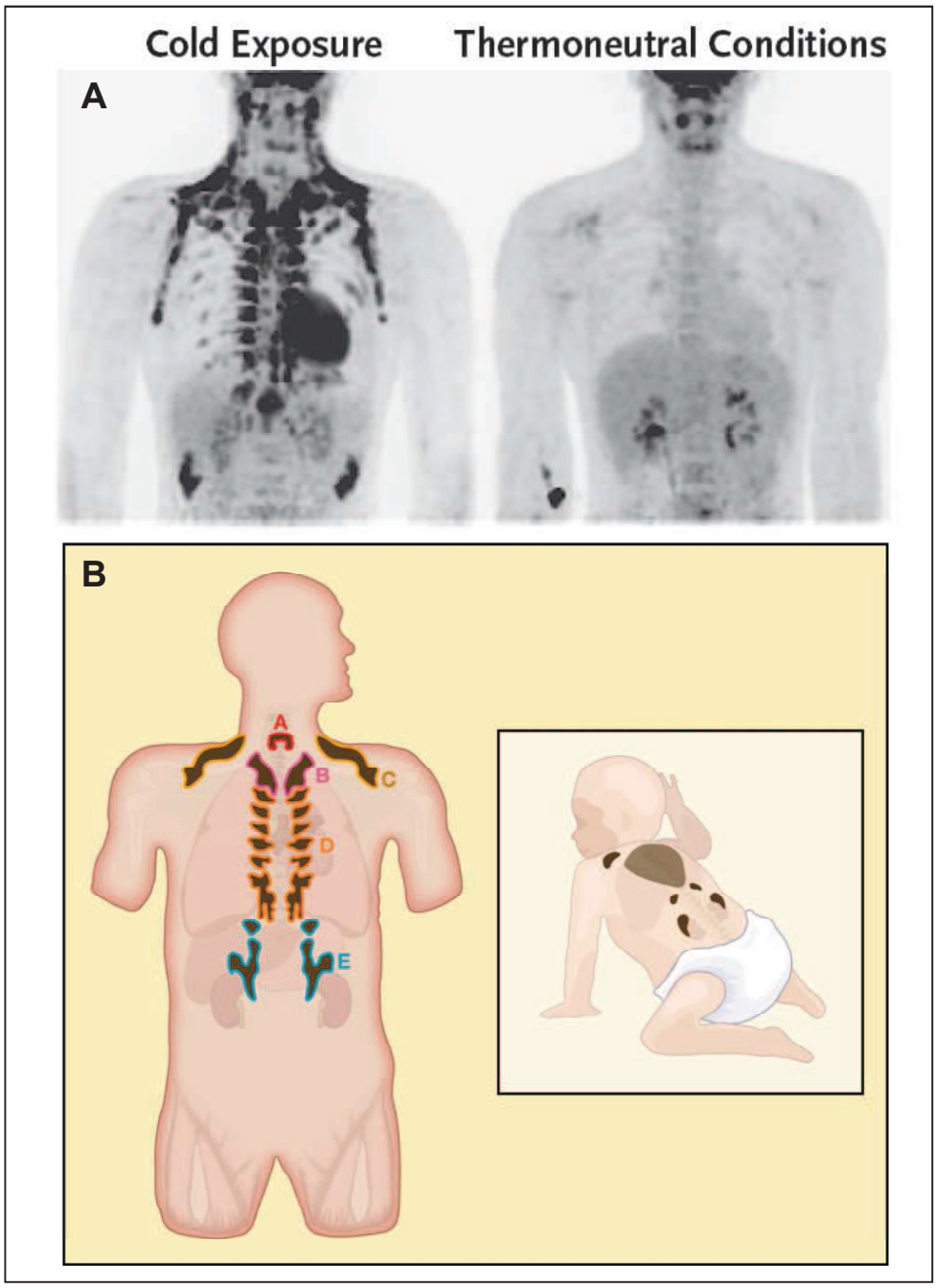


Figure 14: Localisation des différents dépôts adipeux bruns fonctionnels chez l'Homme

(A) Localisation du tissu adipeux brun fonctionnel chez l'adulte par PET-SCAN.
D'après *Wouter D. van Marken Lichtenbelt, et al. New England Journal of Medicine (2009)*
(B) Chez le nourrisson, le tissu adipeux brun est majoritairement localisé en interscapulaire. Chez l'adulte, le tissu adipeux brun est localisé dans les régions (A) trachéales, (B), médiastinales, (C) paracervicales/ supraclaviculaires, (D) parathoraciques, (E) et périrénales.
D'après *Sven Enerbäck, Cell Metabolism (2010)*

Le tissu adipeux brun chez l'Homme

Jusque très récemment, la communauté scientifique pensait que le rôle physiologique de ce tissu était restreint chez l'Homme et le rongeur aux adaptations post-natales. Il avait été ainsi montré que ce tissu permettait de produire de la chaleur juste après la naissance offrant la possibilité à l'organisme de s'adapter aux conditions de froid. Après le sevrage, ce tissu adipeux ne se développe quasiment plus. Ces observations avaient entrainé une controverse sur la pertinence physiologique de ce tissu poussant une partie de la communauté scientifique à ne pas considérer son activité chez l'adulte. Mais en 2009, les énormes progrès techniques acquis en imagerie par la maîtrise du scan par tomographie par émission de positrons ont simultanément permis à trois équipes de démontrer la présence d'un tissu adipeux brun fonctionnel chez l'Homme (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). L'injection de fluorodéoxyglucose (FDG), un analogue radioactif et non-métabolisable du glucose, a permis de visualiser les zones métaboliquement actives par la captation tissulaire de ce produit. L'injection de FDG chez des patients sains soumis à une exposition au froid a permis de révéler de nouvelles zones métaboliquement actives au niveau trachéal, médiastinal, paracervical, supraclaviculaire, parathoracique et périrénal (Figure 14). De plus, la présence de la protéine UCP1 dans les biopsies prélevées dans ces zones actives a confirmé la présence de tissu adipeux brun chez l'Homme. Le tissu adipeux brun joue un rôle majeur dans la dépense énergétique. Cette découverte a aussitôt stimulé la communauté scientifique pour mieux comprendre et décrypter les mécanismes de thermorégulation ainsi que le processus de différenciation adipocytaire.

Les adipocytes thermocompétents : des cibles thérapeutiques pour lutter contre le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est un désordre de la balance énergétique résultant d'une altération des organes-clé du métabolisme comme le foie, le pancréas, le muscle et les dépôts adipeux. La récente découverte de la présence de dépôts adipeux thermo-actifs chez l'Homme a poussé la communauté internationale à considérer l'adipocyte brun comme une cible potentielle pour lutter efficacement contre l'obésité. En effet, l'action thermogénique de ces dépôts permettrait de libérer l'excès des stocks énergétiques sous forme de chaleur

chez des patients obèses. Ces données ont suscité un intérêt majeur dans le développement des thérapies visant à augmenter le nombre d'adipocytes thermo-compétents et ont relancé de manière considérable les recherches visant à comprendre les mécanismes impliqués dans la formation de ces derniers.

D/ Différenciation des adipocytes bruns et beiges

1- Origines des précurseurs des adipocytes

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'adipogenèse blanche fait intervenir de nombreux facteurs de transcription et de corégulateurs. Des données récentes ont permis de mieux caractériser l'adipogenèse brune. Les adipocytes blancs et bruns ont des origines distinctes. Initialement, des données de transcriptomique ont montré que les myocytes et les adipocytes bruns, contrairement aux adipocytes blancs, partagent un profil d'expression similaire, notamment *via* l'expression du facteur myogénique myf5 (Myogenic factor 5), suggérant une origine commune à ces deux premiers types cellulaires (Timmons et al., 2007). Des résultats semblables ont été retrouvés concernant l'expression du marqueur En1 (Engrailed-1), un facteur de transcription à domaine homeobox (Atit et al., 2006). Enfin, des données récentes relatent l'émergence d'adipocytes ayant des propriétés thermogéniques au sein même de dépôts adipeux blancs et présentant un profil d'expression génique spécifique, à la frontière entre l'adipocyte blanc et brun. Une meilleure connaissance de ces adipocytes a permis de les classer dans une nouvelle catégorie, à la frontière entre l'adipocyte blanc et brun : ce sont les adipocytes beiges ou BRITE (BRown in whITE). Le processus d'apparition de ces adipocytes est appelé « beiging ». Les marqueurs des adipocytes beiges commencent maintenant à être caractérisés, ce sont en particulier HoxC9 (Homeobox C9), CD137, TMEM26 (Transmembrane protein 26), et TBX1 (T-Box 1) (Waldén et al., 2012; Wu et al., 2012). Les adipocytes bruns et beiges, malgré leur origine différente, présentent des caractéristiques thermogéniques communes.

2- Différenciation des adipocytes bruns

Certains facteurs moléculaires comme PPARγ et les protéines de la famille C/EBP sont des acteurs communs de la différenciation adipocytaire blanche et brune. Récemment, de

nouveaux acteurs spécifiques de la différenciation de l'adipocyte brun ont été découverts et ont permis de mieux caractériser ce lignage.

PGC1α

Plusieurs facteurs moléculaires avaient déjà été identifiés dans la différenciation adipeuse brune. PGC1α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) est un corégulateur de 91 kDa localisé dans le noyau des cellules. Il a été identifié comme un corégulateur de PPARγ essentiel dans la régulation des gènes du métabolisme oxydatif et de la biogenèse mitochondriale et inductible dans le tissu adipeux brun par le froid (Puigserver et al., 1998). La délétion de PGC1α chez des souris conduit à une faible adaptation thermogénique lors d'une exposition au froid alors qu'une expression ectopique de PGC1α dans les dépôts adipeux blancs confère aux adipocytes une capacité thermogénique *via* l'induction de nombreux gènes comme *ucp1*.

L'expression et l'activité de PGC1α sont soumises à de nombreuses régulations :

• RIP140 (Receptor-interacting protein 140), un corépresseur des récepteurs nucléaires, interagit directement avec PGC1α et inhibe son activité transcriptionnelle sur les gènes du métabolisme oxydatif et de la biogenèse mitochondriale (Hallberg et al., 2008). Les souris déficientes en RIP140 résistent à une obésité par une augmentation de la consommation d'oxygène (Leonardsson et al., 2004).

• TWIST1 (Twist-related protein 1) est une protéine jouant un rôle sur la différenciation ostéoblastique durant les étapes précoces de l'embryogenèse et s'exprime à l'âge adulte, de préférence, dans les tissus adipeux. TWIST1 interagit également avec PGC1α et inhibe son activité transcriptionnelle (Pan et al., 2009).

• Le stress oxydatif provoque une augmentation de l'expression de PGC1α qui contribue à son tour à réguler l'expression des mécanismes enzymatiques antioxydants (Spiegelman, 2007).

PRDM16

PRDM16 (*P*RD1-BF-1-*R*IZ1 homologous domain containing protein 16) est une protéine de 140 KDa composée d'un homéodomaine et deux domaines d'interaction en doigt de zinc. La localisation de son profil d'expression, spécifique des adipocytes bruns, a

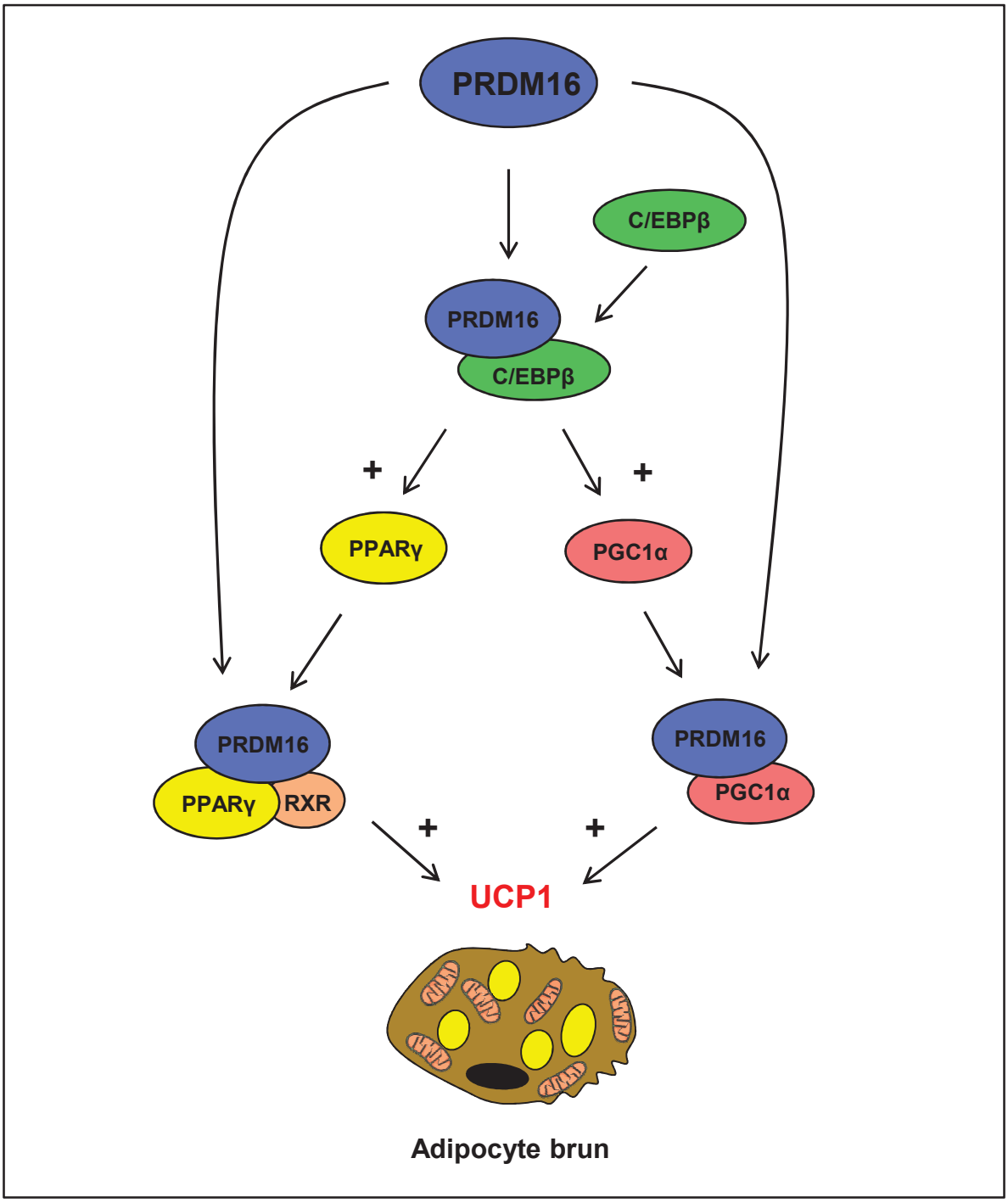


Figure 15: PRDM16 et la cascade moléculaire impliquée dans la différenciation adipocytaire brune

La formation d'un complexe entre PRDM16 (bleu) et C/EBPβ (vert) dans des progéniteurs myf5+ induit l'expression de PPARγ (jaune) et de PGC1α (rouge). PRDM16 forme alors de nouveaux complexes avec les acteurs nouvellement exprimés, ce qui conduit à la différenciation et maturation des progéniteurs en adipocytes bruns matures exprimant UCP1.

Adapté à partir de Kajimura S., *Cell Metabolism (2010)*

modifié profondément les connaissances sur l'adipogenèse brune (Seale et al., 2007). L'expression ectopique de PRDM16 dans des fibroblastes provoque l'expression des gènes spécifiques de l'adipocyte brun et stimule la biogenèse mitochondriale ainsi que le découplage de la phosphorylation oxydative (Seale et al., 2007). La perte de l'expression de PRDM16 sur des cultures primaires de préadipocytes bruns provoque une différenciation musculaire alors que l'expression ectopique dans des myoblastes, isolés à partir de muscles squelettiques de souriceaux ou provenant de la lignée cellulaire C2C12, conduit à la différenciation en adipocytes bruns par l'activation de la transcription des gènes codant pour *pgc1α* et *pgc1β* (Seale et al., 2008). Une mutation dans l'homéodomaine de PRDM16 ne réduit pas sa capacité à différencier les progéniteurs en adipocyte bruns, ce qui a démontré que PRDM16 agissait comme un corégulateur. Par des approches de co-immunoprécipitation, PRDM16 interagit avec PCC1α et PGC1β et la formation de ce complexe est nécessaire à l'augmentation de son activité transcriptionnelle (Seale et al., 2008). Il a également été démontré l'existence d'un complexe entre C/EBPβ et PRDM16. La délétion de C/EBPβ dans les cellules C2C12 ne permet plus la différentiation en adipocytes bruns alors que l'expression ectopique de PRDM16 et de C/EBPβ dans des fibroblastes est suffisante pour induire l'expression des gènes cibles de l'adipocyte brun. Il a donc été proposé que la formation du complexe entre PRDM16 et C/EBPβ était l'événement initiateur de la transcription des autres facteurs tels que PPARγ, PGC1α et PGC1β pour leur permettre ensuite de former un complexe avec PRDM16 dont l'activité transcriptionnelle engage les précurseurs vers une différenciation en adipocytes bruns matures (Figure 15) (Kajimura et al., 2009). PRDM16 réprime aussi l'expression des facteurs myogéniques tels que MyoD (Myogenic Differentiation), myogénine, MRF4 (Myogenic Regulatory Factor 4), MyHC (Myosin Heavy Chain) et MCK (Muscle Creatine Kinase), empêchant ainsi ces derniers de se différencier en cellule musculaire. PRDM16 agit donc comme un interrupteur stoppant la différenciation vers un lignage myogénique au profit d'un lignage adipogénique (Seale et al., 2008). Les facteurs myogéniques exercent un rétrocontrôle négatif sur l'expression de PRDM16 (Borensztein et al., 2012).

BMP7

Parallèlement, il a été montré que l'ajout de BMP7 (Bone Morphogenic Protein 7), un membre de la superfamille des TGF-β (Tumor Growt Factor-β), sur des cellules 3T3-L1 les

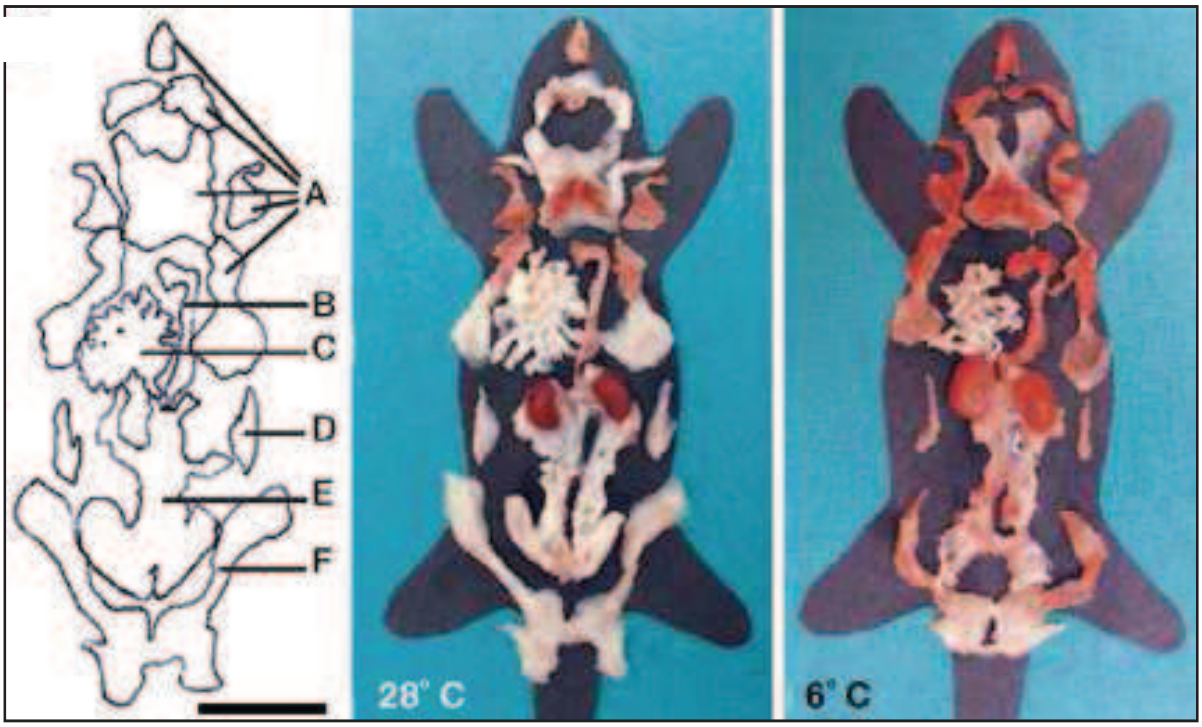


Figure 16: Apparition d'adipocytes thermo-compétents au sein des dépôts blancs chez la souris acclimatée au froid

Anatomie des dépôts adipeux chez une souris femelle SV129 acclimatée à 28°C (milieu) ou 6°C (droite) pendant 10 jours. Les dépôts adipeux sous cutanés antérieurs (A: cervical, interscapulaire, subscapulaire et axillo-thoracique) et postérieurs (F: dorso-lombaire, inguinal et glutéal) ainsi que les dépôts viscéraux médiastinaux (B), mésentériques (C), rétropéritonéaux (D) et paramétriaux (E) changent de couleur lors de l'acclimatation au froid. Ce changement résulte de l'apparition de cellules thermo-compétentes actives.

D'après *Frontini A. and Cinti S., Cell Metabolism (2010)*

engage vers une différenciation en adipocytes bruns. Le rôle crucial de BMP7 dans la différenciation adipocytaire brune a été confirmé *in vivo* par l'analyse phénotypique des souris déficientes pour ce facteur. A la naissance, ces souris présentent une hypoplasie adipocytaire importante entraînant une diminution de près de 70% de la masse du tissu adipeux brun interscapulaire. BMP7 semble jouer un rôle précoce dans les processus de différenciation puisqu'il réprime l'expression du facteur ostéogénique *runx2* et celle de PRDM16 dans des préadipocytes bruns (Tseng et al., 2008).

3- Différenciation des adipocytes beiges

De nombreuses données de la littérature décrivent l'émergence d'adipocytes présentant des propriétés thermogéniques dans des dépôts adipeux blancs chez des souris exposées au froid ou bien soumises à différents traitements. La production de modèles murins a permis de déterminer certains acteurs moléculaires impliqués dans l'apparition de ces adipocytes.

Exposition au froid

L'émergence d'adipocytes thermo-compétents dans les dépôts adipeux blancs a été déjà décrite il y a plus de 30 ans. La caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus a été largement étayée ces dernières années. Un des premiers constats est que l'addition de noradrénaline sur des adipocytes isolés à partir du dépôt adipeux épididymaire de rats augmentait leur dépense calorique uniquement lorsque les animaux étaient préalablement acclimatés au froid (Kuroshima et al., 1979). D'autres observations morphologiques menées chez le chat ont révélé que les dépôts adipeux blancs avaient une configuration similaire à celle des dépôts bruns uniquement lorsque les animaux étaient acclimatés à -30°C deux heures par jour pendant une semaine (Loncar et al., 1986). Plusieurs données décrivent ce phénomène d'émergence d'adipocytes thermo-compétents dans des dépôts adipeux blancs lors d'une exposition au froid et l'importance du récepteur β3-adrénergique dans ce mécanisme chez différentes espèces (Champigny et al., 1991; Himms-Hagen et al., 1994). A ce jour, il est admis chez la souris que l'émergence d'adipocytes thermo-compétents a lieu dans de nombreux dépôts adipeux blancs lors d'une acclimatation au froid, notamment dans le dépôt adipeux inguinal, épididymaire et rétropéritonal (Figure 16) (Frontini and Cinti, 2010).

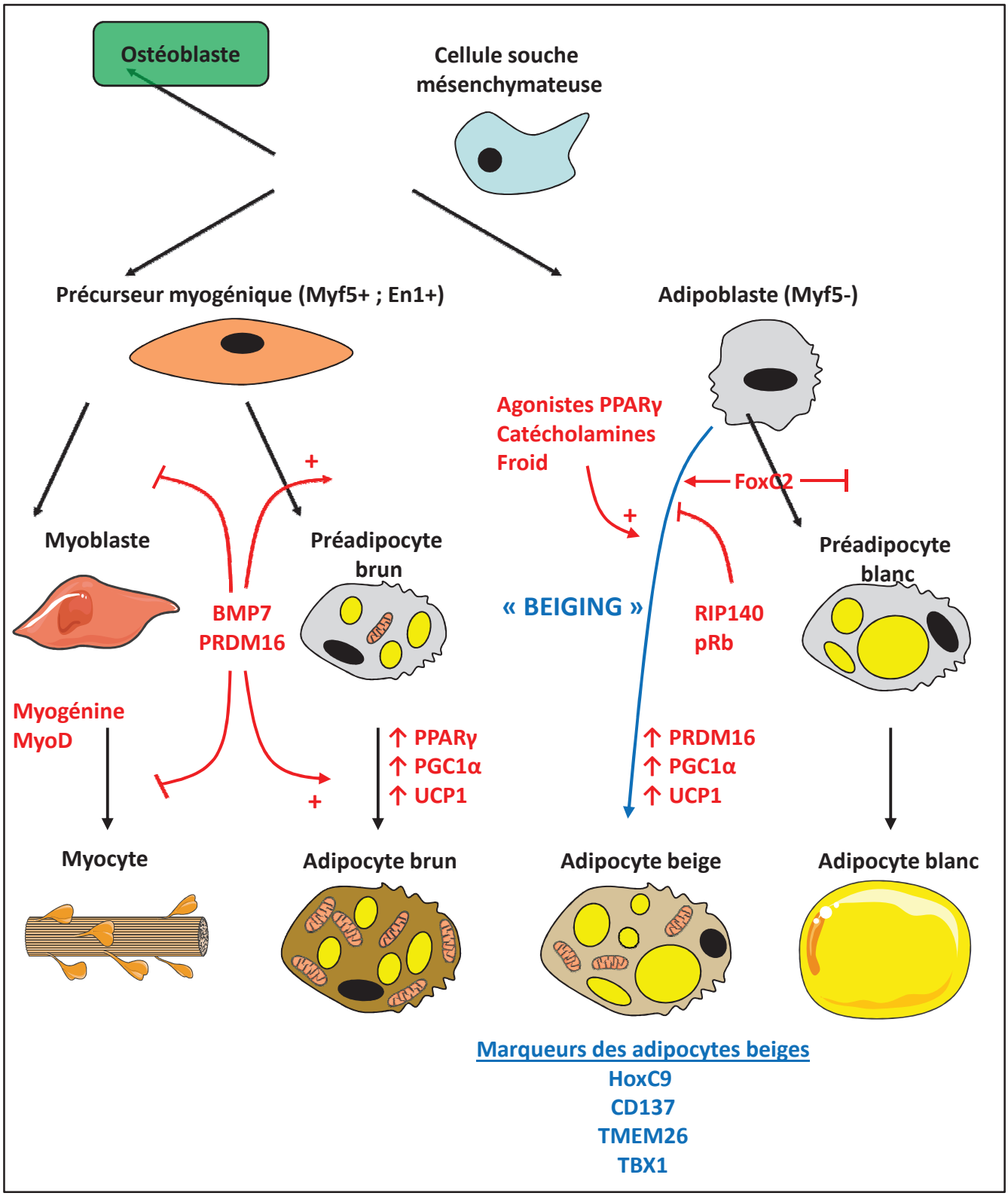


Figure 17: Voie de différenciation des adipocytes bruns, blancs et beiges

Les adipocytes bruns, blancs et beiges ont des origines différentes. Les adipocytes bruns proviennent de précurseurs myogéniques (Myf5+) alors que les adipocytes blancs et beiges proviennent d'adipoblastes (Myf5-). PRDM16 est le régulateur majeur de la différenciation des adipocytes bruns. Il est également impliqué dans la différenciation des adipoblastes en adipocytes beiges, processus appelé « beiging ». Mais contrairement aux adipocytes bruns, les adipocytes beiges expriment 4 marqueurs spécifiques : HoxC9, CD137, TMEM26 et TBX1.

Traitement avec des agonistes de PPARγ

Une exposition au froid n'est pas la seule situation induisant cette apparition d'adipocytes thermo-compétents. Bien que l'utilisation d'agonistes de PPARγ permette l'augmentation de la masse du dépôt adipeux brun interscapulaire chez le rat (Tai et al., 1996), des études récentes montrent que ces agonistes provoquent aussi chez la souris une augmentation de l'expression d'UCP1 et d'autres marqueurs du tissu adipeux brun dans les dépôts adipeux blancs inguinaux, rétropéritonéaux (Sell et al., 2004) et épididymaires (Petrovic et al., 2010). Pourtant l'activation de PPARγ ne peut expliquer à elle seule ce phénomène, puisque son expression est commune aux adipocytes blancs et bruns, et PPARγ est impliqué dans la différenciation de l'un ou l'autre lignage. La surexpression de PPARγ dans les tissus adipeux blancs chez la souris ne provoque pas l'émergence d'adipocytes thermo-compétents dans les dépôts adipeux blancs (Sugii et al., 2009). D'autres mécanismes seraient donc parallèlement impliqués dans ce phénomène de « beiging ». Très récemment, il été montré que ces agonistes agissaient sur la stabilisation de PRDM16 favorisant ainsi la différenciation vers un lignage brun (Ohno et al., 2012).

Modèles murins génétiquement modifiés

Grâce aux modèles de souris génétiquement modifiés, les facteurs moléculaires impliqués dans l'émergence d'adipocytes beiges ont pu être mieux caractérisés. Bien que certains facteurs participent également à la différenciation des adipocytes bruns certains sont plus spécifiques de cette nouvelle classe d'adipocytes (Figure 17).

Les protéines de la famille du rétinoblastome (Rb) : les « proteines pockets ».

pRb, p107 et p130 sont les protéines de la famille du rétinoblastome. Ce sont des suppresseurs de tumeurs fortement impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (Giacinti and Giordano, 2006). Des éléments nouveaux démontrent que ces protéines, particulièrement pRb, jouent un rôle majeur dans la différenciation adipocytaire brune, blanche et beige.

La culture de fibroblastes embryonnaires de souris avec un milieu contenant des facteurs favorisant une différenciation en adipocyte blanc, conduit à une différenciation en cellule ayant des propriétés d'adipocyte brun (augmentation de l'activité et du nombre de mitochondries) uniquement lorsque le gène codant pour pRb est déficient. Ces résultats ont permis de caractériser pRb comme un facteur-clé favorisant la différenciation adipocytaire

blanche, au détriment de la différenciation brune (Hansen et al., 2004). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* à l'aide de souris invalidées pour pRb, plus spécifiquement dans les dépôts adipeux blanc. Sous régime gras, ces souris présentent une prise de poids inférieure comparée aux souris contrôles expliquée en partie par une forte diminution de la masse des dépôts épididymaires et rétropéritonéaux. L'absence de pRb dans ces dépôts adipeux provoque alors une augmentation de la dépense énergétique par l'apparition d'adipocytes bruns et une augmentation des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif chez ces souris (Dali-Youcef et al., 2007).

Chez les souris déficientes en p107, les différents dépôts adipeux blancs ont une masse fortement altérée et présentent de nombreux adipocytes thermo-compétents. L'expression de pRb est diminuée alors que celle de PGC1α est augmentée. A l'aide de tests transcriptionnels et d'immunoprécipitation de la chromatine pratiqués sur la lignée 3T3-L1, il a été démontré que pRb se lie directement sur le promoteur de PGC1α et réprime son expression favorisant ainsi la différenciation vers un lignage adipocytaire blanc (Scimè et al., 2005).

FoxC2

pRb réprime également l'expression du facteur de transcription FoxC2 (Forkhead box protein C2) (Hansen et al., 2004). Sur la lignée 3T3-L1, la surexpression de FoxC2 inhibe l'adipogenèse blanche (Davis et al., 2004). *In vivo*, la surexpression spécifique de FoxC2 dans les dépôts adipeux induit l'expression d'UCP1 dans les dépôts adipeux blancs ainsi qu'une augmentation de l'activité respiratoire des mitochondries. Cette émergence d'adipocytes thermo-compétents est peut-être la conséquence de l'expression de la sous-unité R1α de PKA (Cederberg et al., 2001). Grâce à l'avancée importante des connaissances concernant la différenciation adipocytaire brune, d'autres acteurs essentiels ont été identifiés dans ce processus d'émergence d'adipocytes présentant une activité thermogénique.

PRDM16

Initialement PRDM16 a été décrit comme un acteur important de la différenciation des adipocytes bruns mais des données récentes révèlent son implication dans la différenciation des adipocytes beiges. Chez la souris C57BL/6, l'expression de PRDM16 est

plus importante dans les tissus adipeux sous-cutanés, inguinaux et antérieurs que dans les tissus viscéraux rétropéritonéaux et épididymaires. L'analyse des différentes populations cellulaires composant le tissu adipeux inguinal révèle que PRDM16 s'exprime de préférence dans les adipocytes matures. Les souris surexprimant PRDM16 dans les adipocytes résistent à la prise de poids grâce à une augmentation de la dépense énergétique. Des investigations supplémentaires ont montré que cette dépense accrue d'énergie est liée à l'émergence d'adipocytes thermoactifs uniquement dans le dépôt inguinal suggérant que PRDM16 joue un rôle majeur dans le phénomène de « beiging » (Seale et al., 2011).

E/ Mécanismes centraux et périphériques participant au « beiging »

1- Axe neurosympathique hypothalamo-adipocytaire

Bien que les dépôts adipeux bruns soient beaucoup plus innervés que les dépôts blancs, des éléments de la littérature révèlent un contrôle de l'émergence des adipocytes beiges par l'hypothalamus.

L'environnement dans lequel évoluent les souris modifie de manière conséquente certains paramètres physiopathologiques. Des souris, évoluant dans un environnement enrichi en jouets (cabanes, igloos, tunnel, labyrinthe, roues), ont une augmentation de l'expression de VEGF (vascular endothelial growth factor) dans l'hippocampe qui conduit à une meilleure survie neuronale favorisant ainsi les processus de mémoire et d'apprentissage (Cao et al., 2004b). De manière surprenante, ces souris présentent une diminution des concentrations sériques de leptine. Il a ainsi pu être identifié que l'environnement dans lequel évoluent les souris module l'activité de BDNF (Hypothalamic brain-derived neurotrophic factor) dans l'hypothalamus modifiant la production adypocytaire de leptine *via* un axe neurosympathique β-adrénergique. Il a aussi été montré récémment que l'environnement dans lequel évoluent les souris contribue à l'émergence d'adipocytes beiges *via* l'activation de cet axe hypothalamo-adipocytaire par BDNF (Cao et al., 2011).

L'émergence d'adipocytes beiges dans les dépôts adipeux blancs semblent être corrélée à une innervation plus importante de ces dépôts puisque les souris surexprimant PRDM16 au niveau adipocytaire ont plus de fibres nerveuses dans le dépôts adipeux inguinal (Seale et al., 2011).

2- Mécanisme périphérique

Récemment, un mécanisme périphérique régulant la différenciation des adipocytes beiges a été découvert. Les souris surexprimant PGC1α au niveau musculaire résistent à l'obésité et au diabète liés à l'âge et ont une espérance de vie plus longue (Wenz et al., 2009). L'équipe de B. Spiegelman a suggéré que PGC1α stimulerait des facteurs à partir des cellules musculaires squelettiques qui pourraient affecter la fonction des autres tissus. Par des approches de microarray, FNDC5 (Fibronectin type III Domain Containing 5) a été défini comme un candidat intéressant. FNDC5 est une protéine transmembranaire, exprimée dans le muscle, pouvant subir des modifications transcriptionnelles et un clivage protéolytique. Ces modifications aboutissent à la formation d'une molécule soluble : l'irisine. Les cellules provenant de la fraction SVF du dépôt inguinal présentent une augmentation de l'expression des gènes de la thermogenèse lorsqu'elles sont en présence de FNDC5. Cette étude montre pour la première fois que le muscle secrète une myokine capable de réguler la fonctionnalité des adipocytes (Boström et al., 2012).

F/ Rôles de la prolactine sur les tissus adipeux

Le R PRL s'exprime dans les dépôts adipeux blancs et bruns de nombreuses espèces notamment chez la souris, le rat et l'Homme (Royster et al., 1995; Ling et al., 2000). Son expression augmente significativement chez la souris en lactation. La forme longue du R PRL semble être la forme la plus exprimée dans l'adipocyte. En effet, l'analyse par RT-PCR à partir de tissus adipeux épididymaires de rat a révélé une expression concomitante de la forme longue et la forme courte du R PRL avec un rapport 10 : 1. L'expression génique de la forme longue du R PRL sur des cultures primaires de préadipocytes de tissu adipeux épididymaire de rat en cours de différenciation augmente plus fortement que la forme courte (Brandebourg et al., 2007). Dans la lignée cellulaire 3T3-L1, lignée cellulaire d'origine fibroblastique pouvant se différencier en adipocytes matures, la forme courte du R PRL augmente au cours de la différenciation mais la forme longue reste majoritaire (Fleenor et al., 2006). Sur la lignée adipocytaire brune T37i, isolée et immortalisée à partir d'un hibernome de souris, l'expression de la forme longue augmente également au cours de la différenciation (Viengchareun et al., 2004). Les données *in vivo* et *in vitro* sur l'expression du

R PRL au cours de la différenciation suggèrent que ce récepteur joue un rôle important au cours de l'adipogenèse.

1- Adipogenèse

Chez l'Homme, le rôle de la PRL sur la différenciation adipocytaire reste peu compris. Néanmoins, un certain nombre d'études indique que le retour des concentrations de PRL à des valeurs normales par l'administration de bromocriptine chez des patients hyperprolactinémiques rétablit également leur indice de masse grasse vers des valeurs normales (Greenman et al., 1998). Il a été ainsi montré que la masse grasse chez ces individus est corrélée aux concentrations circulantes de PRL (Doknic et al., 2002; Naliato et al., 2007; Silva et al., 2010). Les études *in vivo* et *in vitro* ont toutefois permis de mieux décrypter le rôle de cette signalisation sur la physiologie de l'adipocyte. Une analyse menée sur le modèle murin R $PRL^{-/-}$ en 2001 a montré que ces souris ont une résistance à la prise de poids comparé à des souris sauvages et que cette résistance est plus importante chez les souris femelles. Le tissu adipeux abdominal des animaux âgées de 7 à 9 mois est diminué chez les souris R $PRL^{-/-}$ expliquant en partie la résistance prise de poids dans ce modèle. (Freemark et al., 2001a). Bien que le volume des adipocytes des tissus paramétriaux et sous-cutanés ne soit pas modifié chez les souris R $PRL^{-/-}$, la masse de ces tissus est réduite et semble être liée à une diminution importante du nombre de cellules. Toutefois, l'étude de la prolifération *in vitro* des cellules provenant de la fraction stroma-vasculaire (SVF) de ces deux tissus n'a montré aucune différence significative entre les deux génotypes (Flint et al., 2006). Il est admis que la PRL joue un rôle majeur dans l'adipogenèse car sur les cellules 3T3-L1 ou NIH-3T3, cellules souches mésenchymateuses multipotentes, elle augmente les facteurs-clé de l'adipogenèse CEBPβ et PPARγ (Nanbu-Wakao et al., 2000). En absence de sérum de veau fœtal, les cellules 3T3-L1 sont capables de se différencier seulement en présence de PRL (Stewart et al., 2004). L'augmentation de l'expression des facteurs STAT3 et STAT5a et b au cours de la différenciation de préadipocytes humains ou issus de la lignée cellulaire 3T3-L1 plaident en faveur de l'importance de la signalisation PRL pendant ce processus (Harp et al., 2001; Fleenor et al., 2006). L'expression du R PRL dans les adipocytes déjà différenciés suggère que la PRL agit également sur la fonction des adipocytes.

2- Métabolisme lipidique

En dépit du fait qu'il n'existe pas suffisament d'études consacrées au rôle de la PRL sur le métabolisme lipidique des adipocytes, les données de la littérature semblent s'accorder sur une action anti-lipogénique de cette hormone. L'injection d'une dose unique de PRL chez des lapins augmente significativement en 30 minutes la concentration de glycérol sérique et des injections quotidiennes pendant 12 jours en accroissent les taux jusqu'à 157% (Fortun-Lamothe et al., 1996). La culture d'adipocytes humains en présence de PRL diminue d'environ 30% l'activité de la LPL. L'activation de cette enzyme par l'addition de cortisol est moins importante lorsque les adipocytes humains sont cultivés avec de la PRL (Ling et al., 2003). Sur des cellules 3T3-L1, la PRL diminue l'expression de FAS. Après avoir montré que cette diminution n'était pas due à une augmentation de la dégradation de l'enzyme, il a été mis en évidence que STAT5a régule négativement l'expression de FAS en se liant directement sur son promoteur (Hogan and Stephens, 2005). L'expression génique de *glut4* ainsi que la concentration de malonyl-CoA dans les adipocytes humains diminuent en présence de PRL renforçant encore une fois le rôle anti-lipogénique de cette hormone (Nilsson et al., 2009). En revanche, le rôle de la PRL sur la synthèse des acides gras semble être différent selon le tissu puisque la PRL augmente à la fois l'activité et la transcription de la LPL sur des cultures d'explants de glandes mammaires prélevés chez des souris à mi-gestation (Hang and Rillema, 1997). La culture de ces explants en présence de PRL augmente aussi l'activité de la pyruvate déshydrogénase à la 6e heure de culture et celle de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) au bout de 12 heures. Le citrate régule de manière allostérique l'ACC et sa concentration cellulaire est indirectement liée à l'activation de la pyruvate déshydrogénase. L'augmentation de l'activité de l'ACC s 'effectuerait probablement par une augmentation du citrate alors que le rôle direct de la PRL est plus discutable (Waters and Rillema, 1988).

3- Production et sécrétion d'adipokines

La PRL régule la sécrétion d'adipokines. En effet sur la lignée cellulaire de préadipocytes bruns T37i, elle potentialise l'effet de l'insuline sur la transcription et la sécrétion de la leptine par une augmentation de la phosphorylation des protéines de la famille des IRS (Viengchareun et al., 2004). En revanche, la présence de PRL dans des

cultures primaires d'adipocytes supprime la sécrétion de leptine par l'insuline *in vitro* et résulterait d'une augmentation de l'expression de SOCS-3 (Ling and Billig, 2001). Les souris femelles R PRL$^{-/-}$ ont une leptinémie basse comparée à celles des souris contrôles. Aucune différence n'est observée chez les souris mâles suggérant un rôle des hormones sexuelles dans la production et/ou sécrétion de leptine par la PRL dans les adipocytes (Freemark et al., 2001b).

Les données de la littérature concernant le rôle inhibiteur de la PRL sur la sécrétion d'adiponectine sont plus concordantes que celles décrites sur la leptine. La pose de pompes osmotiques délivrant de la PRL diminue la concentration plasmatique d'adiponectine alors que la bromocriptine l'augmente (Combs et al., 2003). Les souris femelles surexprimant la PRL présentent aussi des concentrations sériques effondrées de cette hormone. La culture *in vitro* d'adipocytes humains pendant 6 jours en présence de PRL diminue significativement la sécrétion d'adiponectine mais augmente l'expression du transcrit de son récepteur *AdipoR1* (Nilsson et al., 2005). Une autre étude montre que la PRL diminue *in vitro* le contenu intracellulaire d'adiponectine dans des adipocytes humains et que l'inhibition de sa sécrétion induite par la PRL dépend de la dose utilisée (Asai-Sato et al., 2006). La PRL inhiberait également la sécrétion d'IL-6 par les adipocytes puisque l'administration exogène de PRL pendant 36 heures sur la lignée adipocytaire LS14, isolée à partir d'un liposarcome métastatique humain, diminue significativement le relargage de cette cytokine dans le milieu de culture et ce de façon dose-dépendante (Hugo et al., 2006).

4- Production de PRL par l'adipocyte

De nombreuses études ont permis d'identifier l'adipocyte comme un site de synthèse et de production extra-hypophysaire de la PRL. En 2003, L'analyse de cultures d'explants de glande mammaire de femme a montré qu'à partir du 7e jour de culture les adipocytes secrètent près de 15 fois plus de PRL que les cellules épithéliales de la glande (Zinger et al., 2003). Quelques années plus tard, la caractérisation de la lignée adipocytaire LS14 a permis de montrer une production endogène de PRL (Hugo et al., 2006). La culture d'explants de dépôts adipeux issus de patients obèses a par ailleurs révélé une augmentation de sécrétion de PRL au cours du temps, plus importante dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu sous-cutané. De manière très intéressante, les auteurs ont également pu démontrer

l'existence d'une corrélation inverse entre la production adipocytaire de PRL du tissu sous-cutané et l'indice de masse corporelle chez l'Homme (Hugo et al., 2008).

L'utilisation d'IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), un inhibiteur des phosphodiestérases augmentant la production intracellulaire d'AMPc et de GMPc, accroit la production de PRL des préadipocytes en cours de différenciation. L'utilisation d'agonistes de l'adénylate cyclase et d'inhibiteurs de la voie PKA sur ces mêmes cultures de préadipocytes montre que la production de PRL est en partie responsable de l'activation de cette voie (McFarland-Mancini et al., 2006). Récemment, il a été montré que les récepteurs dopaminergiques s'expriment à la surface de l'adipocyte et donc que l'utilisation d'agonistes dopaminergiques sur des cultures primaires de préadipocytes humains et sur la lignée LS14 diminuait significativement la sécrétion de PRL par une baisse de la concentration intracellulaire d'AMPc (Borcherding et al., 2011). Comme pour les autres sites de synthèse extra-hypophysaire de la PRL, sa production au niveau adipocytaire suggère une action auto/paracrine.

5- Tissu adipeux brun et thermorégulation

Les premières études sur l'impact de la PRL sur le tissu adipeux brun ont été effectuées chez la brebis. Initialement, l'équipe de Symonds avait montré que le R PRL s'exprimait dans le tissu adipeux périrénal de fœtus d'agneau et que son niveau d'expression pouvait être corrélé avec le développement du tissu adipeux brun (Budge et al., 2000a, 2003). Puis, cette équipe s'est intéressée aux effets du régime alimentaire de la brebis gestante sur le développement du tissu adipeux brun du fœtus et sur l'expression du R PRL dans ce tissu. Utilisant deux groupes de brebis, l'un mangeant uniquement la ration nécessaire aux besoins métaboliques durant la deuxième moitié de la gestation alors que l'autre avait une ration alimentaire augmenté de 50%, les auteurs montrèrent que dans ce dernier groupe le développement ainsi que la capacité thermogénique du tissu adipeux brun des fœtus étaient augmentés (Budge et al., 2000b). En 2002, cette même équipe a montré que des injections quotidiennes de PRL chez des rates gestantes augmentait la quantité d'UCP1 dans le tissu adipeux brun des nouveaux nés et des fœtus de rat en fin de gestation (Budge et al., 2002). L'analyse phénotypique des souris R $PRL^{-/-}$ à la naissance montre une

altération du développement du tissu adipeux brun confirmant le rôle primordial de la PRL (Viengchareun et al., 2008). En outre, une lignée immortalisée de préadipocytes issue de ces animaux présente une altération de la différenciation en adipocytes matures alors que la réintroduction de R PRL dans cette lignée rétablit leur différenciation. Les niveaux d'expression d'IGF2, une des cibles démontrées de la PRL, sont diminués dans le tissu adipeux brun des souris R $PRL^{-/-}$ et l'administration exogène d'IGF2 sur les préadipocytes R $PRL^{-/-}$ rétablit partiellement leur différenciation en adipocyte mature (Viengchareun et al., 2008). En revanche, la PRL semblent réguler négativement l'activité thermogénique du tissu. L'injection de PRL chez de jeunes rats montre, uniquement chez les femelles une étonnante diminution d'environ 75% de la quantité d'UCP1 dans le tissu adipeux brun (Pearce et al., 2003). Récemment, il a aussi été mis en évidence qu'il existait une corrélation entre la diminution de l'expression des marqueurs du tissu adipeux brun chez la souris en lactation et les concentrations élevées de PRL (Król et al., 2011).

Au moment où nous avions initié ce travail, aucune donnée de la littérature ne proposait un rôle de la signalisation de la PRL sur les adipocytes beiges.

La signalisation de la PRL joue de nombreux rôles sur la formation et la fonction des adipocytes mais aussi d'un autre acteur-clé du métabolisme énergétique : le pancréas.

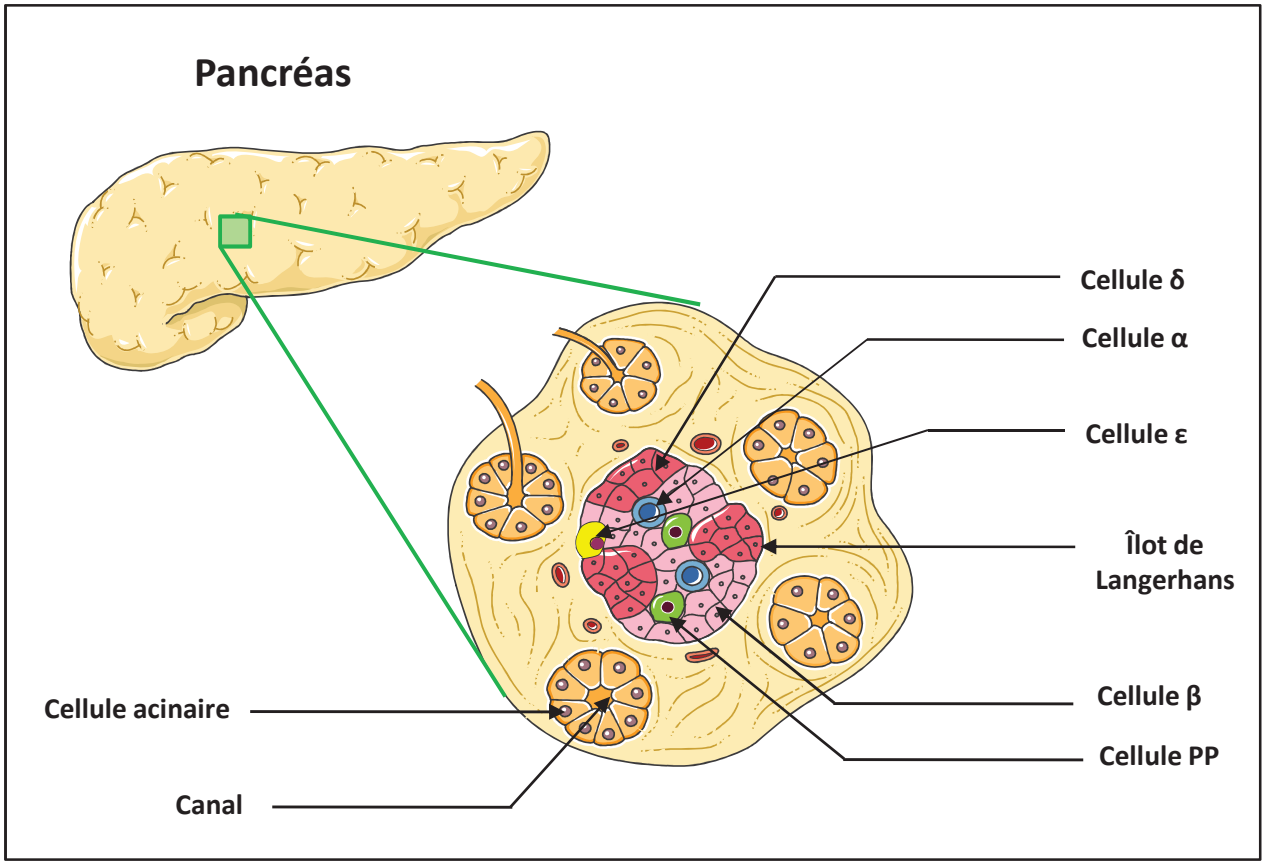


Figure 18: Structure du pancréas et de l'îlot de Langerhans

Le pancréas est composé d'une large fraction exocrine (98%) et endocrine (2%). La fraction exocrine est composée de cellules acinaires et canalaires qui produisent et sécrètent les enzymes de la digestion. La fraction endocrine est composée de cellules α, β, δ, ε et PP qui sécrètent respectivement le glucagon, l'insuline, la somatostatine, la ghréline et le peptide pancréatique.

III. Le pancréas

A/ Structure et fonction

Le pancréas est un organe composé essentiellement d'une fraction exocrine et d'une fraction endocrine plus restreinte (2%).

Les cellules acinaires et canalaires constituant la fraction exocrine produisent et sécrètent les enzymes digestives telles que l'amylase et la lipase pancréatique. Ces enzymes sont ensuite libérées dans le duodénum par le biais du canal pancréatique participant alors à la digestion des macronutriments. Les cellules canalaires produisent également du bicarbonate (HCO3-) et des électrolytes favorisant simultanément le processus de digestion et contrecarrant l'acidité du suc gastrique. Les îlots de Langerhans sont composés de 5 types cellulaires bien distincts ayant chacun un rôle précis et constituant la fraction endocrine (Figure 18).

• Les cellules α produisent le glucagon, une hormone hyperglycémiante rééquilibrant la glycémie lors d'un jeûne en activant des voies productrices de glucose telles que la néoglucogenèse et la glycogénolyse hépatique.

• Les cellules β synthétisent et sécrètent l'insuline, la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme découverte à ce jour. En période postprandiale, les cellules β pancréatiques sécrètent cette hormone en réponse principalement à une augmentation des concentrations sanguines de glucose. La libération de l'insuline active alors les voies métaboliques impliquées dans le stockage énergétique. Le glucose sera stocké sous forme de glycogène au niveau musculaire et hépatique et dégradé par la glycolyse pour fournir l'Acétyl-Coa mitochondrial comme substrat de base nécessaire aux cellules hépatiques pour produire les acides gras.

• Les cellules δ produisent et sécrètent la somatostatine.

• Les cellules PP produisent et sécrètent le polypeptide pancréatique.

• Jusqu'en 2002, la communauté scientifique pensait que seuls ces 4 types cellulaires composaient les îlots de Langerhans, l'émergence d'une nouvelle sous-population cellulaire, les cellules ε, a été mise en évidence par l'équipe de Mauto Papotti. Ces cellules synthétisent

la ghréline mais leur rôle dans le pancréas reste à ce jour encore inconnu (Volante et al., 2002).

La mise en place de ces différents types cellulaires fait appel à des mécanismes complexes où de nombreux facteurs de transcription interviennent lors de l'embryogenèse.

B/ Développement du pancréas et différenciation cellulaire

1- Endoderme et fusion des bourgeons pancréatiques

Le pancréas dérive du feuillet endodermique. Il se forme à partir de l'intestin primitif. A E9 chez la souris, deux évaginations émergent à partir de ce tissu pour former un bourgeon pancréatique ventral et un dorsal. Une forte prolifération de ces deux bourgeons puis une rotation du bourgeon ventral permettront leur fusion au stade E14,5 pour former un seul organe. Le tissu endocrine commence son développement dès E9,5 à partir de progéniteurs pancréatiques par des étapes de différenciation faisant intervenir différents facteurs de transcription dont l'expression transitoire est inscrite dans une fenêtre temporelle précise (Collombat et al., 2006; Bernardo et al., 2008; Rukstalis and Habener, 2009).

2- Facteurs de transcription impliqués dans la néogenèse des cellules β

Lors du bourgeonnement pancréatique, toutes les cellules précurseurs expriment le facteur PDX1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1) et PTF1a (Pancreas Transcription Factor 1a). Au cours du développement, l'expression du facteur PDX1 va progressivement se limiter spécifiquement aux cellules β alors que celle du facteur PTF1a sera spécifique des cellules exocrines. D'autres facteurs participent à la différenciation des cellules endocrines : Ngn3 (Neurogenin3), une protéine à domaine bHLH, est le régulateur majeur de la différenciation endocrinienne pancréatique. Son expression au sein des progéniteurs cellulaires marque l'engagement de ces derniers vers une différenciation endocrine. Son expression est biphasique : un premier pic d'expression est observé dès les premières 48 heures de la formation du pancréas dans certains progéniteurs favorisant le développement

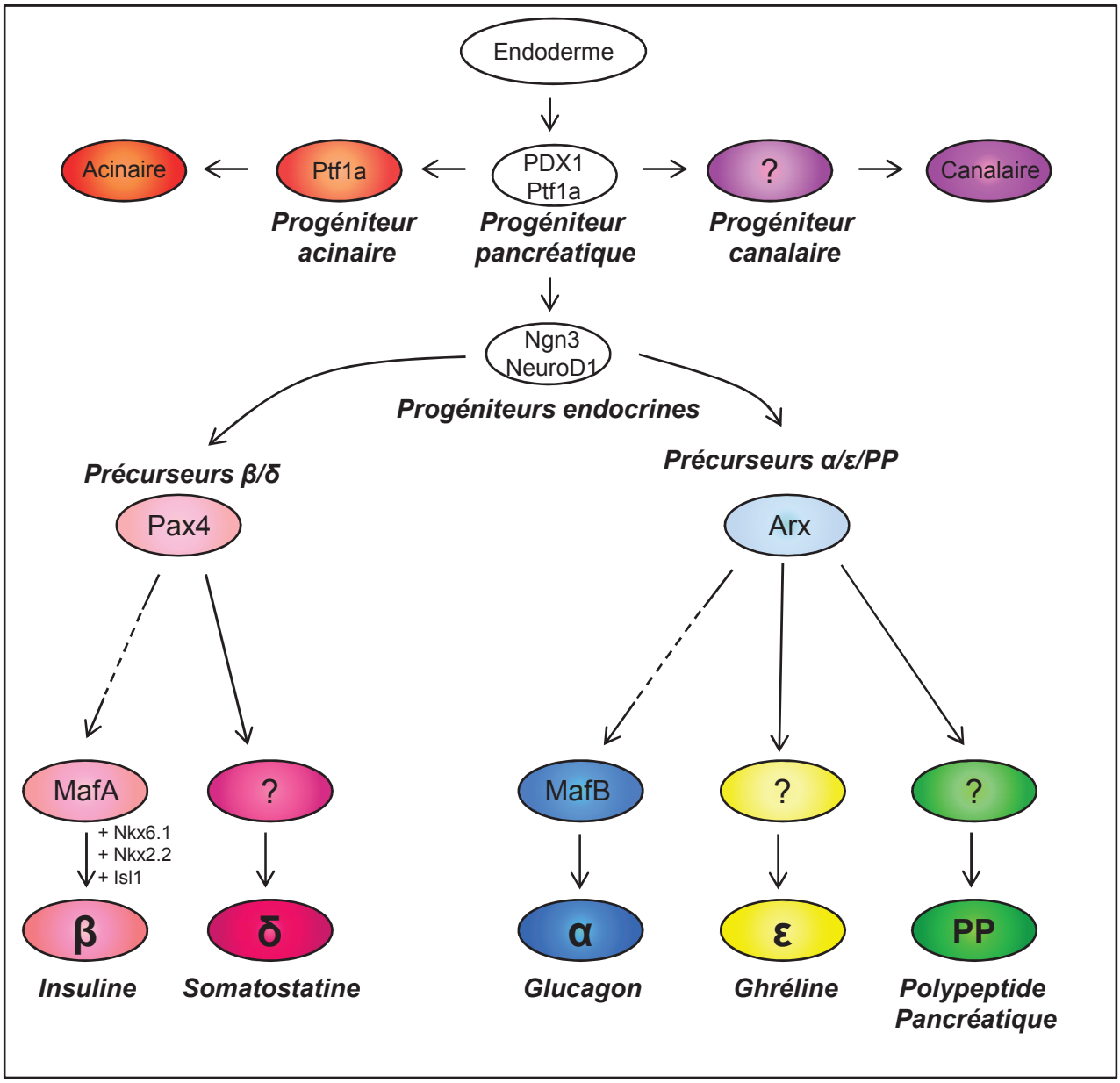


Figure 19: Schéma de la différenciation des progéniteurs pancréatiques en cellules endocrines

Les progéniteurs pancréatiques expriment PDX1 et peuvent donner naissance aux cellules canalaires (violet), acinaires (orange) et endocrines. Ngn3 et de NeudoD1 s'expriment dans les progéniteurs pancréatiques. L'émergence de Pax4 dans les progéniteurs endocrines les différencie en précurseurs des cellules β et δ alors que Arx les différencie en précurseurs des cellules α , ε et PP. A partir de ces précurseurs, l'expression spécifique de facteurs de transcription aboutit à la maturation des cellules β (rose), δ (bordeau),α (bleu), ε (jaune) et PP (vert).

D'après *Collombat P. et al., Mechanisms of development (2006)*

des cellules α. A partir du jour E12,5, son expression reprend pour atteindre un pic autour de E14,5 dans certaines cellules qui deviendront, quant à elles, majoritairement des cellules β. Le modèle de souris invalidé pour le gène *ngn3* montre un défaut majeur de la formation des cellules endocrines. Ngn3 active le promoteur d'un autre gène impliqué dans la différenciation des cellules β: NeuroD1 (Neurogenic Differentiation 1). La protéine NeuroD1 contient également un domaine bHLH ce qui lui permet de se fixer sur le promoteur de l'insuline pour initier la transcription de ce gène. Les facteurs de transcription Pax4 (Paired box gene 4) et Arx (Aristaless related homeobox) sont deux protéines importantes dans la différenciation endocrine. Pax4 est exprimé dans les précurseurs cellulaires des cellules β et δ alors que Arx est présent dans les progéniteurs α, ε et PP (Kordowich et al., 2010). L'expression tardive de facteurs tels que MafA, Nkx2.2, Nkx6.1 et Isl1 (Islet 1) entraîne la différenciation des progéniteurs Pax4 en cellules β matures (Figure 19). L'apparition des premières cellules β a lieu à partir de E12,5 mais l'émergence de ces cellules matures s'observent vers E14,5 (Collombat et al., 2006; Bernardo et al., 2008; Rukstalis and Habener, 2009).

C/ Plasticité des cellules β pancréatiques

Après la naissance, le pancréas contient un certain nombre de cellules β fonctionnelles. Chez l'adulte, l'ensemble de toutes ces cellules, ou masse des cellules β, peut s'accroître ou bien diminuer en fonction des besoins énergétiques de l'organisme dans différents cas d'adaptations physiopathologiques telles que la gestation, l'obésité ou le diabète (Figure 20). Cette plasticité cellulaire fait intervenir des processus tels que la prolifération, l'apoptose, la néogenèse et la transdifférenciation cellulaire.

1- Prolifération

Autour de la naissance chez la souris, les cellules β du pancréas se multiplient pour augmenter le stock de cellules fonctionnelles. Lors de la gestation, une prolifération des cellules β permet d'obtenir un pool de cellules pouvant ainsi répondre aux nouveaux besoins énergétiques de la mère. La réplication cellulaire est déterminée par l'expression et l'activation de nombreux partenaires impliqués dans le cycle cellulaire. Dans les cellules β,

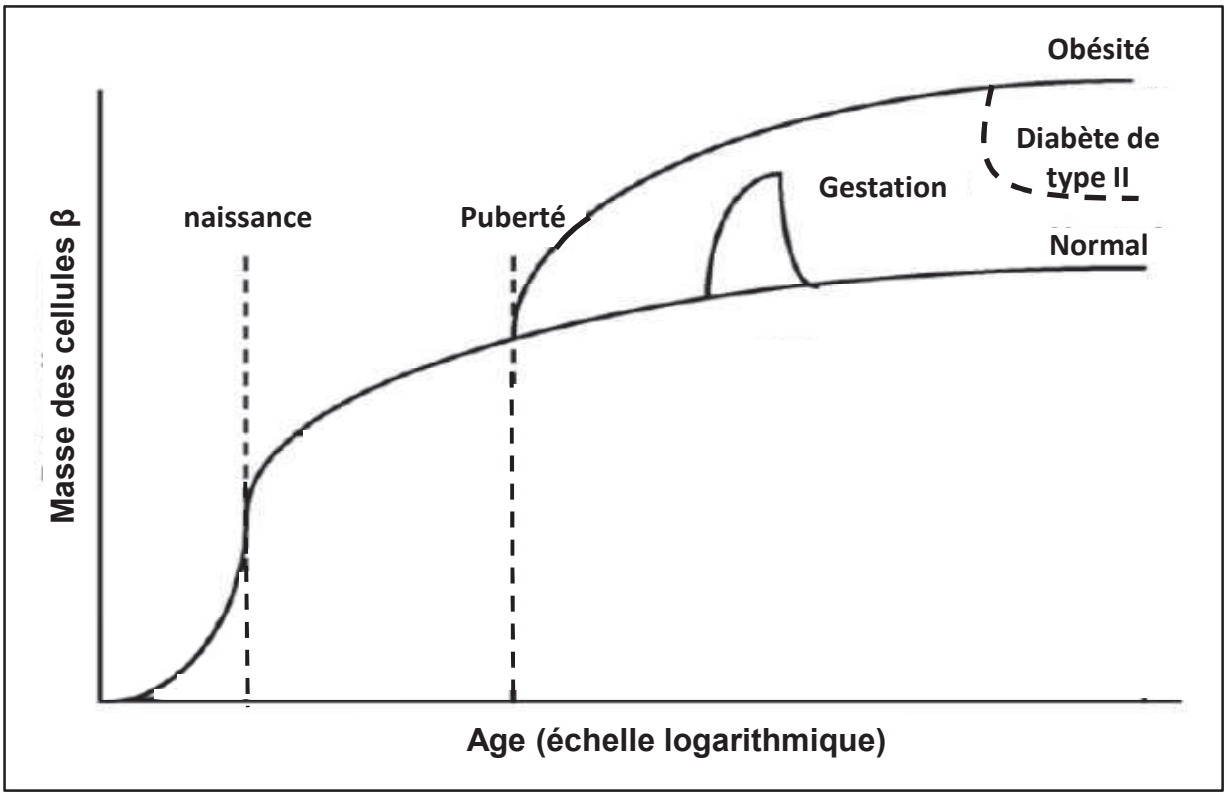


Figure 20: Modification de la masse des cellules β en conditions physiologiques et pathologiques

La masse des cellules β est finement régulée permettant ainsi à l'organisme de s'adapter aux modifications du métabolisme glucido-lipidique. Par exemple, durant les adaptations périnatales et durant la gestation, les cellules β prolifèrent pour constituer une masse β suffisante et fonctionnelle. En cas d'obésité, cette masse β augmente afin de contrecarrer le développement de l'insulino-résistance. En revanche, lorsque l'insuline produite n'est pas suffisante pour contrecarrer l'insulino-résistance des tissus périphériques, une hyperglycémie chronique apparaît et entraîne une apoptose des cellules β provoquant un diabète de type II.

Adapté à partir de *Ying C. Lee and Jens Høiriis Nielsen, Molecular and Cellular Endocrinology (2009)*

l'initiation de l'expression des isoformes D1 et D2 de la cycline permet la formation d'un complexe avec les kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6) et signe l'entrée de ces cellules dans le cycle cellulaire. Une autre famille de protéines les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CDKi), telles que les protéines p18 et p27, inhibent la prolifération. Elles empêchent la formation du complexe avec les cyclines en inhibant l'activité des CDK (Lee and Nielsen, 2009; Aguilar and Fajas, 2010).

.

2- Apoptose

Dans le cas de l'obésité, les muscles squelettiques, le tissu adipeux blanc et le foie deviennent résistants à l'action de l'insuline. L'adaptation compensatrice des cellules β visant à produire et à libérer de façon chronique davantage d'insuline dans la circulation n'est plus suffisante pour assurer la normoglycémie. La masse des cellules β augmente alors afin de compenser le défaut de signalisation insulinique. Lorsque la masse des cellules β nouvellement constituée ne compense plus cette insulinorésistance, une hyperglycémie chronique apparaît entraînant des perturbations métaboliques majeures. L'exposition prolongée des cellules β à de fortes concentrations de glucose (glucotoxicité) et l'accumulation de lipides dans la cellule (lipotoxicité) déclenchent des dysfonctions mitochondriales aboutissant à la mort des cellules (Van Raalte and Diamant, 2011). Les protéines de la famille Bcl-2 sont des acteurs moléculaires de ce processus. Elles peuvent être classées en trois groupes : anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, A1), pro-apoptotique (Bax, Bak, Bok), et des protéines régulatrices à domaine BH3 (Puma, Bim, Bid). En condition normale, les protéines anti-apoptotiques forment un complexe avec les protéines régulatrices à domaine BH3. En condition de stress, ce complexe se dissocie et les protéines à domaine BH3 forment un nouveau complexe avec les protéines pro-apoptotiques, ce qui conduit à la perméabilisation mitochondriale et au relargage de cytochrome c dans le cytosol (Gurzov and Eizirik, 2011). L'apoptose des cellules β est un processus largement impliqué dans le développement du diabète de type II (Butler et al., 2003).

3- Néogenèse et transdifférenciation cellulaire

Quelques études ont montré la possibilité de certains tissus exocrines ou types cellulaires extra-pancréatiques de se transdifférencier *in vitro* en cellule produisant de l'insuline. En 2007, L'équipe de Doris A. Stoffers a été la première à démontrer *in vivo* que les cellules acinaires ne pouvaient pas se transdifférencier en cellule β après des pancréatectomies ou des induction de pancréatites (Desai et al., 2007). Mais de manière très intéressante, l'équipe de Douglas A. Melton a montré en 2008 que l'infection des cellules acinaires murines *in vivo* avec des adénovirus exprimant une combinaison de trois facteurs de transcription (PDX1, Ngn3 et MafA) essentiels au développement embryonnaire du pancréas suffisait à reprogrammer une cellule acinaire en cellule β (Zhou et al., 2008). Les cellules acinaires pourraient se dédifférencier et devenir des progéniteurs pancréatiques capables de se différencier en cellule β (Baeyens and Bouwens, 2008). Mais la surexpression du facteur Pax4 spécifiquement dans les cellules α chez la souris a montré une transdifférenciation de ces cellules en cellules β suggérant que les cellules endocrines étaient aussi capables de se reprogrammer (Collombat et al., 2009). Cet intérêt pour les processus de transdifférenciation s'est accrue lorsqu'il a été démontré qu'une perte massive de cellules β entraînait une transdifférenciation des cellules α en β (Thorel et al., 2010). En revanche, une redifférenciation des cellules β en cellules α a été décrite dans un modèle murin invalidé pour FoxO1 spécifiquement dans les cellules β, ce qui a été retrouvé dans d'autres modèles murins diabétiques démontrant l'importance de ces processus dans le développement du diabète de type II et ouvrant de nouvelles perspectives de recherches (Talchai et al., 2012).

4- Taille cellulaire

La masse des cellules β dépend du nombre de cellules mais aussi de leur taille. Même si les mécanismes moléculaires régulant la taille cellulaire sont à ce jour peu compris, quelques études ont montré que la taille des cellules β était associée à une activation d'Akt. En effet, une augmentation de la masse des cellules β est évidente dans le modèle de souris transgénique surexprimant une forme constitutivement active d'Akt (Tuttle et al., 2001). L'immunomarquage de coupes de pancréas de ces souris avec un anticorps reconnaissant l'insuline ou GLUT2 (Glucose Transporter 2), marqueur membranaire des cellules β, met en

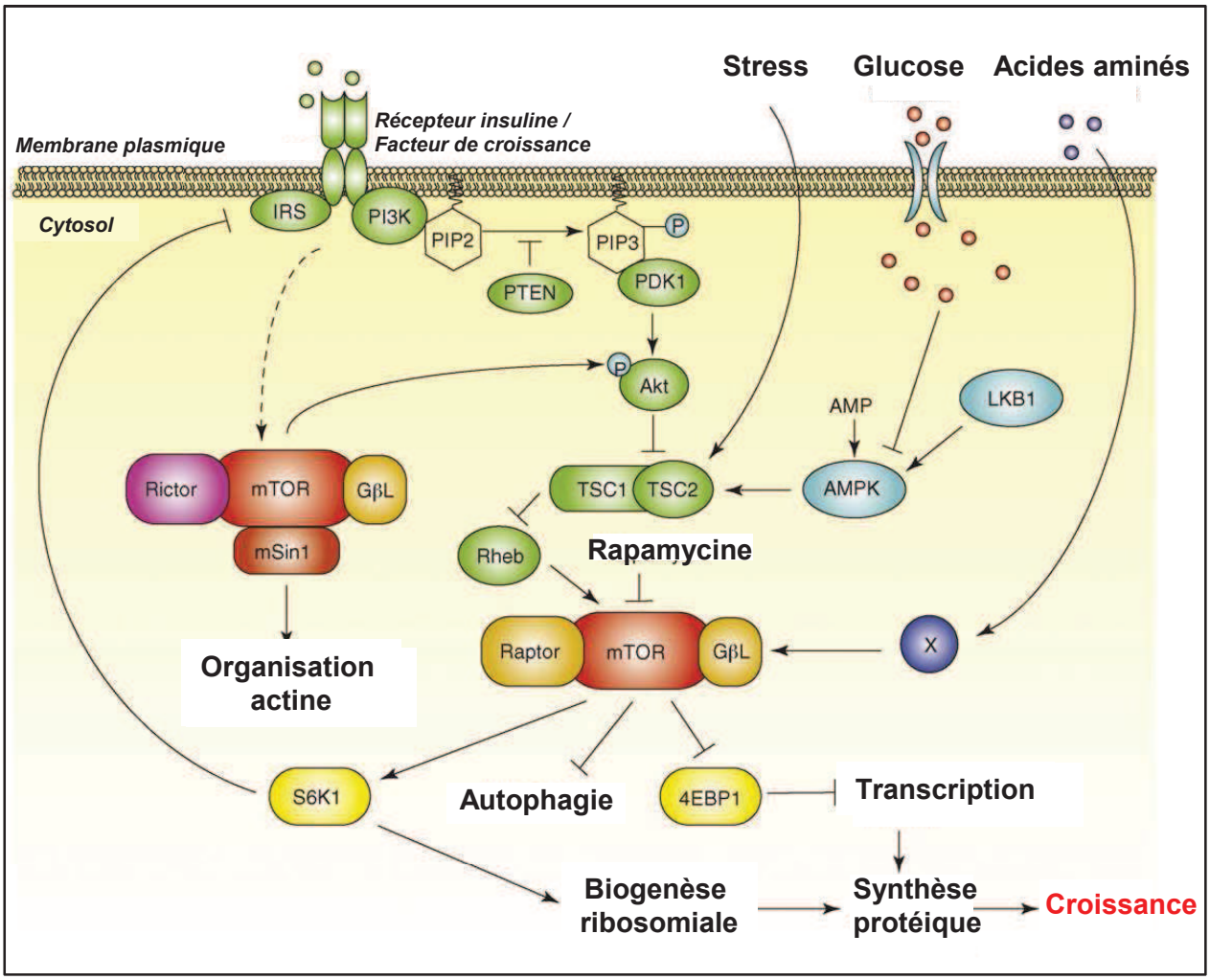


Figure 21: Signalisation de la voie mTOR

mTOR (rouge) est une sérine/thréonine kinase impliquée dans de nombreux processus biologiques dont la croissance cellulaire. Le stress (hypoxie), l'élévation intracellulaire de la quantité d'acides aminés, et des facteurs de croissance activent cette voie de signalisation. L'activation de la voie PI3K entraine la dissociation du complexe TSC1/TSC2 (vert) provoquant l'activation de Rheb, une petite protéine G, puis celle de mTOR. mTOR est impliqué dans la réorganisation du réseau d'actine, la régulation de la synthèse protéique, la biogenèse ribosomale, la transcription et l'autophagie via l'activation de la S6K1 (jaune).

D'après Chi Kwan Tsang et al., Drug Discovery Today (2007)

évidence une augmentation importante de leur taille comparée à celle des souris contrôles (Bernal-Mizrachi et al., 2001; Tuttle et al., 2001). Les homologues d'Akt et d'IRS1, molécules impliquées dans la signalisation de l'insuline en aval d'Akt, chez la drosophile ont été décrites comme des régulateurs de la taille cellulaire (Böhni et al., 1999; Verdu et al., 1999). Le rôle d'Akt dans le contrôle de la taille cellulaire s'effectue par l'activation de la S6K1 (S6 kinase 1), un acteur essentiel de la voie mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) (Alliouachene et al., 2008). Parallèlement à ces découvertes impliquant l'activation d'Akt comme la voie régulatrice de la taille cellulaire, l'analyse de pancréas de souris déficientes en S6K1 révèle une diminution de la taille des cellules β (Pende et al., 2000). Le jeûne ou l'utilisation de rapamycine, un inhibiteur de la voie de signalisation mTOR montre clairement l'implication de cette voie dans la régulation de la taille des cellules β (Figure 21).

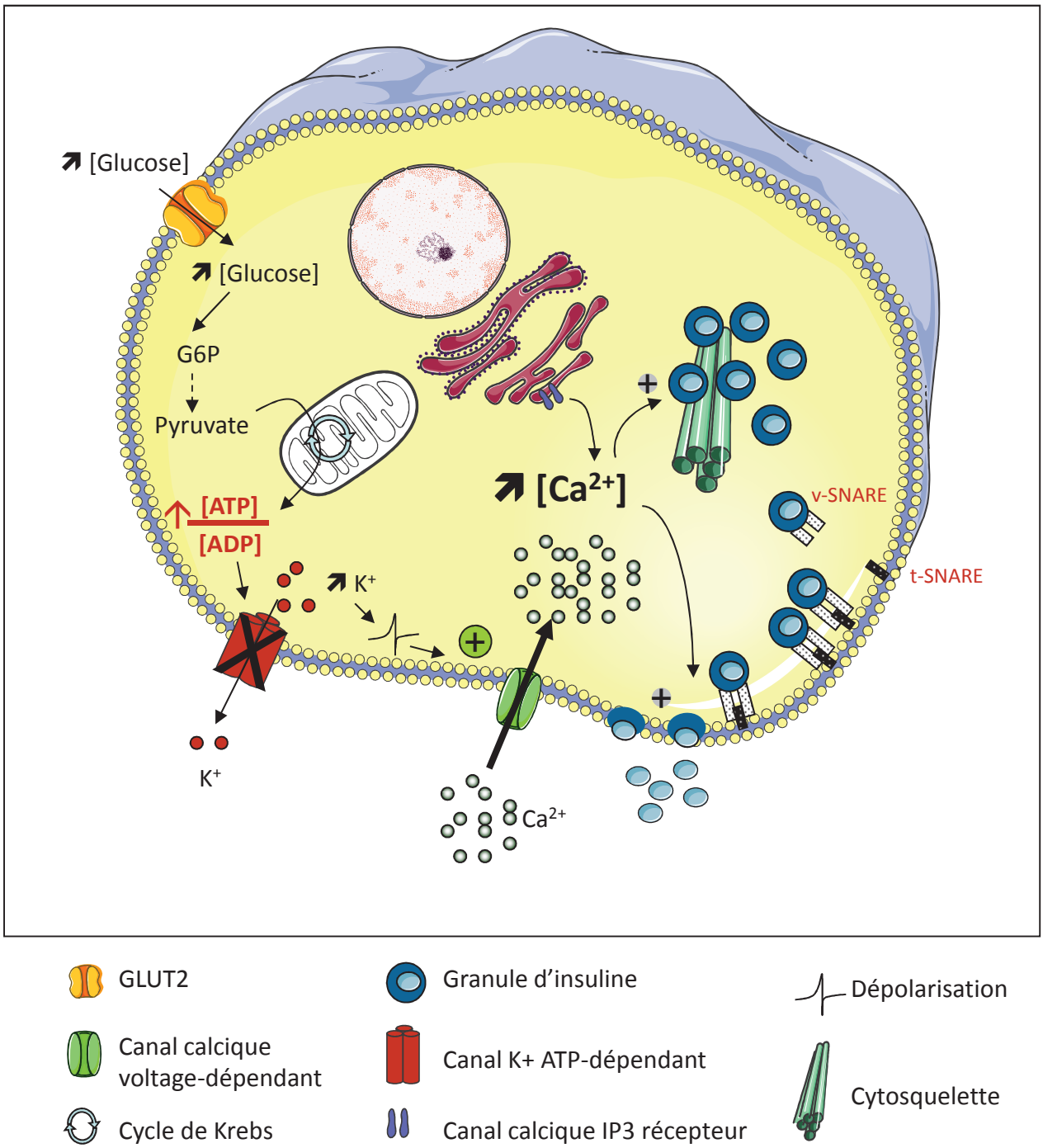
Le diabète de type II est caractérisé par une diminution de l'action de l'insuline sur les tissus périphériques, une diminution du nombre de cellules β mais aussi par un défaut de la sécrétion d'insuline. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la fonction insulino-sécrétrice de la cellule β est essentielle afin de mieux comprendre la physiopathologie du diabète de type II.

D/ Fonction insulino-sécrétrice de la cellule β pancréatique

La sécrétion d'insuline, dont le glucose est le principal stimulateur, se déroule en plusieurs étapes (Figure 22).

1- Les étapes proximales

L'élévation de la glycémie entraîne une importante entrée de glucose dans la cellule β par le transporteur de glucose GLUT2. Le glucose est alors métabolisé en Glucose 6P par la glucokinase et la phosphorylation oxydative engendre une production accrue d'ATP. L'augmentation du rapport ATP/ADP entraîne alors une inhibition des canaux potassiques ATP-dépendants, composés majoritairement de la sous-unité kir6.2 dans la cellule β, conduisant à une dépolarisation de la membrane plasmique.



G6P: Glucose-6-phosphate; SNARE: SolubleN-ethylmaleimide-sensitive (NSF)-attachment protein receptor

Figure 22: Sécrétion d'insuline par la cellules β en réponse au glucose

L'augmentation du rapport ATP/ADP induite par la glycolyse, entraîne une inhibition des canaux K^+ ATP-dépendants dépolarisant la membrane plasmique. Cette dépolarisation provoque l'activation des canaux calciques voltage-dépendants suivie d'une élévation de la concentration intra-cytoplasmique de Ca^{2+}. La signalisation calcique entraîne l'arrimage des vésicules d'insuline à la membrane puis la libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire.

2- Les étapes distales

La dépolarisation de la membrane plasmique active les canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) provoquant ainsi une entrée massive de Ca^{2+} dans le cytosol de la cellule jouant sur les dernières étapes de la sécrétion d'insuline :

• La translocation des vésicules d'insuline du cytoplasme vers la membrane plasmique.

• Une dépolymérisation du réseau sous cortical d'actine de la membrane plasmique.

• La fusion de la vésicule avec la membrane plasmique. Cette étape fait intervenir des protéines de la famille des protéines SNAREs (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor). Ces protéines peuvent être divisées en deux catégories : Les v-SNAREs (vesicle SNARE), comme les protéines VAMP (vesicle-associated membrane protein) sont présentes sur la vésicule ; Les t-SNAREs (target SNARE), présentes à la membrane plasmique, sont responsables de l'arrimage et de la fusion de la vésicule de la membrane grâce à des interactions avec les v-SNAREs. Syntaxine 1a et SNAP25 (Synaptosomal-associated protein 25) sont des t-SNAREs cruciaux dans la machinerie d'exocytose. Munc18 est un régulateur négatif de la sécrétion d'insuline. En condition normale, il forme un complexe avec Syntaxine 1a l'empêchant de se lier à d'autres protéines. La phosphorylation de Munc18 lors de l'entrée de Ca^{2+} provoque la dissociation du complexe et permet alors la formation du complexe SNARE et la libération du contenu de la vésicule dans le milieu extracellulaire (Wang and Thurmond, 2009).

E/ Rôles de la prolactine sur la cellule β

Au début des années 1990, certaines observations constataient que la PRL modifiait la prolifération des cellules β et leur fonctionnalité à la fois sur des lignées cellulaires et des modèles murins (Brelje and Sorenson, 1991; Brelje et al., 1994). Aujourd'hui, de nombreuses données décrivent certains mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la plasticité des cellules β et de leur fonction sécrétrice d'insuline.

1- Impact de la prolactine sur la plasticité cellulaire

Rôle de la signalisation PRL sur l'ontogenèse de la cellule β

L'expression du R PRL dans les différents types cellulaires du pancréas varie au cours du développement. A la naissance par exemple, le R PRL s'exprime préférentiellement dans les structures ductales et acinaires alors qu'au stade adulte son expression est localisée uniquement dans les îlots de Langerhans. La localisation et la cinétique d'expression du R PRL à des moments précis du développement suggèrent un rôle important du R PRL dans l'organogenèse du pancréas (Freemark et al., 1997) dont la forme longue est l'isoforme majoritairement exprimée dans les cellules β (Galsgaard et al., 1999). A ce jour, une seule étude publiée montre le rôle de la PRL sur l'expression des facteurs de différenciation des cellules β. La culture de lignées cellulaires mésenchymateuses, en présence de PRL, augmente significativement l'expression génique de Nkx6.1 suggérant un rôle capital des hormones lactogènes dans la différenciation des cellules β (González et al., 2010).

Effets prolifératifs et anti-apoptotiques des hormones lactogènes

En 2000, l'équipe de Rupangi C. Vasavada a montré que les souris surexprimant les PL spécifiquement dans les cellules β, proliféraient de façon accrue conduisant à la formation d'une masse β plus importante que celle des souris contrôles (Vasavada et al., 2000). Après un traitement par la streptozotocine, une toxine détruisant spécifiquement les cellules β, aucune hyperglycémie n'était observée dans ce modèle contrairement aux souris contrôles. Des études plus approfondies ont permis de mettre en évidence que les hormones lactogènes, *via* la voie Jak2/STAT5 permettaient la survie cellulaire par une augmentation spécifique de la protéine anti-apoptotique Bcl-Xl (Fujinaka et al., 2007). L'impact de la PRL a été largement étudié dans un autre contexte physiologique, la gestation, qui nécessite aussi une augmentation de la masse des cellules β.

En 2007, l'équipe de Seung K. Kim a montré que la surexpression de la ménine, dont l'expression est régulée négativement par les hormones lactogènes, dans des îlots de souris en gestation ne permettait pas l'expansion de la masse β. La ménine permettrait l'expression des CDKi p18 et p27. Ainsi, au cours de la gestation, l'augmentation de l'expression du R PRL dans les cellules β et des concentrations circulantes des hormones lactogènes favorisent la diminution de l'expression de la ménine entraînant à leur tour une diminution de

l'expression des CDKi provoquant ainsi une levée d'inhibition de la prolifération (Karnik et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré chez le rongeur que l'expression de FoxM1, une cible des hormones lactogènes, augmentait lors de la gestation. L'invalidation de ce gène spécifiquement dans le pancréas provoque chez des souris gestantes un défaut majeur de la prolifération des cellules β ne permettant pas l'adaptation de la masse β normalement observée chez les souris contrôles (Zhang et al., 2010).

Les souris R $PRL^{+/-}$ gestantes ne parviennent pas à adapter la masse des cellules β comparée à celle des souris contrôles car aucune augmentation du nombre ni de la taille des cellules β n'était constatée dans ce modèle (Huang et al., 2009). L'expression altérée de la ménine et de sa cible p18 dans les îlots de souris gestantes R $PRL^{+/-}$ ainsi que le défaut de phosphorylation d'Akt suggèrent que le phénotype observé chez les souris R $PRL^{+/-}$ serait dû à la fois à un défaut des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et à la taille des cellules (Hughes and Huang, 2011).

Très récemment, un autre mécanisme a été décrypté pour expliquer le rôle des hormones lactogènes sur la prolifération des cellules β (Schraenen et al., 2010). Lors de la gestation, l'expression des isoformes 1 et 2 de Tph (Tryptophan hydroxylase), une enzyme responsable de la conversion de tryptophane en sérotonine, augmente fortement et spécifiquement dans les îlots de Langerhans favorisant ainsi localement sa production. Chez les souris en gestation invalidées pour le récepteur de la sérotonine, un défaut majeur de prolifération des cellules β est observé démontrant ainsi le rôle crucial joué par la sérotonine produite localement sur la prolifération cellulaire. L'inhibition de la synthèse de sérotonine par une restriction alimentaire en tryptophane conduit également à un défaut de l'expansion des cellules β chez la souris gestantes (Kim et al., 2010; Schraenen et al., 2010).

2- Impact de la prolactine sur la sécrétion d'insuline

Le modèle murin R $PRL^{-/-}$ a montré l'importance physiologique du R PRL dans le métabolisme glucidique. En effet, ces souris ont été décrites comme étant intolérantes au glucose mais sans présenter de modification de la sensibilité à l'insuline par rapport aux souris contrôles (Freemark et al., 2002). L'analyse approfondie de leur masse β pancréatique a montré une diminution de 30% des souris R $PRL^{-/-}$ comparée à celle des contrôles

expliquant ainsi partiellement l'intolérance au glucose décrite. Des mesures de sécrétion d'insuline à partir d'îlots de Langerhans isolés a montré que les îlots provenant des souris R $PRL^{-/-}$ avaient un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Freemark et al., 2002).

Des études se sont ensuite intéressées aux partenaires de l'insulino-sécrétion dont l'expression et/ou l'activité pourraient être modifiées par la signalisation de la PRL. Certains éléments de la littérature suggèrent que l'addition de PRL sur des îlots de rat à la naissance pouvait augmenter l'expression de GLUT2 (De Mazancourt et al., 1994). L'addition de PRL, sur la lignée de cellules β murines MIN-6, augmente l'activité de la glucokinase (Shao et al., 2004). Le promoteur de la glucokinase contient des séquences de réponse aux facteurs STAT et l'ajout de PRL sur des cellules INS-1 augmente significativement l'expression génique de cette enzyme (Weinhaus et al., 2007). Ces résultats montrent que la PRL influence les partenaires impliqués dans les étapes proximales de l'exocytose. Par ailleurs, elle module de manière cruciale les étapes distales. En 2006, il a été montré une augmentation de l'expression génique et protéique des SNAREs syntaxine 1A, VAMP-2, SNAP25 et des isoformes I et V de la synaptotagmine chez la rate en gestation (Cunha et al., 2006). La culture d'îlots de rat à la naissance en présence de PRL a également montré une augmentation de l'expression de ces acteurs impliqués dans les étapes distales d'exocytose des vésicules d'insuline. Un an plus tard, cette même équipe a montré que la culture d'îlots néonataux de rats en présence de PRL provoquait une augmentation de la phosphorylation de SNAP 25, syntaxin1A, map-2, kinésine et munc18-c favorisant ainsi la formation des complexes SNAREs et l'interaction entre map-2 et la kinésine qui sont eux responsables de la translocation des vésicules à la membrane plasmique (Cunha et al., 2007).

En conclusion, les hormones lactogènes favorisent donc la plasticité de la masse β pancréatique par des effets prolifératifs et anti-apoptotiques. Néanmoins, ces effets potentiels sur l'ontogenèse de ces cellules restent totalement inconnus. La PRL favorise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose en modifiant l'expression et l'activité de partenaires impliqués dans les étapes proximales et surtout distales de cette sécrétion. Les mécanismes moléculaires régulés par la PRL ne sont pas aujourd'hui totalement élucidés.

Objectifs du travail

La démarche expérimentale de ce travail a été guidée par des études antérieures montrant que la PRL *via* son récepteur exerçait des effets majeurs sur le métabolisme en agissant sur deux organes impliqués dans la régulation de la balance énergétique : le tissu adipeux et le pancréas. Ces dernières décennies, de nombreuses recherches se sont portées sur la compréhension de la dérégulation de ces deux organes afin de lutter efficacement contre la progression des « épidémies » mondiales que sont l'obésité et le diabète. Ces maladies métaboliques sont la résultante de multiples facteurs environnementaux et génétiques. L'insulino-résistance des tissus périphériques, accompagnée de l'altération de la fonction et de la masse des cellules β pancréatiques sont des causes importantes de développement de diabète de type II. En 2009, un polymorphisme de la PRL a été décrit associé au développement de l'obésité (Meyre et al., 2009). Par ailleurs, l'hyperprolactinémie physiologique et pathologique est associée à une augmentation de la prise de poids. Toutes ces observations permettent de s'interroger sur les effets de la PRL sur la cellule β pancréatique et l'adipocyte.

Au moment où nous avons initié ce travail de thèse, plusieurs questions concernant l'impact du R PRL sur l'adipocyte et la cellule β pancréatique étaient posées.

1/ Quel est l'impact de la PRL au cours d'un régime obésogène ?

Au terme de la revue bibliographique, la PRL semble jouer un rôle pro-adipogénique et anti-lipogénique *via* l'expression de son récepteur dans les adipocytes. L'augmentation de la prise calorique par une modification du régime alimentaire est souvent associée à une prise de poids importante ainsi qu'à des modifications du statut métabolique. Il nous semblait indispensable de mieux caractériser l'effet de la PRL sur les adipocytes dans des conditions favorables à un stockage de l'énergie sous forme de triglycérides. Nous avons donc étudié l'impact d'un régime obésogène sur le modèle de souris R $PRL^{-/-}$.

2/ Quel est le rôle de la PRL sur la balance énergétique ?

Le contrôle de la prise alimentaire est un processus complexe faisant intervenir le système nerveux central et périphérique. Dans la littérature, la PRL est décrite comme ayant des propriétés orexigènes sur le système nerveux central. La régulation de la balance énergétique est à la fois contrôlée par les dépenses énergétiques et la prise alimentaire. Nous avons tenté de comprendre le rôle de la PRL sur la prise alimentaire et la dépense énergétique à l'aide du modèle déficient en R PRL en condition normale et au cours du développement de l'obésité.

3/ Quel est le rôle de la signalisation de la PRL sur l'ontogenèse et la fonction des cellules β pancréatiques ?

L'expression du R PRL dans la cellule β et les nombreux arguments de la littérature démontrant son implication dans le maintien de la masse des cellules β à l'âge adulte nous a poussés à mieux comprendre le rôle de la signalisation de la PRL sur l'ontogenèse de la cellule β au cours des adaptations périnatales.

Il est clairement établi que la PRL favorise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Néanmoins, les cibles moléculaires de la PRL responsables de ce mécanisme ne sont encore pas bien connues. Il nous paraissait donc important de mieux caractériser l'action de la PRL sur les mécanismes de sécrétion d'insuline.

L'objectif de ce travail a été de mieux caractériser les effets de la PRL sur la balance énergétique en étudiant plus précisément son impact sur la cellule β pancréatique et l'adipocyte sur des aspects intégratifs.

Dans la première partie, nous avons tenté d'élucider les effets de la PRL sur la balance énergétique à travers le modèle murin R $PRL^{-/-}$ soumis à un régime standard (riche en sucres) ou un régime riche en lipides qui induit le développement d'une obésité. Nous

avons étudié le comportement alimentaire, l'activité locomotrice et la dépense énergétique de ces animaux. Par des approches immunohistologiques et moléculaire, nous avons étudié le profil d'expression de gènes impliqués dans la fonction, la prolifération et la différenciation adipocytaire.

Dans la deuxième partie de la thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact du R PRL sur l'ontogenèse de la cellule β lors des adaptations périnatales et sur leur capacité à sécréter de l'insuline chez l'adulte. L'étude du modèle GK, un rat développant spontanément un diabète de type II, et du modèle de souris R $PRL^{-/-}$ à des temps-clé de l'ontogenèse du pancréas nous a permis de mieux comprendre l'impact de cette signalisation sur la mise en place des différentes cellules composant le pancréas. Nous avons vérifié *in vitro* l'altération de la capacité sécrétrice des cellules β des souris R $PRL^{-/-}$ en réponse au glucose et déterminé les partenaires impliqués dans cette sécrétion d'insuline potentiellement altérée.

Partie II

Impact d'un régime obésogène sur la balance énergétique des souris invalidées pour le R PRL

PARTIE II. Impact d'un régime obésogène sur la balance énergétique des souris invalidées pour le R PRL

I. Justification des approches expérimentales

L'ensemble des résultats exposés dans la première partie de ce travail a été obtenu grâce au modèle de souris R $PRL^{-/-}$ en comparaison de souris sauvages. Les paragraphes suivants décrivent les aspects méthodologiques non présentés dans l'article ainsi que les réflexions nous ayant aiguillés au choix des approches expérimentales pour répondre aux questions initiales.

L'étude de la signalisation de la PRL grâce aux souris déficientes en R PRL est un bon modèle d'étude puisque les PL et la PRL jouent un rôle primordial sur la détermination et la différenciation adipocytaire. Ainsi, l'utilisation de ces souris soumises à un régime hyperlipidémique nous a permis d'étudier l'impact de PRL, à la fois sur les différents dépôts adipeux, mais également sur un aspect plus intégratif en déterminant la balance énergétique.

Nous avons réalisé à trois types expériences indépendantes :

• La première expérience a consisté à étudier l'évolution de la prise de poids et celle de la glycémie après 16 heures de jeûne au cours des régimes et à la fin des régimes, à déterminer les concentrations plasmatiques de paramètres métaboliques ainsi que la masse des organes des différents groupes de souris. A partir des tissus prélevés, nous avons procédé à l'analyse histologique des dépôts adipeux et quantifié l'expression de marqueurs impliqués dans la détermination et la fonction adipocytaire.

• La deuxième expérience a permis de confirmer les résultats précédemment obtenus sur la prise de poids des différents groupes de souris et de mesurer la glycémie après 4 heures de jeûne chaque semaine durant toute l'expérience. Nous avons également étudié la balance énergétique de ces souris à l'aide de cages métaboliques qui déterminent les valeurs de la prise alimentaire, de l'activité locomotrice et de la consommation d'O_2 des souris.

• Enfin la troisième expérience nous a permis de délimiter et de comparer les zones métaboliquement actives après une exposition au froid de 45 minutes, grâce à la technologie PET-Scan.

Article 1

Beige differentiation of adipose depots in mice lacking prolactin receptor protects against high-fat-diet-induced obesity

Julien Auffret, Say Viengchareun, Nadège Carré, Raphaël G. P. Denis, Christophe Magnan, Pierre-Yves Marie, Adeline Muscat, Bruno Fève, Marc Lombès, and Nadine Binart.

***Faseb Journal* 26, 3728–3737 (2012)**

The FASEB Journal • Research Communication

Beige differentiation of adipose depots in mice lacking prolactin receptor protects against high-fat-diet-induced obesity

Julien Auffret,[*,†] Say Viengchareun,[*,†] Nadège Carré,[*,†] Raphaël G. P. Denis,[‡] Christophe Magnan,[‡] Pierre-Yves Marie,[§] Adeline Muscat,[‖] Bruno Fève,[‖] Marc Lombès,[*,†,¶] and Nadine Binart[*,†,¶,1]

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U693, Le Kremlin-Bicêtre, France; †Université Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, Unité Mixte de Recherche (UMR)-S693, Le Kremlin-Bicêtre, France; ‡Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Équipes d'Accueil Conventionnées (EAC) 4413, Equipe Homéostasie Energétique et Régulations Nerveuses et Endocrines, Paris, France; §INSERM U961, Centre Hospitalier Universitaire-Nancy, Nancy, France; ‖UMR-S 938, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Site St Antoine, Paris, France; and ¶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital de Bicêtre, Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, Le Kremlin Bicêtre, France

ABSTRACT **Stimulating conversion of white fat to metabolically active adipocytes (beige fat) constitutes a promising strategy against weight gain and its deleterious associated-disorders. We provide direct evidence that prolactin (PRL), best known for its actions on the mammary gland, plays a pivotal role in energy balance through the control of adipocyte differentiation and fate. Here we show that lack of prolactin receptor (PRLR) causes resistance to high-fat-diet-induced obesity due to enhanced energy expenditure and increased metabolic rate. Mutant mice displayed reduced fat mass associated with appearance of massive brown-like adipocyte foci in perirenal and subcutaneous but not in gonadal fat depots under a high-fat diet. Positron emission tomography imaging further demonstrated the occurrence of these thermogenic brown fat depots in adult mice, providing additional support for recruitable brown-like adipocytes (beigeing) in white fat depots. Consistent with the activation of brown adipose tissue, PRLR inactivation increases expression of master genes controlling brown adipocyte fate (PRDM16) and mitochondrial function (PGC1α, UCP1). Altered *pRb/Foxc2* expression suggests that this PRL-regulated pathway may contribute to beige cell commitment. Together, these results provide direct genetic evidence that PRLR affects energy balance and metabolic adaptation in rodents *via* effects on brown adipose tissue differentiation and function.—Auffret, J., Viengchareun, S., Carré, N., Denis, R. G. P., Magnan, C., Marie, P.-Y., Muscat, A., Fève, B., Lombès, M., Binart, N. Beige differentiation of adipose depots in mice lacking prolactin receptor protects against high-fat-diet-induced obesity. *FASEB J.* 26, 3728–3737 (2012). www.fasebj.org**

Key Words: thermogenesis · adipocyte

Body weight is finely regulated through energy expenditure and nutritional, neuronal, and hormonal signals. Organs, such as the brain, pancreas, and liver, skeletal muscle, and adipose tissue can integrate these endogenous or environmental factors to ensure metabolic homeostasis. Prolactin (PRL), initially identified for its ability to stimulate mammary gland development and lactation, was thereafter suspected to exert pleiotropic functions, including effects on growth, development, immunoregulation, brain function and behavior, and electrolyte and energy homeostasis (1–3). However, the physiological relevance of most of these functions in humans remains an open issue.

The biological actions of PRL are mediated by its interaction with PRL receptor (PRLR), a member of the cytokine receptor superfamily (4, 5). Compared to growth hormone and its cognate receptor, the actions

Abbreviations: ADRβ3, β3-adrenoceptor; BAT, brown adipose tissue; C/EBPβ, CCAAT/enhancer-binding protein β; DEXA, dual-energy X-ray absorptiometry; FDG, fluoro-2-deoxyglucose; FOXC2, forkhead box protein C2; HFD, high-fat diet; HOMA, homeostasic model assessment; IL-6, interleukin-6; PBS, phosphate-buffered saline; PET, positron emission tomography; PGC1α, peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α; PPARγ, peroxisome proliferator-activated receptor γ; pRb, protein retinoblastoma; PRDM16, PR domain-containing 16; PRL, prolactin; PRLR, prolactin receptor; Rb, retinoblastoma; SC, standard chow; SREBP1, sterol regulatory element-binding protein 1; UCP1, uncoupling protein 1; WAT, white adipose tissue; ZFP423, 30-zinc finger transcription factor

[1] Correspondence: INSERM U693, Le Kremlin-Bicêtre, F-94276, France. E-mail: nadine.binart@inserm.fr
doi: 10.1096/fj.12-204958
This article includes supplemental data. Please visit *http://www.fasebj.org* to obtain this information.

0892-6638/12/0026-3728 © FASEB

of PRL and PRLR on metabolic homeostasis under nonlactating conditions have received less attention. However, within the past decade, a wealth of experimental data has documented the potential role of PRLR signaling in body weight regulation, pancreas development and insulin secretion, and adipose tissue physiology (3). Regarding body weight regulation, some conflicting results have emerged from $PRLR^{-/-}$ mice, while decreased weight gain was observed in 8–9 mo old $PRLR^{-/-}$ females (6). This was not confirmed by subsequent studies in younger animals (7, 8).

Interestingly, several reports described higher body weight in humans with prolactinoma, but the mechanisms underlying this association are poorly understood and likely pleiotropic (9). Some researchers suggest that weight loss in humans occurs after complete or near normalization of serum PRL with dopamine agonists (10). Several lines of evidence support a direct role for PRL in adipogenesis. PRL enhances the expression of CCAAT/enhancer-binding protein β (*C/EBP*β) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (*PPAR*γ) in NIH-3T3, two master genes of adipogenesis (11). Lack of PRLR in mice results in an impaired development of both parametrial and subcutaneous adipose tissues associated with a lower number of adipocytes without change in their volume (8). PRL signaling also alters lipid metabolism through inhibition of lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue (WAT) and inhibits release of adipokines, including leptin, adiponectin, and interleukin-6 (IL-6) (12). In addition, PRL potentiates the insulin effect on leptin release in cultured brown adipocytes (13). Most important, PRL signaling is essential for normal perinatal brown adipocyte thermogenesis. Newborn mice lacking PRLR have hypotrophic brown adipose tissue (BAT) depots that express low levels of adipogenic markers, reducing mouse viability during cold challenge (14). Moreover, immortalized $PRLR^{-/-}$ preadipocytes fail to undergo differentiation into mature brown adipocytes, and could be rescued by reintroduction of PRLR (14). Interestingly, PRL is also released both by primary preadipocytes and adipose explants, and its expression changes according to WAT localization, suggesting a potential autocrine-paracrine loop in a depot-specific manner (15).

Although all these experimental data converge to support a physiological role of PRLR in the control of energy homeostasis, the pathophysiological involvement of this receptor on adipocyte plasticity remains unclear. The aim of the present study was to clarify the potential adaptive function of PRL signaling under obesogenic conditions. For this purpose, we subjected $PRLR^{-/-}$ mice to a high-fat diet (HFD) for 16 wk and analyzed their metabolic phenotypes. Remarkably, $PRLR^{-/-}$ mice were highly resistant to HFD-induced obesity, a phenomenon that involves a brown conversion of white fat depots defined as beigeing (16, 17). Thus, manipulations of the PRL signaling pathway could hopefully be translated into adjunct therapy to raise energy expenditure and promote weight loss.

MATERIALS AND METHODS

Mice

$PRLR^{-/-}$ and wild-type male mice (8 wk old), on a pure 129/SvJ background, were kept on a 12-h light-dark cycle in a temperature-controlled colony room with *ad libitum* access to tap water, and were challenged for 16 wk with standard chow (SC; 17% fat, 23% protein, 60% carbohydrates; Harlan, Gannat, France) or HFD (60% fat, 20% protein, 20% carbohydrates; Research Diets, Gentofte, Denmark) (18). Body weight was measured weekly. Mice were sacrificed, and tissues were removed, weighed, and used for subsequent gene expression and histological analyses. All procedures were approved by the Ministère de l'Agriculture, France.

Body fat determination

Body weight composition was evaluated by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) using a Piximus apparatus (Lunar Corp.; Madison, WI, USA). Mice were anesthetized by intraperitoneal injection (100 μl/10 g body weight) of a saline mixture containing 0.1% xylazine (Rompun; Bayer Pharma; Puteaux, France) and 10 mg/ml of ketamine (Imalgène 1000, Merial, Lyon, France). Fat mass and lean masses were calculated according to computerized measurements of the Piximus apparatus.

Metabolic parameters exploration

Mice were analyzed for whole-body energy expenditure, as well as oxygen consumption (Vo_2), food intake (g), and spontaneous activities using calorimetric cages with bedding. They had *ad libitum* access to food and water (Labmaster; TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany). Animals were acclimated in individual cages for 48 h before experiments. Data were recorded every 40 min during the entire experiment. The flow was calibrated with O_2 and CO_2 mixtures of known concentrations before the experiment. Whole energy expenditure was calculated according to the Weir equation. Food and water consumption were recorded by highly sensitive online feeding and drinking sensors. Each cage enabled tracking of mice with infrared light, thus allowing measurement of total activity. The sensors for gases and detection of movement operate efficiently in both light and dark phases, allowing continuous recording. Mice were monitored for body weight and composition at entry and exit of the experiment. Body mass composition (lean tissue mass, fat mass, free water, and total water content) was analyzed using an EchoMRI whole-body composition analyzer (Echo Medical Systems, Houston, TX, USA). Data analysis was performed using extracted value of Vo_2 consumed, (expressed in ml/kg/h), and energy expenditure (kcal/kg/h).

Plasma measurements

Blood was collected at sacrifice, and fasting plasma insulin in mice unfed for 16 h was measured using the Ultra Sensitive Insulin ELISA kit (Crystal Chem Inc., Downers Grove, IL, USA). Glycemia was determined with Accu-Chek Performa Glucometer (Roche, Bâle, Switzerland). Plasma leptin and resistin were measured using the MADPK-71K kit (Millipore, Molsheim, France). Total cholesterol levels were determined by enzymatic colorimetric assays (Sobodia, Montbonnot-Saint-Martin, France).

Homeostasic model assessment (HOMA) determination

The HOMA-IR and HOMA-β indexes were used to quantify insulin resistance and β-cell function, respectively. These indexes were determined as follows: HOMA-IR = (glucose × insulin)/405 and HOMA-β = (360 × insulin)/(glucose – 63) %. Fasting glucose and insulin are expressed as milligrams per deciliter and milliunits per liter, respectively.

Immunocytochemical and histomorphological procedures

Tissues were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, dehydrated, and embedded in paraffin, and 5-μm-thick sections were prepared. Sections were permeabilized with 0.1% Triton X-100 diluted in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min at room temperature. Sections were rinsed again in PBS, incubated in peroxidase blocking solution (3% H_2O_2 in PBS) for 10 min to block endogenous peroxidase activity, rinsed in PBS, and incubated with 5% rabbit serum blocking solution diluted with antibody diluent (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) for 1 h at room temperature. Sections were subsequently incubated overnight at 4°C with goat anti-uncoupling protein 1 (UCP1) antibody (sc-6528; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) diluted 1:100. After washes in PBS, sections were incubated with biotinylated rabbit anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Newmarket, UK; diluted 1:500 in blocking solution) for 1 h at room temperature. Following 3 rinses in PBS, sections were incubated with HRP-streptavidin (Vector Laboratories, Peterborough, UK) diluted in PBS for 45 min at room temperature, rinsed in PBS, incubated in DAB peroxidase substrate solution for 2–5 min, rinsed in distilled water, and coverslipped with glycergel (Dako, Trappes, France). Paraffin-embedded adipose sections were analyzed after hematoxylin and eosin staining. Histological quantification was performed using the ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Adipocyte size was measured on >150 cells per depot and per mouse (5 mice/group). Percentage of BAT was determined by calculating BAT area on total area of perirenal adipose tissue.

Western blot analyses

Total protein extracts were prepared from perirenal WAT isolated from mice. Briefly, WAT was lysed as described previously (13) using the Tissuelyser apparatus (Qiagen, Courtaboeuf, France); then 30 μg of protein was submitted directly to SDS-PAGE. After protein blotting on an Odyssey nitrocellulose membrane (LI-COR, Lincoln, NE, USA), blots were incubated for 1 h at room temperature in a blocking buffer (LI-COR) before an overnight incubation at 4°C with a sheep anti-UCP1 antibody (1:3000; kindly provided by Prof. D. Ricquier, Institut Cochin, Paris, France). After washes, blots were incubated with an IRDye 680-conjugated affinity purified anti-sheep IgG second antibody (1:10,000; ABM, Richmond, BC, Canada) for 1 h at room temperature. After washes, proteins were visualized with an Odyssey Fc apparatus (LI-COR). GAPDH protein was used as an internal control: blots were incubated for 1 h at room temperature with rabbit anti-GAPDH (1:5000; Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) followed by 1 h incubation at room temperature with an IRDye 800-conjugated affinity purified anti-rabbit secondary antibody (1:10,000; Thermo Scientific, Illkirch, France). UCP1 infrared fluorescence was normalized to GAPDH as determined by densitometry using the Image Studio software (LI-COR).

Positron emission tomography (PET)

PET recording was performed on 6-mo-old male mice with 2-[^{18}F]fluoro-2-deoxyglucose (18F-FDG), an ^{18}F-labeled glucose analog, which is known to be actively trapped by activated BAT in mice (19, 20). After 45 min of cold exposure at 6°C, each of the 4 analyzed mice received ~15 MBq of ^{18}F-FDG *via* tail-vein injection; 45 min later, a whole-body recording was started under continuous anesthesia by isoflurane, (5% induction, 1–2% maintenance) and using a dedicated small-animal PET system (Inveon; Siemens, Knoxville, TN, USA). After a 30-min recording period and conventional 3D image reconstruction, the volume of the foci with high FDG activity was determined in 2 areas, using a threshold value of 2 standardized uptake value (SUV): within the interscapular area, which is known to be a depot of BAT in normal mice (19, 20), and along the remaining part of the dorsal walls from the thorax and abdomen, and thus in sites known to normally involve WAT in normal conditions.

Gene expression analyses

Quantitative real-time PCR was performed as described previously (14). After DNase I treatment, RNA was reverse transcribed and used for quantitative RT-PCR (qRT-PCR) using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Final primer concentrations were 300 nM (see **Table 1** for primer sequences). Reaction parameters were carried out on a StepOne Real-

TABLE 1. *Primer sequences of genes analyzed in quantitative RT-PCR*

Name	Accession number	Amplicon	Sense primer	Antisense primer
18S	X00686	66 bp	CCCTGCCCTTTGTACACACC	CGATCCGAGGGCCTCACTA
PRDM16	NM_027504	78 bp	CTTCTCCGAGATCCGAAACTTC	GATCTCAGGCCGTTTGTCCAT
PGC-1α	AF049330	162 bp	CCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAA	CCTTTCGTGCTCATAGGCTTCATA
UCP1	BC01270	150 bp	GCCAAAGTCCGCCTTCAGAT	TGATTTGCCTCTGAATGCCC
AdRβ3	NM_013462	150 bp	TGCGCACCTTAGGTCTCATTAT	AAGGCGGAGTTGGCATAGC
ZFP423	NM_033327	95 bp	CCCCCTGATGGGAATAATGC	GCAATGCGCCTGTTGGA
C/EBPα	NM_007678	116 bp	CGCAAGAGCCGAGATAAAGC	CAGTTCACGGCTCAGCTGTTC
PPARγ2	U09138	161 bp	GCATCAGGCTTCCACTATGGA	AAGGCACTTCTGAAACCGACA
SREBP1	NM_011480	83 bp	CGGCCCCTTCCCTCTACTC	AGATACCACGATTGTTTTGGAAGTG
pRb1	NM_009029	89 bp	CTGGCCTGTGCTCTTGAAGTT	CCACGGGAAGGACAAATCTGT
Foxc2	NM_013519	120 bp	TCCATGGGAACCTTCTTCGA	GATCTCAAACTGAGCTGCGGATA

Table shows abbreviations of the genes, their GenBank or U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI) accession number, and the 5′ to 3′ nucleotide sequences of the sense and antisense primers.

Time PCR System (Applied Biosystems). Relative expression within a given sample was calculated as a ratio [specific gene (amol)/18S (fmol)]. Results are means ± SE.

Data analysis

Data are expressed as means ± SE. Data were analyzed using a nonparametric Mann-Whitney test or, for multiple comparisons, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's posttest as appropriate with use of the computer software Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Comparisons between time points were analyzed using linear regression. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

PRLR$^{-/-}$ mice are resistant to HFD-induced obesity despite high food intake

Previous studies on PRLR$^{-/-}$ mice showed a mild body weight difference compared to wild-type mice (6). We examined whether this receptor inactivation affects body weight regulation. We found that PRLR knockout resulted in a small decrease in the body weight gain over the 24 wk when male mice were maintained on SC (**Fig. 1*A***). To investigate further the metabolic effect of PRL signaling, we subjected the PRLR$^{-/-}$ and control mice to an HFD. As expected, 16 wk of *ad libitum* HFD feeding caused a sharp increase in body weight in both groups; however, PRLR$^{-/-}$ mice gained 16% less weight than controls during the same period ($P<0.001$; Fig. 1*A*). This difference of body weight was associated with a profound reduction of adipose mass with no difference in the lean mass, as revealed by DEXA method ($P<0.01$; Fig. 1*B*, *C*). Indeed, examination of body fat mass revealed a marked 40% reduction of the perirenal adipose pad normalized to body weight in PRLR$^{-/-}$ mice ($P<0.01$; Fig. 1*D*), while gonadal and subcutaneous WAT depot, kidney, and spleen weights (Fig. 1*E–H*) were similar, pointing to a genotypic and diet-related difference in site-specific adipose depots.

To investigate the mechanisms underlying the resistance to HFD-induced obesity of PRLR$^{-/-}$ mice, we measured behavioral and metabolic adjustments to the diet, given that energy intake should equal energy expenditure to maintain energy homeostasis. As depicted in **Fig. 2*A***, over 4 consecutive days in metabolism cages, cumulative food intake on SC feeding was significantly increased in PRLR$^{-/-}$ mice compared to controls; the same trend was observed when animals were fed HFD. No change in locomotor activity was detected between the groups (Supplemental Fig. S1). Oxygen consumption and energy expenditure were significantly increased in PRLR$^{-/-}$ mice as compared to WT mice both on SC feeding and after 16 wk of HFD feeding (Fig. 2*B*, *C*). Under HFD, diet-induced enhancement of metabolic rate and energy expenditure, normalized to lean mass, was calculated at 9.5 and 9.8%, respectively, in control mice but increased to 12.8 and 11.9% in PRLR$^{-/-}$ mice. Taken together, our data

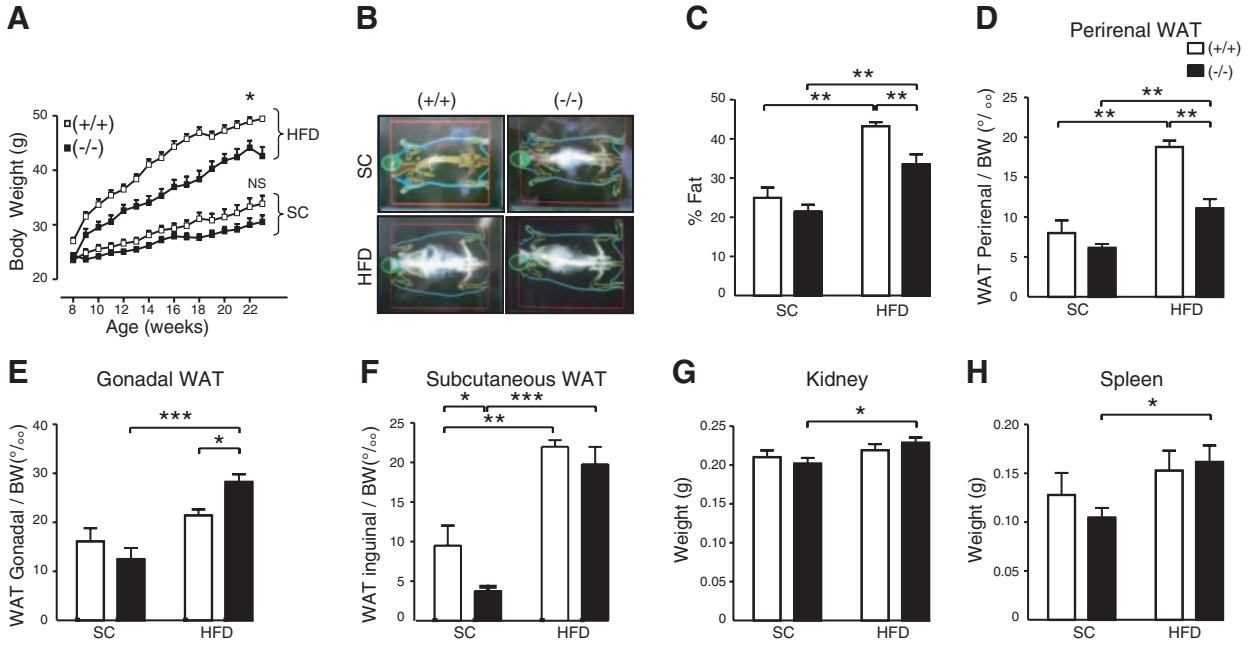


Figure 1. Lack of PRLR impaired HFD-induced obesity in male mice. *A*) Body weights of PRLR$^{+/+}$ (n=5–9) and PRLR$^{-/-}$ mice (n=8–9) during 16-wk time course of SC or HFD feeding. Linear regression was performed for each curve, and regression coefficients were compared. *B*) Representative images of DEXA analyses in PRLR$^{+/+}$ and PRLR$^{-/-}$ mice under SC or HFD feeding. *C*) Determination of body fat mass percentage following DEXA analyses (n=5–9). *D–F*) Perirenal (*D*) gonadal (*E*), and subcutaneaous (*F*) WAT/body weight (BW) ratio were determined on 6-mo-old PRLR$^{+/+}$ (n=5–9) and PRLR$^{-/-}$ (n=8–9) mice. Results are expressed as mean ± SE WAT mass (mg)/BW (g) (‰). *G*, *H*) Kidney (*G*) and spleen (*H*) mass. Results are expressed as mean ± SE tissue mass (g). *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$.

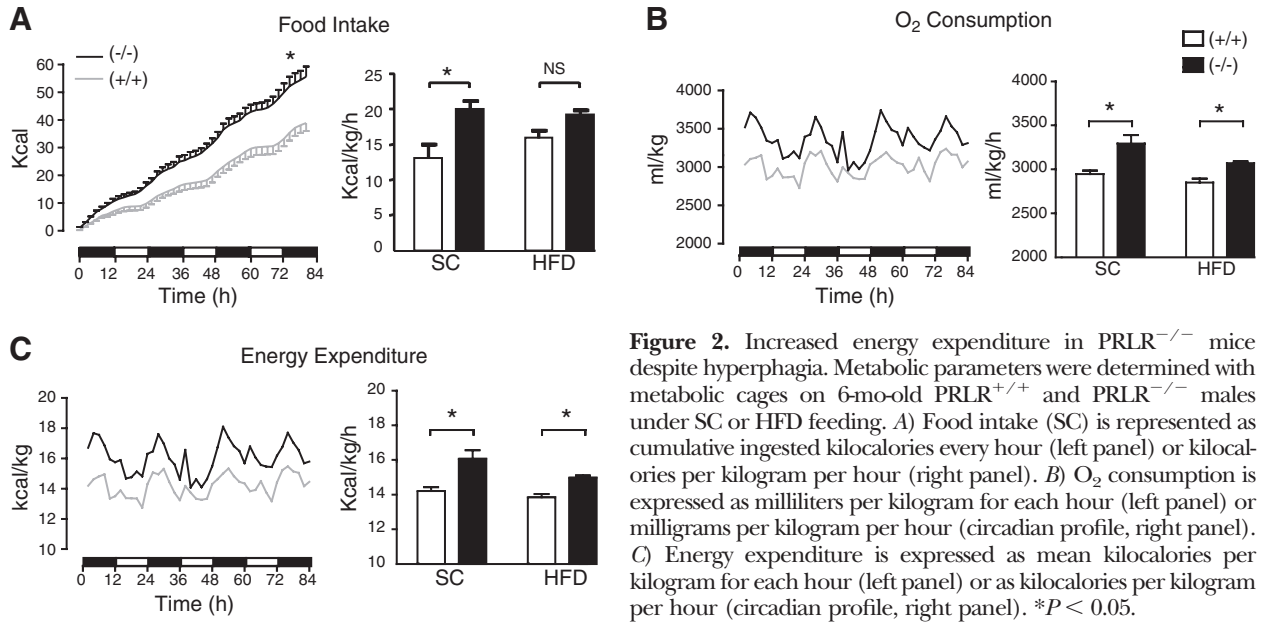


Figure 2. Increased energy expenditure in PRLR$^{-/-}$ mice despite hyperphagia. Metabolic parameters were determined with metabolic cages on 6-mo-old PRLR$^{+/+}$ and PRLR$^{-/-}$ males under SC or HFD feeding. *A*) Food intake (SC) is represented as cumulative ingested kilocalories every hour (left panel) or kilocalories per kilogram per hour (right panel). *B*) O_2 consumption is expressed as milliliters per kilogram for each hour (left panel) or milligrams per kilogram per hour (circadian profile, right panel). *C*) Energy expenditure is expressed as mean kilocalories per kilogram for each hour (left panel) or as kilocalories per kilogram per hour (circadian profile, right panel). $*P < 0.05$.

demonstrate that PRL signaling is involved in normal energy expenditure and body weight regulation.

PRLR$^{-/-}$ mice are protected against HFD-induced insulin resistance

To further assess the effect of PRLR deletion on glucose metabolism, we showed that under HFD, WT mice exhibited a glucose intolerance associated with a drastic increase in plasma insulin levels; whereas PRLR$^{-/-}$ mice improved their glucose homeostasis, as revealed by normal glycemia with appropriate insulin secretion (**Fig. 3*A*, *B***). Calculated HOMA-IR and HOMA-β indexes provided additional support for the improvement of insulin resistance and the conservation of insulin secretion in the absence of PRLR under HFD conditions (Fig. *C*, *D*). Leptin levels were elevated after HFD feeding in both groups, but they were significantly lower in the PRLR$^{-/-}$ mice than in control mice, as expected from lesser weight gain (Fig. 3*E*). Finally, in contrast to WT mice, resistin levels were unchanged in PRLR$^{-/-}$ mice, whatever the diet, excluding a major contribution of this insulin action inhibitor in the prevention of HFD-induced glucose intolerance (Fig. 3*F*).

BAT-like remodeling of perirenal WAT in PRLR$^{-/-}$ mice

We next explored whether the resistance to HFD-induced body weight gain in PRLR$^{-/-}$ mice was associated with histomorphological modifications of fat depots. Both subcutaneous and gonadal WAT disclosed a marked reduction of adipocyte size in PRLR$^{-/-}$ mice under HFD conditions, consistent with the global decrease in fat mass (Supplemental Fig. S2). This finding suggests a major effect of PRL signaling on the adipocyte metabolic activity. Several multilocular brown-like adipocytes were detected in perirenal WAT of PRLR$^{-/-}$ HFD-fed males (**Fig. 4*A***). In contrast, significantly fewer brown-like adipocytes were found embedded in the perirenal fat depot of PRLR$^{+/+}$ HFD-fed mice (Fig. 4*A*). Quantification of brown-like adipose area in the perirenal tissues showed a dramatic increase of the emergence of browning (Fig. 4*B*), suggesting that in the absence of PRL signaling, HFD induces BAT-like remodeling of perirenal WAT, as revealed by BAT-specific UCP1 immunostaining (Fig. 4*C*). These observations were confirmed by Western blot analysis (Fig. 4*D*) that revealed a 3-fold increase of UCP1

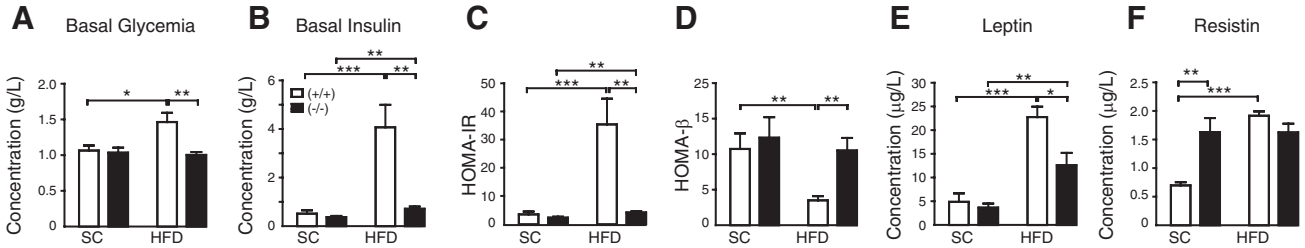


Figure 3. PRLR$^{-/-}$ mice are protected against HFD-induced diabetes. *A*, *B*) Basal glycemia (*A*) and basal plasma insulin (*B*) were measured from 6-mo-old PRLR$^{-/-}$ and PRLR$^{+/+}$ males unfed for 16 h (n=5–9/group). *C*, *D*) HOMA-IR (*C*) and HOMA-β (*D*) indexes were determined from basal glycemia and insulinemia as described in Materials and Methods. *E*, *F*) Plasma leptin (*E*) and resistin (*F*) levels were measured in PRLR$^{-/-}$ and PRLR$^{+/+}$ mice (n=9–10/group). $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$.

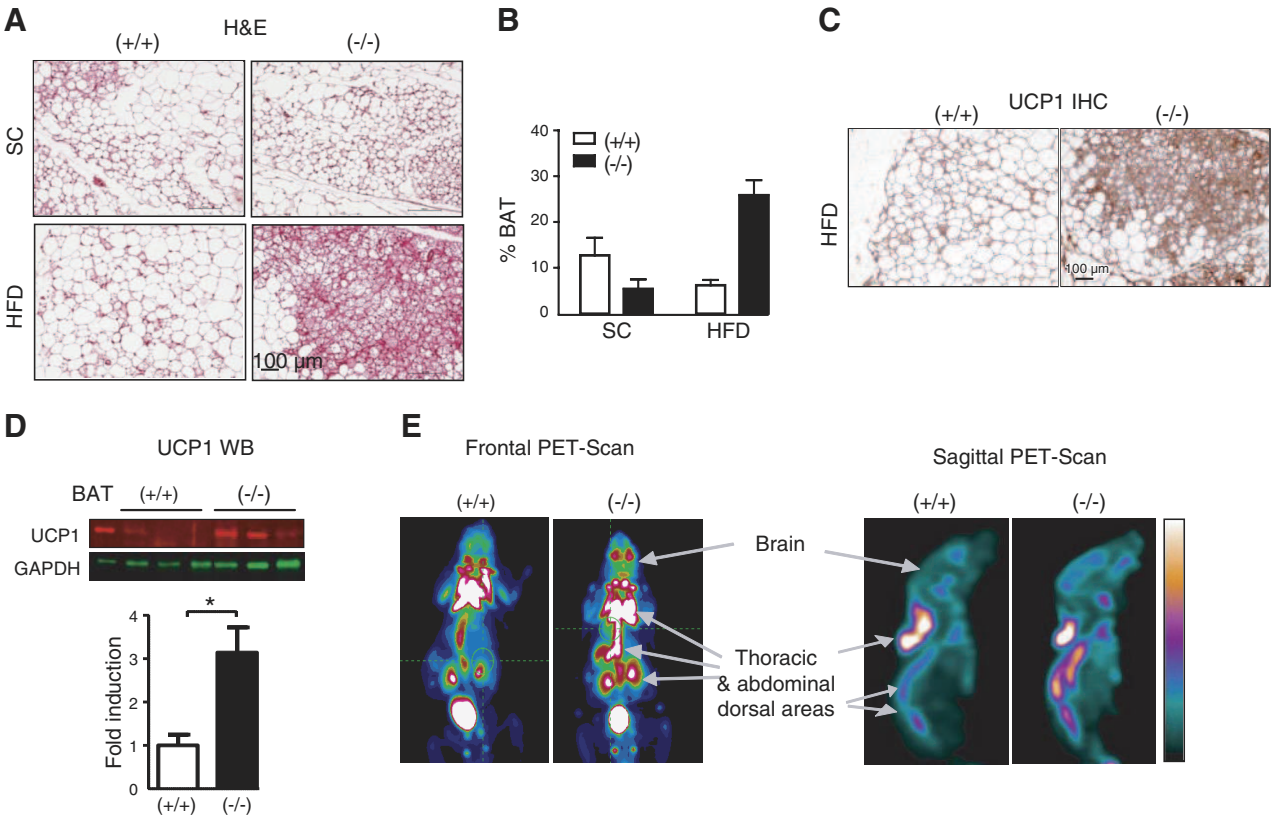


Figure 4. Emergence of brown adipocytes in white fat depots in PRLR$^{-/-}$ male mice. *A*) Paraffin-embedded perirenal WAT sections of PRLR$^{+/+}$ and PRLR$^{-/-}$ mice under SC and HFD feeding (n=3–5/group) were stained with hematoxylin and eosin (H&E). *B*) Percentage of BAT in perirenal WAT was assessed with ImageJ software. *C*) Representative photomicrographs of perirenal WAT sections of UCP1 immunostaining (IHC). *D*) Western blot analysis of UCP1 in perirenal WAT of PRLR$^{-/-}$ HFD-fed mice compared to controls. Proteins (30 µg) were loaded for immunoblotting with specific antibodies raised against UCP1 and GAPDH. BAT proteins (4 µg) were used as a positive control (representative illustration of 3 PRLR$^{+/+}$ and 3 PRLR$^{-/-}$ WAT). UCP1 infrared fluorescence normalized to that of the GAPDH was determined by densitometry using the Image Studio software (LI-COR) and expressed as fold induction (n=4–6/group). *$P < 0.05$. *E*) Coronal and sagittal FDG-PET slices obtained after a cold stress (45 min at 6°C) in PRLR$^{+/+}$ and PRLR$^{-/-}$ HFD-fed mice (see Supplemental Material). Areas of high FDG uptake (standardized uptake value >2) are represented in orange to white colors.

protein in perirenal WAT of PRLR$^{-/-}$ mice. Further evidence for increased metabolic activity in PRLR$^{-/-}$ mice was provided by PET tracking of uptake of FDG, a glucose analog taken up avidly by activated BAT in humans as well as in rodents after a cold challenge (19, 20). As illustrated in Fig. 4*E*, all mice had large foci of high FDG uptake in the upper part of the dorsal body area, as visualized on frontal and sagittal sections. PRLR$^{-/-}$ animals exhibited additional foci of high FDG activity in the sites known to mainly harbor WAT under normal conditions, with a calculated FDG activity volume of 785±1.35 mm^3, compared to 463±1.81 mm^3 in PRLR$^{+/+}$ mice.

Among multiple metabolic adaptations, HFD enhances dissipation of chemical energy in the form of heat in brown adipocytes (21). This physiological adjustment is achieved through activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α (PGC1α)-dependent pathways that leads to mitochondrial biogenesis and increased expression of BAT-selective genes [PR domain-containing 16 (*PRDM16*), *UCP1*]. To gather insights into adipocyte function and to further evaluate the effect of PRLR on adipocyte differentiation, we assessed the expression of brown and adipogenic markers in different WAT depots. As presented in **Fig. 5*A***, HFD strongly induced *PRDM16*, *PGC1α*, *UCP1*, and adrenoreceptor β3 (*AdRβ3*) mRNA expression in perirenal WAT of PRLR$^{-/-}$ mice along with the pronounced BAT-like phenotype, in contrast to what was observed under SC feeding. Interestingly, the expression of adipogenic markers, such as 30-zinc finger transcription factor (ZFP423), C/EBPα, PPARγ2, and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1), was significantly reduced in WAT depots of PRLR$^{-/-}$ mice as compared to those of WT animals under SC feeding. This impaired expression of adipogenic genes in WAT was rescued after HFD (Fig. 5*B*), which suggests that compensatory mechanisms may counteract PRL signaling defects. Interestingly, this adaptive brown-like cell programming is highly dependent on the location of adipose depots, in subcutaneous but not gonadal fat (Supplemental Fig. S3), in accordance with the well-known plasticity of specific fat depots (22, 23). Altogether, these data indicate that the lack of PRL signaling selectively facilitates BAT-like remodeling under specific metabolic conditions.

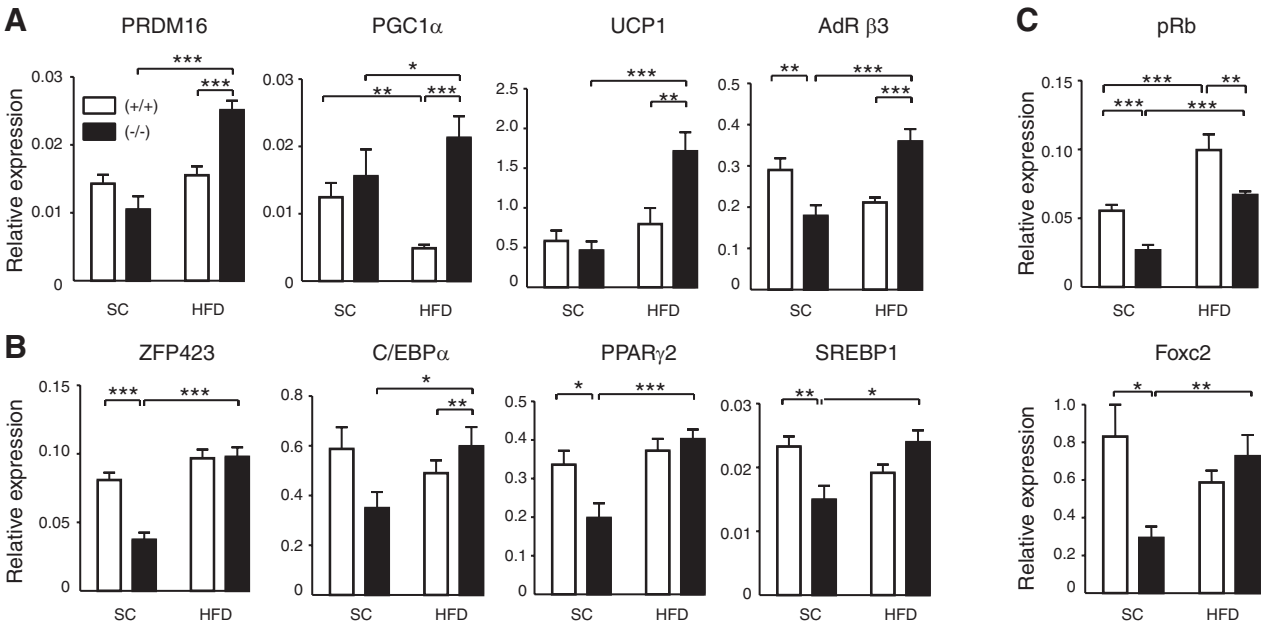


Figure 5. PRLR controls beige cell transdifferentiation through pRb signaling. *A*) Expression of brown fat markers (PRDM16, PGC1α, UCP1, AdRβ3) and of adipocyte differentiation genes (*ZFP423, C/EBPα, PPARγ2, SREBP1*), normalized to 18S mRNA levels, were quantified by qPCR in perirenal WAT of 6-mo-old male mice from both genotypes (n=8–10). *B*) *pRb* and *Foxc2* mRNA levels were determined by qPCR in perirenal WAT. *FoxC2* expression was significantly lower in PRLR$^{-/-}$ mice under SC feeding (n=8–10/group). *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$.

Altered protein retinoblastoma (pRb)/forkhead box protein C2 (Foxc2) pathway is a key molecular switch for beige cell emergence

We next investigated the molecular mechanisms by which the absence of PRL signaling is associated with the emergence of UCP1-expressing beige fat cells and resistance to HFD-induced obesity. We focused our attention on pRb, a transcription factor involved in cell cycle, previously reported as a downstream effector of PRL signaling (24). In addition, given that pRb plays a key role in fate choice of differentiating common mesenchymal precursors toward adipocytes (25), we hypothesized that pRb could regulate adipocyte differentiation and beige conversion. pRb expression was drastically increased on HFD feeding whatever the genotype (Fig. 5*C*, top panel); however, PRLR$^{-/-}$ mice displayed a marked reduction of pRb expression in perirenal depots as compared to PRLR$^{+/+}$ mice.

We also investigated Foxc2 expression, another important transcriptional factor regulating adipocyte metabolism and mitochondrial function (26). Foxc2 expression was significantly reduced in PRLR$^{-/-}$ mice under SC feeding as compared to PRLR$^{+/+}$ mice, concomitant with the reduction of adipogenic markers (see Fig. 5*C*, bottom panel). In contrast, *Foxc2* mRNA levels were greatly enhanced under HFD feeding, consistent with the prominent role of this forkhead transcription factor as a key metabolic regulator of brown adipocytes. Hence, our experiments demonstrate that in mice lacking PRLR, both perirenal and subcutaneous WAT have acquired a brown fat-like phenotype under HFD feeding, referred to as beigeing. In addition, the coordinated changes in pRb and Foxc2 pathways may constitute a molecular switch for preferential metabolic transdifferentiation in this model.

DISCUSSION

While PRL is known as the pituitary hormone of lactation, accumulating evidence shows that it exerts pleiotropic effects, including growth and metabolic actions (2, 3). Here, we demonstrate that PRLR is an important effector modulating adipocyte fate and differentiation with effect on energy homeostasis and adaptive thermogenesis.

Despite increased food intake in both SC and HFD, PRLR$^{-/-}$ mice remained leaner than controls and were protected against HFD-induced obesity, with a marked reduction in adiposity, notably in perirenal fat mass. Thus, we hypothesized that change in overall energy expenditure may be at least in part responsible for this phenotype. This was supported by increased O_2 consumption and enhanced heat dissipation that were significantly higher in PRLR$^{-/-}$ mice as compared to PRLR$^{+/+}$ mice. The relative resistance to HFD-induced obesity was accompanied by a more favorable carbohydrate homeostatic profile in PRLR$^{-/-}$ mice, consistent with the major implication of PRL signaling in energy balance. However, these changes in whole-body homeostasis were likely not sufficient to account for the robust protection against HFD-induced weight gain. Increased energy expenditure through BAT activation constitutes a powerful mechanism by which high calorie intake could be dissipated, thereby defending against obesity

(27). Indeed, enhanced conversion of white to thermogenically active adipocytes observed in PRLR$^{-/-}$ mice seems to be the key regulatory event involved in protection against HFD-induced obesity, consistent with a role of PRL signaling in adipocyte fate determination and/or reprogramming.

In accordance with PRL-mediated transcriptional control of proadipogenic factors (11), PRLR deficiency was associated with a down-regulation of key regulators of adipocyte differentiation, whose expressions were restored to similar extent than in WT mice under HFD feeding. Beyond this HFD-induced rescue observed in PRLR$^{-/-}$ mice, the most striking finding is the emergence of BAT within WAT depots. The question of where beige cells originate remains unresolved. It has been proposed that the adaptive UCP1-expressing brown-like adipose cells that develop in WAT in response to cold exposure or β-adrenergic stimulation can be derived either from a specialized compartment of committed brown precursors, direct differentiation from white preadipocytes, and/or transdifferentiation from mature white adipocytes (28). Regardless of how they arise and the origin of mesenchymatous precursors (often referred to as Myf5^{-} and Sca1^{+} progenitors; refs. 29, 30), the development of beige adipocytes (17) in perirenal fat tissue correlates well with protection against obesity in PRLR$^{-/-}$ mice. New advances in identification of cellular lineage specification have highlighted several key regulatory factors in specifying brown fat cell fate, including PRDM16, a master coregulator critical for the commitment toward brown adipocyte lineage (31, 32). Loss of PRDM16 from brown fat precursors caused a massive reduction in molecular and morphological features of brown adipocytes (33). Conversely, transgenic overexpression of *PRDM16* strongly induced the development of brown-like adipocytes in adipose depots (22). Remarkably, under HFD feeding, *PRDM16* expression is dramatically induced in the perirenal fat depots as well as in the subcutaneous white fat, associated with a concomitant increase of BAT markers. This finding is supported by the emergence of UCP1-expressing adipocytes and metabolically active beige cells located in the perirenal and paraspinal areas, accounting for the increased metabolic rate in absence of PRLR. Accordingly, PRLR$^{-/-}$ mice displayed an increase of *AdRβ3* expression, which suggests that PRL signaling may affect sympathetic nervous system activity and/or nerve fiber infiltration in fat depots. Altogether, these findings demonstrate that PRLR inactivation could lead to the emergence of inducible brown adipocytes and its associated thermogenesis. Remarkably, this beige reprogramming is genetically determined (markedly in PRLR$^{-/-}$ mice), induced under HFD feeding, and more pronounced in specific fat depots. By contrast, the presence of an active PRL signaling could participate in the white adipocyte phenotype maintenance of these fat depots. One question concerns the signaling molecules involved in acquisition of a brown adipose-like phenotype in perirenal depots. pRb has been suggested to regulate adipocyte differentiation (34). In addition, p107, a member of Rb family, is also implicated in adipose development. P107$^{-/-}$ mice are refractory to HFD-induced fat accumulation associated with an increase of *PGC1α* expression (34). Consistently, marked decrease of *pRb* expression was found in mice deficient in fsp27, a member of the *cide* family proteins regulating adipose tissue differentiation (35). Gonadal and subcutaneous white fat pads of Fsp27$^{-/-}$ mice are reduced in size compared to wild-type mice, together with the acquisition of BAT-like phenotype (35). Collectively, these findings underscore the implication of pRb pathway in adipocyte fate, in accordance with the pRb defect observed in PRLR$^{-/-}$ fat depots. It was shown that pRb-deficient mouse embryonic fibroblasts exhibited an increased expression of Foxc2 that accompanied a white to brown adipocyte transdifferentiation (36). Similarly, overexpression of *Foxc2* in adipose tissue leads to a lean and insulin-sensitive phenotype, accompanied by an increased BAT-like function due to an enhanced mitochondrial biogenesis through activation of mitochondrial transcription factors (26, 37). PRLR$^{-/-}$ mice under HFD feeding displayed a sharp increase in *Foxc2* expression, in agreement with the involvement of pRb/Foxc2 pathway in the beigeing conversion.

The functional role of PRL signaling seems to be highly dependent on the developmental stage. Indeed, we have demonstrated that PRLR is pivotal for early development of BAT to support neonatal thermogenesis (14). In contrast, during adulthood, the absence of PRL signaling is associated with beige conversion, most notably as an adaptive mechanism to facilitate high-fat-induced thermogenesis. Thus, PRL signaling plays important but changing roles in energy homeostasis during the life span. This finding is reminiscent of the metabolic action of PRL reported in amphibians (38), fish, and birds (1) but far extends the pleiotropic function of PRL in mammals. From a metabolic point of view, PRL is critical during gestation and lactation, favoring anabolic lipid storages indispensable for energy needs during these two major physiological periods. Several lines of evidence suggest that in humans, PRL signaling could be involved in energy homeostasis including the orexigenic property of PRL (39, 40), the genetic association between PRL and obesity (41, 42), and the relationship between hyperprolactinemia and obesity (43, 44). Several recent reports confirmed the major role of BAT in the control of energy balance. Thermogenic UCP1-expressing cells are found interspersed in adult human subcutaneous fat, yet their presence negatively correlates with weight gain and insulin resistance (45–49). It would be relevant to examine whether patients with hyperprolactinemia are less prone to develop a functional BAT in response to cold exposure or overfeeding using PET.

In sum, our work demonstrates that mice lacking PRLR are highly resistant to HFD-induced obesity, owing to the emergence of a brown adipose-like phenotype in peculiar white fat depots. This finding is

associated with a concomitant increase of *PRDM16*, *PGC1α*, *AdRβ3*, and *Foxc2* that constitutes a molecular switching mechanism. This in turn converges toward an activation of thermogenic brown capacity with the final increase of UCP1 responsible for heat dissipation and resistance to high-calorie weight gain. We thus propose that PRL signaling represents an additional determinant of energy homeostasis during physiological and pathophysiological conditions. FJ

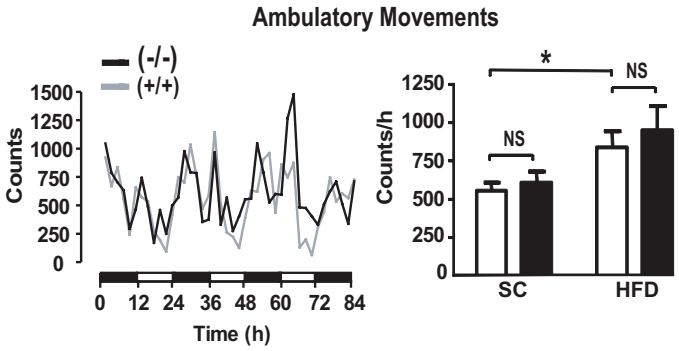
The authors thank Prof. M. Freemark (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA) for helpful discussions of the manuscript, P. Letteron (IFR2 Bichat Medical School, Paris, France) for his help with DEXA analysis, and S. Poussier and F. Maskali for the recording and analysis of FDG-PET. The authors are also grateful to Prof. D. Ricquier (Institut Cochin, Paris, France) for UCP1 antibody. Calorimetric studies were performed at the Functional and Physiological Exploration Platform (FPE) of the Unit Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Université Paris Diderot (Sorbonne Paris Cité, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, équipes d'Accueil Conventionnées 4413, Centre National de la Recherche Scientifique). R.G.P.D. received a research fellowship from the Région Île-de-France (CODDIM). J.A. is the recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie, France. This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (09-BLAN-0246), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Université Paris-Sud.

REFERENCES

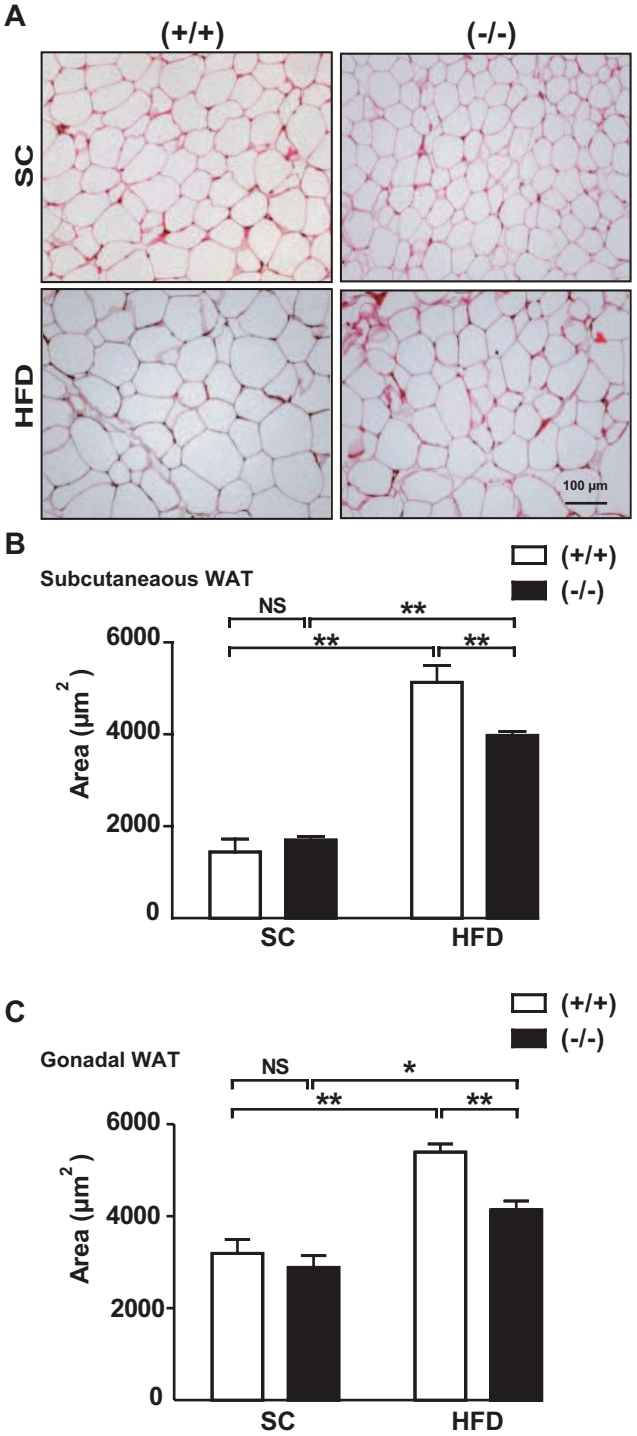
1. Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., and Kelly, P. A. (1998) Prolactin and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* **19,** 225–268
2. Goffin, V., Binart, N., Touraine, P., and Kelly, P. A. (2002) Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu. Rev. Physiol.* **64,** 47–67
3. Ben Jonathan, N., Lapensee, C. R., and Lapensee, E. W. (2008) What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr. Rev.* **29,** 1–41
4. Clevenger, C. V., Gadd, S. L., and Zheng, J. (2009) New mechanisms for PRLr action in breast cancer *Trends Endocrinol. Metab.* **20,** 223–229
5. Binart, N., Bachelot, A., and Bouilly, J. (2010) Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol. Metab.* **21,** 362–368
6. Freemark, M., Fleenor, D., Driscoll, P., Binart, N., and Kelly, P. A. (2001) Body weight and fat deposition in prolactin receptor-deficient mice. *Endocrinology* **142,** 532–537
7. Fleenor, D., Oden, J., Kelly, P. A., Mohan, S., Alliouachene, S., Pende, M., Wentz, S., Kerr, J., and Freemark, M. (2005) Roles of the lactogens and somatogens in perinatal and postnatal metabolism and growth: studies of a novel mouse model combining lactogen resistance and growth hormone deficiency. *Endocrinology* **146,** 103–112
8. Flint, D. J., Binart, N., Boumard, S., Kopchick, J. J., and Kelly, P. (2006) Developmental aspects of adipose tissue in GH receptor and prolactin receptor gene disrupted mice: site-specific effects upon proliferation, differentiation and hormone sensitivity. *J. Endocrinol.* **191,** 101–111
9. Dos Santos Silva, C. M., Barbosa, F. R., Lima, G. A., Warszawski, L., Fontes, R., Domingues, R. C., and Gadelha, M. R. (2010) BMI and metabolic profile in patients with prolactinoma before and after treatment with dopamine agonists. *Obesity (Silver Spring)* **19,** 800–805
10. Kok, P., Roelfsema, F., Frolich, M., van Pelt, J., Stokkel, M. P., Meinders, A. E., and Pijl, H. (2006) Activation of dopamine D2 receptors simultaneously ameliorates various metabolic features of obese women. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291,** E1038–E1043
11. Nanbu-Wakao, R., Fujitani, Y., Masuho, Y., Muramatu, M., and Wakao, H. (2000) Prolactin enhances CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) messenger RNA expression and stimulates adipogenic conversion of NIH-3T3 cells. *Mol. Endocrinol.* **14,** 307–316
12. Brandebourg, T. D., Bown, J. L., and Ben Jonathan, N. (2007) Prolactin upregulates its receptors and inhibits lipolysis and leptin release in male rat adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357,** 408–413
13. Viengchareun, S., Bouzinba-Segard, H., Laigneau, J. P., Zennaro, M. C., Kelly, P. A., Bado, A., Lombes, M., and Binart, N. (2004) Prolactin potentiates insulin-stimulated leptin expression and release from differentiated brown adipocytes. *J. Mol. Endocrinol.* **33,** 679–691
14. Viengchareun, S., Servel, N., Feve, B., Freemark, M., Lombes, M., and Binart, N. (2008) Prolactin receptor signaling is essential for perinatal brown adipocyte function: a role for insulin-like growth factor-2. *PLoS ONE* **3,** e1535
15. Hugo, E. R., Borcherding, D. C., Gersin, K. S., Loftus, J., and Ben Jonathan, N. (2008) Prolactin release by adipose explants, primary adipocytes, and LS14 adipocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93,** 4006–4012
16. Vegiopoulos, A., Muller-Decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., Berriel, D. M., Rozman, J., Hrabe, d. A., Nusing, R. M., Meyer, C. W., Wahli, W., Klingenspor, M., and Herzig, S. (2010) Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* **328,** 1158–1161
17. Ishibashi, J., and Seale, P. (2010) Medicine. Beige can be slimming. *Science* **328,** 1113–1114
18. Ormandy, C. J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B. K., Buteau, H., Edery, M., Brousse, N., Babinet, C., Binart, N., and Kelly, P. A. (1997) Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* **11,** 167–178
19. Carter, E. A., Bonab, A. A., Hamrahi, V., Pitman, J., Winter, D., Macintosh, L. J., Cyr, E. M., Paul, K., Yerxa, J., Jung, W., Tompkins, R. G., and Fischman, A. J. (2011) Effects of burn injury, cold stress and cutaneous wound injury on the morphology and energy metabolism of murine brown adipose tissue (BAT) in vivo. *Life Sci.* **89,** 78–85
20. Fueger, B. J., Czernin, J., Hildebrandt, I., Tran, C., Halpern, B. S., Stout, D., Phelps, M. E., and Weber, W. A. (2006) Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice. *J. Nucl. Med.* **47,** 999–1006
21. Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84,** 277–359
22. Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., and Spiegelman, B. M. (2011) Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Invest.* **121,** 96–105
23. Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M., and Kajimura, S. (2012) PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* **15,** 395–404
24. Schroeder, M. D., Symowicz, J., and Schuler, L. A. (2002) PRL modulates cell cycle regulators in mammary tumor epithelial cells. *Mol. Endocrinol.* **16,** 45–57
25. Calo, E., Quintero-Estades, J. A., Danielian, P. S., Nedelcu, S., Berman, S. D., and Lees, J. A. (2010) Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature* **466,** 1110–1114
26. Lidell, M. E., Seifert, E. L., Westergren, R., Heglind, M., Gowing, A., Sukonina, V., Arani, Z., Itkonen, P., Wallin, S., Westberg, F., Fernandez-Rodriguez, J., Laakso, M., Nilsson, T., Peng, X. R., Harper, M. E., and Enerback, S. (2011) The adipocyte-expressed forkhead transcription factor Foxc2 regulates metabolism through altered mitochondrial function. *Diabetes* **60,** 427–435
27. Seale, P., and Lazar, M. A. (2009) Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. *Diabetes* **58,** 1482–1484
28. Kajimura, S., Seale, P., and Spiegelman, B. M. (2010) Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab.* **11,** 257–262

29. Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J. P., De Matteis, R., and Cinti, S. (2010) The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298,** E1244–E1253
30. Schulz, T. J., Huang, T. L., Tran, T. T., Zhang, H., Townsend, K. L., Shadrach, J. L., Cerletti, M., McDougall, L. E., Giorgadze, N., Tchkonia, T., Schrier, D., Falb, D., Kirkland, J. L., Wagers, A. J., and Tseng, Y. H. (2011) Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108,** 143–148
31. Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L. M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B. M. (2007) Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* **6,** 38–54
32. Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M. P., Ruas, J. L., Chin, S., Tempst, P., Lazar, M. A., and Spiegelman, B. M. (2008) Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev.* **22,** 1397–1409
33. Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M. A., Beier, D. R., and Spiegelman, B. M. (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454,** 961–967
34. Scime, A., Grenier, G., Huh, M. S., Gillespie, M. A., Bevilacqua, L., Harper, M. E., and Rudnicki, M. A. (2005) Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell Metab.* **2,** 283–295
35. Toh, S. Y., Gong, J., Du, G., Li, J. Z., Yang, S., Ye, J., Yao, H., Zhang, Y., Xue, B., Li, Q., Yang, H., Wen, Z., and Li, P. (2008) Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of fsp27 deficient mice. *PLoS ONE* **3,** e2890
36. Hansen, J. B., Jorgensen, C., Petersen, R. K., Hallenborg, P., De Matteis, R., Boye, H. A., Petrovic, N., Enerback, S., Nedergaard, J., Cinti, S., te Riele, H., and Kristiansen, K. (2004) Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 4112–4117
37. Cederberg, A., Gronning, L. M., Ahren, B., Tasken, K., Carlsson, P., and Enerback, S. (2001) FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* **106,** 563–573
38. Nybroe, O., Rosenkilde, P., and Ryttersgaard, L. (1985) Effects of hypophysectomy and substitution with growth hormone, prolactin, and thyroxine on growth and deposition in juvenile frogs, *Xenopus laevis. Gen. Comp. Endocrinol.* **57,** 257–265
39. Roy, A. F., Benomar, Y., Bailleux, V., Vacher, C. M., Aubourg, A., Gertler, A., Djiane, J., and Taouis, M. (2007) Lack of cross-desensitization between leptin and prolactin signaling pathways despite the induction of suppressor of cytokine signaling 3 and PTP-1B. *J. Endocrinol.* **195,** 341–350
40. Lisboa, P. C., Passos, M. C., Dutra, S. C., Bonomo, I. T., Denolato, A. T., Reis, A. M., and Moura, E. G. (2006) Leptin and prolactin, but not corticosterone, modulate body weight and thyroid function in protein-malnourished lactating rats. *Horm. Metab. Res.* **38,** 295–299
41. Meyre, D., Delplanque, J., Chevre, J. C., Lecoeur, C., Lobbens, S., Gallina, S., Durand, E., Vatin, V., Degraeve, F., Proenca, C., Gaget, S., Korner, A., Kovacs, P., Kiess, W., Tichet, J., Marre, M., Hartikainen, A. L., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Levy-Marchal, C., Pattou, F., Heude, B., Tauber, M., McCarthy, M. I., Blakemore, A. I., Montpetit, A., Polychronakos, C., Weill, J., Coin, L. J., Asher, J., Elliott, P., Jarvelin, M. R., Visvikis-Siest, S., Balkau, B., Sladek, R., Balding, D., Walley, A., Dina, C., and Froguel, P. (2009) Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat. Genet.* **41,** 157–159
42. Nilsson, L., Olsson, A. H., Isomaa, B., Groop, L., Billig, H., and Ling, C. (2011) A common variant near the PRL gene is associated with increased adiposity in males. *Mol. Genet. Metab.* **102,** 78–81
43. Kok, P., Roelfsema, F., Frolich, M., Meinders, A. E., and Pijl, H. (2004) Prolactin release is enhanced in proportion to excess visceral fat in obese women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89,** 4445–4449
44. Dos Santos Silva, C. M., Barbosa, F. R., Lima, G. A., Warszawski, L., Fontes, R., Domingues, R. C., and Gadelha, M. R. (2011) BMI and metabolic profile in patients with prolactinoma before and after treatment with dopamine agonists. *Obesity* **19,** 800–805
45. Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N. J., Enerback, S., and Nuutila, P. (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* **360,** 1518–1525
46. Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., and Teule, G. J. (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* **360,** 1500–1508
47. Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., Kolodny, G. M., and Kahn, C. R. (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **360,** 1509–1517
48. Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., and Tsujisaki, M. (2009) High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58,** 1526–1531
49. Lee, P., Zhao, J. T., Swarbrick, M. M., Gracie, G., Bova, R., Greenfield, J. R., Freund, J., and Ho, K. K. (2011) High prevalence of brown adipose tissue in adult humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96,** 2450–2455

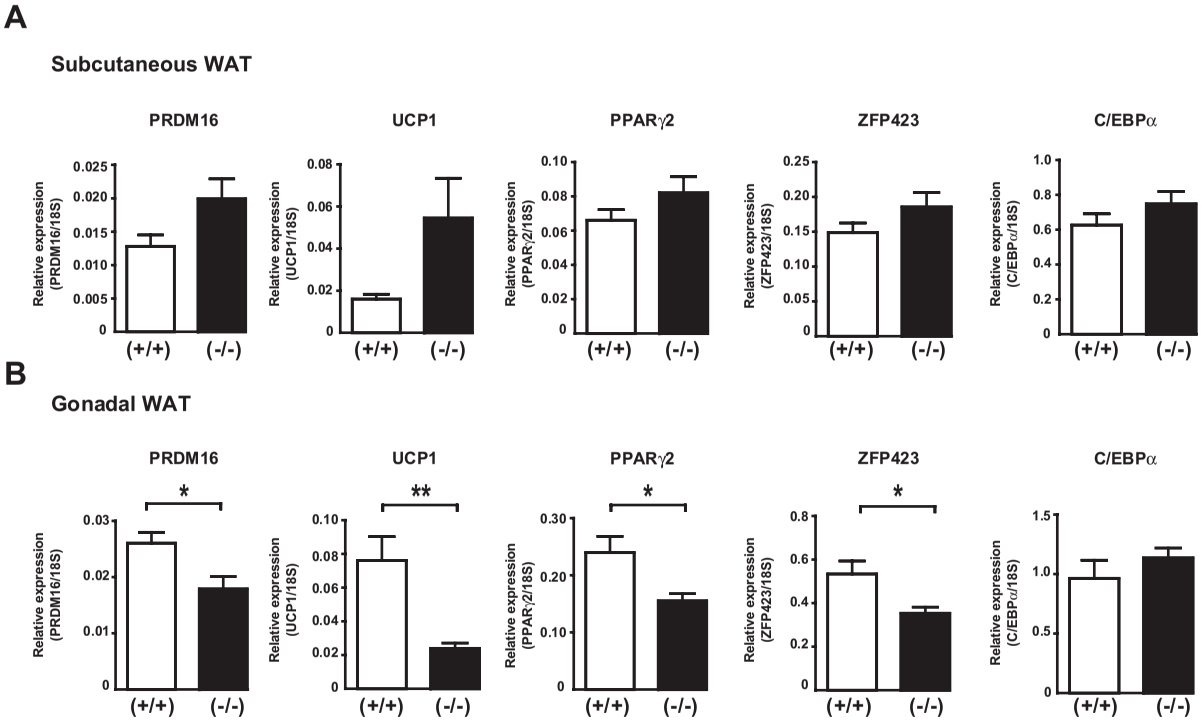
Received for publication January 27, 2012.
Accepted for publication May 8, 2012.



Supplemental Figure S1



Supplemental Figure S2



Supplemental Figure S3

II. Résumé de l'article n°1

Un ensemble de données expérimentales a permis de mettre en évidence le rôle de la signalisation par la PRL dans l'homéostasie énergétique, la régulation du poids corporel et la physiologie du tissu adipeux. Ces données sont cependant controversées. Afin de clarifier ce rôle, des souris mâles R PRL$^{-/-}$ et R PRL$^{+/+}$ âgées de 8 semaines ont été soumises soit à un régime standard (riche en glucides) ou obésogène (riche en lipides) pendant 16 semaines. Sous régime standard, les souris R PRL$^{-/-}$ présentent une prise de poids réduite comparée à celle des souris R PRL$^{+/+}$ qui s'accentue sous régime gras. L'analyse par absorptiométrie a révélé que les souris R PRL$^{-/-}$ soumises à ce régime gras avaient un indice de masse grasse inférieur à celui des souris contrôles. Le prélèvement des différents dépôts adipeux (inguinal, périrénal, épididymaire) a montré des disparités en terme de masse entre les deux génotypes. La masse du dépôt périrénal est fortement diminuée chez les souris R PRL$^{-/-}$ et est corrélée à la résistance de prise de poids précédemment observée. Des analyses histologiques de ce tissu ont montré l'apparition de cellules adipeuses multiloculaires, caractéristiques des adipocytes bruns, ce qui a été confirmé par des immunomarquages dirigés contre la protéine découplante UCP1 spécifique du tissu adipeux brun. Le défaut d'expression des acteurs moléculaires impliqués dans la différenciation (PPARγ, C/EBP, SREBP1c, ZFP423) de ce tissu observé chez les souris R PRL$^{-/-}$ sous régime standard est rétabli sous régime gras. La quantification de l'expression des marqueurs du tissu adipeux brun a montré une augmentation uniquement chez les souris R PRL$^{-/-}$démontrant la présence d'adipocytes thermoactifs dans les dépôts adipeux périrénaux. La fonctionnalité de ces adipocytes a été définitivement établie par PET-Scan après une exposition au froid des animaux. Cette analyse révèle que les souris R PRL$^{-/-}$ présentent de nouvelles zones métaboliquement actives au niveau périrénal mais également au niveau para-thoracique. Ces adipocytes sont maintenant caractérisés et sont, appelés adipocytes beiges. La protéine pRb, une cible de la PRL, est un acteur moléculaire-clé dans la détermination adipocytaire brune notamment en régulant l'expression de FoxC2. Nous avons montré une altération de la voie pRb/FoxC2 dans le dépôt périrénal des souris R PRL$^{-/-}$ suggèrant que cette voie de signalisation participe à l'engagement du lignage beige. L'ensemble de ces résultats démontre que le RPRL affecte la balance énergétique et l'adaptation métabolique des rongeurs par la voie des effets sur des nouvelles lignées adipocytaires.

III. Résultats supplémentaires, discussion et perspectives

A/ Quel est le lien entre l'absence du récepteur de la prolactine et un régime gras dans l'émergence des adipocytes beiges ?

Nous montrons que les souris R PRL$^{-/-}$ présentent une prise de poids inférieure à celle des souris sauvages surtout en régime gras. L'analyse plus approfondie des différents tissus adipeux révèle une émergence d'adipocytes beiges dans le dépôt périrénal, ce qui est corrélé à une augmentation de la dépense énergétique uniquement chez les souris R PRL$^{-/-}$ soumises à un régime gras. L'altération de la voie pRb/FoxC2 dans le dépôt périrénal des souris R PRL$^{-/-}$ sous régime gras est corrélée à l'apparition d'adipocytes beiges. Or la diminution de l'expression de pRb dans ce tissu chez les souris R PRL$^{-/-}$ est observée aussi bien sous régime standard que sous régime obésogène. Parallèlement au défaut de pRb observé chez ces souris en condition standard, le changement de régime ferait intervenir d'autres acteurs qui participeraient à l'émergence d'adipocytes beiges.

1- Les protéines de la famille E2F : les partenaires de pRb impliqués dans la détermination adipocytaire.

Les protéines E2F sont des facteurs de transcription fortement impliqués dans la transition G1/S du cycle cellulaire. Certains de ces facteurs comme E2F1 sont capables d'activer leurs gènes cibles alors que d'autres comme E2F4 les répriment. Ces facteurs forment un complexe avec les protéines pRb, p107 et p130. L'état de phosphorylation de ces protéines joue un rôle majeur dans la formation de ce complexe. Dans le cas où pRb est hypophosphorylé, le complexe pRb/E2F se forme. L'hyperphosphorylation de pRb provoque alors la dissociation du complexe avec E2F et module la transcription de gènes cibles (Poznic, 2009).

Depuis quelques années, le rôle des protéines E2F sur l'adipogenèse se clarifie. Il a été montré que E2F1 et E2F4 se lient au promoteur de *pparγ,* activent et répriment respectivement la transcription de ce gène, modulant ainsi et de manière importante, l'adipogenèse. De manière très intéressante, la masse adipeuse blanche des souris E2F1$^{-/-}$ est altérée. Les souris E2F1$^{-/-}$ résistent à une obésité induite par un régime gras (Fajas et al., 2002). Ces résultats démontrent le rôle majeur d'E2F1 dans la détermination adipocytaire.

Mais des données plus récentes précisent le rôle d'E2F1 et E2F4 sur la différenciation adipocytaire blanche et brune. L'association d'E2F4 avec pRb dans des cellules souches bloque l'adipogenèse, notamment en réprimant l'expression de *pparγ* (Calo et al., 2010). La température corporelle des souris E2F1$^{-/-}$ est significativement plus élevée que celle des animaux contrôles suggérant un rôle dans la thermorégulation. A partir de ces résultats, il a été montré que le complexe E2F1/pRb est déjà formé et associé aux promoteurs des gènes du métabolisme oxydatif tels qu'*ucp1* dans les adipocytes bruns de souris acclimatées à 23°C. L'activation du tissu adipeux brun entraîne la phosphorylation sur la sérine780 de pRb provoquant alors la dissociation du complexe formé avec E2F1 et les promoteurs des gènes du métabolisme oxydatif. Cette dissociation permet à E2F1 de jouer son rôle de facteur de transcription sur l'expression de ces gènes (Blanchet et al., 2011). L'état de phosphorylation de pRb est donc crucial dans le contrôle de l'expression des gènes du métabolisme oxydatif du tissu adipeux brun.

2- Modulation de l'expression des facteurs E2F et de la formation du complexe E2F/pRb sous régime gras ?

L'obésité s'accompagne d'un état inflammatoire qui est corrélé à une augmentation importante du stress oxydant entraînant la peroxydation des lipides (Furukawa, 2004). En effet, la concentration des produits de la peroxydation lipidique tels que les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) et le 8-epi-prostaglandine F2α plasmatiques est corrélée avec l'indice de masse corporelle chez l'Homme (Furukawa, 2004). Les souris obèses KKAy ont une augmentation de la production des espèces réactives à l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) uniquement au niveau plasmatique et dans le tissu adipeux blanc entrainant la formation de produits de la peroxydation lipidique (Furukawa, 2004). Un régime gras chez la souris provoque aussi une élévation importante de la production adipocytaire d'un aldéhyde réactif et toxique pour la cellule, le trans-4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (Grimsrud et al., 2007).

L'expression des protéines E2F et la formation d'un complexe avec pRb sont fortement modulés dans des conditions de stress oxydatif. Le traitement de cellules 3T3-L1 avec du buthionine sulfoximine, un inhibiteur de la synthèse de glutathion provoque une

diminution de l'expression de E2F4 (Borrás et al., 2004). Les cellules HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) cultivées en présence de HNE ont une diminution de 80% de l'expression d'E2F4 (Barrera et al., 2004). De plus, les HNE modifient l'état de phosphorylation de pRb puisque la culture des cellules HL-60 en présence de HNE produit une perte progressive de la phosphorylation de pRb. pRb hypophosphorylé se lie alors à E2F1 et inactive son activité transcriptionnelle (Barrera et al., 2004).

Etant donné l'importance des facteurs E2F1 et E2F4 dans l'activation et la répression des gènes impliqués dans la détermination adipocytaire et dans le métabolisme oxydatif *via* la formation d'un complexe avec pRb, il aurait été intéressant d'étudier l'expression de ces derniers ainsi que l'état de phosphorylation de pRb. Il serait ainsi envisageable qu'une modification du rapport E2F1/E2F4 sous régime gras et l'altération de l'expression de pRb chez les souris R $PRL^{-/-}$ puissent modifier profondément la formation de complexe pRb/E2F et/ou de forme « libre » de E2F engendrant des modifications transcriptionnelles majeures des gènes du métabolisme oxydatif.

3- Emergence d'adipocytes beiges : un phénomène dépôt-spécifique ?

Les études utilisant des modèles murins génétiquement modifiés et se focalisant sur l'émergence d'adipocytes beiges sont contradictoires quant à la localisation des dépôts. Le fond génétique influence l'émergence d'adipocytes beiges selon la localisation des dépôts adipeux. Par exemple, les dépôts rétropéritonéaux des souris A/J soumises à une exposition au froid présentent une apparition de l'expression d'UCP1 comparés à des conditions standards alors qu'aucune différence n'est observée dans ce même dépôt chez les souris C57/BL6 (Guerra et al., 1998).

Dans notre étude, l'analyse de l'expression des transcrits des marqueurs des adipocytes thermo-compétents montre une hétérogénéité en terme d'induction d'UCP1 dans les différents dépôts analysés. De plus, grâce à l'analyse par PET-Scan, la visualisation de l'activité métabolique des adipocytes thermo-compétents lors d'une exposition au froid augmente non seulement au niveau périrénal mais aussi au niveau parathoracique en

absence du R PRL. Ces résultats suggèrent que la signalisation de la PRL régulerait la différenciation des précurseurs adipocytaires de manière dépôt-spécifique.

Les résultats supplémentaires obtenus au cours de cette étude, confortés par des données issues de la littérature, permettent d'envisager d'autres phénotypes, au niveau de la prise alimentaire, de l'absorption intestinale de macronutriments et du métabolisme glucidique, ce qui participerait également à la résistance du développement de l'obésité chez les souris R PRL$^{-/-}$.

B/ Prise alimentaire

Le rôle orexigène de la PRL a été décrit dans la littérature. Notre étude montre pourtant que l'absence de R PRL entraîne une hyperphagie. Ces résultats semblent être en contradiction avec ceux décrits dans la littérature. Or, la régulation de la prise alimentaire fait intervenir des mécanismes centraux mais aussi périphériques. De nombreuses hormones sont sécrétées le long du tractus gastro-intestinal et participent de manière conséquente à la régulation de la satiété. Pour mieux comprendre le rôle de la PRL dans le contrôle de la prise alimentaire, il convient de connaître ses effets centraux et périphériques. Malheureusement, les études sur les effets oréxigènes de la PRL se sont portées uniquement sur les mécanismes centraux délaissant ainsi les éventuels effets périphériques. Pourtant, une étude menée antérieurement au laboratoire, avec la collaboration de O. Guallilo, a montré que les souris R PRL$^{-/-}$ présentent une augmentation de la concentration plasmatique de ghréline (résultats non publiés). Cette donnée intéressante permettrait d'établir un lien avec l'augmentation de la prise alimentaire observé chez les souris R PRL$^{-/-}$.

En 1998, l'équipe d'André Bado a montré que les cellules tapissant la muqueuse gastrique étaient une source de leptine (Bado et al., 1998). La leptine gastrique se fixe sur son récepteur localisé dans les terminaisons nerveuses viscérales transmettant ainsi un signal de satiété au SNC *via* des afférences vagales. Elle augmente aussi l'activité du récepteur de la CCK déclenchant une action synergique entre la leptine et la CCK sur la régulation précoce de la satiété *via* le noyau du tractus solitaire (Guilmeau et al., 2004). Nous

avons montré chez la souris, que les cellules tapissant la muqueuse gastrique expriment le transcrit de la PRL (résultats non publiés). Ces résultats restent insuffisants pour attribuer un rôle de la PRL dans ce tissu. Il serait donc intéressant de vérifier l'expression protéique de la PRL et de vérifier ensuite si cette PRL gastrique pourrait réguler la prise alimentaire avec des mécanismes similaires à ceux décrits pour la leptine gastrique car le R PRL s'exprime aussi le long du tractus gastro-intestinal (Ouhtit et al., 1994).

La PRL pourrait directement moduler l'expression des peptides régulant la prise alimentaire comme la ghréline ou les peptides anorexigènes et pourrait participer, comme la leptine gastrique, au contrôle de la prise alimentaire *via* des afférences vagales.

C/ Absorption des macronutriments

Certaines données de la littérature et celles obtenues au cours de cette étude suggèrent que la PRL pourrait participer à l'absorption des macronutriments par l'organisme en agissant sur des organes-clé liés à ce processus.

1- Phénotype intestinal chez les souris R PRL$^{-/-}$?

La PRL favorise l'absorption intestinale de calcium par une activation de la voie PI3K sur des segments intestinaux de rat et le modèle cellulaire d'entérocyte humain Caco-2(Jantarajit et al., 2007). La PRL facilite ce flux calcique directement en augmentant l'expression du canal calcique TRPV6 (Transient Receptor Potential Vanilloid 6) à la membrane apicale de l'entérocyte chez les rongeurs indirectement en modulant le métabolisme de la vitamine D (Ajibade et al., 2010). La PRL participe à l'absorption de macronutriments puisque deux injections quotidiennes de PRL chez le rat suffisent à potentialiser l'absorption de glucose et d'acides aminés tels que la proline et la glycine (Mainoya, 1975). Aucune étude *in vitro* ne confirme ces résultats suggérant que d'autres effets périphériques pourraient intervenir dans cette augmentation de l'absorption intestinale induite par la PRL.

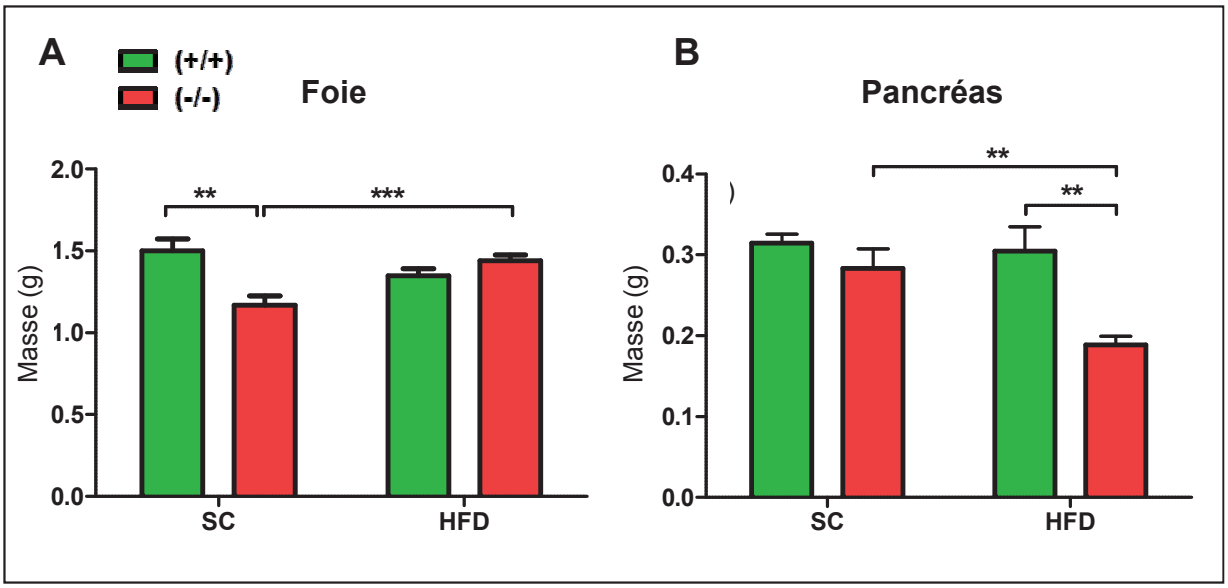


Figure 23: Masse du foie et du pancréas des souris R PRL+/+ et R PRL-/- à la fin des différents régimes

La masse hépatique est diminuée chez les souris R PRL-/- (rouge) sous régime standard (SC) comparée à celle des souris contrôles (vert) et augmente sous régime gras (HFD) (A). La masse du pancréas diminue de 30% chez les souris R PRL-/- lors d'un régime gras comparée à celle des souris contrôles (B).
Les tissus ont été prélevés en fin de régime (n=5-9 par groupe). **<P0,01 ; ***<P0,001.

2- Phénotype hépatique chez les souris R PRL$^{-/-}$?

La PRL participe au cycle entéro-hépatique en modulant la sécrétion des sels biliaires par la vésicule biliaire et leur réabsorption par le foie. Or, la sécrétion des sels biliaires de la vésicule biliaire à l'intestin participe à l'émulsion des lipides du bol alimentaire en gouttelettes plus petites, ce qui favorise leur absorption. Lors du prélèvement des organes chez des souris soumises à un régime obésogène, le foie ne présentait aucun aspect jaunâtre, caractéristique normalement observée lors du développement d'une stéatose hépatique. Les souris sauvages SV129 ne développent pas de stéatose importante (Biddinger et al., 2005) en régime gras ce qui pourrait expliquer l'absence de modification de la masse hépatique entre les deux régimes chez les souris sauvages. Néanmoins, une augmentation de la masse hépatique est observée chez les souris R PRL$^{-/-}$ lorsqu'elles sont soumises à un régime gras (Figure 23). Il semblerait donc judicieux, au regard de ces résultats, d'étudier plus finement le métabolisme entéro-hépatique dans notre modèle de souris R PRL$^{-/-}$.

3- Phénotype de la fraction exocrine du pancréas chez les souris R PRL$^{-/-}$

Après l'émulsion des lipides par les sels biliaires, la lipase pancréatique hydrolyse les lipides en acide gras pour faciliter leur assimilation. Sous régime obesogène, la masse totale du pancréas diminue de près de 30% chez les souris R PRL$^{-/-}$ comparé à celle des souris R PRL$^{+/+}$ soumises à ce même régime (Figure 23). La masse endocrine du pancréas ne représentant que 2% de la masse totale du pancréas, cette diminution drastique de la masse du pancréas chez les souris R PRL$^{-/-}$ suggèrent fortement une diminution de la fraction exocrine. Il est rapporté dans la littérature qu'une altération de la fraction exocrine du pancréas conduit à une mauvaise digestion des macronutriments et provoque indirectement une mauvaise absorption de ces derniers (Muniraj et al., 2012).

L'hyperprolactinémie induite chez des souris conduit à une hypertrophie ainsi qu'à une augmentation de la prolifération des acini (Matsuda et al., 1994). Une meilleure fonction digestive est aussi observée puisque une augmentation de la synthèse des enzymes digestives telles que la chymotrypsine, la lipase et l'amylase est aussi observée. Cependant, ces modifications sont transitoires puisqu'aucune différence n'est observée plus tardivement (Matsuda et al., 1995). Les observations préalablement établies sur la

régulation de l'absorption du glucose et de certains acides aminés par la PRL pourraient résulter d'une augmentation de la fonction digestive du pancréas exocrine (Mainoya, 1975). Pourtant, Le R PRL ne s'exprimant pas à l'âge adulte dans les cellules acinaires (communication personnelle), des mécanismes indirects interviendraient dans l'augmentation du nombre de cellules acinaires et de leur fonctionnalité.

Il semble donc essentiel de caractériser le phénotype pancréatique des souris R PRL$^{-/-}$ sous régime gras. Dans un premier temps, une analyse histologique de coupes de pancréas permettrait de mieux comprendre le phénotype pancréatique et la présence éventuelle d'une fibrose. Ensuite, l'analyse de l'expression des enzymes de la digestion telles que l'amylase, la lipase pancréatique ou bien encore des protéases pourrait constituer un premier indicateur pour la compréhension d'une éventuelle altération exocrine du pancréas. Une destruction de la fraction exocrine entraîne le relargage d'enzymes telles que les lipases, les protéases et l'amylase dans la circulation sanguine. La mesure de la lipasémie et de l'amylasémie seraient ainsi un bon élément pour identifier un éventuel défaut exocrine du pancréas.

D/ Régulation du métabolisme glucidique

L'intolérance au glucose et la diminution de la masse des cellules β chez les souris R PRL$^{-/-}$ conduisaient à penser que ces souris seraient susceptibles de développer un diabète de type II au cours d'un régime enrichi en lipides. Contrairement à l'hypothèse de départ, notre étude montre que les souris R PRL$^{-/-}$ sont protégées du développement d'un diabète de type II lors d'un régime obésogène. En effet, ces souris ne présentent pas d'augmentation massive de l'insulinémie basale après 16 semaines de régime gras alors qu'une hyperinsulinémie apparaît généralement en cours de régime gras afin de contrecarrer le défaut d'action d'insuline sur les tissus périphériques (Samuel and Shulman, 2012). Par ailleurs, les souris R PRL$^{-/-}$ soumises à un régime gras ne développent qu'une légère insulino-résistance comparée aux souris contrôles. Ces différences pourraient entraîner des modifications majeures dans la régulation du métabolisme glucidique mais d'autres mécanismes pourraient également intervenir. Les voies métaboliques impliquées dans le contrôle de la glycémie ne sont pas les mêmes lors d'un jeûne court et long. Des enzymes

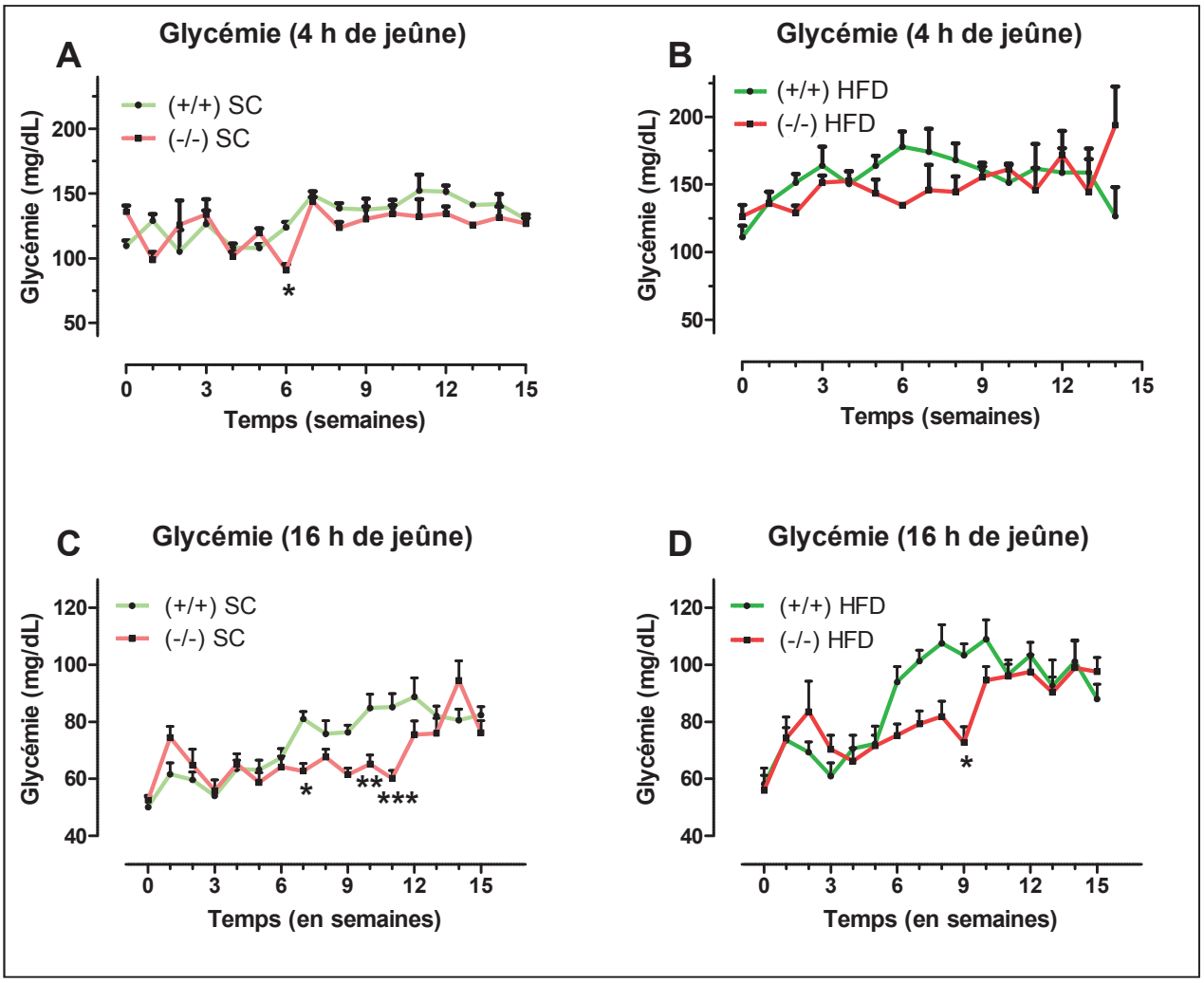


Figure 24: Profil de la glycémie des souris soumises à un régime standard ou enrichi en lipides

La glycémie a été mesurée chaque semaine chez les souris R PRL-/- (rouge) et sauvages (vert) pendant le temps de l'étude. (A-B) Après 4 heures de jeûne, la glycémie des souris R PRL-/- sous régime standard (SC) et sous régime gras (HFD) n'est pas différente de celle des souris contrôles. (C-D) Après 16 heures de jeûne et quelque soit le régime, les souris R PRL-/- présentent une glycémie diminuée comparée à celles des souris sauvages à partir de la 6e semaine de l'étude. Les différents groupes (n=4-9 par groupe) ont été comparés à l'aide d'un test two way ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni *<P0,05 ; **<P0,01 ; ***<P0,001.

dont l'activité et l'expression sont finement régulées par le statut hormonal de l'organisme régulent ces voies métaboliques.

Lors d'un jeûne long, les modifications de la concentration plasmatique d'insuline et de glucagon entrainent une augmentation du rapport glucagon/insuline augmentant ainsi l'activité des enzymes de la néoglucogenèse. Le glucagon est le principal régulateur de la production hépatique de glucose. De faibles doses de glucagon perfusées au niveau de la veine porte chez le chien entraîne une augmentation nette de la production hépatique de glucose (Cherrington, 1999). Par ailleurs, le dosage de la glucagonémie chez des patients atteints de diabète de type II montre une inhibition de la diminution de la sécrétion de glucagon normalement observé après un repas chez des patients sains (Müller et al., 1970). De plus, le diabète de type II est caractérisé par une hyperglycémie chronique résultant en partie d'une production hépatique de glucose élevé et une hyperglucagonémie.

Afin de mieux déterminer le statut du métabolisme glucidique des souris R $PRL^{-/-}$, nous avons mesuré chaque semaine la glycémie au cours des différents régimes durant un jeûne court (4 heures) et long (16 heures) (Figure 24). Sous régime standard, la glycémie n'est pas modifiée entre les deux génotypes après 4 heures de jeûne. En revanche, lors d'un régime gras, les souris R $PRL^{-/-}$ présentent une légère diminution de la glycémie entre la 6e et la 9e semaine de régime. De manière très intéressante, l'évaluation du profil glycémique après 16 heures de jeûne pendant un régime standard montre clairement que les souris R $PRL^{-/-}$ présentent une glycémie plus faible que les souris sauvages entre la 6e et 11e semaine de régime. Cette différence est plus importante lors d'un régime gras.

Des données suggèrent que le R PRL s'exprime dans les cellules α au cours du développement du pancréas chez la souris (Freemark et al., 1997) et plus tardivement (communication personnelle). Ainsi, nous pourrions envisager qu'une altération du rapport glucagon/insuline chez les souris R $PRL^{-/-}$ modifierait de manière conséquente les voies métaboliques impliquées dans la régulation de la glycémie. Nous pourrions déterminer les concentrations sériques de glucagon en période post-prandiale et à différentes périodes de jeûne dans le modèle de souris R $PRL^{-/-}$ et mesurer la production et/ou la sécrétion de cette hormone par les cellules α. Cette étude permettrait de caractériser le rôle de la PRL sur la cellule α.

Notre étude montre que la PRL est un acteur essentiel de la différenciation des adipocytes beiges, acteurs impliqués dans la balance énergétique, lors d'une modification du régime.

L'insuline, produite par le pancréas, participe à la différenciation des adipocytes. Le pancréas, un autre organe-clé du métabolisme dont la fonction est régulée par la PRL, pourrait subir des altérations et participer à la résistance de la prise de poids des souris R $PRL^{-/-}$. Une étude approfondie sur la formation et l'adaptation du pancréas dans des conditions physiologiques, comme les adaptations périnatales permettrait de mieux comprendre le phénotype du modèle R $PRL^{-/-}$.

Partie III

Rôles de la signalisation de la prolactine sur l'ontogenèse et la fonctionnalité de la cellule β pancréatique

PARTIE III. Rôles de la signalisation de la prolactine sur l'ontogenèse et la fonctionnalité de la cellule β pancréatique ?

I. Justification des approches expérimentales

Les données expérimentales de la précédente étude montrent que les souris R PRL$^{-/-}$ résistent au développement de l'obésité induite par un régime obésogène par l'émergence d'adipocytes beiges. Les souris R PRL$^{-/-}$ présentent également un défaut majeur d'adaptation du pancréas lors d'un régime obésogène corrélé à la modification de leur statut glucidique. Notre équipe a montré lors d'une précédente étude que les souris adultes R PRL$^{-/-}$ présentent une diminution importante de la masse des cellules β corrélée à une intolérance au glucose sous régime standard (Freemark et al., 2002). Dans un premier temps, il nous a semblé nécessaire de mieux comprendre ces défauts en nous focalisant sur la morphogenèse pancréatique lors des adaptations périnatales puis, dans un deuxième temps, de mieux décrypter les altérations moléculaires liées à l'absence de la signalisation de la PRL pouvant conduire à un défaut de sécrétion d'insuline.

A/ Rôle de la signalisation de la PRL sur l'ontogenèse de la cellule β

Durant les adaptations périnatales, le pancréas et tout particulièrement les cellules endocrines se différencient puis prolifèrent afin de constituer une masse endocrine suffisante à la régulation normale du métabolisme glucidique. Nous avons donc analysé dans cette partie le rôle de la signalisation PRL dans le développement du pancréas en analysant deux modèles d'études.

1- Le rat Goto-Kakizaki

A la fin des années 70, deux chercheurs japonais, Goto et Kakizaki, ont sélectionné des rats Wistar présentant une intolérance au glucose. En croisant ces rats et en sélectionnant les animaux issus de ces croisements, les animaux présentaient aussi une intolérance au glucose. Les auteurs sont parvenus après une trentaine de générations à obtenir des rats qui spontanément développaient un diabète de type II, le rat Goto-Kakizaki (GK) (Goto et al., 1976).

Ce modèle est caractérisé par :

• Un prédiabète (de la naissance au sevrage) associé à une diminution de 50% de la masse des cellules β et à une anomalie de la sécrétion d'insuline. Malgré ces altérations, ces rats sont normoglycémiques durant cette période.

• Un développement d'un diabète de type II au sevrage. La transition d'un régime hyperlipidémique (lait maternel) à un régime riche en glucides et les anomalies liées au développement et la fonctionnalité de la masse β chez le rat GK, conduisent à l'apparition d'une hyperglycémie chronique (1,8g/L). Ces rats présentent aussi une intolérance au glucose ainsi qu'une insulino-résistance (Movassat et al., 2007).

Nous avons tenté de savoir si le défaut de l'ontogenèse des cellules β observé chez ces rats serait lié à une altération de la signalisation de la PRL. Des ébauches pancréatiques de rats Wistar et GK prélevées à E13 ont été cultivées en présence ou en absence de PRL pendant 7 jours. La détermination de la masse des cellules β et les processus développementaux conduisant à sa régulation ont été étudiés.

2- La souris déficiente en R PRL

Nous avons aussi étudié le développement des cellules β du pancréas des souris R $PRL^{-/-}$ à différents temps autour de la naissance, à E18,5, le jour de naissance (J0,5) et six jours plus tard (J6,5). Pour ce faire, nous avons analysé l'évolution de la masse β ainsi que la prolifération, la taille et l'apoptose de ces cellules. Nous avons également analysé, de manière plus extensive, le développement des cellules endocrines α/δ et le développement des acini à ces différents temps.

Les résultats présentés dans l'article suivant (en cours de soumission) décrivent ceux obtenus seulement sur l'impact de la signalisation de la PRL sur le développement des ébauches pancréatiques de rats GK et ceux obtenus sur le développement du pancréas à E18,5 et à J6,5 sur le modèle invalidé pour le R PRL. Les données obtenues à J0,5 sont présentées dans la partie « résultats supplémentaires ».

Tableau 1. Séquences des amorces des gènes analysés par RT-PCR quantitative.

Nom	Numéro d'accession	Taille amplicon (pb)	Amorces sens	Amorces anti-sens
18S	X00686	66	CCCTGCCCTTTGTACACACC	CGATCCGAGGGCCTCACTA
cdk5	NM_007668.3	100	GGGACACCGACTGAGGAACA	GCACGACGTTCAGCAAGGAT
glucokinase	NM_010292.4	100	TCCACACCCCACAAATGCT	CTGGCTGACTTGGCTTGCA
glut2	NM_031197.2	100	ACCGGGATGATTGGCATGT	TGGCAGTCATGCTCACGTAAC
kir6.2	NM_010602.3	100	GCCTGGACTCTCAGAGCAGTGT	GCAAGAAACGCCCAGAGTTC
pyruvate carboxylase	NM_008797.3	80	CCACCTGGATCCCCAACTT	CGGCGTTCTCATAGCCTACCT
serca	NM_016745.3	120	ACAGAGACCGCCCTGACTTG	CCGCATGAGTTGCTTGATGA
snap25	NM_011428.3	150	GCCATCAGTGGTGGCTTCAT	CTGGCGATTCTGGGTGTCA
synt1a	NM_016801.3	90	TGTGGCCAGAGTTGCATGTT	GGGTGAGACTACAGGCCCAAA
vdccβ	NR_045533.1	100	CTTGTGAGCATCTTGCCGACTAT	GAGGCTAAAGTCCGGCTAAGC

Le tableau récapitule le nom des gènes, leur numéro d'accession du National Center for Biotechnology Information (NCBI), et la séquence nucléotidique 5' 3' des amorces sens et anti-sens utilisées pour analyser leur expression par RT-PCR quantitative.

B/ Rôle de la signalisation de la PRL sur la fonctionnalité de la cellule β pancréatique chez la souris adulte.

Les cellules β des souris R PRL$^{-/-}$ adultes présentent un défaut d'insulinosécrétion. Les partenaires moléculaires participant à la sécrétion d'insuline et pouvant être altérés dans le modèle invalidé pour le R PRL n'ont jamais été caractérisés. Pour ce faire, nous avons préalablement confirmé ce défaut d'insulino-sécrétion observé chez les souris R PRL$^{-/-}$. Des îlots de Langerhans ont été isolés à partir de souris âgées de 6 mois puis incubés en présence de différentes concentrations physiologiques de glucose. Nous avons ensuite déterminé l'expression des partenaires moléculaires (Tableau 1) impliqués dans les étapes proximales et distales de l'exocytose des vésicules d'insuline à partir d'îlots isolés de souris R PRL$^{-/-}$ et contrôles adultes. Les données obtenues sont présentées en tant que résultats supplémentaires.

Article 2

Defective PRL Signaling Impairs Pancreatic β cell Development during Perinatal Period in Rodents

Julien Auffret, Yves Mathieu, Cécile Tourrel-Cuzin, Nadège Carré, Mohamad Alawieh, Bernard Portha, Marc Lombès, Jamileh Movassat and Nadine Binart.

En préparation

Defective prolactin signaling impairs pancreatic β cell development during perinatal period in rodents

Julien Auffret[1,2], Yves Mathieu[3], Cécile Tourrel-Cuzin[3], Nadège Carré[1,2], Mohamad Alawieh[3], Bernard Portha[3], Marc Lombès[1,2,4], Jamileh Movassat[3] and Nadine Binart[1,2,4]

[1] Inserm U693, Le Kremlin-Bicêtre, F-94276, France;

[2] Univ Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, UMR-S693, Le Kremlin-Bicêtre, F-94276, France;

[3] Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, CNRS EAC 4413, Équipe Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, Paris, F-75025, France;

[4]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital de Bicêtre, Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, Le Kremlin Bicêtre F-94275, France.

*Corresponding author: Dr Nadine Binart

Tel: 33 1 49 59 67 01

E-mail address: nadine.binart@inserm.fr

Running title: *PRLR deficiency and β cell development*

ABSTRACT

Prolactin (PRL) and the placental lactogen hormones control reproduction, mammary development and lactation through binding to the PRL receptor (PRLR). These hormones, highly secreted during pregnancy, exert significant role on adipose tissues and endocrine pancreas, two major players of energy balance in adulthood. However, the contribution of PRL signaling on β cell ontogeny and function in the perinatal life as well as the mechanisms regulating adaptive islet growth in this setting are poorly understood. Using the Goto-Kakizaki (GK) rat, a spontaneous model of type 2 diabetes, we showed that embryonic pancreatic buds were unable to undergo PRL-mediated proliferation, related to decreased content of IGF2, a PRL target. We provide further evidence that β cell mass expansion during both embryogenesis and the postnatal period is impaired in the $PRLR^{-/-}$ mouse model. $PRLR^{-/-}$ newborns displayed a decrease of β islet surface associated with a 30% reduction of β cell mass, without modification in proliferation/apoptosis index. Likewise, a defect in the development of acini is also observed in absence of PRL signaling. Interestingly, the cellular size is drastically diminished in both endocrine and exocrine compartments. IGF2 is reduced in both rat and mouse models, suggesting that this factor constitutes a molecular link between the PRL signaling and cell ontogenesis. Together, these results provide evidence that PRL signaling is essential for pancreas ontogenesis during the critical perinatal window.

KEYWORDS

Insulin; diabetes; proliferation; apoptosis; IGF2

INTRODUCTION

In adults, the pancreatic β cells are terminally differentiated and have a low proliferative capacity. However, high level of β cell proliferation during perinatal adaptation is essential for the formation of a functional β cell mass. An alteration of both β cell mass and function is implicated in the development of diabetes (28).

Prolactin (PRL), initially identified to stimulate mammary gland development and milk production, was thereafter shown to exert pleiotropic functions, including effects on growth, development, immunoregulation, brain function and behaviour, and electrolyte and energy homeostasis (5, 8, 19). Altogether, the physiological relevance of most of these functions in humans remains still poorly understood. The biological actions of PRL are mediated by its interaction with PRL receptor (PRLR), a member of the cytokine receptor superfamily. Moreover, placental lactogens (PL) produced by placenta during pregnancy are also able to bind PRLR (6, 9, 11). Compared to growth hormone and its cognate receptor, the actions of PRL on metabolic homeostasis under non-lactating conditions have received less attention. Within the past decade, a large amount of experimental data has documented the potential role of PRLR signaling in body weight regulation and adipose tissue physiology but also in pancreas development, insulin secretion and peripheral insulin sensitivity (3, 4, 16, 40). Indeed, we have previously shown that PRLR deficient adult mice ($PRLR^{-/-}$) exhibit a decreased β cell mass by 30% and an alteration of insulin production and secretion leading to glucose intolerance as compared to WT animals. These defects in islet number, β-cell mass, and glucose-dependent insulin production in adults clearly established a physiological role for the lactogens in islet and β-cell maturation, development, and function (16). Moreover, targeted overexpression of PL-I specifically in β cells of transgenic mice leads to an increase of proliferation and protects β cell death induced by streptozotocin through Jak2/Stat5 activation and upregulation of the anti-apoptotic protein Bcl-xl (18, 40). PL also protect *in*

vitro INS-1 cells against glucolipotoxicity induced cell-death through these same signaling pathways (26). In addition, the role of PRL signaling on β cell adaptation during pregnancy has been well documented. Indeed, β cell mass and insulin production increase markedly in response to development of maternal insulin resistance in mid-late gestation. Recently, it has been shown that menin, an endocrine tumor suppressor and transcriptional regulator and a potential PRL target (24) participates to the physiological adaptation of β cell mass during pregnancy (24). Thus, it has been reported that $PRLR^{+/-}$ mice exhibited an alteration of menin/p18 and p21 signaling pathways leading to a defect of β cell proliferation and to a non-adaptation of β cell mass during pregnancy (22, 23). Although all these experimental data converge to support a physiological role of PRLR in the control of β cell mass adaptation notably during pregnancy, the role of PRL signaling on β cell during perinatal adaptation is still poorly understood.

The course of pancreas development is exposed to several growth factors during this period such as Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2) (21). Interestingly, we and others have previously shown that IGF2 is a direct PRL target in mammary gland (10) and also in brown adipocytes (42). Indeed, we have demonstrated that $PRLR^{-/-}$ newborns exhibited a hypotrophic brown adipose tissue related to a decrease IGF2 content (42). Likewise, the Goto-Kakizaki (GK) rat, a spontaneous model of type 2 diabetes, has been characterized as having a defective pancreatic IGF2 content that precedes β cell mass alteration during the perinatal period (12, 20). Thus, we postulated that this growth factor might be a mediator of PRL-induced pancreas differentiation.

The aim of this study was to clarify the physiological role of PRL signaling on pancreas ontogenesis through pancreatic *igf2* expression. For this purpose, we analyzed pancreas development using two rodent models during the perinatal period which constitutes the critical period for β cell mass setting (13). We showed that PRL signaling is involved in

the whole pancreas development specifically on β cells by modulating cell size related to *igf2* expression.

MATERIELS AND METHODS

*Animals***.** GK and Wistar (used as control) rats were obtained in our local colony (32) with free access to food and water. Mating was performed by housing males with females overnight (one male with three females), and pregnancy was confirmed by the presence of the vaginal plug. Virgin females, pregnant females (days 6, 14, 21 of gestation) and dams at day 5 post partum were killed by lethal doses of pentobarbital sodium (Ceva Santé Animale, Libourne, France). The pancreases were removed and stored at -20°C. $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ 129/SvJ mice were kept on a 12:12 h light-dark cycle in a temperature-controlled colony room with *ad libitum* access to food and water. All procedures were approved by the Ministère de l'Agriculture, France.

Tissues. Embryos from Wistar and GK pregnant rats at 13.5 days of gestation were removed from the uterus and weighed. The dorsal pancreatic rudiments were dissected and separated from surrounding mesenchyme as previously described (31). Body weight of $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ mice was recorded at embryonic day 18.5 (E18.5), the day of birth (D0.5) and six days later (D6.5). Mice were sacrificed and pancreases were collected, weighted and immediately placed in TRI Reagent solution (Life Technologies, Saint-Aubin, France) or in 4% PFA to explore gene expression and histological analyses respectively.

*Determination of plasma PRL and IGF2 levels***.** The levels of PRL in the plasma of virgin females, pregnant females (days 6, 14, 21 of gestation) and dams at day 5 post partum were determined by radio-immunoassay (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France).

The pancreatic expression of PRLR was determined by Western blot analysis using a mouse monoclonal antibody (Thermo Scientific, Illkirch, France) according to the protocol described

in (39). IGF2 levels from pancreatic rudiments were evaluated by quantitative analyses of signals from Western blot analysis on 25 µg of protein samples using mouse monoclonal anti rat IGF2 (clone S1F2, 1/500; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) as previously described (12).

Dorsal pancreatic rudiment culture. Culture of dorsal pancreatic rudiment was performed as previously described (12, 31). Pancreatic rudiments were grown into three dimensional collagen gel: 10% RPMI 10X (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 80% type I rat tail collagen (3 mg/ml; Institut Jacques Boy, Reims, France) and 10% sodium bicarbonate in NaOH 0.1 mol/l. The culture medium consisted of 500 µl of RPMI 1640 (Cambrex, Emerainville, France) supplemented with 5.5 mmol/l of glucose (VWR International, Pessac, France) and containing penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively; Cambrex), HEPES (10 mmol/l; Cambrex), L-glutamine (2 mmol/l; Cambrex), non-essential amino acids 1X (Life Technologies) and 1% heat-inactivated horse serum. Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% O_2 and 5% CO_2. The culture medium was changed every 2 days and the media were stored at -20°C until measurement of insulin concentration. In some experiments, ovine PRL (1 µg/ml; Sigma-Aldrich) was added daily. During the last hour of culture, 5 µl of bromo-deoxyuridine (BrdU) was added to the medium to label cells in the S phase. At the end of the culture, pancreatic rudiments were fixed for 1 h in aqueous Bouin's solution.

Immunohistochemistry. Whole pancreases were fixed in aqueous Bouin's solution and paraplast embedded and sliced in serial sections (5µm of thickness). After rehydration, sections were permeabilized with 0.1% Triton X-100 diluted in PBS for 10 min at room temperature. Sections were rinsed in PBS, incubated in peroxidase blocking solution (3% H_2O_2 in PBS) for 10 min to block endogenous peroxidase activity, extensively rinsed in PBS, and incubated with blocking solution diluted with antibody diluent (Cell Marque, Rocklin,

USA) for 1 h at room temperature. Every 20 sections throughout to length, one section was immunostained for insulin, glucagon and somatostatin to identify β, α and δ cells respectively. Sections were subsequently incubated overnight at 4°C with a guinea pig anti-insulin (MP Biomedical, Illkirch, France; diluted 1:200 in blocking solution) or a rabbit anti-glucagon (Millipore, Molsheim, France; diluted 1:500 in blocking solution) and a rabbit anti-somatostatin (Millipore; diluted 1:500 in blocking solution). Sections were extensively rinsed in PBS and incubated with an anti-guinea pig IgG (Dako, Trappes, France; diluted 1:200 in blocking solution) or an anti-rabbit IgG (Abiocode, Agoura Hills, USA; diluted 1:200 in blocking solution). After PBS washing, sections were incubated in DAB peroxidase substrate solution for 1 min, washed in distilled water, and coverslipped with glycergel (Dako).

Proliferation assays. Pregnant and newborn mice and GK rats were injected with BrdU (50 mg/kg body weight) 1 h before pancreas isolation. Paraffin-embedded pancreatic tissue was processed as described above. BrdU detection (Cell proliferation kit; GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) was performed as previously described (39). Sections were incubated with fast red substrate (Dako) for 2 min, rinsed in distilled water, hematoxylin counter-stained and coverslipped with glycergel (Dako). The percentage of BrdU positive cells of either insulin-positive cells or acinar cells was calculated at E18.5 and D6.5 for each pancreatic section using the ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

Apoptosis Assay. Apoptosis detection was performed with *ApopTag*® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore). Insulin detection and hematoxylin counter-stained was performed as described above. The percentage of insulin-positive cells was counted for each genotype at both E18.5 and D6.5 using the ImageJ software.

Gene expression analyses. Whole pancreas from $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ were isolated at both D0.5 and D6.5 and their total RNA content was extracted from each sample by homogenization with Tissuelyser (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantitative real-time PCR

was performed as described previously (42). After DNAse I treatment, RNA was reverse-transcribed and used for quantitative RT-PCR (qRT-PCR) using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Final primer concentrations were 300 nM (see Table 1 for primer sequences). Reaction parameters were carried out on a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Relative expression within a given sample was calculated as a ratio (amol of specific gene/fmol of 18S). Results are means ± SEM.

Statistical analyses. Data are expressed as means ± SEM and analyzed using a non parametric Mann Whitney test with use of the computer software Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA). Statistical significance is indicated at P values <0.05, 0.01 and 0.001.

RESULTS

PRL levels and pancreatic PRLR content are altered in GK rats along pregnancy. Because maternal PRL plays a key role on fetal organogenesis, we analyzed whether an impairment of PRL signaling could be demonstrated in the GK rat. It is well known that PRL levels increase during pregnancy in rodents (5). We showed that, circulating PRL levels peaked at 60 ng/ml in Wistar rats at 21 days of pregnancy whereas such pregnancy-induced increase of PRL levels was not detected in GK rats (Fig. 1A). It is well known that there is a significant proliferation and expansion of β cell mass during pregnancy, which is related to PRL and PL (22). We therefore examined whether pancreatic PRLR protein abundance was modified in GK female rats at mid-pregnancy compared to virgin females. As determined by Western blot analysis and signal quantification, the PRLR content in the pancreases of Wistar rats increases by approx. 2 fold while pancreatic PRLR expression in pregnant GK rats remains unchanged compared to virgin animals (Fig. 1B), suggesting that functional PRL signaling is required for β cell plasticity during gestation.

Evidence for altered PRL signaling in GK developing pancreas. To evaluate the response of β cells to fetal PRL, pancreatic buds of Wistar and GK rats were isolated at E13.5 and exposed to PRL during 7 d culture. PRL treatment induced a strong increase of β cell surface in Wistar pancreatic buds but was ineffective on GK pancreatic buds (Fig. 2A). This finding correlated with the lack of PRL-induced β cell proliferation rate in GK buds as determined by counting the BrdU/insulin positive cells (Fig. 2B) suggesting a defective PRL signaling in GK rat model. Since IGF2 has been previously shown to mediate PRL signaling during mammary gland morphogenesis (10) and is a major effector of placental and fetal growth (14, 15), we measured the IGF2 pancreatic levels in Wistar and GK fetuses at both E13.5 and E18.5 developmental stages. A significant decrease of IGF2 protein was found in GK fetuses at both stages (Fig. 2C), as previously described (12). Altogether, these findings provide strong evidence of an altered PRL signaling, responsible for a downregulation of its target IGF2 in GK rat, consistent with a crucial role of PRL and PL in the pathophysiology of type 2 diabetes, most notably during pregnancy and perinatal adaptive period.

PRL signaling is required for pancreas development. In order to specify the impact of PRL signaling on pancreas development and to clarify the role of PRLR on β cell ontogenesis, a mouse model deficient in PRLR was used. No difference was detectable between $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ mice at E18.5 in terms of body weight and pancreas weight (Table 2). However, even though a difference was observed in body weight and pancreas weight of $PRLR^{-/-}$ at D0.5 and D6.5 as compared to $PRLR^{+/+}$, there was no modification of pancreas weight/ body weight ratio between both genotypes suggesting that the lack of PRLR does not impact the global growth of pancreas. This contrasts with a drastic decrease of pancreatic *igf2* expression at birth, also observed in other PRL target tissues such as brown tissue (42). As anticipated, this difference was abolished at D6.5 given that IGF2 secretion disappears at postnatal period. Thus, we focused our study to the two most distant and critical

developmental stages, i.e. before (E18.5) and after birth (D6.5), to determine whether this IGF2 alteration leads to a specific defect on endocrine and exocrine pancreatic compartment during morphogenesis.

PRLR$^{-/-}$ mice exhibit an alteration of β cell mass during perinatal adaptation. We first evaluated the impact of PRLR inactivation on β cell ontogenesis. We quantified percentage of β cell surface on the whole pancreas using insulin immunostaining on pancreas sections at E18.5 and D6.5. Figure 3A illustrates representative sections on pancreas from wild-type and PRLR$^{-/-}$ newborns at D6.5, showing an apparent reduction of islet numbers and sizes. In order to quantify the β cell surface, mass and cell size, we quantified islet parameters by higher magnifications of sections using ImageJ software (Fig. 3B). Interestingly, percentage of β cell surface is strongly decreased at D6.5 as compared to E18.5 in PRLR$^{-/-}$ mice, this is not observed in control mice (Fig. 3C left panel). Moreover, determination of β cell mass, calculated from values of β cell surface and pancreas weight, reveals as expected a 3 fold increase of β cell mass in PRLR$^{+/+}$ mice between E18.5 and D6.5, while this does not occur in PRLR$^{-/-}$ mice (Fig. 3C right panel). This in accordance with the reduction of whole mass of PRLR$^{-/-}$ pancreas at D6.5, suggesting that β cell proliferation and/or apoptosis rates could be modified in the absence of PRL signaling. Apoptosis was not altered irrespective of the developmental stage and the genotype (Fig. S1A). By contrast, proliferation rate decreased significantly at D6.5 in both genotypes ruling out a reduction of β cell number but rather suggesting a change of cell size in PRLR$^{-/-}$ pancreases (Fig. S1B). We next determined the mean β cell size using ImageJ software from insulin immunostained sections. A slight but significant reduction of β cell size was observed in PRLR$^{+/+}$ mice at D6.5 whereas the mean β cell size in PRLR$^{-/-}$ pancreases was severely reduced by 30% (Fig. 3D left panel). This indicated that the β cells in the absence of PRL signaling are significantly smaller than those in wild-type animals. This observation is consistent with the drastic decrease of β cell mass of

PRLR$^{-/-}$ mice. To determine the functional consequences of β cell size reduction in PRLR$^{-/-}$ mice, insulin mRNA content in the whole pancreas was determined by real time qPCR (Fig. 3D right panel). Insulin expression was drastically reduced in PRLR$^{-/-}$ pancreas, a finding well correlated with the decreased β cell mass as well as β cell size. To figure out the PRL impact on the other endocrine cell lineages such as α/δ cells, glucagon/somatostatin labelling was performed on pancreas sections in both genotypes at D6.5 (Fig. 4A). Interestingly, while α/δ cell surface was unaffected whatever the genotype and developmental stages (Fig. 4B), likewise β cell mass (see Fig. 3C), postnatal induction of α/δ cell mass did not occur in PRLR$^{-/-}$ mice (Fig. 4C). Collectively, these findings suggest that a fully functional PRL signaling is required for an adequate setting of pancreatic endocrine cell compartment. However, this does not exclude an impact of PRL on exocrine pancreas.

Lack of PRL signaling also alters exocrine pancreas morphology and function. Owing to the drastic reduction of pancreas mass of PRLR$^{-/-}$ mice at D6.5 and given that pancreas is mainly composed of acinar cells, double BrdU/insulin immunostaining was performed on pancreas sections (Fig. 5A) to delineate the exocrine from endocrine compartments. Quantification studies revealed that the acinar cell proliferation was reduced by 25% in PRLR$^{-/-}$ as compared to age-matched control mice (Fig. 5B). As illustrated in Fig. 5C, hematoxylin counterstained pancreas sections revealed an apparent reduction of acinar size in PRLR$^{-/-}$ mice. Measurement of cell size demonstrated a strong reduction of the mean acinar cell surface in both genotypes along pancreas development. In addition, we further confirmed a 15% smaller size of acinar cells in PRLR$^{-/-}$ mice as compared with PRLR$^{+/+}$ mice at D6.5 (Fig. 5D). We next quantified the lipase mRNA content as an enzymatic marker of exocrine pancreas (Fig. 5E). Interestingly, correlated to the reduction of acinar proliferation and size in the absence of PRLR, *lipase* gene expression in the whole pancreas was half of that measured in PRLR$^{+/+}$ mice, suggesting a potential impairment in production of pancreatic enzymes in

PRLR$^{-/-}$ mice. Taken together, both endocrine and exocrine pancreatic compartments are affected in absence of PRLR notably during the neonatal adaptive period.

DISCUSSION

It is essential to clarify the roles of the placental lactogen hormones and pituitary PRL in the control of fetal growth and pancreatic organogenesis. This study describes the impact of PRL signaling on pancreas morphogenesis and especially on β cell ontogenesis during perinatal adaptation. Using two rodent models of partial and total PRL signaling defect, the type 2 diabetes GK rat model (33) and the null mutation of PRLR mouse model (34), we provide evidence that PRL signaling is required for β cell mass expansion both during embryogenesis and postnatal period.

It is well known that the metabolic adaptation during pregnancy involves a progressive increase of circulating PRL (17) together with PL exerting their effects through binding to the PRLR. During the fetal development, high levels of circulating PL are likely major players of embryonic organogenesis.

Accordingly, β cell mass and subsequent insulin production are markedly dependent on β cell replication occurring during the critical window of the late gestation and immediate perinatal period (30). This coincides with the materno-fetal PRL and PL surges known to stimulate β cell replication and insulin production (1). Along this line, it is not surprising that in absence of PRLR, a decrease of β cell mass occurred in PRLR$^{-/-}$ resulting from an alteration of β cell replication rather than an increased apoptosis index.

IGF2, a well known direct PRL target, has been shown to play a crucial role on mammary epithelial cell development during pregnancy (10) as well as in brown adipose tissue development at birth (42). Here, we provide additional evidence that IGF2 is a key regulator of β cell growth. Indeed, we demonstrated a reduction of IGF2 content in GK rat

embryos as well as in PRLR$^{-/-}$ newborns. Interestingly, PRL is unable to induce β cell growth and proliferation in GK pancreatic buds (present study), while IGF2 exposure facilitates expansion of β cell pool (12). In addition, we demonstrated that PRLR$^{-/-}$ mice also exhibited a defect of β cell mass during the perinatal adaptive period associated with a decreased cell size. This might be related to a functional consequence of the 50% reduction in pancreatic IGF2 expression in PRLR$^{-/-}$ newborns. This result suggests that IGF2 is one of the molecular links between PRL signaling and β cell mass adaptation. It is well known that β cell replication/differentiation is highly regulated in a stage-dependent manner (28) by numerous factors including FoxM1(43), FOXO1(2), Pdx1 (27), Neurogenin 3 (35), menin (24), Tph1 (25, 36). It remains to establish whether PRL signaling modulates the expression of such regulatory genes. Besides, an unexpected pancreatic acinar cell alteration was observed in PRLR$^{-/-}$ animals in terms of cell proliferation and size as well as pancreas enzymatic content. This observation is somehow surprising given that PRLR expression has never been reported in this cell type, suggesting an indirect effect of PRL signaling on pancreatic exocrine organogenesis. Indeed, it was previously shown that hyperprolactinemia induced by pituitary graft induced acinar proliferation in mice (29).

It is well accepted that cell size is largely dependent upon many factors including the PI3K/Akt pathway, as described in pioneer studies in drosophila (7, 41). Moreover, it was subsequently demonstrated that overexpression of active Akt1 in mouse β cells increases cell size (38). Thus, the reduction of β cell size observed in PRLR$^{-/-}$ pancreases might be related to a defect of PRL-mediated PI3K/Akt pathway activation.

It has been recently proposed that the pathogenesis of β cell failure is not related to a cell apoptosis but rather to a dedifferentiation process converting β cell into other endocrine cell type (37). Since an increased apoptosis index was excluded in our model, it may be hypothesized that such endocrine cell conversion could participate to β cell dysfunction.

Given that the β cell pool in the perinatal period is reduced in PRLR$^{-/-}$ newborns, we suspected that inappropriate response to metabolic stresses during aging could lead to a failure of β cell function and insulin production. Further experiments are needed to identify novel direct PRL target genes promoting β cell growth and survival. A better understanding of the basic mechanism governing the pathological events leading to diabetes may facilitate future developments of relevant pharmacological strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank V. Kéo (Inserm U693, Le Kremlin-Bicêtre, F-94276, France) for technical assistance and S. Berissi (Inserm U845, Paris, 75015, France) for the quality of pancreas sections. The authors are also grateful to S. Viengchareun (Inserm U693, Le Kremlin-Bicêtre, F-94276, France) for helpful discussions.

GRANTS

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (09-BLAN-0246), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Université Paris-Sud.. J.A. is the recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie, France.

REFERENCES

1. **Arumugam R, Fleenor D, Lu D, Freemark M.** Differential and complementary effects of glucose and prolactin on islet DNA synthesis and gene expression. *Endocrinology* 152: 856–868, 2011.

2. **Arumugam R, Horowitz E, Lu D, Collier JJ, Ronnebaum S, Fleenor D, Freemark M.** The Interplay of Prolactin and the Glucocorticoids in the Regulation of B-Cell Gene Expression, Fatty Acid Oxidation, and Glucose-Stimulated Insulin Secretion: Implications for Carbohydrate Metabolism in Pregnancy. *Endocrinology* 149: 5401–5414, 2008.

3. **Auffret J, Viengchareun S, Carré N, Denis RGP, Magnan C, Marie P-Y, Muscat A, Fève B, Lombès M, Binart N.** Beige differentiation of adipose depots in mice lacking prolactin receptor protects against high-fat-diet-induced obesity. *FASEB J.* 26: 3728–3737, 2012.

4. **Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, LaPensee CR.** Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 17: 110–116, 2006.

5. **Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW.** What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans? *Endocrine Reviews* 29: 1–41, 2007.

6. **Binart N, Bachelot A, Bouilly J.** Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21: 362–368, 2010.

7. **Böhni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andruss BF, Beckingham K, Hafen E.** Autonomous Control of Cell and Organ Size by CHICO, a Drosophila Homolog of Vertebrate IRS1–4. *Cell* 97: 865–875, 1999.

8. **Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA.** Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews* 19: 225–268, 1998.

9. **Bouilly J, Sonigo C, Auffret J, Gibori G, Binart N.** Prolactin signaling mechanisms in ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 356: 80–87, 2012.

10. **Brisken C, Ayyannan A, Nguyen C, Heineman A, Reinhardt F, Jan T, Dey SK, Dotto GP, Weinberg RA.** IGF-2 Is a Mediator of Prolactin-Induced Morphogenesis in the Breast. *Developmental Cell* 3: 877–887, 2002.

11. **Brooks CL.** Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr. Rev.* 33: 504–525, 2012.

12. **Calderari S, Gangnerau M-N, Thibault M, Meile M-J, Kassis N, Alvarez C, Portha B, Serradas P.** Defective IGF2 and IGF1R protein production in embryonic pancreas precedes beta cell mass anomaly in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 50: 1463–1471, 2007.

13. **Collombat P, Hecksher-Sørensen J, Serup P, Mansouri A.** Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mech. Dev.* 123: 501–512, 2006.

14. **Efstratiadis A.** Genetics of mouse growth. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 955–976, 1998.

15. **Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M.** Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm. Res.* 65 Suppl 3: 50–58, 2006.

16. **Freemark M, Avril I, Fleenor D, Driscoll P, Petro A, Opara E, Kendall W, Oden J, Bridges S, Binart N, Breant B, Kelly PA.** Targeted Deletion of the PRL Receptor: Effects on Islet Development, Insulin Production, and Glucose Tolerance. *Endocrinology* 143: 1378–1385, 2002.

17. **Freemark M.** Placental Hormones and the Control of Fetal Growth. *JCEM* 95: 2054–2057, 2010.

18. **Fujinaka Y, Takane K, Yamashita H, Vasavada RC.** Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J. Biol. Chem.* 282: 30707–30717, 2007.

19. **Goffin V, Binart N, Touraine P, Kelly PA.** PROLACTIN: The New Biology of an Old Hormone. *Annual Review of Physiology* 64: 47–67, 2002.

20. **Goto Y, Kakizaki M, Masaki N.** Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J. Exp. Med.* 119: 85–90, 1976.

21. **Hill DJ, Petrik J, Arany E.** Growth factors and the regulation of fetal growth. *Diabetes Care* 21 Suppl 2: B60–69, 1998.

22. **Huang C, Snider F, Cross JC.** Prolactin Receptor Is Required for Normal Glucose Homeostasis and Modulation of B-Cell Mass During Pregnancy. *Endocrinology* 150: 1618–1626, 2009.

23. **Hughes E, Huang C.** Participation of Akt, Menin, and P21 in Pregnancy-Induced B-Cell Proliferation. *Endocrinology* 152: 847–855, 2011.

24. **Karnik SK, Chen H, McLean GW, Heit JJ, Gu X, Zhang AY, Fontaine M, Yen MH, Kim SK.** Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science* 318: 806–809, 2007.

25. **Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H i, Fujitani Y, Kawamori R, Miyatsuka T, Kosaka Y, Yang K, Honig G, van der Hart M, Kishimoto N, Wang J, Yagihashi S, Tecott LH, Watada H, German MS.** Serotonin Regulates Pancreatic β-Cell Mass during Pregnancy. *Nat Med* 16: 804–808, 2010.

26. **Kondegowda NG, Mozar A, Chin C, Otero A, Garcia-Ocaña A, Vasavada RC.** Lactogens protect rodent and human beta cells against glucolipotoxicity-induced cell death through Janus kinase-2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) signalling. *Diabetologia* (March 3, 2012). doi: 10.1007/s00125-012-2501-9.

27. **Kushner JA, Ye J, Schubert M, Burks DJ, Dow MA, Flint CL, Dutta S, Wright CVE, Montminy MR, White MF.** Pdx1 restores beta cell function in Irs2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* 109: 1193–1201, 2002.

28. **Lee YC, Nielsen JH.** Regulation of beta cell replication. *Mol. Cell. Endocrinol.* 297: 18–27, 2009.

29. **Matsuda M, Mori T, Park MK, Yanaihara N, Kawashima S.** Enhanced cell proliferation by hyperprolactinemia in both exocrine and endocrine pancreas in mice. *Eur. J. Endocrinol.* 130: 187–194, 1994.

30. **Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza RA, Butler PC.** Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57: 1584–1594, 2008.

31. **Miralles F, Czernichow P, Scharfmann R.** Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* 125: 1017–1024, 1998.

32. **Movassat J, Bailbé D, Lubrano-Berthelier C, Picarel-Blanchot F, Bertin E, Mourot J, Portha B.** Follow-up of GK rats during prediabetes highlights increased insulin action and fat deposition despite low insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: E168–175, 2008.

33. **Movassat J, Calderari S, Fernández E, Martín MA, Escrivá F, Plachot C, Gangnerau MN, Serradas P, Álvarez C, Portha B.** Type 2 diabetes – a matter of failing β-cell neogenesis? Clues from the GK rat model. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9: 187–195, 2007.

34. **Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA.** Null Mutation of the Prolactin Receptor Gene Produces Multiple Reproductive Defects in the Mouse. *Genes Dev.* 11: 167–178, 1997.

35. **Rukstalis JM, Habener JF.** Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets* 1: 177–184, 2009.

36. **Schraenen A, Lemaire K, de Faudeur G, Hendrickx N, Granvik M, Van Lommel L, Mallet J, Vodjdani G, Gilon P, Binart N, in't Veld P, Schuit F.** Placental lactogens induce serotonin biosynthesis in a subset of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia* 53: 2589–2599, 2010.

37. **Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D.** Pancreatic β Cell Dedifferentiation as a Mechanism of Diabetic β Cell Failure. *Cell* 150: 1223–1234, 2012.

38. **Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, Lee J-P, Koeberlein B, Furth EE, Polonsky KS, Naji A, Birnbaum MJ.** Regulation of pancreatic |[beta]|-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKB|[alpha]|. *Nature Medicine* 7: 1133–1137, 2001.

39. **Uzan B, Figeac F, Portha B, Movassat J.** Mechanisms of KGF Mediated Signaling in Pancreatic Duct Cell Proliferation and Differentiation. *PLoS ONE* 4: e4734, 2009.

40. **Vasavada RC, Garcia-Ocaña A, Zawalich WS, Sorenson RL, Dann P, Syed M, Ogren L, Talamantes F, Stewart AF.** Targeted expression of placental lactogen in the

beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia. *J. Biol. Chem.* 275: 15399–15406, 2000.

41. **Verdu J, Buratovich MA, Wilder EL, Birnbaum MJ.** Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in Drosophila by Akt/PKB. *Nature Cell Biology* 1: 500–506, 1999.

42. **Viengchareun S, Servel N, Fève B, Freemark M, Lombès M, Binart N.** Prolactin Receptor Signaling Is Essential for Perinatal Brown Adipocyte Function: A Role for Insulin-like Growth Factor-2. *PLoS ONE* 3: e1535, 2008.

43. **Zhang H, Zhang J, Pope CF, Crawford LA, Vasavada RC, Jagasia SM, Gannon M.** Gestational Diabetes Mellitus Resulting From Impaired β-Cell Compensation in the Absence of FoxM1, a Novel Downstream Effector of Placental Lactogen. *Diabetes* 59: 143–152, 2010.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: PRL levels and pancreatic PRLR content are altered in Wistar and GK rats during pregnancy. A: Evolution of plasma PRL measured in virgin, pregnant (6, 14, 21 days post-coitum dpc) and 5 days post parturition (5 dpp) in Wistar (open circles) and GK (full circles) females. Values are means ± SEM (n = 9-16). *$P < 0.05$. B: Quantification of PRLR content in pancreases of pregnant Wistar and GK female rats (14 dpc) evaluated after by western blot analysis as compared to virgin rats (n = 3), results are expressed as fold induction. *$P < 0.05$.

Fig. 2: Effect of PRL on pancreatic β cell rudiments from Wistar and GK rats. A: Average β cell surface on total pancreas surface measured on pancreatic buds from Wistar (white) and GK (black) fetuses at E 13.5 after PRL treatment (hatched) or not for 7 days. B: β cell proliferation index was determined by double insulin/BrdU immunostaining on pancreas buds of GK and Wistar fetus rats after PRL exposure (hatched). Results are expressed as fold increase compared to β cell proliferation index measured in GK and Wistar buds in the absence of PRL. C: Quantification of IGF2 protein content measured by Western blot analysis on E13.5 and E18.5 pancreatic rudiments of Wistar (white) and GK (black) fetuses. Results are expressed as percentage of age-matched Wistar fetuses values. * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Fig. 3: Lack of PRLR leads to alteration of pancreatic β cell mass development. A: Pancreas sections from $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ at D6.5 after insulin immunostaining (brown). Scale bars 200 μm. B: Sections from $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ pancreas at D6.5 after double BrdU (brown) and insulin (pink) immunostaining. Scale bars 50 μm. C: β cell surface was measured and normalized to the total pancreas surface of $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ at E18.5 and D6.5 (6 to 8 pancreas sections per animal) (left panel). Results are means ± SEM (n = 3-6 /group) and

expressed as percentage of total pancreatic surface. **P* < 0.05. Determination of β cell mass was calculated according to the values in left panel normalized by pancreas weight (right panel). **P*<0.05, ***P*<0.01. D: Determination of β cell size was calculated (μm^2) after quantification of β cell surface by ImageJ software divided by the total number of nuclei (at least, 750 cells counted for each mouse (n = 3-6/group). **P* < 0.05; ***P* < 0.01 (left panel). Insulin gene expression was quantified by qPCR in whole pancreases of $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ mice at D6.5 (right panel) (n = 10-22/group) ****P*<0.001.

Fig. 4: PRLR is dispensable for α/δ cells ontogenesis. A: Pancreas sections from $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ at D6.5 after glucagon and somatostatin (brown) immunostaining. Scale bars 100 μm. B: Quantification of α and δ average cell surface from pancreas sections of $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ animals. Six to 8 pancreas sections per mouse were used to quantify percentage of α and δ cells. C: α/δ cell mass was calculated after quantification of α/δ cell surface by ImageJ taking into account for the pancreas weight of $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ mice. Values represent means ± SEM (n = 3-6 /group). Statistical differences are indicated, *P < 0.05; **P < 0.01.

Fig. 5: Lack of PRLR leads to alteration of pancreatic acinar development. A: Pancreas sections from at D6.5 after double BrdU (brown) and insulin (pink) immunostaining. Scale bars 150 μm. B: Quantification of BrdU positive cells in acini of $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ mice at E18.5 and D6.5. Results are expressed as percentage of positive cells *vs* total counted cells (at least 2000 cells/animal). **P*<0.05, ***P*<0.01. C: Hematoxylin stained pancreas sections from $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ mice at D6.5. Scale bars 300 μm. D: Determination of acinar cell size of $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ mice at E18.5 and D6.5 using ImageJ software. Cell surface (in μm^2) was calculated for at least 750 cells per animal. Results are means ± SEM (n = 3-6). **P* <

0.05; ***P* < 0.01. E: *Lipase* gene expression was determined by qPCR in whole pancreases from $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ mice at D6.5 (n = 3-13 /group). **P* < 0.05.

Fig. S1: Reduced β cell mass in $PRLR^{-/-}$ is not due to proliferation or apoptosis alteration. A: Percentage of β cell apoptosis of $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ pancreases was quantified from insulin/ TUNEL assay immunostained sections, and counterstaining with hematoxylin at E18.5 and D6.5. Approximately 3000 cells were counted for each animal. B: Pancreas sections from mice were BrdU/insulin immunostained and counterstained with hematoxylin to quantify the percentage of β cell proliferation. At least 2000 cells were counted for each mouse (n=3-6) **P* < 0.05.

TABLE 1. Primer sequences of genes analyzed in quantitative RT-PCR

Name	Accession Number	Amplicon	Sense Primer	Antisense Primer
18S	X00686	66 bp	CCCTGCCCTTTGTACACACC	CGATCCGAGGGCCTCACTA
igf2	NM_010514.3	149 bp	TCGTCTTACCACCCAAAGAAC	GTGGGACGTGATGGAACTGTC
insulin	NM_008387.4	100 bp	ACCCAGGCTTTTGTCAAGCA	GGGACATGGGTGTGTAGAAGAAG
lipase	NM_026925.3	100 bp	TAGCTGGAAGGGAAGTTTGCTT	CTCCAGGGCAGTGCTTTCAG

Table shows abbreviations of the genes, their GenBank or U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI) accession number, and the 5′ to 3′ nucleotide sequences of the sense and antisense primers.

TABLE 2. *Effects of PRLR deficiency on body weight, pancreas and igf2 expression*

	Body Weight (g)		Pancreas weight (mg)		Pancreas weight / body weight (‰)		Relative pancreas *igf2* expression	
	(+/+)	(-/-)	(+/+)	(-/-)	(+/+)	(-/-)	(+/+)	(-/-)
E18.5 (n=15-20)	1.10 ± 0.03	1.09 ± 0.02	5.83 ± 0.30	5.85 ± 0.22	5.35 ± 0.30	5.37 ± 0.19	ND	ND
D0.5 (n=15-19)	1.26 ± 0.11	1.44 ± 0.12 ***	7.47 ± 0.31	8.69 ± 0.29 **	5.94 ± 0.23	6.07 ± 0.19	1.00 ± 0.12	0.52 ± 0.08 *
D6.5 (n=23-27)	3.85 ± 0.10	2.92 ± 0.08 ***	14.9 ± 0.62	11.54 ± 0.52 ***	3.96 ± 0.21	3.93 ± 0.25	1.00 ± 0.23	1.37 ± 0.14

Table shows evolution of body weight, pancreas weight and *igf2* expression in $PRLR^{+/+}$ and $PRLR^{-/-}$ mice between E18.5 and D6.5. Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were performed between the two genotypes *P<0.05; **P<0.01; ***P<0,001.

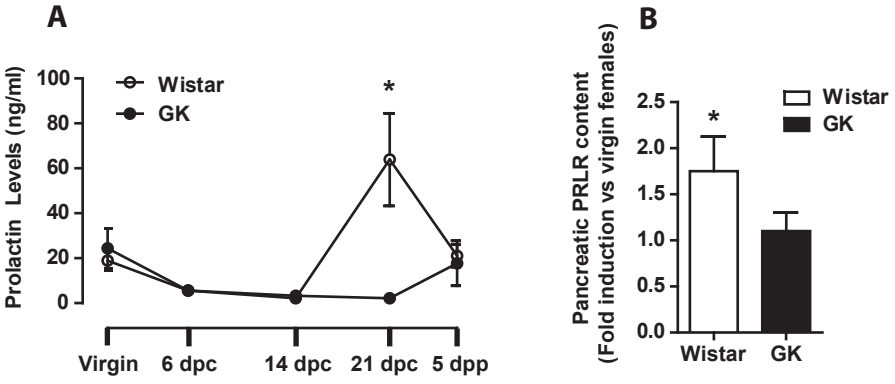

A
Prolactin Levels (ng/ml)
100
80
60
40
20
0
Wistar
GK
*
Virgin
6 dpc
14 dpc
21 dpc
5 dpp
B
Pancreatic PRLR content
(Fold induction vs virgin females)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Wistar
GK
Wistar
GK

Figure 1

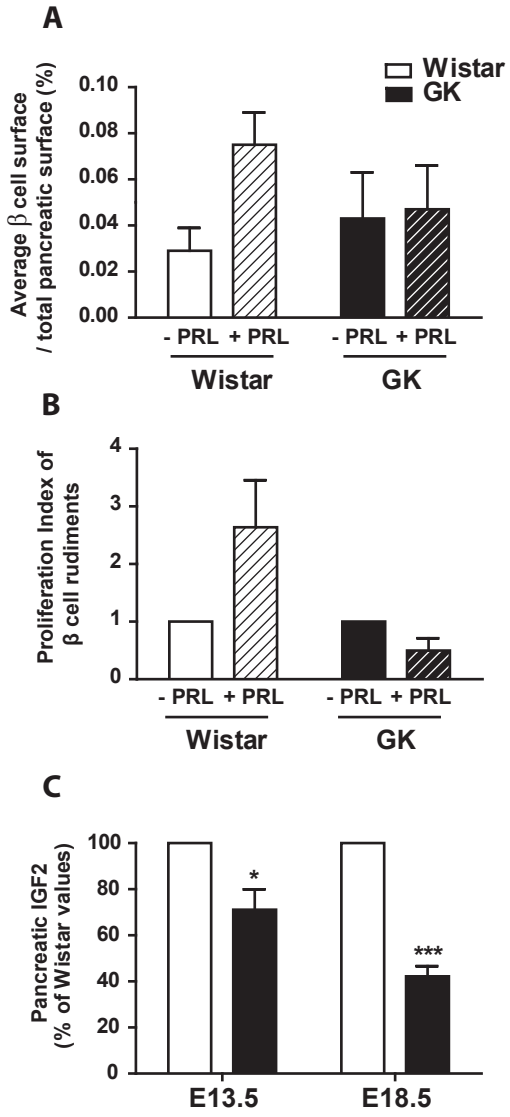

A
Wistar
GK
Average β cell surface / total pancreatic surface (%)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
- PRL + PRL
- PRL + PRL
Wistar
GK
B
Proliferation Index of β cell rudiments
4
3
2
1
0
- PRL + PRL
- PRL + PRL
Wistar
GK
C
Pancreatic IGF2 (% of Wistar values)
100
80
60
40
20
0
*
***
E13.5
E18.5

Figure 2

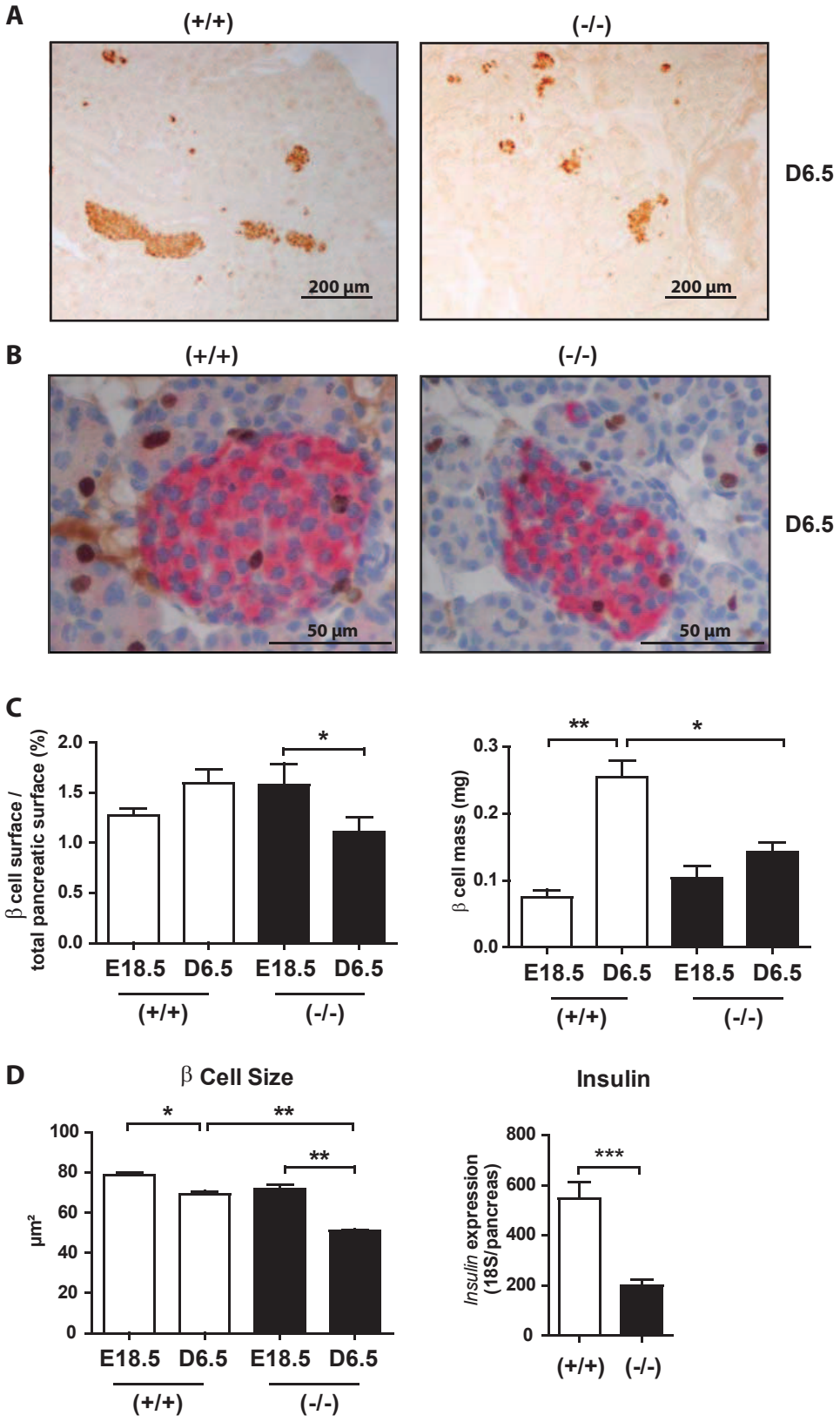

A
(+/+)
(-/-)
D6.5
200 µm
200 µm
B
(+/+)
(-/-)
D6.5
50 µm
50 µm
C
β cell surface / total pancreatic surface (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
E18.5
D6.5
E18.5
D6.5
(+/+)
(-/-)
β cell mass (mg)
0.3
0.2
0.1
0.0
**
*
E18.5
D6.5
E18.5
D6.5
(+/+)
(-/-)
D
β Cell Size
µm²
100
80
60
40
20
0
*
**
**
E18.5
D6.5
E18.5
D6.5
(+/+)
(-/-)
Insulin
Insulin expression (18S/pancreas)
800
600
400
200
0
***
(+/+)
(-/-)

Figure 3

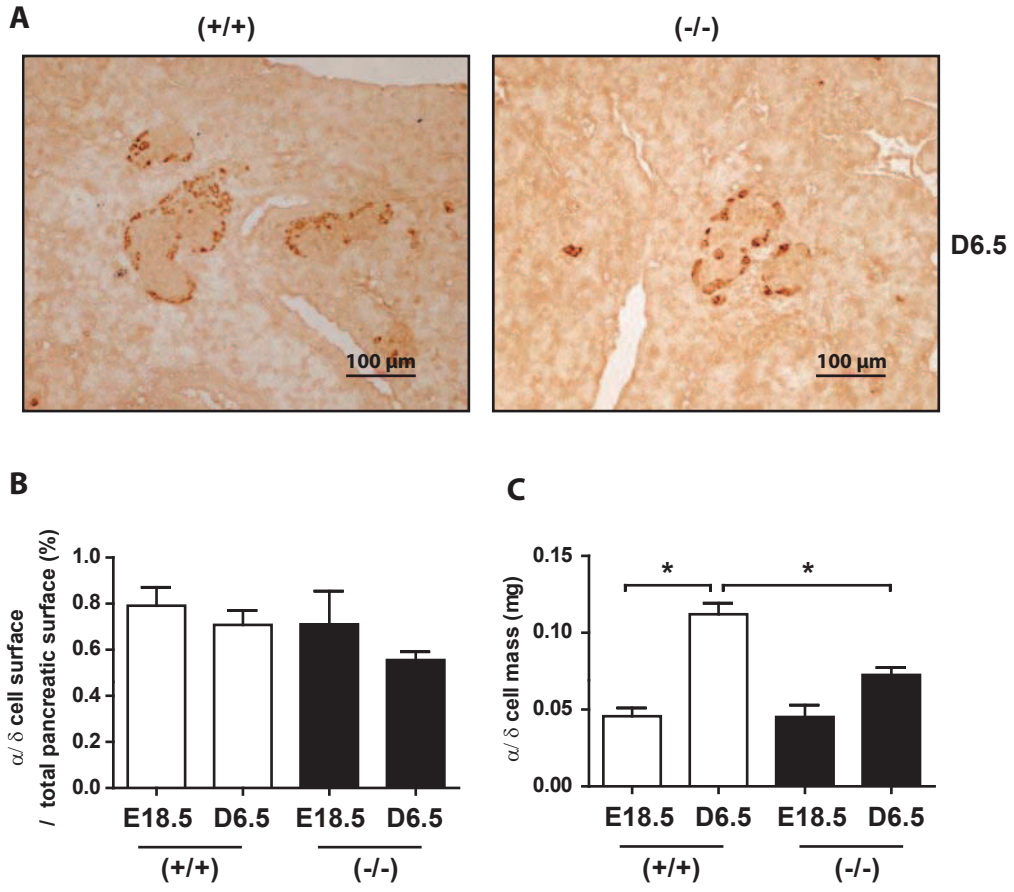
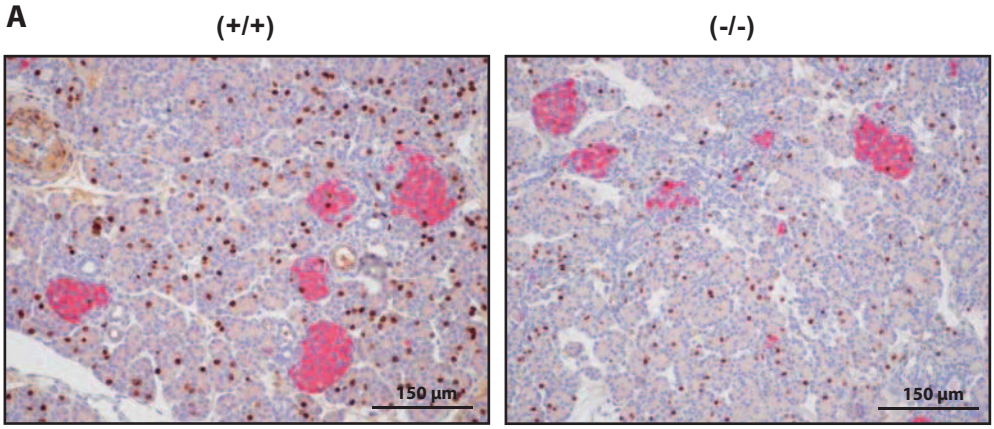
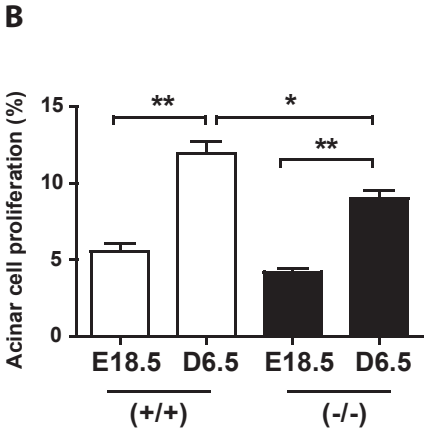
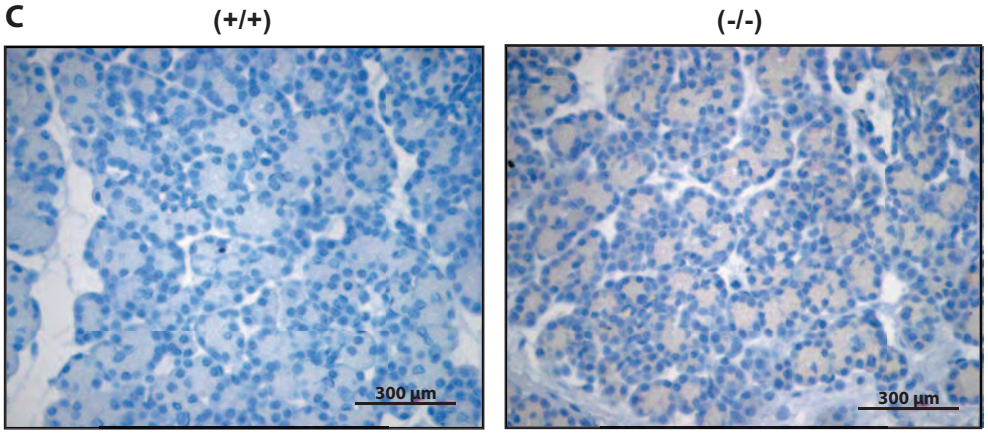
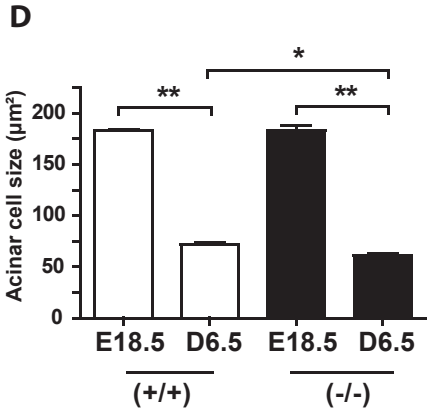

A
(+/+)
(-/-)
D6.5
100 µm
100 µm
B
α/δ cell surface / total pancreatic surface (%)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
E18.5
D6.5
E18.5
D6.5
(+/+)
(-/-)
C
α/δ cell mass (mg)
0.15
0.10
0.05
0.00
*
*
E18.5
D6.5
E18.5
D6.5
(+/+)
(-/-)

Figure 4


A
(+/+)
(-/-)
150 µm
150 µm


B
Acinar cell proliferation (%)
15
10
5
0
**
*
**
E18.5
D6.5
E18.5
D6.5
(+/+)
(-/-)


C
(+/+)
(-/-)
300 µm
300 µm


D
Acinar cell size (µm²)
200
150
100
50
0
*
**
**
E18.5
D6.5
E18.5
D6.5
(+/+)
(-/-)

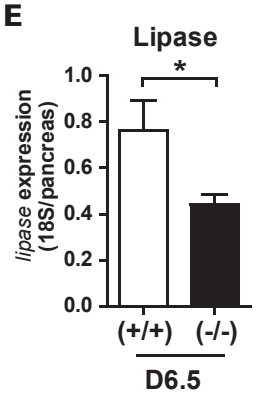

E
Lipase
lipase expression
(18S/pancreas)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
(+/+)
(-/-)
D6.5

Figure 5

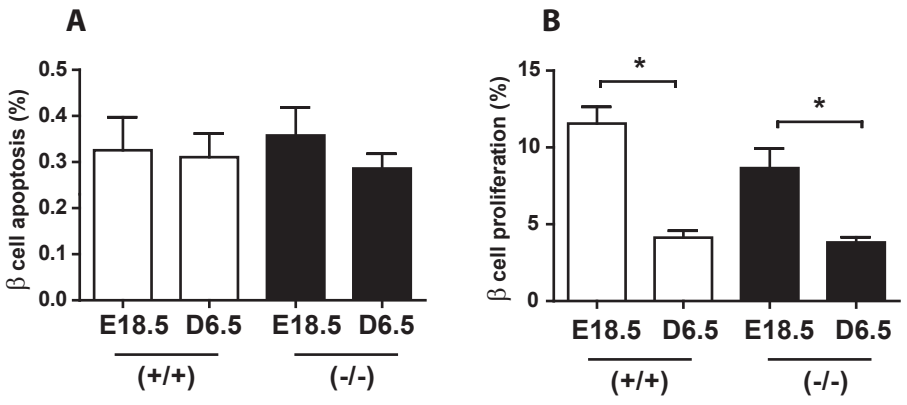

A
β cell apoptosis (%)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
E18.5
D6.5
E18.5
D6.5
(+/+)
(-/-)
B
β cell proliferation (%)
15
10
5
0
*
*
E18.5
D6.5
E18.5
D6.5
(+/+)
(-/-)

Figure S1

II. Résumé de l'article n°2

Un défaut de masse β du pancréas a précédemment été découvert chez les animaux adultes déficients en récepteur PRL (R PRL), ce défaut s'accompagnant d'une intolérance au glucose. Afin de définir le rôle du R PRL sur la morphogenèse pancréatique et déterminer si ce défaut est précoce, des pancréas de souris R PRL$^{-/-}$ et R PRL$^{+/+}$ ont été analysés pendant le développement embryonnaire (E18,5), le jour de la naissance (J0,5) et 6 jours plus tard (J6,5), des étapes-clé du développement pancréatique. L'expression d'*Igf2*, une cible de la PRL, est fortement altérée dans le pancréas des souris R PRL$^{-/-}$ le jour de la naissance comparée à celle des souris contrôles. Pour évaluer l'impact de cette altération sur le développement pancréatique, une analyse approfondie de la masse endocrine et exocrine du pancréas a été réalisée à E18,5 et J6,5. Des approches combinées d'immunomarquage et de quantification par imagerie ont montré un défaut d'adaptation de la masse des cellules β à cette période chez les souris R PRL$^{-/-}$ comparée à celle des souris contrôles. La quantification des taux de prolifération et d'apoptose n'a pas permis de révéler des différences entre les deux génotypes suggérant que le nombre de cellules β ne serait pas modifié. La détermination de la taille individuelle de ces cellules révèle une diminution de 30% chez les souris R PRL$^{-/-}$ à J6,5 et est corrélée à une diminution importante de l'expression d'insuline comparé à celles des souris contrôles. Une analyse de la masse α/δ montre également un défaut similaire chez les souris R PRL$^{-/-}$. Par ailleurs, une diminution importante de la prolifération (25%) et de la taille des acini (15%) est aussi observée à J6,5 chez les souris R PRL$^{-/-}$ suggérant que la signalisation de la PRL participe au développement du pancréas dans sa totalité. La voie PI3K/mTOR/S6K1 empruntée par la PRL est cruciale dans le contrôle de la taille cellulaire. Afin d'étudier cette voie de signalisation, nous avons montré que dans les cellules INS-1 l'incorporation de leucine était augmentée en présence de PRL et réduite en présence de rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR. De même, une augmentation par la PRL de la phosphorylation de la kinase S6 dans les cellules INS-1 est également observée. Ces données suggèrent que cette voie de signalisation est régulée dans ce système. La diminution de la taille cellulaire des pancréas R PRL$^{-/-}$ peut résulter à la fois d'un effet direct, (absence du R PRL) mais aussi par des effets indirect de l'insuline et l'IGF2, des ligands activant la voie PI3K et dont l'expression est fortement altérée dans le pancréas des souris R PRL$^{-/-}$. Dans un contexte physiopathologique, le développement du pancréas de

rats Goto-Kakizaki (GK), un modèle spontané de diabète de type 2 et de rats Wistar (contrôle) a été étudié. Dans les îlots de rates gestantes GK, un défaut d'expression du R PRL est observé et on observe aussi une altération de la concentration circulante de PRL comparé à celle de rats Wistar. Des ébauches pancréatiques embryonnaires issues de rats GK et Wistar ont été mises en culture en présence ou non de PRL. La masse des cellules β augmente au cours du temps dans les bourgeons pancréatiques de rats Wistar alors qu'elle n'est pas modifiée dans ceux de rats GK par le traitement PRL. Ce défaut est le résultat d'une baisse de prolifération de ces cellules, une des causes de l'altération de la masse β préalablement des bourgeons pancréatiques de rats GK.

Cette étude montre que la signalisation de la PRL est capitale pour le développement du pancréas et ouvre de nouvelles perspectives d'étude dans les événements pathologiques à l'origine du diabète.

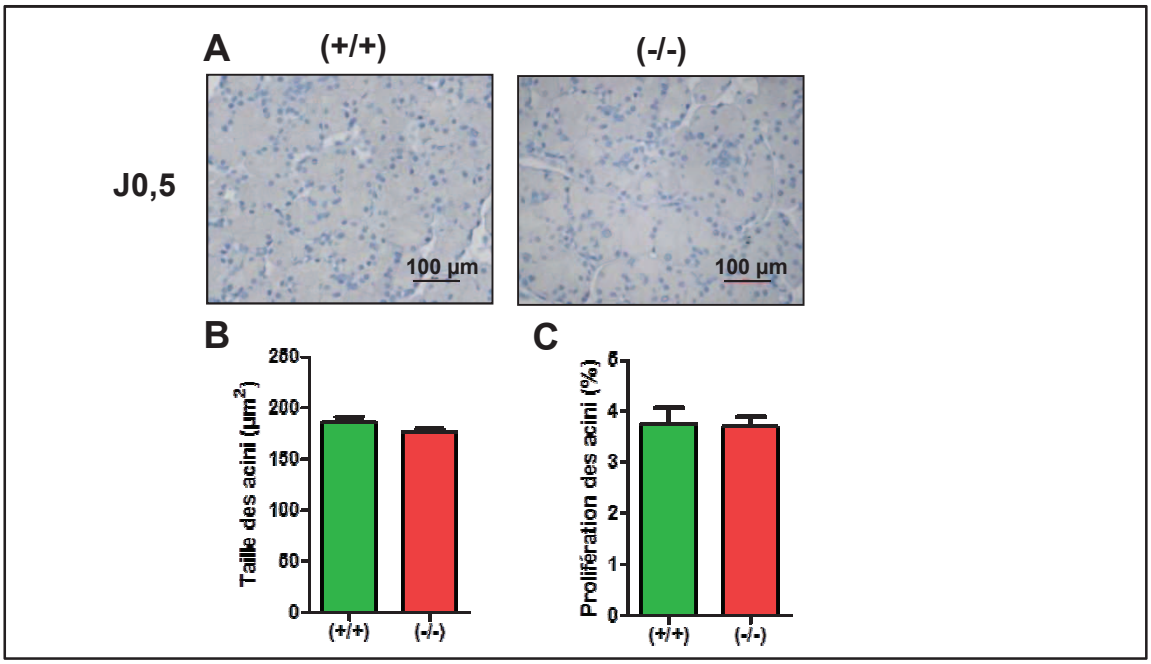


Figure 25: Phénotype du pancréas exocrine chez les souris R PRL$^{-/-}$

Coupes représentatives de pancréas à J0,5 colorées à l'hématoxyline (A). La quantification de la taille des acini ne montre aucune différence entre les deux génotypes. Au moins 750 cellules ont été comptées pour chaque animal (n=4-5 par groupe) (B) La quantification des taux de prolifération ne révèle aucune différence entre les deux génotypes. Au moins 2000 cellules ont été comptées pour chaque animal (n=4-5 par groupe) (C).

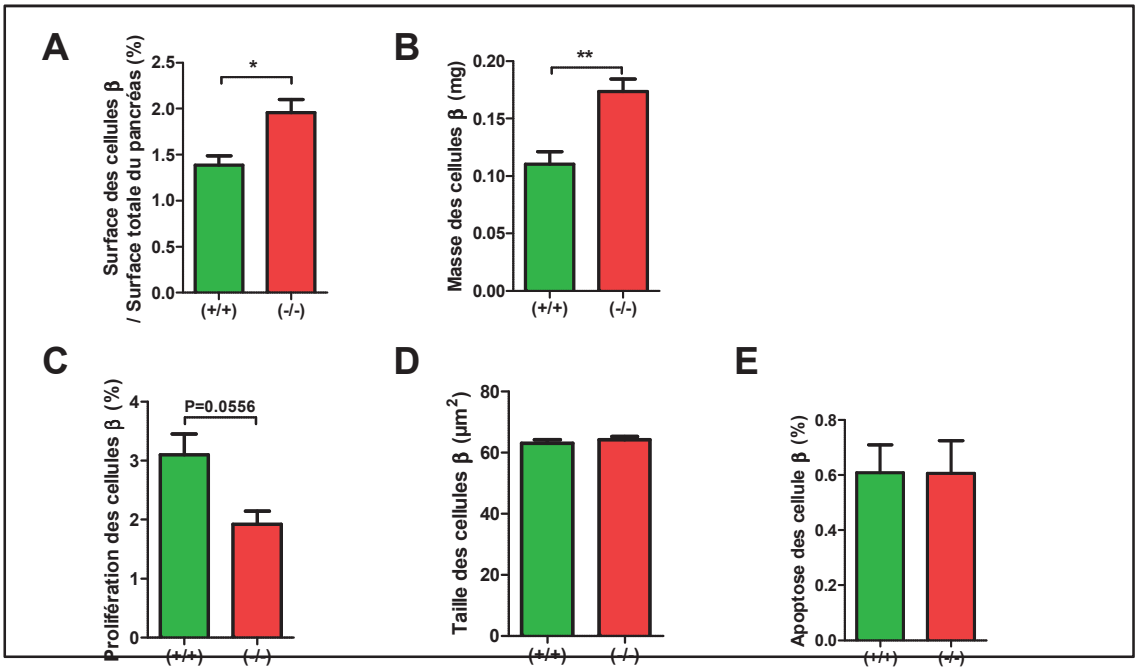


Figure 26: Augmentation de la masse β chez les souris R PRL$^{-/-}$

Le jour de la naissance, le pourcentage (A) ainsi que la masse (B) des cellules β sont augmentés chez les souris R PRL$^{-/-}$. Aucune différence significative n'est observée entre les deux génotypes en terme de prolifération (C), taille (D) et d'apoptose (E) des cellules β. *<P0,05 ; **<P0,01

III. Résultats supplémentaires, discussions et perspectives

A/ Rôle de la signalisation de la PRL sur l'ontogenèse du pancréas le jour de naissance

1- Phénotype exocrine

Les taux de prolifération et la taille des acini ne sont pas différents entre les deux groupes le jour de la naissance (Figure 25). La mesure de l'apoptose, réalisée à l'aide de marquage TUNEL sur des coupes de pancréas de souris, révèle un nombre beaucoup trop faible de cellules apoptotiques pour que ce processus biologique ait un impact physiologique (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que la signalisation de la PRL n'intervient pas dans la mise en place des acini au jour de naissance. Toutefois, la masse totale du pancréas est augmentée chez les souris R PRL$^{-/-}$ comparée à celle des souris sauvages suggérant que les processus biologiques conduisant à la formation du pancréas avant la naissance seraient altérés chez ces animaux.

2- Phénotype endocrine

Cellule β

La quantification des zones immunomarquées à l'insuline sur des coupes de pancréas montre de manière très intéressante que les souris R PRL$^{-/-}$ présentent une augmentation significative du pourcentage et de la masse des cellules β le jour de naissance (Figure 26A-B). Afin de mieux comprendre cette augmentation, nous avons mesuré les taux de prolifération et d'apoptose des cellules β ainsi que leur taille. Aucune différence significative en termes d'apoptose et de taille cellulaire n'a pu être observée entre les deux génotypes ne permettant pas de conclure sur les mécanismes impliqués dans cette augmentation de masse β (Figure 26C-E). Néanmoins, la prolifération des cellules β semblent diminuée chez les souris R PRL$^{-/-}$ et pourrait participer au défaut de la masse β observé 6 jours plus tard. La période anténatale est une période critique dans la différenciation des progéniteurs pancréatiques en cellules endocrines *via* l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Deux communications affichées (Argente-Pla et al., 2011; Huang, 2011) ont

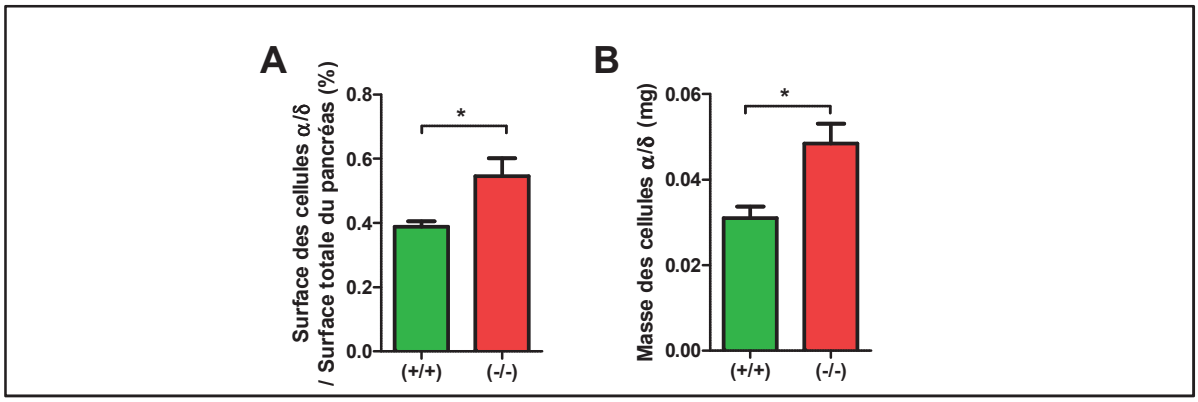


Figure 27: Augmentation de la masse α/δ chez les souris R PRL$^{-/-}$

Le jour de naissance, le pourcentage de la surface (A) ainsi que la masse (B) des cellules α/δ sont augmentés chez les souris R PRL$^{-/-}$ comparé à ceux des souris contrôles. (n=3 par groupe). *P<0,05

montré un impact de la PRL sur la régulation de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la néogenèse.

1) En quantifiant le nombre de cellule Ngn3^{+}/insuline^{-} chez des souris R PRL$^{+/-}$ et sauvages, Carol Huang a montré que le nombre de progéniteurs des cellules endocrines ne varie pas chez les souris R PRL$^{+/-}$ au cours de la gestation alors que ce nombre diminue chez les souris sauvages. L'expression des transcrits de *ngn3* n'est pas modifiée dans le pancréas de souris R PRL$^{+/-}$ gestantes comparée à celle des souris non-gestantes alors qu'elle diminue significativement dans le pancréas de souris sauvages au cours de la gestation (Huang, 2011).

2) L'addition de PRL sur des îlots isolés provenant de rats âgés de 10 et 17 jours diminue significativement l'expression de MafA qui est un facteur de transcription essentiel à la maturation des cellules β (Argente-Pla et al., 2011).

Ces deux études suggèrent que la PRL diminuerait l'expression de deux facteurs de transcription des cellules β : Ngn3 et MafA. Des données de la littérature suggèrent que des progéniteurs pancréatiques proviendraient de cellules canalaires, de l'îlot de Langerhans ou bien même des acini (Baeyens and Bouwens, 2008). Nous avons donc décidé de comparer les taux de néogenèse à E18,5 entre les souris R PRL$^{+/+}$ et R PRL$^{-/-}$ en quantifiant le nombre de progéniteurs PDX1^{+}/insuline^{-} en fonction de cette localisation. Le nombre de progéniteurs présents dans les îlots et les canaux ne diffèrent pas entre les deux génotypes mais des résultats préliminaires montrent que ce nombre est deux fois plus important dans les acini des souris R PRL$^{-/-}$ que ceux des souris sauvages (résultats non publiés). L'augmentation de la masse β chez les souris R PRL$^{-/-}$ le jour de la naissance pourrait s'expliquer par une augmentation de la néogenèse des cellules β à des temps plus précoces.

<u>Cellule α/δ</u>

La quantification des zones immunomarquées au glucagon et à la somatostatine montre une augmentation significative du pourcentage et de la masse des cellules α/δ chez les souris R PRL$^{-/-}$ le jour de la naissance (Figure 27). Les cellules α représentent approximativement 20% de la masse endocrine alors que les cellules δ représentent seulement 2% suggérant ainsi que ce résultat pourrait s'expliquer en partie par une altération de l'ontogenèse de la cellule α. Il a été décrit une expression du R PRL dans la

cellule α en période anténatale (Freemark et al., 1997), mais les rôles de la signalisation PRL sur l'ontogenèse de la cellule α et de son impact sur cette cellule sont à ce jour totalement inconnus et ouvrent des perspectives nouvelles dans la compréhension de l'impact de la PRL sur le métabolisme glucidique.

Les adaptations périnatales sont capitales pour l'ontogenèse des cellules endocrines, tout particulièrement les cellules β, dans le modèle R PRL$^{-/-}$ puisque la masse β est augmentée le jour de la naissance et est diminuée 6 jours plus tard comparée à celle des souris contrôles. Ces résultats suggèrent qu'une augmentation du nombre de progéniteurs à des temps précoces du développement pourrait favoriser le développement des cellules β jusqu'à la naissance. En revanche, l'altération de la prolifération des cellules β dès le jour de la naissance et la diminution drastique de leur taille six jours plus tard empêcherait l'adaptation de leur masse dans le modèle R PRL$^{-/-}$. Cette altération expliquerait en partie le défaut de cette masse à l'âge adulte. Une deuxième vague de prolifération des cellules a lieu lors du sevrage (Gunasekaran et al., 2012). Il serait envisageable alors que la PRL participe à ce processus permettant de constituer un nombre de cellules suffisant pour réguler le métabolisme glucidique. La détermination de la masse β et des processus biologiques la régulant sur des pancréas de souris R PRL$^{-/-}$ et R PRL$^{+/+}$ âgées de 3 semaines permettrait de conclure sur un rôle de la PRL à cette étape-clé du développement des cellules β.

Cette étude montre que ce défaut d'adaptation de la masse des cellules β est corrélé à un défaut d'expression d'*igf2* sans exclure l'altération de l'expression d'autres acteurs essentiels au développement pancréatique. Les gènes *igf2* et *H19* sont des gènes soumis à l'empreinte parentale. La génération d'une souris invalidée pour l'allèle maternel *H19* (*H19*$^{+/-}$) présente une expression biallélique d'igf2 (Ripoche et al., 1997). Des expériences sont en cours (croisement de souris mâles R PRL$^{+/-}$ avec des souris femelles H19$^{+/-}$) afin d'obtenir des animaux R PRL$^{-/-}$ et une expression normale d'IGF2 consécutive à l'inactivation de l'allèle maternel H19. Nous espérons ainsi rétablir le développement du pancréas chez des souris R PRL$^{-/-}$ *via* une normalisation de l'expression d'IGF2. Des données très préliminaires montre un rétablissement de la masse du pancréas chez les souris R PRL$^{-/-}$ H19$^{+/-}$ comparée à celle des souris contrôles (résultats non publiés).

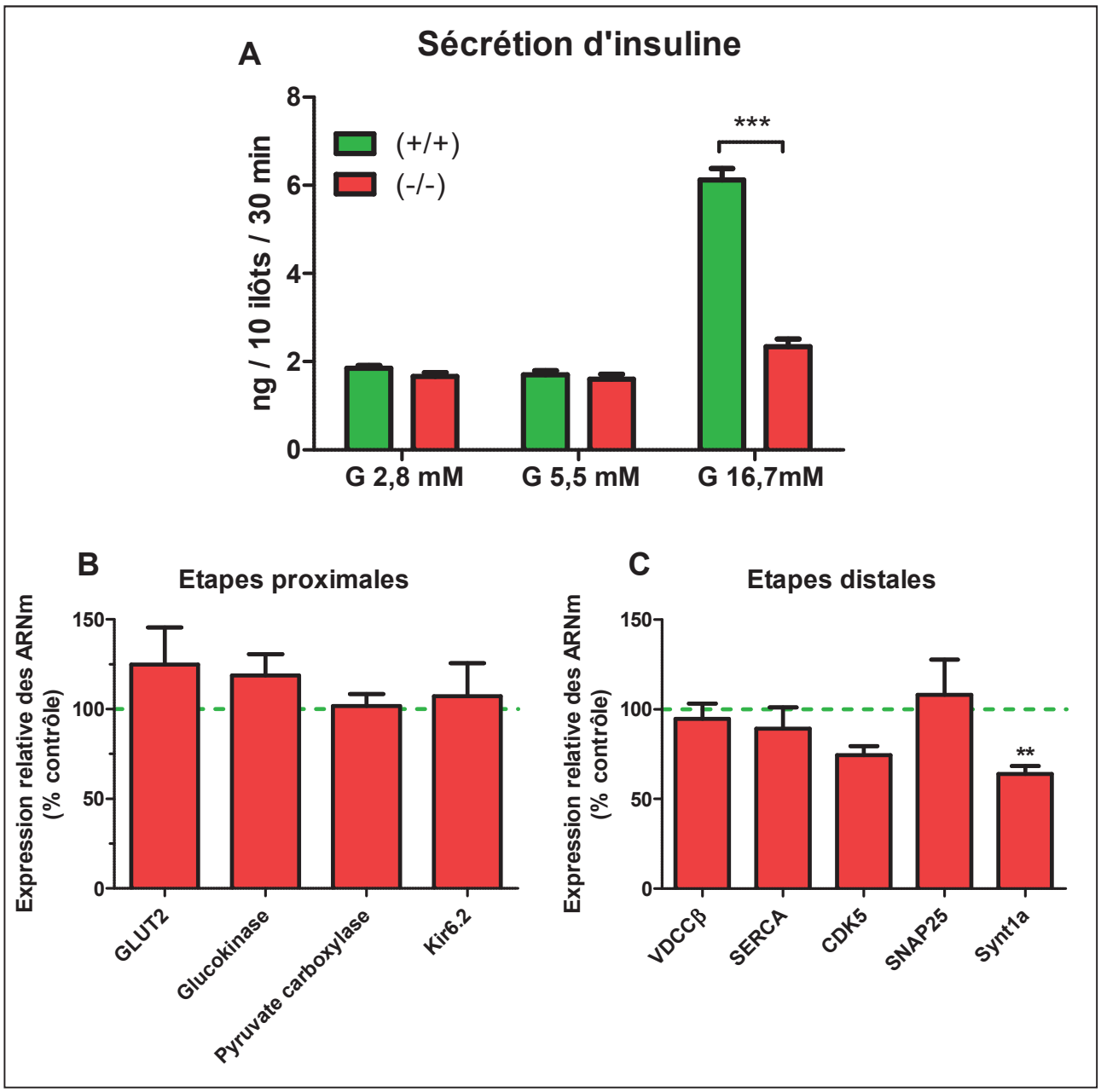


Figure 28: Altération de la sécrétion d'insuline chez les souris R PRL$^{-/-}$

L'incubation d'îlots de Langherans, isolés à partir de pancréas de souris adultes, avec différentes concentrations de glucose (2,8 mM, 5,5 mM, 16,7 mM) provoque une sécrétion d'insuline alors qu'en absence de R PRL la sécrétion d'insuline est réduite (n=5-17) (A). L'analyse par PCR quantitative, sur des îlots isolés de souris âgées de 6 mois, des gènes impliqués dans les étapes proximales de la sécrétion des vésicules d'insuline (*glut2* ; *glucokinase* ; *pyruvate carboxylase* et *kir6.2*) ne montre aucune différence significative par rapport aux valeurs contrôles (B). En revanche, l'étude de l'expression des gènes impliqués dans les étapes distales (*vdccβ*; *serca*; *cdk5*; *snap25* et *synt1a*) montre un défaut de l'expression de *synt1a* dans les îlots de Langherans provenant de souris R PRL$^{-/-}$ comparée à celle des souris sauvages (n=3-5) (C). **<P0,01 ; ***<P0,001.

Les souris R PRL$^{-/-}$ présentent un défaut majeur du développement de la totalité du pancréas après la naissance qui pourrait continuer jusqu'à l'âge adulte et participer à une aggravation de la fonction pancréatique (sécrétion enzymes digestions, sécrétion insuline) lors d'un changement de régime. Ces données nous ont donc amenés à étudier l'impact de la signalisation de la PRL sur les mécanismes d'exocytose des vésicules d'insuline.

B/ PRL et fonction insulinosécrétrice de la cellule β chez la souris adulte

Afin de confirmer l'implication du R PRL dans la sécrétion d'insuline par la cellule β, nous avons déterminé la capacité sécrétoire d'îlots de Langerhans isolés à partir de souris R PRL$^{-/-}$ et R PRL$^{+/+}$ adultes. L'incubation de ces îlots en présence de concentrations faibles de glucose (2,8 mM et 5,5 mM) ne révèle aucune différence entre les deux génotypes en termes de sécrétion basale d'insuline. En revanche, l'incubation à des concentrations de glucose stimulant la sécrétion d'insuline (16,7 mM) montre un défaut majeur de l'insulino-sécrétion dans les îlots de souris R PRL$^{-/-}$ comparé à ceux provenant des souris sauvages (Figure 28A).

Afin de mieux comprendre quelles étapes de la sécrétion d'insuline pourraient être altérées dans les cellules β déficientes en R PRL, nous avons quantifié, à partir d'îlots isolés de souris âgées de 6 mois, l'expression génique de plusieurs partenaires impliqués dans cette sécrétion.

1- Les étapes proximales de la sécrétion d'insuline

Aucune différence significative en termes d'expression génique de tous les partenaires analysés (*glut2*, *glucokinase*, *pyruvate carboxylase* et la sous-unité *kir6.2* du canal potassique) n'a été observée entre les deux génotypes. Ces résultats suggèrent que le défaut d'insulinosécrétion préalablement observé ne serait pas consécutif à une altération des étapes proximales (Figure 28B).

2- Les étapes distales de la sécrétion d'insuline

Signalisation calcique

La PRL régule positivement la sécrétion d'insuline par une augmentation de l'expression de SERCA2 (Anhê et al., 2007). Au vu de l'importance des flux calciques dans la sécrétion d'insuline par la cellule β, il nous a semblé judicieux d'étudier l'expression de plusieurs partenaires impliqués dans la modulation de ces flux. SERCA et VDDCβ favorisent le passage des ions Ca2+ respectivement du réticulum endoplasmique et du milieu extracellulaire dans le cytosol de la cellule. Néanmoins, aucune différence en termes d'expression n'a été observée entre les deux génotypes (Figure 28C).

CDK5

Le rôle de la sérine/thréonine kinase CDK5 (Cyclin Dependent Kinase 5), et de son activation par la formation d'un complexe protéique avec p35 ou P39 sur la neurogenèse, la survie neuronale et son implication dans les maladies neurodégénératives ont été largement décrits dans la littérature (Cheung and Ip, 2012). Les neurones et les cellules β partagent de grandes similitudes dans les mécanismes impliqués dans la sécrétion. L'expression de CDK5 a été démontrée dans la cellule β murine. Son rôle reste encore controversé mais les données de la littérature montrent que CDK5 participe à la sécrétion d'insuline en contrôlant la capacitance de la cellule β et en favorisant la migration des vésicules d'insuline jusqu'à la membrane plasmique (Lilja et al., 2001, 2004; Schubert et al., 2010).

L'expression de CDK5 tend à diminuer dans les îlots provenant des souris R $PRL^{-/-}$ sans pour autant être significative (Figure 28C). Or, CDK5 serait une cible intéressante pour expliquer le défaut d'insulino-sécrétion chez les souris R $PRL^{-/-}$. En effet, la stimulation des lymphomes à cellules T avec de la PRL stimule l'expression du transcrit de CDK5 (Hosokawa et al., 1995). Plus récemment, Michael Freemark a montré que l'altération de la signalisation de la PRL sur des îlots murins isolés, par l'ajout de siRNA ciblant spécifiquement le R PRL, diminue significativement l'expression du transcrit de *cdk5* (Fleenor et al., 2011). Il serait judicieux d'augmenter le nombre d'échantillons afin de vérifier si cette tendance devient significative.

Les SNAREs

L'analyse des transcrits des acteurs impliqués dans la fusion des vésicules d'insuline à la membrane plasmique montre que l'expression de Synt1a est diminué de 40% chez les souris R PRL$^{-/-}$ alors qu'aucune différence n'est observée pour SNAP25 (Figure 28C). Ainsi, un défaut d'expression de Synt1a pourrait altérer ce processus et provoquer un défaut d'insulino-sécrétion.

Synt1a subit des modifications conformationnelles importantes durant le processus de sécrétion lui permettant d'interagir avec d'autres partenaires de l'insulino-sécrétion et de réguler leur activité. Synt1a existe sous une conformation dite « ouverte » ou « fermée ». En condition basale, Synt1a, présent majoritairement sous sa forme « fermée » interagit avec le canal calcique voltage-dépendant VDCCβ et inhibe l'entrée de Ca^{2+} au sein de la cellule. En condition stimulant la sécrétion, la conformation de Synt1a s'ouvre ce qui lui permet d'interagir avec le canal Kv et d'inhiber son activité repolarisante de la membrane en empêchant les ions K^+ d'entrer dans la cellule. Le passage de la conformation « fermée » à « ouverte » de Synt1a favorise l'entrée de calcium dans la cellule et prolonge la dépolarisation de la membrane plasmique, en inhibant l'entrée d'ions K^+, maintenant la cellule dans un état pro-sécrétoire (Leung et al., 2007).

Comme cela est admis, la PRL module l'expression de la Synt1a (Cunha et al., 2006). Il a été également montré que la signalisation de la PRL diminue les interactions entre Munc18-1 et Synt1a par des modifications covalentes suggérant ainsi que la PRL pourrait indirectement moduler la conformation de Synt1a (Cunha et al., 2007). Néanmoins, le modèle déficient en Synt1a présente des altérations uniquement lors de la première phase de sécrétion d'insuline (Ohara-Imaizumi et al., 2007). Or nos résultats et ceux déjà publiés semblent suggérer que les deux phases de sécrétion d'insuline sont altérées dans le modèle R PRL$^{-/-}$ (Freemark et al., 2002). D'autres altérations pourraient donc participer au défaut de sécrétion d'insuline observé en absence de R PRL.

Ces résultats sont préliminaires mais suggèrent que le défaut d'insulinosécrétion des cellules β en absence de R PRL est lié à des altérations des étapes distales de l'exocytose. Nous montrons que l'expression de Synt1a est fortement diminuée en absence de R PRL et

que celle de CDK5 pourrait être altérée. Il serait nécessaire d'analyser l'expression d'autres partenaires impliqués dans la sécrétion d'insuline tels que Munc18-1 et VAMP2 afin de mieux caractériser le défaut d'insulino-sécrétion des cellules β des souris R $PRL^{-/-}$.

Les modifications de l'état de phosphorylation de nombreux acteurs sont des mécanismes-clé de la régulation de cette sécrétion. La PRL modifie l'état de phosphorylation de ces acteurs dans des îlots de rats suggérant que des altérations d'interaction entre partenaires de l'exocytose est envisageable dans notre modèle. Une altération de CDK5, dont l'expression est régulée par la PRL, pourrait également participer à ce défaut d'exocytose. Des altérations d'un changement conformationnel de Synt1a pourraient participer au défaut d'insulino-sécrétion en réponse au glucose observé dans notre modèle.

A partir d'îlots isolés de souris adultes R $PRL^{-/-}$ et sauvages, la quantification par western blot de l'état de phosphorylation de Synt1a dans des conditions stimulant ou non la sécrétion d'insuline permettrait d'argumenter en faveur d'une possible altération du changement conformationnel de cette protéine. Des expériences de co-immunoprécipitation entre Synt1a et les différents partenaires décrits dans la littérature (Munc18-1, VDCCβ, Kv) permettrait de savoir si l'altération de l'insulino-sécrétion des souris R $PRL^{-/-}$ est correlée à un défaut de changement de conformation de Synt1a.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les PL et la PRL, à travers le R PRL, exercent de nombreux rôles essentiellement sur la lactation et la reproduction. L'expression du R PRL dans la cellule β pancréatique et les adipocytes a suscité un intérêt considérable de la communauté scientifique ces dernières années. Ces hormones favorisent la différenciation des adipocytes blancs et bruns, inhibent la sécrétion de nombreuses adipokines, et présentent des propriétés anti-lipogéniques. Ces hormones participent aussi à l'adaptation de la masse des cellules β pendant la gestation en favorisant son augmentation d'un facteur 2 et régulent positivement la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Ce travail de thèse s'est construit autour de deux axes principaux de recherche : l'impact d'un régime obésogène sur la balance énergétique des souris invalidées pour le R PRL et le rôle de la signalisation PRL sur l'ontogenèse et la fonctionnalité de la cellule β pancréatique. Il apporte des éléments nouveaux qui permettent de mieux caractériser le rôle de la signalisation PRL sur la régulation de la balance énergétique. Cette étude démontre que la signalisation de la PRL:

•Participe, dans des conditions obésogènes, à la différenciation des progéniteurs adipocytaires en adipocytes beiges.

•Participe de manière essentielle à l'ontogenèse des cellules β pancréatiques au cours du développement et à la sécrétion d'insuline des cellules β en modifiant l'expression de gènes cibles à l'âge adulte.

Ces données suscitent de nouvelles questions et des perspectives intéressantes dans la compréhension de la signalisation des hormones lactogènes et de la PRL.

Rôle de la PRL sur l'ensemble des acteurs contribuant à l'émergence d'adipocytes beiges et sur l'homéostasie de la balance énergétique

La prise alimentaire, l'activité locomotrice et l'activité thermogénique sont les composantes principales de l'homéostasie de la balance énergétique. La dépense thermogénique s'effectue en grande partie par le tissu adipeux brun interscapulaire. Il serait donc très intéressant de mieux caractériser l'impact de la PRL sur le tissu adipeux brun dans des conditions obésogènes pour déterminer plus précisément la capacité thermogénique de ce tissu. En effet, certains neurones du noyau ARC et PVH, où l'expression du R PRL a été décrite, jouent un rôle important dans l'activation du tissu adipeux brun. A l'aide de sonde, la mesure de la température corporelle à différentes localisation de l'organisme, telles que le tissu adipeux interscapulaire et périrénal, permettrait de déterminer la contribution de chacun de ces tissus dans la dépense calorique (Kong et al., 2012). L'obtention de ces valeurs permettrait de mieux comprendre la contribution des adipocytes beiges dans l'augmentation de la dépense énergétique observée dans notre modèle sous régime gras.

Les données de la littérature décryptant les mécanismes centraux et périphériques impliqués dans l'activité thermogénique et l'apparition des adipocytes bruns et beiges ont abondé ces dernières années. Le muscle et certaines populations neuronales, exprimant tous deux le R PRL, sont des composantes importantes de ces processus. Il est donc probable qu'ils puissent contribuer, en plus de l'altération de la voie pRb/FoxC2 décrite dans notre étude, à l'apparition d'adipocytes beiges dans le modèle R $PRL^{-/-}$ sous régime obésogène. L'invalidation ubiquiste du R PRL rend donc impossible la dissociation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition des adipocytes beiges des mécanismes périphériques et centraux. Il serait donc intéressant d'étudier un modèle d'invalidation conditionnelle par un système CRE/lox. Ce modèle vient d'être créé par l'équipe de Michael Freemark et permettra à l'avenir de mieux caractériser l'impact du R PRL sur le pancréas, les tissus adipeux, mais aussi sur le foie, le système nerveux central ou bien encore le tractus gastro-intestinal et d'exclure d'éventuels effets compensatoires liés à une invalidation totale.

Mécanismes moléculaires empruntés par la signalisation de la PRL et impliqués dans la différenciation des adipocytes beiges

L'étude de modèles cellulaires particuliers pourrait apporter une connaissance supplémentaire sur les cibles moléculaires de la PRL directement impliquées dans la différenciation des adipocytes beiges. Les adipocytes beiges et blancs sont issus des progéniteurs communs (myf5-) cependant aucun modèle de cellules beiges n'est disponible aujourd'hui. La mise en culture de préadipocytes, contenus dans la fraction du stroma-vasculaire du tissu adipeux périrénal des souris R PRL$^{-/-}$, pourrait constituer une approche adéquate pour étudier la cinétique des événements moléculaires conduisant à la différenciation de cette population adipocytaire. L'utilisation des cellules souches embryonnaires (ES) permettrait aussi de mieux caractériser les étapes précoces de cette différenciation. Ces modèles complémentaires permettraient d'élucider la cinétique d'expression des différents acteurs impliqués dans la différenciation des adipocytes beiges.

Rôles distincts des PL et de la PRL sur le développement et la fonctionnalité du pancréas ?

Dans notre étude, nous montrons que la signalisation de la PRL est capitale pour le développement du pancréas et qu'après un régime gras la masse du pancréas est altérée en absence de PRL. L'invalidation conditionnelle du R PRL dans le pancréas, soit pendant une période définie du développement ou plus tard à l'âge adulte permettrait de dissocier les effets liés aux adaptations périnatales et aux adaptations physiopathologiques (gestation et régimes), aussi bien sur les cellules exocrines que les cellules endocrines. Par cette approche, le rôle de la signalisation de la PRL pourrait être mieux compris sur les tissus cibles des PL et de la PRL au cours du temps.

Retombées de ces données sur la physiopathologie humaine.

Chez l'Homme, la PRL et la GH lient le R PRL avec des affinités proches rendant difficile de transposer les résultats de notre étude à un rôle du R PRL dans le développement du syndrome métabolique chez l'Homme. Des études cliniques, telles que la mesure de

l'activité du tissu adipeux brun chez des patients hyperprolactinémiques par PET-Scan, seraient des approches complémentaires à notre étude. Par ailleurs, l'utilisation de modèles cellulaires humains pourrait étayer les rôles de la PRL sur ces tissus cibles. L'obtention de la première lignée humaine de cellules β immortalisées (Ravassard et al., 2011), constituerait un outil intéressant pour confirmer les rôles prolifératifs, anti-apoptotiques et pro-sécrétoire de la PRL très bien décrits dans des modèles murins.

Ces données très novatrices sur le tissu adipeux brun et l'existence d'un nouveau type cellulaire au sein du tissu adipeux blanc permettent d'ouvrir des perspectives thérapeutiques intéressantes. Cependant, même si des corrélations semblent suggérer un lien entre activité du tissu adipeux brun et le développement de l'obésité, il manque encore des données indiscutables pour établir définitivement que l'activation du tissu adipeux brun pourrait s'accompagner d'une perte de poids marquée et durable, sans effet secondaire néfaste. Nous sommes donc probablement à l'aube de nombreuses découvertes et la recherche dans ce domaine a sûrement un avenir très prometteur…

En conclusion, ce travail a conduit à préciser le rôle de la signalisation de la PRL sur l'émergence d'une nouvelle population adipocytaire ainsi que sur l'ontogenèse et la sécrétion des cellules β pancréatiques. Il ouvre également de nouvelles perspectives de recherche dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant la prise en charge de l'obésité et du diabète.

Références bibliograhiques

Références bibliographiques

Aguilar, V., and Fajas, L. (2010). Cycling through metabolism. EMBO Mol Med *2*, 338–348.

Ajibade, D.V., Dhawan, P., Fechner, A.J., Meyer, M.B., Pike, J.W., and Christakos, S. (2010). Evidence for a Role of Prolactin in Calcium Homeostasis: Regulation of Intestinal Transient Receptor Potential Vanilloid Type 6, Intestinal Calcium Absorption, and the 25-Hydroxyvitamin D3 1α Hydroxylase Gene by Prolactin. Endocrinology *151*, 2974–2984.

Albarracin, C.T., Parmer, T.G., Duan, W.R., Nelson, S.E., and Gibori, G. (1994). Identification of a major prolactin-regulated protein as 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. Endocrinology *134*, 2453–2460.

Alliouachene, S., Tuttle, R.L., Boumard, S., Lapointe, T., Berissi, S., Germain, S., Jaubert, F., Tosh, D., Birnbaum, M.J., and Pende, M. (2008). Constitutively active Akt1 expression in mouse pancreas requires S6 kinase 1 for insulinoma formation. J. Clin. Invest. *118*, 3629–3638.

Andrews, Z.B. (2005). Neuroendocrine Regulation of Prolactin Secretion During Late Pregnancy: Easing the Transition into Lactation. Journal of Neuroendocrinology *17*, 466–473.

Anhê, G.F., Nogueira, T.C.A., Nicoletti-Carvalho, J.E., Lellis-Santos, C., Barbosa, H.C., Cipolla-Neto, J., Bosqueiro, J.R., Boschero, A.C., and Bordin, S. (2007). Signal transducer and activator of transcription 3-regulated sarcoendoplasmic reticulum Ca2+-ATPase 2 expression by prolactin and glucocorticoids is involved in the adaptation of insulin secretory response during the peripartum period. J. Endocrinol. *195*, 17–27.

Argente-Pla, M., Aguayo-Mazzucato, C., Marinelarena, A., Merino-Torres, J.F., Sharma, A., Weir, G.C., and Bonner-Weir Susan (2011). Plasma Prolactin levels May Affect the Development of Postnatal Rat Islets. P2-491 Endocrine Society.

Arnold, E., Rivera, J.C., Thebault, S., Moreno-Páramo, D., Quiroz-Mercado, H., Quintanar-Stéphano, A., Binart, N., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2010). High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. Diabetes *59*, 3192–3197.

Asai-Sato, M., Okamoto, M., Endo, M., Yoshida, H., Murase, M., Ikeda, M., Sakakibara, H., Takahashi, T., and Hirahara, F. (2006). Hypoadiponectinemia in Lean Lactating Women: Prolactin Inhibits Adiponectin Secretion from Human Adipocytes. Endocrine Journal *53*, 555–562.

Atit, R., Sgaier, S.K., Mohamed, O.A., Taketo, M.M., Dufort, D., Joyner, A.L., Niswander, L., and Conlon, R.A. (2006). Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. Dev. Biol. *296*, 164–176.

Auernhammer, C.J., Bousquet, C., Chesnokova, V., and Melmed, S. (2000). SOCS Proteins: Modulators of Neuroimmunoendocrine Functions: Impact on Corticotroph LIF Signaling. Annals of the New York Academy of Sciences *917*, 658–664.

Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., et al. (1998). The stomach is a source of leptin. Nature *394*, 790–793.

Baeyens, L., and Bouwens, L. (2008). Can beta-cells be derived from exocrine pancreas? Diabetes Obes Metab *10 Suppl 4*, 170–178.

Bamshad, M., Song, C.K., and Bartness, T.J. (1999). CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *276*, R1569–R1578.

Banerjee, R.R., Rangwala, S.M., Shapiro, J.S., Rich, A.S., Rhoades, B., Qi, Y., Wang, J., Rajala, M.W., Pocai, A., Scherer, P.E., et al. (2004). Regulation of Fasted Blood Glucose by Resistin. Science *303*, 1195–1198.

Barrera, G., Pizzimenti, S., and Dianzani, M.U. (2004). 4-hydroxynonenal and regulation of cell cycle: effects on the pRb/E2F pathway. Free Radic. Biol. Med. *37*, 597–606.

Bartness, T.J., Vaughan, C.H., and Song, C.K. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. International Journal of Obesity *34*, S36–S42.

Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., et al. (2002). Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake. Nature *418*, 650–654.

Ben-Jonathan, N., and Hnasko, R. (2001). Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor. Endocrine Reviews *22*, 724–763.

Ben-Jonathan, N., LaPensee, C.R., and LaPensee, E.W. (2007). What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans? Endocrine Reviews *29*, 1–41.

Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M., and Scherer, P.E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. Nature Medicine *7*, 947–953.

Berger, J., and Moller, D.E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. Annu. Rev. Med. *53*, 409–435.

Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C.M., and Permutt, M.A. (2001). Islet β cell expression of constitutively active Akt1/PKBα induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. Journal of Clinical Investigation *108*, 1631–1638.

Bernardo, A.S., Hay, C.W., and Docherty, K. (2008). Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic beta cell. Mol. Cell. Endocrinol. *294*, 1–9.

Biddinger, S.B., Almind, K., Miyazaki, M., Kokkotou, E., Ntambi, J.M., and Kahn, C.R. (2005). Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. Diabetes *54*, 1314–1323.

Binart, N., Bachelot, A., and Bouilly, J. (2010). Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. Trends in Endocrinology & Metabolism *21*, 362–368.

Binart, N., Helloco, C., Ormandy, C.J., Barra, J., Clément-Lacroix, P., Baran, N., and Kelly, P.A. (2000). Rescue of Preimplantatory Egg Development and Embryo Implantation in Prolactin Receptor-Deficient Mice After Progesterone Administration. Endocrinology *141*, 2691–2697.

Blanchet, E., Annicotte, J.-S., Lagarrigue, S., Aguilar, V., Clapé, C., Chavey, C., Fritz, V., Casas, F., Apparailly, F., Auwerx, J., et al. (2011). E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. Nature Cell Biology *13*, 1146–1152.

Blanco, J.C.G., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.-J., Walker, K.K., Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y., and Ozato, K. (1998). The Histone Acetylase PCAF Is a Nuclear Receptor Coactivator. Genes Dev. *12*, 1638–1651.

Böhni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B.F., Beckingham, K., and Hafen, E. (1999). Autonomous Control of Cell and Organ Size by CHICO, a Drosophila Homolog of Vertebrate IRS1–4. Cell *97*, 865–875.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., and Kelly, P.A. (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. Endocrine Reviews *19*, 225–268.

Borcherding, D.C., Hugo, E.R., Idelman, G., De Silva, A., Richtand, N.W., Loftus, J., and Ben-Jonathan, N. (2011). Dopamine Receptors in Human Adipocytes: Expression and Functions. PLoS ONE *6*, e25537.

Borensztein, M., Viengchareun, S., Montarras, D., Journot, L., Binart, N., Lombès, M., and Dandolo, L. (2012). Double Myod and Igf2 inactivation promotes brown adipose tissue development by increasing Prdm16 expression. FASEB J.

Borrás, C., Esteve, J.M., Viña, J.R., Sastre, J., Viña, J., and Pallardó, F.V. (2004). Glutathione Regulates Telomerase Activity in 3T3 Fibroblasts. J. Biol. Chem. *279*, 34332–34335.

Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., et al. (2012). A PGC1-[agr]-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. Nature *481*, 463–468.

Bouchard, B., Ormandy, C.J., Di Santo, J.P., and Kelly, P.A. (1999). Immune System Development and Function in Prolactin Receptor-Deficient Mice. J Immunol *163*, 576–582.

Bouilly, J., Sonigo, C., Auffret, J., Gibori, G., and Binart, N. (2012). Prolactin signaling mechanisms in ovary. Mol. Cell. Endocrinol. *356*, 80–87.

Boutin, J.M., Edery, M., Shirota, M., Jolicoeur, C., Lesueur, L., Ali, S., Gould, D., Djiane, J., and Kelly, P.A. (1989). Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. Mol. Endocrinol. *3*, 1455–1461.

Boutin, J.-M., Jolicoeur, C., Okamura, H., Gagnon, J., Edery, M., Shirota, M., Banville, D., Dusanter-Fourt, I., Djiane, J., and Kelly, P.A. (1988). Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. Cell *53*, 69–77.

Brandebourg, T.D., Bown, J.L., and Ben-Jonathan, N. (2007). Prolactin upregulates its receptors and inhibits lipolysis and leptin release in male rat adipose tissue. Biochemical and Biophysical Research Communications *357*, 408–413.

Brelje, T.C., Parsons, J.A., and Sorenson, R.L. (1994). Regulation of islet beta-cell proliferation by prolactin in rat islets. Diabetes *43*, 263–273.

Brelje, T.C., and Sorenson, R.L. (1991). Role of prolactin versus growth hormone on islet B-cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. Endocrinology *128*, 45–57.

Brisken, C., Ayyannan, A., Nguyen, C., Heineman, A., Reinhardt, F., Jan, T., Dey, S.K., Dotto, G.P., and Weinberg, R.A. (2002). IGF-2 Is a Mediator of Prolactin-Induced Morphogenesis in the Breast. Developmental Cell *3*, 877–887.

Brito, M.N., Brito, N.A., Baro, D.J., Song, C.K., and Bartness, T.J. (2007). Differential activation of the sympathetic innervation of adipose tissues by melanocortin receptor stimulation. Endocrinology *148*, 5339–5347.

Brooks, C.L. (2012). Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor. Endocrine Reviews.

Buckley, A.R., and Buckley, D.J. (1991). Prolactin-stimulated ornithine decarboxylase induction in rat hepatocytes: coupling to diacylglycerol generation and protein kinase C. Life Sci. *48*, 237–243.

Buckley, A.R., Crowe, P.D., and Russell, D.H. (1988). Rapid activation of protein kinase C in isolated rat liver nuclei by prolactin, a known hepatic mitogen. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *85*, 8649–8653.

Buckley, A.R., Putnam, C.W., Evans, R., Laird, H.E., 2nd, Shah, G.N., Montgomery, D.W., and Russell, D.H. (1987). Hepatic protein kinase C: translocation stimulated by prolactin and partial hepatectomy. Life Sci. *41*, 2827–2834.

Budge, Dandrea, Ingleton, Stephenson, and Symonds (2000a). Effect of fetal number on prolactin receptor abundance in perirenal adipose tissue of neonatal lambs. Early Hum. Dev. *58*, 72.

Budge, H., Bispham, J., Dandrea, J., Evans, E., Heasman, L., Ingleton, P.M., Sullivan, C., Wilson, V., Stephenson, T., and Symonds, M.E. (2000b). Effect of maternal nutrition on brown adipose tissue and its prolactin receptor status in the fetal lamb. Pediatr. Res. *47*, 781–786.

Budge, H., Dandrea, J., Mostyn, A., Evens, Y., Watkins, R., Sullivan, C., Ingleton, P., Stephenson, T., and Symonds, M.E. (2003). Differential effects of fetal number and maternal nutrition in late gestation on prolactin receptor abundance and adipose tissue development in the neonatal lamb. Pediatr. Res. *53*, 302–308.

Budge, H., Mostyn, A., Wilson, V., Khong, A., Walker, A.M., Symonds, M.E., and Stephenson, T. (2002). The Effect of Maternal Prolactin Infusion During Pregnancy on Fetal Adipose Tissue Development. J Endocrinol *174*, 427–433.

Burchell, B., Nebert, D.W., Nelson, D.R., Bock, K.W., Iyanagi, T., Jansen, P.L., Lancet, D., Mulder, G.J., Chowdhury, J.R., and Siest, G. (1991). The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence. DNA Cell Biol. *10*, 487–494.

Butler, A.E., Janson, J., Soeller, W.C., and Butler, P.C. (2003). Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. Diabetes *52*, 2304–2314.

Calo, E., Quintero-Estades, J.A., Danielian, P.S., Nedelcu, S., Berman, S.D., and Lees, J.A. (2010). Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. Nature *466*, 1110–1114.

Cao, J., Gowri, P.M., Ganguly, T.C., Wood, M., Hyde, J.F., Talamantes, F., and Vore, M. (2001a). PRL, Placental Lactogen, and GH Induce Na+/Taurocholate-Cotransporting Polypeptide Gene Expression by Activating Signal Transducer and Activator of Transcription-5 in Liver Cells. Endocrinology *142*, 4212–4222.

Cao, J., Huang, L., Liu, Y., Hoffman, T., Stieger, B., Meier, P.J., and Vore, M. (2001b). Differential regulation of hepatic bile salt and organic anion transporters in pregnant and postpartum rats and the role of prolactin. Hepatology *33*, 140–147.

Cao, J., Wood, M., Liu, Y., Hoffman, T., Hyde, J., Park-Sarge, O.-K., and Vore, M. (2004a). Estradiol Represses Prolactin-Induced Expression of Na+/Taurocholate Cotransporting Polypeptide in Liver Cells Through Estrogen Receptor-A and Signal Transducers and Activators of Transcription 5a. Endocrinology *145*, 1739–1749.

Cao, L., Choi, E.Y., Liu, X., Martin, A., Wang, C., Xu, X., and During, M.J. (2011). White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. Cell Metab. *14*, 324–338.

Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D.S., Liu, Y., Fong, D.M., Young, D., and During, M.J. (2004b). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. Nature Genetics *36*, 827–835.

Cariou, B. (2012). Le tissu adipeux brun. Médecine Clinique & Endocrinologie Diabète.

Cederberg, A., Grønning, L.M., Ahrén, B., Taskén, K., Carlsson, P., and Enerbäck, S. (2001). FOXC2 Is a Winged Helix Gene that Counteracts Obesity, Hypertriglyceridemia, and Diet-Induced Insulin Resistance. Cell *106*, 563–573.

Champigny, O., Ricquier, D., Blondel, O., Mayers, R.M., Briscoe, M.G., and Holloway, B.R. (1991). Beta 3-adrenergic receptor stimulation restores message and expression of brown-fat mitochondrial uncoupling protein in adult dogs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *88*, 10774.

Chan, C.-B., Liu, X., Ensslin, M.A., Dillehay, D.L., Ormandy, C.J., Sohn, P., Serra, R., and Ye, K. (2010). PIKE-A is required for prolactin-mediated STAT5a activation in mammary gland development. EMBO J. *29*, 956–968.

Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Weingarth, D.T., Adams, J.R., Frazier, E.G., Shen, Z., Marsh, D.J., Feighner, S.D., Guan, X.-M., et al. (2004). Orexigenic Action of Peripheral Ghrelin Is Mediated by Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein. Endocrinology *145*, 2607–2612.

Chen, P., and Smith, M.S. (2004). Regulation of Hypothalamic Neuropeptide Y Messenger Ribonucleic Acid Expression During Lactation: Role of Prolactin. Endocrinology *145*, 823–829.

Cherrington, A.D. (1999). Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. Diabetes *48*, 1198–1214.

Cheung, Z.H., and Ip, N.Y. (2012). Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. Trends in Cell Biology *22*, 169–175.

Cinti, S. (1999). Adipose tissues and obesity. Ital J Anat Embryol *104*, 37–51.

Clapp, C., González, C., Macotela, Y., Aranda, J., Rivera, J.C., García, C., Guzmán, J., Zamorano, M., Vega, C., Martín, C., et al. (2006). Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. Front Horm Res *35*, 64–73.

Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gourmelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.-M., et al. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature *392*, 398–401.

Clément-Lacroix, P., Ormandy, C., Lepescheux, L., Ammann, P., Damotte, D., Goffin, V., Bouchard, B., Amling, M., Gaillard-Kelly, M., Binart, N., et al. (1999). Osteoblasts Are a New Target for Prolactin: Analysis of Bone Formation in Prolactin Receptor Knockout Mice. Endocrinology *140*, 96–105.

Collombat, P., Hecksher-Sørensen, J., Serup, P., and Mansouri, A. (2006). Specifying pancreatic endocrine cell fates. Mech. Dev. *123*, 501–512.

Collombat, P., Xu, X., Ravassard, P., Sosa-Pineda, B., Dussaud, S., Billestrup, N., Madsen, O.D., Serup, P., Heimberg, H., and Mansouri, A. (2009). The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. Cell *138*, 449–462.

Combs, T.P., Berg, A.H., Obici, S., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. Journal of Clinical Investigation *108*, 1875–1881.

Combs, T.P., Berg, A.H., Rajala, M.W., Klebanov, S., Iyengar, P., Jimenez-Chillaron, J.C., Patti, M.E., Klein, S.L., Weinstein, R.S., and Scherer, P.E. (2003). Sexual Differentiation, Pregnancy, Calorie Restriction, and Aging Affect the Adipocyte-Specific Secretory Protein Adiponectin. Diabetes *52*, 268–276.

Cooke, N.E., Coit, D., Shine, J., Baxter, J.D., and Martial, J.A. (1981). Human Prolactin. cDNA Structural Analysis and Evolutionary Comparisons. J. Biol. Chem. *256*, 4007–4016.

Cristancho, A.G., and Lazar, M.A. (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. Nature Reviews Molecular Cell Biology *12*, 722–734.

Crosignani, P.G. (2006). Current treatment issues in female hyperprolactinaemia. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. *125*, 152–164.

Crowe, P.D., Buckley, A.R., Zorn, N.E., and Rui, H. (1991). Prolactin activates protein kinase C and stimulates growth-related gene expression in rat liver. Molecular and Cellular Endocrinology *79*, 29–35.

Cunha, D.A., Amaral, M.E., Carvalho, C.P., Collares-buzato, C.B., Carneiro, E.M., and Boschero, A.C. (2006). Increased expression of SNARE proteins and synaptotagmin IV in islets from pregnant rats and in vitro prolactin-treated neonatal islets. Biological Research *39*, 555–566.

Cunha, D.A., Roma, L.P., and Boschero, A.C. (2007). Prolactin modulates the association and phosphorylation of SNARE and kinesin/MAP-2 proteins in neonatal pancreatic rat islets. Molecular and Cellular Endocrinology *273*, 32–41.

Cunningham, B.C., Bass, S., Fuh, G., and Wells, J.A. (1990). Zinc mediation of the binding of human growth hormone to the human prolactin receptor. Science *250*, 1709–1712.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. N. Engl. J. Med. *360*, 1509–1517.

Dali-Youcef, N., Mataki, C., Coste, A., Messaddeq, N., Giroud, S., Blanc, S., Koehl, C., Champy, M.-F., Chambon, P., Fajas, L., et al. (2007). Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabesity because of increased energy expenditure. PNAS *104*, 10703–10708.

Davis, K.E., Moldes, M., and Farmer, S.R. (2004). The Forkhead Transcription Factor FoxC2 Inhibits White Adipocyte Differentiation. J. Biol. Chem. *279*, 42453–42461.

Desai, B.M., Oliver-Krasinski, J., De Leon, D.D., Farzad, C., Hong, N., Leach, S.D., and Stoffers, D.A. (2007). Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet β cell, regeneration. Journal of Clinical Investigation *117*, 971–977.

Doknic, M., Pekic, S., Zarkovic, M., Medic-Stojanoska, M., Dieguez, C., Casanueva, F., and Popovic, V. (2002). Dopaminergic Tone and Obesity: An Insight from Prolactinomas Treated with Bromocriptine. Eur J Endocrinol *147*, 77–84.

Dolinska, B., Budzinski, G., Caban, A., Ostrozka-Cieslik, A., Oczkowicz, G., Cierpka, L., and Ryszka, F. (2011). Prolactin (PRL) reduces the release of transaminases from the isolated pig liver. Ann. Transplant. *16*, 98–102.

Enerbäck, S. (2010). Human brown adipose tissue. Cell Metab. *11*, 248–252.

Fajas, L. (2003). Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. Ann. Med. *35*, 79–85.

Fajas, L., Landsberg, R.L., Huss-Garcia, Y., Sardet, C., Lees, J.A., and Auwerx, J. (2002). E2Fs Regulate Adipocyte Differentiation. Developmental Cell *3*, 39–49.

Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J.B., Najib, J., Martin, G., Fruchart, J.-C., Briggs, M., Spiegelman, B.M., and Auwerx, J. (1999). Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Expression by Adipocyte Differentiation and Determination Factor 1/Sterol Regulatory Element Binding Protein 1: Implications for Adipocyte Differentiation and Metabolism. Mol. Cell. Biol. *19*, 5495–5503.

Faust, I.M., Johnson, P.R., Stern, J.S., and Hirsch, J. (1978). Diet-Induced Adipocyte Number Increase in Adult Rats: A New Model of Obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab *235*, E279.

Fève, B. (2005). Adipogenesis: cellular and molecular aspects. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism *19*, 483–499.

Fleenor, D., Arumugam, R., Becker, T., and Freemark, M. (2011). Control of β-Cell DNA Synthesis and Gene Expression: Effects of Prolactin Receptor Knockdown. P2-340 Endocrine Society.

Fleenor, D., Arumugam, R., and Freemark, M. (2006). Growth Hormone and Prolactin Receptors in Adipogenesis: STAT-5 Activation, Suppressors of Cytokine Signaling, and Regulation of Insulin-Like Growth Factor I. Hormone Research *66*, 101–110.

Flint, D.J., Binart, N., Boumard, S., Kopchick, J.J., and Kelly, P. (2006). Developmental Aspects of Adipose Tissue in GH Receptor and Prolactin Receptor Gene Disrupted Mice: Site-Specific Effects Upon Proliferation, Differentiation and Hormone Sensitivity. J Endocrinol *191*, 101–111.

Fortun-Lamothe, L., Langin, D., and Lafontan, M. (1996). Influence of prolactin on in vivo and in vitro lipolysis in rabbits. Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. *115*, 141–147.

Freemark, M., Avril, I., Fleenor, D., Driscoll, P., Petro, A., Opara, E., Kendall, W., Oden, J., Bridges, S., Binart, N., et al. (2002). Targeted Deletion of the PRL Receptor: Effects on Islet Development, Insulin Production, and Glucose Tolerance. Endocrinology *143*, 1378–1385.

Freemark, M., Driscoll, P., Maaskant, R., Petryk, A., and Kelly, P.A. (1997). Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development. J Clin Invest *99*, 1107–1117.

Freemark, M., Fleenor, D., Driscoll, P., Binart, N., and Kelly, P. (2001a). Body weight and fat deposition in prolactin receptor-deficient mice. Endocrinology *142*, 532–537.

Freemark, M., Fleenor, D., Driscoll, P., Binart, N., and Kelly, P.A. (2001b). Body Weight and Fat Deposition in Prolactin Receptor-Deficient Mice. Endocrinology *142*, 532–537.

Friesen, H., Guyda, H., and Hardy, J. (1970). The biosynthesis of human growth hormone and prolactin. J. Clin. Endocrinol. Metab. *31*, 611–624.

Frontini, A., and Cinti, S. (2010). Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. Cell Metabolism *11*, 253–256.

Fujinaka, Y., Takane, K., Yamashita, H., and Vasavada, R.C. (2007). Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. J. Biol. Chem. *282*, 30707–30717.

Furukawa, S. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. Journal of Clinical Investigation *114*, 1752–1761.

Galsgaard, E.D., Nielsen, J.H., and Møldrup, A. (1999). Regulation of Prolactin Receptor (PRLR) Gene Expression in Insulin-producing Cells PROLACTIN AND GROWTH HORMONE ACTIVATE ONE OF THE RAT PRLR GENE PROMOTERS VIA STAT5a AND STAT5b. J. Biol. Chem. *274*, 18686–18692.

Ganguly, T., Hyde, J.F., and Vore, M. (1993). Prolactin Increases Na+/Taurocholate Cotransport in Isolated Hepatocytes from Postpartum Rats and Ovariectomized Rats. J Pharmacol Exp Ther *267*, 82–87.

Ganguly, T.C., Liu, Y., Hyde, J.F., Hagenbuch, B., Meier, P.J., and Vore, M. (1994). Prolactin increases hepatic Na+/taurocholate co-transport activity and messenger RNA post partum. Biochemical Journal *303*, 33.

Gerardo-Gettens, T., Moore, B.J., Stern, J.S., and Horwitz, B.A. (1989). Prolactin Stimulates Food Intake in a Dose-Dependent Manner. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *256*, R276–R280.

Giacinti, C., and Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. Oncogene *25*, 5220–5227.

Gibori, G., and Richards, J.S. (1978). Dissociation of two distinct luteotropic effects of prolactin: regulation of luteinizing hormone-receptor content and progesterone secretion during pregnancy. Endocrinology *102*, 767–774.

Goffin, V., Binart, N., Touraine, P., and Kelly, P.A. (2002). PROLACTIN: The New Biology of an Old Hormone. Annual Review of Physiology *64*, 47–67.

Gondret, F., Ferré, P., and Dugail, I. (2001). ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. J. Lipid Res. *42*, 106–113.

González, P., Santos, T.M., Calil, A., Corradi Perini, C., Percegona, L.S., Silva, I.C., Kuligovski, C., Aguiar, A.M., Câmara, N.O.S., and Aita, C.A.M. (2010). Expression of Pancreatic Endocrine Markers by Prolactin-Treated Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Transplantation Proceedings *42*, 566–569.

Goto, Y., Kakizaki, M., and Masaki, N. (1976). Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. Tohoku J. Exp. Med. *119*, 85–90.

Greenman, Y., Tordjman, K., and Stern, N. (1998). Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: weight loss with normalization of prolactin levels. Clin. Endocrinol. (Oxf) *48*, 547–553.

Grimsrud, P.A., Picklo, M.J., Sr, Griffin, T.J., and Bernlohr, D.A. (2007). Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. Mol. Cell Proteomics *6*, 624–637.

Grosdemouge, I., Bachelot, A., Lucas, A., Baran, N., Kelly, P.A., and Binart, N. (2003). Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. Reprod. Biol. Endocrinol. *1*, 12.

Guerra, C., Koza, R.A., Yamashita, H., Walsh, K., and Kozak, L.P. (1998). Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. Journal of Clinical Investigation *102*, 412–420.

Guilmeau, S., Buyse, M., and Bado, A. (2004). Gastric leptin: a new manager of gastrointestinal function. Current Opinion in Pharmacology *4*, 561–566.

Gunasekaran, U., Hudgens, C.W., Wright, B.T., Maulis, M.F., and Gannon, M. (2012). Differential regulation of embryonic and adult β cell replication. Cell Cycle *11*, 2431–2442.

Gupta, R.K., Arany, Z., Seale, P., Mepani, R.J., Ye, L., Conroe, H.M., Roby, Y.A., Kulaga, H., Reed, R.R., and Spiegelman, B.M. (2010). Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. Nature *464*, 619–623.

Gurzov, E.N., and Eizirik, D.L. (2011). Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of β-cell death and dysfunction. Trends in Cell Biology *21*, 424–431.

Hallberg, M., Morganstein, D.L., Kiskinis, E., Shah, K., Kralli, A., Dilworth, S.M., White, R., Parker, M.G., and Christian, M. (2008). A functional interaction between RIP140 and PGC-1alpha regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA. Mol. Cell. Biol. *28*, 6785–6795.

Halperin, J., Devi, S.Y., Elizur, S., Stocco, C., Shehu, A., Rebourcet, D., Unterman, T.G., Leslie, N.D., Le, J., Binart, N., et al. (2008). Prolactin signaling through the short form of its receptor represses forkhead transcription factor FOXO3 and its target gene galt causing a severe ovarian defect. Mol. Endocrinol. *22*, 513–522.

Hang, J., and Rillema, J.A. (1997). Prolactin's effects on lipoprotein lipase (LPL) activity and on LPL mRNA levels in cultured mouse mammary gland explants. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *214*, 161–166.

Hansen, J.B., Jørgensen, C., Petersen, R.K., Hallenborg, P., De Matteis, R., Bøye, H.A., Petrovic, N., Enerbäck, S., Nedergaard, J., Cinti, S., et al. (2004). Retinoblastoma Protein Functions as a Molecular Switch Determining White Versus Brown Adipocyte Differentiation. PNAS *101*, 4112–4117.

Harp, J.B., Franklin, D., Vanderpuije, A.A., and Gimble, J.M. (2001). Differential Expression of Signal Transducers and Activators of Transcription during Human Adipogenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications *281*, 907–912.

Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (2001). Signaling Pathways in Mammary Gland Development. Developmental Cell *1*, 467–475.

Hervey, G.R. (1959). The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. The Journal of Physiology *145*, 336.

Himms-Hagen, J., Cui, J., Danforth, E., Jr, Taatjes, D.J., Lang, S.S., Waters, B.L., and Claus, T.H. (1994). Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. Am. J. Physiol. *266*, R1371–1382.

Hogan, J.C., and Stephens, J.M. (2005). The Regulation of Fatty Acid Synthase by STAT5A. Diabetes *54*, 1968–1975.

Horseman, N.D., Zhao, W., Montecino-Rodriguez, E., Tanaka, M., Nakashima, K., Engle, S.J., Smith, F., Markoff, E., and Dorshkind, K. (1997). Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. EMBO J. *16*, 6926–6935.

Hosokawa, Y., Yang, M., Kaneko, S., Tanaka, M., and Nakashima, K. (1995). Synergistic gene expressions of cyclin E, cdk2, cdk5 and E2F-1 during the prolactin-induced G1/S transition in rat Nb2 pre-T lymphoma cells. Biochem. Mol. Biol. Int. *37*, 393–399.

Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ Is a Novel Adipose-Specific Gene Dysregulated in Obesity. J. Biol. Chem. *271*, 10697–10703.

Huang, C. (2011). Potential Role of Ngn3 in Regulation of β-cell Proliferation during Pregnancy. P2-503 Endocrine Society.

Huang, C., Snider, F., and Cross, J.C. (2009). Prolactin Receptor Is Required for Normal Glucose Homeostasis and Modulation of B-Cell Mass During Pregnancy. Endocrinology *150*, 1618–1626.

Hughes, E., and Huang, C. (2011). Participation of Akt, Menin, and P21 in Pregnancy-Induced B-Cell Proliferation. Endocrinology *152*, 847–855.

Hugo, E.R., Borcherding, D.C., Gersin, K.S., Loftus, J., and Ben-Jonathan, N. (2008). Prolactin Release by Adipose Explants, Primary Adipocytes, and LS14 Adipocytes. JCEM *93*, 4006–4012.

Hugo, E.R., Brandebourg, T.D., Comstock, C.E.S., Gersin, K.S., Sussman, J.J., and Ben-Jonathan, N. (2006). LS14: A Novel Human Adipocyte Cell Line That Produces Prolactin. Endocrinology *147*, 306–313.

Hwang, P., Guyda, H., and Friesen, H. (1971). A Radioimmunoassay for Human Prolactin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *68*, 1902.

Issemann, I., and Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature *347*, 645–650.

Issemann, I., Prince, R.A., Tugwood, J.D., and Green, S. (1993). The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. Biochimie *75*, 251–256.

Jantarajit, W., Thongon, N., Pandaranandaka, J., Teerapornpuntakit, J., Krishnamra, N., and Charoenphandhu, N. (2007). Prolactin-Stimulated Transepithelial Calcium Transport in Duodenum and Caco-2 Monolayer Are Mediated by the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. Am J Physiol Endocrinol Metab *293*, E372–E384.

Jarmuszkiewicz, W., Woyda-Ploszczyca, A., Antos-Krzeminska, N., and Sluse, F.E. (2010). Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *1797*, 792–799.

Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Platanias, L.C., and Yi, T. (1996). Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. Molecular and Cellular Biology *16*, 6985.

Jomain, J.-B., Tallet, E., Broutin, I., Hoos, S., Agthoven, J. van, Ducruix, A., Kelly, P.A., Kragelund, B.B., England, P., and Goffin, V. (2007). Structural and Thermodynamic Bases for the Design of Pure Prolactin Receptor Antagonists X-RAY STRUCTURE OF Del1-9-G129R-hPRL. J. Biol. Chem. *282*, 33118–33131.

Julve, J., Robert, M.Q., Llobera, M., and Peinado-Onsurbe, J. (1996). Hormonal regulation of lipoprotein lipase activity from 5-day-old rat hepatocytes. Molecular and Cellular Endocrinology *116*, 97–104.

Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and Adiponectin Receptors. Endocrine Reviews *26*, 439–451.

Kajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J.V., Gygi, S.P., and Spiegelman, B.M. (2009). Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. Nature *460*, 1154–1158.

Kajimura, S., Seale, P., and Spiegelman, B.M. (2010). Transcriptional Control of Brown Fat Development. Cell Metabolism *11*, 257–262.

Kanety, H., Feinstein, R., Papa, M.Z., Hemi, R., and Karasik, A. (1995). Tumor Necrosis Factor -Induced Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) POSSIBLE MECHANISM FOR SUPPRESSION OF INSULIN-STIMULATED TYROSINE PHOSPHORYLATION OF IRS-1. J. Biol. Chem. *270*, 23780–23784.

Karnik, S.K., Chen, H., McLean, G.W., Heit, J.J., Gu, X., Zhang, A.Y., Fontaine, M., Yen, M.H., and Kim, S.K. (2007). Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. Science *318*, 806–809.

Keeler, C., Dannies, P.S., and Hodsdon, M.E. (2003). The tertiary structure and backbone dynamics of human prolactin. J. Mol. Biol. *328*, 1105–1121.

Kim, H., Toyofuku, Y., Lynn, F.C., Chak, E., Uchida, T., Mizukami, H. i, Fujitani, Y., Kawamori, R., Miyatsuka, T., Kosaka, Y., et al. (2010). Serotonin Regulates Pancreatic β-Cell Mass during Pregnancy. Nat Med *16*, 804–808.

Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPARγ through the production of endogenous ligand. PNAS *95*, 4333–4337.

Kliewer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A., and Evans, R.M. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. , Published Online: 27 August 1992; | Doi:10.1038/358771a0 *358*, 771–774.

Kokay, I.C., and Grattan, D.R. (2005). Expression of mRNA for Prolactin Receptor (Long Form) in Dopamine and Pro-Opiomelanocortin Neurones in the Arcuate Nucleus of Non-Pregnant and Lactating Rats. Journal of Neuroendocrinology *17*, 827–835.

Kong, D., Tong, Q., Ye, C., Koda, S., Fuller, P.M., Krashes, M.J., Vong, L., Ray, R.S., Olson, D.P., and Lowell, B.B. (2012). GABAergic RIP-Cre Neurons in the Arcuate Nucleus Selectively Regulate Energy Expenditure. Cell *151*, 645–657.

Kordowich, S., Mansouri, A., and Collombat, P. (2010). Reprogramming into pancreatic endocrine cells based on developmental cues. Molecular and Cellular Endocrinology *323*, 62–69.

Kozak, L.P. (2011). The genetics of brown adipocyte induction in white fat depots. Front Endocrinol (Lausanne) *2*, 64.

Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., and Lu, S.D. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. Cell *53*, 45–53.

Król, E., Martin, S.A.M., Huhtaniemi, I.T., Douglas, A., and Speakman, J.R. (2011). Negative Correlation Between Milk Production and Brown Adipose Tissue Gene Expression in Lactating Mice. J Exp Biol *214*, 4160–4170.

Kuroshima, A., Kurahashi, M., and Yahata, T. (1979). Calorigenic effects of noradrenaline and glucagon on white adipocytes in cold- and heat-acclimated rats. Pflugers Arch. *381*, 113–117.

Lafontan, M., and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. Progress in Lipid Research *48*, 275–297.

Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., and Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. Diabetes & Metabolism *30*, 294–309.

Le, J.A., Wilson, H.M., Shehu, A., Mao, J., Devi, Y.S., Halperin, J., Aguilar, T., Seibold, A., Maizels, E., and Gibori, G. (2012). Generation of mice expressing only the long form of the prolactin receptor reveals that both isoforms of the receptor are required for normal ovarian function. Biol. Reprod. *86*, 86.

Lee, Y.C., and Nielsen, J.H. (2009). Regulation of beta cell replication. Mol. Cell. Endocrinol. *297*, 18–27.

Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. (1995). An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Γ (PPARγ). J. Biol. Chem. *270*, 12953–12956.

Leonardsson, G., Steel, J.H., Christian, M., Pocock, V., Milligan, S., Bell, J., So, P.-W., Medina-Gomez, G., Vidal-Puig, A., White, R., et al. (2004). Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 8437–8442.

Leung, Y.M., Kwan, E.P., Ng, B., Kang, Y., and Gaisano, H.Y. (2007). SNAREing voltage-gated K+ and ATP-sensitive K+ channels: tuning beta-cell excitability with syntaxin-1A and other exocytotic proteins. Endocr. Rev. *28*, 653–663.

Lever, J.D., Mukherjee, S., Norman, D., Symons, D., and Jung, R.T. (1988). Neuropeptide and noradrenaline distributions in rat interscapular brown fat and in its intact and obstructed nerves of supply. J. Auton. Nerv. Syst. *25*, 15–25.

Li, S., Crenshaw, E.B., Rawson, E.J., Simmons, D.M., Swanson, L.W., and Rosenfeld, M.G. (1990). Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. , Published Online: 11 October 1990; | Doi:10.1038/347528a0 *347*, 528–533.

Lilja, L., Johansson, J.U., Gromada, J., Mandic, S.A., Fried, G., Berggren, P.-O., and Bark, C. (2004). Cyclin-dependent kinase 5 associated with p39 promotes Munc18-1 phosphorylation and Ca(2+)-dependent exocytosis. J. Biol. Chem. *279*, 29534–29541.

Lilja, L., Yang, S.-N., Webb, D.-L., Juntti-Berggren, L., Berggren, P.-O., and Bark, C. (2001). Cyclin-dependent Kinase 5 Promotes Insulin Exocytosis. J. Biol. Chem. *276*, 34199–34205.

Ling, C., and Billig, H. (2001). PRL Receptor-Mediated Effects in Female Mouse Adipocytes: PRL Induces Suppressors of Cytokine Signaling Expression and Suppresses Insulin-Induced Leptin Production in Adipocytes in Vitro. Endocrinology *142*, 4880–4890.

Ling, C., Hellgren, G., Gebre-Medhin, M., Dillner, K., Wennbo, H., Carlsson, B., and Billig, H. (2000). Prolactin (PRL) Receptor Gene Expression in Mouse Adipose Tissue: Increases During Lactation and in PRL-Transgenic Mice. Endocrinology *141*, 3564–3572.

Ling, C., Svensson, L., Odén, B., Weijdegård, B., Edén, B., Edén, S., and Billig, H. (2003). Identification of Functional Prolactin (PRL) Receptor Gene Expression: PRL Inhibits Lipoprotein Lipase Activity in Human White Adipose Tissue. JCEM *88*, 1804–1808.

Liu, Y., Ganguly, T., Hyde, J.F., and Vore, M. (1995). Prolactin Increases mRNA Encoding Na(+)-TC Cotransport Polypeptide and Hepatic Na(+)-TC Cotransport. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol *268*, G11–G17.

Loncar, D., Bedrica, L., Mayer, J., Cannon, B., Nedergaard, J., Afzelius, B.A., and Svajger, A. (1986). The effect of intermittent cold treatment on the adipose tissue of the cat. Apparent transformation from white to brown adipose tissue. J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. *97*, 119–129.

Lucas, B.K., Ormandy, C.J., Binart, N., Bridges, R.S., and Kelly, P.A. (1998). Null Mutation of the Prolactin Receptor Gene Produces a Defect in Maternal Behavior. Endocrinology *139*, 4102–4107.

Luquet, S. (2008). Du nouveau dans la régulation de la prise alimentaire ? Médecine/sciences *24*, 680–682.

Luquet, S., and Magnan, C. (2009). The central nervous system at the core of the regulation of energy homeostasis. Front Biosci (Schol Ed) *1*, 448–465.

Luquita, M.G., Catania, V.A., Pozzi, E.J.S., Veggi, L.M., Hoffman, T., Pellegrino, J.M., Ikushiro, S.-I., Emi, Y., Iyanagi, T., Vore, M., et al. (2001). Molecular Basis of Perinatal Changes in UDP-Glucuronosyltransferase Activity in Maternal Rat Liver. J Pharmacol Exp Ther *298*, 49–56.

Luquita, M.G., Catania, V.A., Sánchez-Pozzi, E.J., and Mottino, A.D. (1996). Ovine Prolactin Increases Hepatic UDP-Glucuronosyltransferase Activity in Ovariectomized Rats. J Pharmacol Exp Ther *278*, 921–925.

Machida, T., Taga, M., and Minaguchi, H. (1990). Effect of prolactin (PRL) on lipoprotein lipase (LPL) activity in the rat fetal liver. Asia Oceania J Obstet Gynaecol *16*, 261–265.

Macias, H., and Hinck, L. (2012). Mammary gland development. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology *1*, 533–557.

Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., Nagaretani, H., Matsuda, M., Komuro, R., Ouchi, N., et al. (2001). PPARγ Ligands Increase Expression and Plasma Concentrations of Adiponectin, an Adipose-Derived Protein. Diabetes *50*, 2094–2099.

Mainoya, J.R. (1975). Effect of prolactin on sugar and amino acid transport by the rat jejunum. J. Exp. Zool. *192*, 149–154.

Van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. N. Engl. J. Med. *360*, 1500–1508.

Matsuda, M., and Mori, T. (1996). Modification of prolactin receptor (PRL-R) expression by PRL in the mouse liver: estimation of the ratio of two forms of PRL-R mRNAs by “one-sided competitive PCR”. Zool. Sci. *13*, 435–441.

Matsuda, M., Mori, T., Park, M.K., and Kawashima, S. (1995). Modification of pancreatic digestive function by pituitary grafting in mice. Eur. J. Endocrinol. *133*, 221–226.

Matsuda, M., Mori, T., Park, M.K., Yanaihara, N., and Kawashima, S. (1994). Enhanced cell proliferation by hyperprolactinemia in both exocrine and endocrine pancreas in mice. Eur. J. Endocrinol. *130*, 187–194.

De Mazancourt, P., Carneiro, E.M., Atwater, I., and Boschero, A.C. (1994). Prolactin treatment increases GLUT2 but not the G protein subunit content in cell membranes from cultured neonatal rat islets. FEBS Lett. *343*, 137–140.

McFarland-Mancini, M., Hugo, E., Loftus, J., and Ben-Jonathan, N. (2006). Induction of prolactin expression and release in human preadipocytes by cAMP activating ligands. Biochemical and Biophysical Research Communications *344*, 9–16.

McNally, S., and Martin, F. (2011). Molecular regulators of pubertal mammary gland development. Annals of Medicine *43*, 212–234.

Melmed, S., Casanueva, F.F., Hoffman, A.R., Kleinberg, D.L., Montori, V.M., Schlechte, J.A., and Wass, J.A.H. (2011). Diagnosis and Treatment of Hyperprolactinemia: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. JCEM *96*, 273–288.

Meyre, D., Delplanque, J., Chèvre, J.-C., Lecoeur, C., Lobbens, S., Gallina, S., Durand, E., Vatin, V., Degraeve, F., Proença, C., et al. (2009). Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. Nature Genetics *41*, 157–159.

Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., et al. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature *387*, 903–908.

Movassat, J., Calderari, S., Fernández, E., Martín, M.A., Escrivá, F., Plachot, C., Gangnerau, M.N., Serradas, P., Álvarez, C., and Portha, B. (2007). Type 2 diabetes – a matter of failing β-cell neogenesis? Clues from the GK rat model. Diabetes, Obesity and Metabolism *9*, 187–195.

Müller, W.A., Faloona, G.R., Aguilar-Parada, E., and Unger, R.H. (1970). Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response to carbohydrate and protein ingestion. N. Engl. J. Med. *283*, 109–115.

Muniraj, T., Gajendran, M., Thiruvengadam, S., Raghuram, K., Rao, S., and Devaraj, P. (2012). Acute Pancreatitis. Disease-a-Month *58*, 98–144.

Murphy, K.G., and Bloom, S.R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. Nature *444*, 854–859.

Muse, E.D., Obici, S., Bhanot, S., Monia, B.P., McKay, R.A., Rajala, M.W., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2004). Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. J. Clin. Invest. *114*, 232–239.

Naliato, E.C.O., Violante, A.H.D., Caldas, D., Filho, A.L., Loureiro, C.R., Fontes, R., Schrank, Y., Souza, R.G., Costa, P.L.M., and Colao, A. (2007). Body fat in nonobese women with prolactinoma treated with dopamine agonists. Clinical Endocrinology *67*, 845–852.

Nanbu-Wakao, R., Fujitani, Y., Masuho, Y., Muramatu, M.-A., and Wakao, H. (2000). Prolactin Enhances CCAAT Enhancer-Binding Protein-B (C/EBPβ) and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Γ (PPARγ) Messenger RNA Expression and Stimulates Adipogenic Conversion of NIH-3T3 Cells. Molecular Endocrinology *14*, 307–316.

Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P.S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. Nature *480*, 104–108.

Nguyen, N.-Q.-N., Tabruyn, S.P., Lins, L., Lion, M., Cornet, A.M., Lair, F., Rentier-Delrue, F., Brasseur, R., Martial, J.A., and Struman, I. (2006). Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 14319–14324.

Nilsson, L., Binart, N., Bohlooly-Y, M., Bramnert, M., Egecioglu, E., Kindblom, J., Kelly, P.A., Kopchick, J.J., Ormandy, C.J., Ling, C., et al. (2005). Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. Biochemical and Biophysical Research Communications *331*, 1120–1126.

Nilsson, L.A., Roepstorff, C., Kiens, B., Billig, H., and Ling, C. (2009). Prolactin Suppresses Malonyl-CoA Concentration in Human Adipose Tissue. Hormone and Metabolic Research *41*, 747–751.

Ohara-Imaizumi, M., Fujiwara, T., Nakamichi, Y., Okamura, T., Akimoto, Y., Kawai, J., Matsushima, S., Kawakami, H., Watanabe, T., Akagawa, K., et al. (2007). Imaging analysis reveals mechanistic differences between first- and second-phase insulin exocytosis. J Cell Biol *177*, 695–705.

Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B.M., and Kajimura, S. (2012). PPARγ agonists Induce a White-to-Brown Fat Conversion through Stabilization of PRDM16 Protein. Cell Metabolism *15*, 395–404.

Oktem, O., and Urman, B. (2010). Understanding follicle growth in vivo. Hum. Reprod. *25*, 2944–2954.

Olazabal, I.M., Muñoz, J.A., Rodríguez-Navas, C., Alvarez, L., Delgado-Baeza, E., and García-Ruiz, J.P. (2009). Prolactin's role in the early stages of liver regeneration in rats. Journal of Cellular Physiology *219*, 626–633.

Oliver-Krasinski, J.M., and Stoffers, D.A. (2008). On the Origin of the B Cell. Genes Dev. *22*, 1998–2021.

Ormandy, C.J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B., Buteau, H., Edery, M., Brousse, N., Babinet, C., Binart, N., et al. (1997a). Null Mutation of the Prolactin Receptor Gene Produces Multiple Reproductive Defects in the Mouse. Genes Dev. *11*, 167–178.

Ormandy, C.J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B., Buteau, H., Edery, M., Brousse, N., Babinet, C., Binart, N., et al. (1997b). Null Mutation of the Prolactin Receptor Gene Produces Multiple Reproductive Defects in the Mouse. Genes Dev. *11*, 167–178.

Ouhtit, A., Kelly, P.A., and Morel, G. (1994). Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat digestive tissues. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol *266*, G807–G815.

Pan, D., Fujimoto, M., Lopes, A., and Wang, Y.-X. (2009). Twist-1 is a PPAR δ-inducible, negative feedback regulator of PGC-1 α in brown fat metabolism. Cell *137*, 73–86.

Park, B.-H., Qiang, L., and Farmer, S.R. (2004). Phosphorylation of C/EBP at a Consensus Extracellular Signal-Regulated Kinase/Glycogen Synthase Kinase 3 Site Is Required for the Induction of Adiponectin Gene Expression during the Differentiation of Mouse Fibroblasts into Adipocytes. Molecular and Cellular Biology *24*, 8671–8680.

Patel, L., Buckels, A.C., Kinghorn, I.J., Murdock, P.R., Holbrook, J.D., Plumpton, C., Macphee, C.H., and Smith, S.A. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPARγ activators. Biochemical and Biophysical Research Communications *300*, 472–476.

Pearce, S., Dieguez, C., Gualillo, O., Symonds, M.E., and Stephenson, T. (2003). Differential Effects of Age and Sex on the Postnatal Responsiveness of Brown Adipose Tissue to Prolactin Administration in Rats. Experimental Physiology *88*, 527–531.

Pende, M., Kozma, S.C., Jaquet, M., Oorschot, V., Burcelin, R., Marchand-Brustel, Y.L., Klumperman, J., Thorens, B., and Thomas, G. (2000). Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished |[beta]|-cell size in S6K1-deficient mice. Nature *408*, 994–997.

Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. J. Biol. Chem. *285*, 7153–7164.

Pirvulescu, M., Manduteanu, I., Gan, A.M., Stan, D., Simion, V., Butoi, E., Calin, M., and Simionescu, M. (2012). A novel pro-inflammatory mechanism of action of resistin in human endothelial cells: Up-regulation of SOCS3 expression through STAT3 activation. Biochemical and Biophysical Research Communications *422*, 321–326.

Poznic, M. (2009). Retinoblastoma protein: a central processing unit. J. Biosci. *34*, 305–312.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell *92*, 829–839.

Van Raalte, D.H., and Diamant, M. (2011). Glucolipotoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus: Target for durable therapy? Diabetes Research and Clinical Practice *93, Supplement 1*, S37–S46.

Rajala, M.W., Qi, Y., Patel, H.R., Takahashi, N., Banerjee, R., Pajvani, U.B., Sinha, M.K., Gingerich, R.L., Scherer, P.E., and Ahima, R.S. (2004). Regulation of Resistin Expression and Circulating Levels in Obesity, Diabetes, and Fasting. Diabetes *53*, 1671–1679.

Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (2011). A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. J. Clin. Invest. *121*, 3589–3597.

Ricquier, D., and Kader, J.C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a soidum dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. Biochem. Biophys. Res. Commun. *73*, 577–583.

Ripoche, M.A., Kress, C., Poirier, F., and Dandolo, L. (1997). Deletion of the H19 transcription unit reveals the existence of a putative imprinting control element. Genes Dev. *11*, 1596–1604.

Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M. (1999). PPARγ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. Molecular Cell *4*, 611–617.

Rothwell, N.J., and Stock, M.J. (1984). Effects of denervating brown adipose tissue on the responses to cold, hyperphagia and noradrenaline treatment in the rat. J Physiol *355*, 457–463.

Roy, A.F., Benomar, Y., Bailleux, V., Vacher, C.M., Aubourg, A., Gertler, A., Djiane, J., and Taouis, M. (2007). Lack of Cross-Desensitization Between Leptin and Prolactin Signaling Pathways Despite the Induction of Suppressor of Cytokine Signaling 3 and PTP-1B. J Endocrinol *195*, 341–350.

Royster, M., Driscoll, P., Kelly, P.A., and Freemark, M. (1995). The prolactin receptor in the fetal rat: cellular localization of messenger ribonucleic acid, immunoreactive protein, and ligand-binding activity and induction of expression in late gestation. Endocrinology *136*, 3892–3900.

Rukstalis, J.M., and Habener, J.F. (2009). Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. Islets *1*, 177–184.

Ryszka, F., Dolińska, B., Caban, A., Ostróżka-Cieślik, A., Budziński, G., Krzysztofik, M., Oczkowicz, G., and Cierpka, L. (2011). Hepatoprotective Effect of Prolactin and Cysteine Contained in Perfusion and Preservation Solutions on Porcine Liver Stored in Simple Hypothermia. Transplantation Proceedings *43*, 2882–2886.

Ryszka, F., Dolińska, B., Sławski, M., and Orkisz, W. (2004). Effect of prolactin on release of selected enzymes from the isolated rabbit liver. Transplantation Proceedings *36*, 2583–2585.

Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. Cell *148*, 852–871.

Sauvé, D., and Woodside, B. (2000). Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. Brain Research *868*, 306–314.

Schraenen, A., Lemaire, K., De Faudeur, G., Hendrickx, N., Granvik, M., Van Lommel, L., Mallet, J., Vodjdani, G., Gilon, P., Binart, N., et al. (2010). Placental lactogens induce serotonin biosynthesis in a subset of mouse beta cells during pregnancy. Diabetologia *53*, 2589–2599.

Schubert, S., Knoch, K.-P., Ouwendijk, J., Mohammed, S., Bodrov, Y., Jäger, M., Altkrüger, A., Wegbrod, C., Adams, M.E., Kim, Y., et al. (2010). β2-Syntrophin is a Cdk5 substrate that restrains the motility of insulin secretory granules. PLoS ONE *5*, e12929.

Schuff, K.G., Hentges, S.T., Kelly, M.A., Binart, N., Kelly, P.A., Iuvone, P.M., Asa, S.L., and Low, M.J. (2002). Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms. Journal of Clinical Investigation *110*, 973–981.

Scimè, A., Grenier, G., Huh, M.S., Gillespie, M.A., Bevilacqua, L., Harper, M.-E., and Rudnicki, M.A. (2005). Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1α. Cell Metabolism *2*, 283–295.

Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. Nature *454*, 961–967.

Seale, P., Conroe, H.M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., and Spiegelman, B.M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. Journal of Clinical Investigation *121*, 96–105.

Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. Cell Metab. *6*, 38–54.

Sell, H., Berger, J.P., Samson, P., Castriota, G., Lalonde, J., Deshaies, Y., and Richard, D. (2004). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonism Increases the Capacity for Sympathetically Mediated Thermogenesis in Lean and ob/ob Mice. Endocrinology *145*, 3925–3934.

Shao, J., Qiao, L., and Friedman, J.E. (2004). Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6 beta-cells. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *286*, E304–310.

Shapiro, L., and Scherer, P.E. (1998). The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. Current Biology *8*, 335–340.

Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C., and Weiss, S. (2003). Pregnancy-Stimulated Neurogenesis in the Adult Female Forebrain Mediated by Prolactin. Science *299*, 117–120.

Silva, C.M. dos S., Barbosa, F.R.P., Lima, G.A.B., Warszawski, L., Fontes, R., Domingues, R.C., and Gadelha, M.R. (2010). BMI and Metabolic Profile in Patients With Prolactinoma Before and After Treatment With Dopamine Agonists. Obesity *19*, 800–805.

Simon-Holtorf, J., Mönig, H., Klomp, H.-J., Reinecke-Lüthge, A., Fölsch, U.R., and Kloehn, S. (2006). Expression and distribution of prolactin receptor in normal, fibrotic, and cirrhotic human liver. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes *114*, 584–589.

Slabaugh, M.B., Lieberman, M.E., Rutledge, J.J., and Gorski, J. (1982). Ontogeny of growth hormone and prolactin gene expression in mice. Endocrinology *110*, 1489–1497.

Soares, M.J. (2004). The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. Reprod. Biol. Endocrinol. *2*, 51.

Soares, M.J., Konno, T., and Alam, S.M.K. (2007). The prolactin family: effectors of pregnancy-dependent adaptations. Trends in Endocrinology & Metabolism *18*, 114–121.

Song, C.K., Vaughan, C.H., Keen-Rhinehart, E., Harris, R.B.S., Richard, D., and Bartness, T.J. (2008). Melanocortin-4 receptor mRNA expressed in sympathetic outflow neurons to brown adipose tissue: neuroanatomical and functional evidence. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *295*, R417–428.

Sonigo, C., Bouilly, J., Carré, N., Tolle, V., Caraty, A., Tello, J., Simony-Conesa, F.-J., Millar, R., Young, J., and Binart, N. (2012). Hyperprolactinemia-induced ovarian acyclicity is reversed by kisspeptin administration. J. Clin. Invest. *122*, 3791–3795.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., N|[auml]|slund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature *453*, 783–787.

Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of energy homeostasis through the PGC1 coactivators. Novartis Found. Symp. *286*, 3–6; discusssion 6–12, 162–163, 196–203.

Staszkiewicz, J., Gimble, J., Cain, C., Dietrich, M., Burk, D., Kirk-Ballard, H., and Gawronska-Kozak, B. (2009). Flow cytometric and immunohistochemical detection of in vivo BrdU-labeled cells in mouse fat depots. Biochemical and Biophysical Research Communications *378*, 539–544.

Steppan, C.M., Brown, E.J., Wright, C.M., Bhat, S., Banerjee, R.R., Dai, C.Y., Enders, G.H., Silberg, D.G., Wen, X., Wu, G.D., et al. (2001). A Family of Tissue-Specific Resistin-Like Molecules. PNAS *98*, 502–506.

Steppan, C.M., Wang, J., Whiteman, E.L., Birnbaum, M.J., and Lazar, M.A. (2005). Activation of SOCS-3 by Resistin. Molecular and Cellular Biology *25*, 1569–1575.

Stöcklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., and Groner, B. (1996). Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. , Published Online: 24 October 1996; | Doi:10.1038/383726a0 *383*, 726–728.

Stoecklin, E., Wissler, M., Schaetzle, D., Pfitzner, E., and Groner, B. (1999). Interactions in the transcriptional regulation exerted by Stat5 and by members of the steroid hormone receptor family. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *69*, 195–204.

Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M., and Strosberg, A.D. (1998). A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. Nature Genetics *18*, 213–215.

Sugii, S., Olson, P., Sears, D.D., Saberi, M., Atkins, A.R., Barish, G.D., Hong, S.-H., Castro, G.L., Yin, Y.-Q., Nelson, M.C., et al. (2009). PPARgamma activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 22504–22509.

Sul, H.S. (2009). Minireview: Pref-1: Role in Adipogenesis and Mesenchymal Cell Fate. Molecular Endocrinology *23*, 1717–1725.

Tai, T.-A.C., Jennermann, C., Brown, K.K., Oliver, B.B., MacGinnitie, M.A., Wilkison, W.O., Brown, H.R., Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Morris, D.C., et al. (1996). Activation of the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Promotes Brown Adipocyte Differentiation. J. Biol. Chem. *271*, 29909–29914.

Talchai, C., Xuan, S., Lin, H.V., Sussel, L., and Accili, D. (2012). Pancreatic β Cell Dedifferentiation as a Mechanism of Diabetic β Cell Failure. Cell *150*, 1223–1234.

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 Endocrinol (Lausanne) *2*, 29.

Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP|[beta]| and/or C/EBP|[delta]| gene. The EMBO Journal *16*, 7432–7443.

Tang, Q.-Q., Zhang, J.-W., and Daniel Lane, M. (2004). Sequential gene promoter interactions of C/EBPβ, C/EBPα, and PPARγ during adipogenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications *319*, 235–239.

Tang, W., Zeve, D., Suh, J.M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R.E., Tallquist, M.D., and Graff, J.M. (2008). White Fat Progenitor Cells Reside in the Adipose Vasculature. Science *322*, 583–586.

Thorel, F., Népote, V., Avril, I., Kohno, K., Desgraz, R., Chera, S., and Herrera, P.L. (2010). Conversion of adult pancreatic α-cells to β-cells after extreme β-cell loss. Nature *464*, 1149–1154.

Timmons, J.A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T.B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D.L., Gimeno, R.E., Wahlestedt, C., Baar, K., et al. (2007). Myogenic Gene Expression Signature Establishes That Brown and White Adipocytes Originate from Distinct Cell Lineages. PNAS *104*, 4401–4406.

Tong, Y., and Pelletier, G. (1992). Prolactin regulation of pro-opiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. Neuroendocrinology *56*, 561–565.

Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., and Spiegelman, B.M. (1994). mPPAR Gamma 2: Tissue-Specific Regulator of an Adipocyte Enhancer. Genes Dev. *8*, 1224–1234.

Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A., and Evans, R.M. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. Cell *93*, 241–252.

Trujillo, M.L., Spuch, C., Carro, E., and Señarís, R. (2011). Hyperphagia and Central Mechanisms for Leptin Resistance During Pregnancy. Endocrinology *152*, 1355–1365.

Tsang, C.K., Qi, H., Liu, L.F., and Zheng, X.F.S. (2007). Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. Drug Discovery Today *12*, 112–124.

Tseng, Y.-H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., et al. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. Nature *454*, 1000–1004.

Tuttle, R.L., Gill, N.S., Pugh, W., Lee, J.-P., Koeberlein, B., Furth, E.E., Polonsky, K.S., Naji, A., and Birnbaum, M.J. (2001). Regulation of pancreatic |[beta]|-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKB|[alpha]|. Nature Medicine *7*, 1133–1137.

Vasavada, R.C., Garcia-Ocaña, A., Zawalich, W.S., Sorenson, R.L., Dann, P., Syed, M., Ogren, L., Talamantes, F., and Stewart, A.F. (2000). Targeted expression of placental lactogen in the beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia. J. Biol. Chem. *275*, 15399–15406.

Verdu, J., Buratovich, M.A., Wilder, E.L., and Birnbaum, M.J. (1999). Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in Drosophila by Akt/PKB. Nature Cell Biology *1*, 500–506.

Vergani, G., Mayerhofer, A., and Bartke, A. (1994). Acute effects of rat growth hormone (GH), human GH and prolactin on proliferating rat liver cells in vitro: A study of mitotic behaviour and ultrastructural alterations. Tissue and Cell *26*, 457–465.

Viengchareun, S., Bouzinba-Segard, H., Laigneau, J.-P., Zennaro, M.-C., Kelly, P.A., Bado, A., Lombès, M., and Binart, N. (2004). Prolactin Potentiates Insulin-Stimulated Leptin Expression and Release from Differentiated Brown Adipocytes. J Mol Endocrinol *33*, 679–691.

Viengchareun, S., Servel, N., Fève, B., Freemark, M., Lombès, M., and Binart, N. (2008). Prolactin Receptor Signaling Is Essential for Perinatal Brown Adipocyte Function: A Role for Insulin-like Growth Factor-2. PLoS ONE *3*, e1535.

Villalba, M., Zabala, M.T., Martinez-Serrano, A., De la Colina, R., Satrústegui, J., and Garcia-Ruiz, J.P. (1991). Prolactin increases cytosolic free calcium concentration in hepatocytes of lactating rats. Endocrinology *129*, 2857–2861.

Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., et al. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. N. Engl. J. Med. *360*, 1518–1525.

Volante, M., Allìa, E., Gugliotta, P., Funaro, A., Broglio, F., Deghenghi, R., Muccioli, G., Ghigo, E., and Papotti, M. (2002). Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. *87*, 1300–1308.

Voorhees, J.L., and Brooks, C.L. (2010). Obligate Ordered Binding of Human Lactogenic Cytokines. J. Biol. Chem. *285*, 20022–20030.

Waldén, T.B., Hansen, I.R., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2012). Recruited Vs. Nonrecruited Molecular Signatures of Brown, “brite,” and White Adipose Tissues. Am J Physiol Endocrinol Metab *302*, E19–E31.

Wang, C., Mao, X., Wang, L., Liu, M., Wetzel, M.D., Guan, K.-L., Dong, L.Q., and Liu, F. (2007). Adiponectin Sensitizes Insulin Signaling by Reducing P70 S6 Kinase-Mediated Serine Phosphorylation of IRS-1. J. Biol. Chem. *282*, 7991–7996.

Wang, N.D., Finegold, M.J., Bradley, A., Ou, C.N., Abdelsayed, S.V., Wilde, M.D., Taylor, L.R., Wilson, D.R., and Darlington, G.J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. Science *269*, 1108–1112.

Wang, Z., and Thurmond, D.C. (2009). Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. J. Cell. Sci. *122*, 893–903.

Waters, S.B., and Rillema, J.A. (1988). Effect of Prolactin on Enzymes of Lipid Biosynthesis in Mammary Gland Explants. Am J Physiol Endocrinol Metab *255*, E567–E571.

Weinhaus, A.J., Stout, L.E., Bhagroo, N.V., Brelje, T.C., and Sorenson, R.L. (2007). Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. J. Endocrinol. *193*, 367–381.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. Journal of Clinical Investigation *112*, 1796–1808.

Wenz, T., Rossi, S.G., Rotundo, R.L., Spiegelman, B.M., and Moraes, C.T. (2009). Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 20405–20410.

Wiper-Bergeron, N., Salem, H.A., Tomlinson, J.J., Wu, D., and Haché, R.J.G. (2007). Glucocorticoid-Stimulated Preadipocyte Differentiation Is Mediated Through Acetylation of C/EBPβ by GCN5. PNAS *104*, 2703–2708.

Woodside, B. (2007). Prolactin and the hyperphagia of lactation. Physiology & Behavior *91*, 375–382.

Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. Cell *150*, 366–376.

Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., and Spiegelman, B.M. (1999). Cross-Regulation of C/EBPα and PPARγ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity. Molecular Cell *3*, 151–158.

Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N.L., and Farmer, S.R. (1995). Conditional Ectopic Expression of C/EBP Beta in NIH-3T3 Cells Induces PPAR Gamma and Stimulates Adipogenesis. Genes Dev. *9*, 2350–2363.

Yamamoto, K., and Rose-John, S. (2012). Therapeutic Blockade of Interleukin-6 in Chronic Inflammatory Disease. Clinical Pharmacology & Therapeutics *91*, 574–576.

Yeh, W.C., Cao, Z., Classon, M., and McKnight, S.L. (1995). Cascade Regulation of Terminal Adipocyte Differentiation by Three Members of the C/EBP Family of Leucine Zipper Proteins. Genes Dev. *9*, 168–181.

Zhang, H., Zhang, J., Pope, C.F., Crawford, L.A., Vasavada, R.C., Jagasia, S.M., and Gannon, M. (2010). Gestational Diabetes Mellitus Resulting From Impaired β-Cell Compensation in the Absence of FoxM1, a Novel Downstream Effector of Placental Lactogen. Diabetes *59*, 143–152.

Zhang, J.-W., Klemm, D.J., Vinson, C., and Lane, M.D. (2004). Role of CREB in Transcriptional Regulation of CCAAT/Enhancer-Binding Protein B Gene During Adipogenesis. J. Biol. Chem. *279*, 4471–4478.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature *372*, 425–432.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., and Melton, D.A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. Nature *455*, 627–632.

Zhu, Y., Qi, C., Calandra, C., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1996). Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Gene Expr. *6*, 185–195.

Zinger, M., McFarland, M., and Ben-Jonathan, N. (2003). Prolactin Expression and Secretion by Human Breast Glandular and Adipose Tissue Explants. JCEM *88*, 689–696.

Annexes

Article 3

Prolactin signaling mechanisms in ovary

Justine Bouilly, Charlotte Sonigo, **Julien Auffret**, Geula Gibori, Nadine Binart.

Molecular and Cellular Endocrinology 356 80–87 (2012)

Molecular and Cellular Endocrinology 356 (2012) 80–87

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Review

Prolactin signaling mechanisms in ovary

Justine Bouilly [a,b], Charlotte Sonigo [a,b], Julien Auffret [a,b], Geula Gibori [c], Nadine Binart [a,b,*]

[a] INSERM U 693, Le Kremlin-Bicêtre, France
[b] Univ. Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, UMR-S693, France
[c] Dept. of Physiology and Biophysics, University of Illinois at Chicago College of Medicine, Chicago, IL 60612, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 1 June 2011

Keyword:
Prolactin
Female
Isoform
Receptor

ABSTRACT

Prolactin is a hormone that is essential for normal reproduction and signals through two types of receptors. Not only is the classical long form of the prolactin receptor identified, but so are many short form receptors in rodents and human tissues. Mouse mutagenesis studies have offered insight into the biology of prolactin family, providing compelling evidence that the different isoforms have independent biological activity. The possibility that short forms mediate cell proliferation is important for a variety of tissues including mammary gland and ovarian follicles. This review summarizes our current knowledge about prolactin signaling and its role in reproduction through either long or short isoform receptors.
© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. PRL actions . . . 80
2. Synthesis and control of prolactin secretion . . . 81
3. PRLR isoforms . . . 81
4. PRLR: Binding, dimerization and degradation . . . 81
5. Signaling pathways activated by PRL . . . 82
6. Lessons from PRLR manipulated mice . . . 83
7. Ovary and PRLR−/− model . . . 83
8. Phenotype of mice over-expressing only one short isoform of the PRLR . . . 84
9. Fertility and prolactin in humans . . . 85
10. Conclusions . . . 85
Acknowledgments . . . 85
References . . . 85

1. PRL actions

Prolactin (PRL), which was discovered 80 years ago, is a polypeptide hormone originally identified by its ability to stimulate mammary gland development and lactation (Stricker and Grueter, 1928). More than 300 separate actions have been reported in various vertebrates, including effects on water and salt balance, growth and development, endocrinology and metabolism, brain and behavior, reproduction, and immune regulation and protection (Bole-Feysot et al., 1998; Goffin et al., 2002). A very small part of PRL actions are due to cross reaction with growth hormone (GH) receptors only in humans. Human GH binds not only to its cognate receptor but also to the PRL receptor, and it mimics some PRL actions. While several lines of evidence indicate that PRL acts as an autocrine, paracrine, and endocrine progression factor for mammary carcinoma in rodents and human (Clevenger et al., 2003, 2009), its actions on reproductive processes represent the largest group of identified functions (Bole-Feysot et al., 1998). Recently, a broad range of prolactin actions in the brain have been described (Grattan and Kokay, 2008). The range of neuroendocrine functions influenced by prolactin includes activation of hypothalamic dopaminergic neurons to control its own secretion, suppression of fertility, stimulation of maternal behavior (Lucas et al., 1998), suppression of the stress response, stimulation of myelinization in the central nervous system and generation of new neurons in the olfactory bulb (Shingo et al., 2003). Prolactin is widely considered as an adaptive hormone, but

* Corresponding author at: Univ. Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, UMR-S693, France.
E-mail address: nadine.binart@inserm.fr (N. Binart).

0303-7207/$ - see front matter © 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mce.2011.05.004

there have been attempts to rationalize the reason why a single hormone might exert such a range of diverse and seemingly unrelated endocrine functions.

2. Synthesis and control of prolactin secretion

PRL is predominantly produced by the lactotrophic cells of the anterior pituitary gland. However, it is also generated in extra-pituitary sites such as immune, decidual, mammary, epithelial and fat cells (Ben-Jonathan et al., 1996; Hugo et al., 2006; Prigent-Tessier et al., 1999). Its secretion is under dual regulation by hypothalamic hormones via the pituitary portal circulation (Freeman et al., 2000; Grattan and Kokay, 2008). The predominant regulatory signal is the inhibition of prolactin secretion by the neurotransmitter, dopamine, from neurons in the hypothalamus. Evidence suggests that prolactin secretion is regulated by three populations of hypothalamic dopaminergic systems (Demaria et al., 1999): the tuberoinfundibular, tuberohypophyseal, and periventricular hypophyseal dopaminergic neurons. The stimulatory signal for prolactin secretion can be mediated by other factors including thyrotrophin-releasing hormone (TRH). Chronic increases in 17β-estradiol also stimulate prolactin secretion, both through actions on the pituitary gland and through hypothalamic mechanisms (Palm et al., 2001).

3. PRLR isoforms

Biological effects of prolactin are mediated by its interaction with PRL receptor (PRLR), a member of the cytokine receptor superfamily (Bole-Feysot et al., 1998; Clevenger et al., 2003). PRLRs are present in nearly all organs and tissues. While the *PRLR* gene is unique in each species, alternative splicing generates its different isoforms which are identical in their extracellular domains but differ in the lengths and sequences of their intracellular domains (Bole-Feysot et al., 1998; Davis and Linzer, 1989; Hu et al., 2001; Kline et al., 1999; Trott et al., 2004). As for the protein, the long-PRLR isoform (long-R) and several short-PRLR isoforms (short-R) have been detected. The PRLR exists as seven recognized isoforms in human, four in mouse (but only two short forms have been identified as proteins) and three in rat; all of these isoforms exhibit different signaling properties (Fig. 1). For example, their ligand binding domains, transmembrane regions, and 44 amino acids of their cytoplasmic domains are identical in rats. Their difference relies in a unique intracellular sequence composed of 57 amino acids in the short-R and of 358 amino acids in the long-R (Goffin et al., 2002). The expression of the diverse isoforms has been shown to vary during development and as a function of the stage of the estrous cycle, pregnancy, and lactation in rodents (Nagano and Kelly, 1994). The long isoform is highly expressed in the ovary, adrenal, kidney, mammary gland, small intestine, choroid plexus and pancreas, while other organs, i.e., the liver, also express high levels of short isoform. The co-expression of both receptor isoforms is important for the normal physiological development of the ovarian follicles. Indeed, long-R is expressed at much higher levels than short-R in the growing follicles (Russell and Richards, 1999) and this may prevent signaling through short-R. However, because of the extremely broad distribution of PRLR, it is currently difficult to propose a general overview of its regulation of expression (Bole-Feysot et al., 1998).

4. PRLR: Binding, dimerization and degradation

The hormone PRL in its tertiary structure is composed of a bundle of four antiparallel α-helices (Kossiakoff, 2004) and utilizes a conserved, single pass transmembrane receptor classified as cytokine type 1 receptor.

PRLRs are composed of an extracellular domain required for ligand binding, a single transmembrane region, and an intracellular domain containing a region of membrane-proximal homology to other cytokine receptors. The human PRLR binding interface contains four histidines whose protonation is hypothesized to regulate pH-dependent receptor recognition, thermodynamic modeling of the pH dependence to receptor binding affinity reveals large changes in site-specific protonation constants for a majority interface histidines upon complexation (Kulkarni et al., 2010). The cytoplasmic domain of cytokine receptors displays a more restricted sequence similarity than the extracellular domain. Two regions, called box 1 and box 2 are conserved. Box 1 is a membrane-proximal region composed of 8 aa highly enriched in prolines and hydrophobic residues and is assumed to adopt the consensus folding specifically recognized by transducing molecules. The second consensus region, box 2, is much less conserved than box 1 and consists in the succession of hydrophobic, negatively charged,

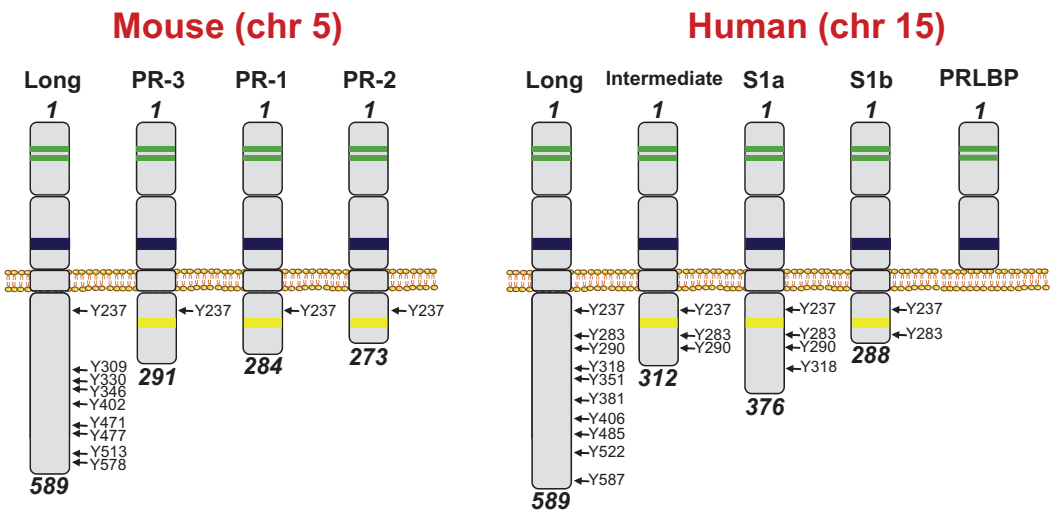


Fig. 1. Schema of the PRLR proteins in mouse and human. The PRLR protein consists of an extracellular domain (ECD) and a transmembrane domain that are identical within species, as well as a cytoplasmic domain of variable length and composition. The common features such as a disulfide bond (green), WS motif (blue), as well as Box 1 (yellow) are conserved. A soluble PRLR binding protein (PRLBP) contains only the ECD. In the intracellular domain, are represented the positions of all known tyrosine residues which are the phosphorylation substrates.

and then positively charged residues. While box 1 is conserved in all membrane PRLR isoforms, box 2 is not found in short isoforms.

The initial event in PRL signaling is the binding of one prolactin molecule to two cell-surface receptor monomers, leading to their dimerization and subsequent activation. This model was based on studies with growth hormone receptor (GHR), but very recent studies revealed that predimerization of GHR occurs *in vivo* in the absence of ligand (Brown et al., 2005), subsequently the ligand activates a preformed dimer by inducing rotational torque through the transmembrane domain. Discordant studies from independent laboratories have looked at PRLR dimerization, in the past: one study demonstrated that recombinant soluble PRLR-extracellular domain does not predimerize but rather form an unstable homodimer upon PRL binding (Gertler et al., 1996). In addition, full length PRLR failed to show Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) in absence of ligand (Biener et al., 2003) whereas another study demonstrated a lack of Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) signal between homodimers and heterodimers of long-R and two short-R in the absence of ligand (Tan et al., 2005). Nevertheless, it has been reported that homo- and heterodimers of human PRLR are constitutively present, and that the hormone acts on the preformed long form homodimer to induce the active signal transduction configuration (Qazi et al., 2006). These results could be partly explained by differences in both the nature of the constructs and the sensitivity of the BRET/FRET approaches (Qazi et al., 2006; Tan et al., 2005). Using biochemical techniques, ligand-independent dimerization of transfected and endogenous PRLR (Gadd and Clevenger, 2006) has been demonstrated. Taken together, all these data corroborate ligand-independent dimerization of cytokine receptors, the addition of ligand seems to bind a preformed dimer and initiate conformational changes leading to activation of receptor. Now, the unsolved question remains to decipher what enables the receptor to modify its conformation after ligand binding to activate the Janus kinases.

Heterodimerization of different PRLR isoforms produces inactive complexes which might also be of importance in the physiological context because PRL target cells usually express more than a single PRLR isoform. It is of note that long-R/short-R heterodimerization of the human receptors has also been demonstrated and the co-expression of the short-R (SF1b form) decreases the amount of long-R mRNA by accelerating long-R mRNA degradation (Tan and Walker, 2010).

In contrast to GHR homodimers in response to GH, covalently linked PRLR have not been observed. The issue of GHR-PRLR heterodimerization has been only minimally explored. Previous reconstitution experiments suggest that ovine GHR and PRLR can heterodimerize in response to placental lactogens (Biener et al., 2003; Herman et al., 2000). Furthermore, it has been suggested that the human receptors may also dimerize (Langenheim and Chen, 2009), and recent immunoprecipitation studies revealed specific GHR-PRLR association in human breast cancer cells that was enhanced by GH treatment. GH signaling in these cells is largely mediated by the PRLR in the context of both homo- and heterodimers broadening our understanding of how GH and PRL and their related receptors may function in physiology and pathology (Xu et al., 2011).

Ubiquitination and degradation of PRLR is mainly mediated by the β-transducin-repeat-containing protein (β-TrCP) E3 ubiquitin ligase that is recruited to PRLR in a manner that requires phosphorylation of Ser349 of the receptor (Li et al., 2004). Signaling induced by PRL and mediated by catalytic activation of Janus kinase 2 (Jak2) stimulates this Ser349 phosphorylation in addition to ubiquitination, initial internalization, and degradation of PRLR (Swaminathan et al., 2008b). These data are in line with the hypothesis that ligand stimulated PRLR ubiquitination leads to PRLR internalization, sorting to the lysosomes, and lysosomal degradation. The ubiquitination mechanisms of PRLR leading to its degradation have been recently elucidated. PRLR is degraded primarily through the lysosomal pathway and efficient clathrin-dependent internalization of PRLR requires both receptor ubiquitination and the function of the assembly polypeptide 2 (AP2) complex. The ubiquitination of PRLR stimulates its interaction with the AP2 complex. Then, polyubiquitination and K63 linkages are required for the internalization, post-internalization sorting, and lysosomal degradation of PRLR (Varghese et al., 2008).

5. Signaling pathways activated by PRL

PRLR is devoid of intrinsic tyrosine kinase activity but can be phosphorylated by associated proteins. Although the signaling pathway downstream of the long-R has been well characterized, little is known about PRL actions mediated by short-R. Acting through the long isoform, PRL activates many kinases including Janus kinase2 (Jak2) (Goffin et al., 2002), Src kinase (Clevenger et al., 2003; Swaminathan et al., 2008a), Phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase) (Berlanga et al., 1997b), MAP kinase (Bole-Feysot et al., 1998) and serine/threonine kinase Nek3-vav2-Rac1 pathways (Clevenger, 2004). Jak2 phosphorylates PRLR on multiple tyrosine sites along the loop and the loop-associated signal transducer and activator of transcription a/b (Stat5a/b) on a conserved tyrosine residue within the C-terminal SH2-dimerization domain. Subsequently, tyrosine-phosphorylated Stat5 dissociates from the receptor, forms a transcriptional active dimer and translocates into the nucleus, where it regulates gene expression. These signaling events induce several PRL-responsive genes such as those involved in cell proliferation (cyclin D1 and cytokine-inducible SH2-containing protein (CIS)) and differentiation (Ali et al., 1996; Brockman et al., 2002) (Fig. 2). Recently, a new member of the PRL signaling cascade was added; PI3kinase enhancer-A (PIKE-A) has been shown to directly associate with both Stat5a and PRLR, which is essential for PRL-provoked Stat5a activation and the subsequent gene transcription (Chan et al., 2010). PIKE-A is critical for the activation of Akt signaling its depletion in HC11 epithelial cells diminished PRL-induced Stat5 activation and cyclin D1 expression, resulting in profoundly impaired cell proliferation *in vitro*.

The interaction of the PRLR with the kinases, or with other proteins involved in positive and negative regulation of signaling (adapters, phosphatases, suppressor of cytokine signaling (SOCS), etc.), has been mapped in identified regions of the cytoplasmic domain. For example, the tyrosine residues in the C-terminal part of the long-R contribute to the engagement and phosphorylation of Stat5 by Jak2 (Pezet et al., 1997) (Fig. 2). Very recently, PRL-activated PRLR and its downstream Stat5b were shown both acetylated by CREB-binding protein (CBP). These results suggest that the acetylation/deacetylation process provides the rheostat-like regulation for PRLR in its cytoplasmic loop dimerization and subsequent Stat activation. Acetylation-dependent cytoplasmic loop dimerization has been shared as a mechanism for activation among type I cytokine receptors that activate Stat (Ma et al., 2010).

Most of what we know about PRL receptor signaling comes from analysis of the long-R where the best studied pathway is activation of Jak/Stat. Although it has been suggested that PRLR short isoforms behave either as dominant negatives by inhibiting the function of the long-R (Berlanga et al., 1997a; Lesueur et al., 1991; Perrot-Applanat et al., 1997; Saunier et al., 2003), or as positive regulators in mammary gland (Binart et al., 2003a), the mechanisms by which PRL signals through the short-R remain unclear. In addition, soluble receptor isoforms containing the extracellular domain have only been identified in humans but not in rodents (Kline and Clevenger, 2001). The various PRLR isoforms exhibit different signaling properties; for example, the short-R is not

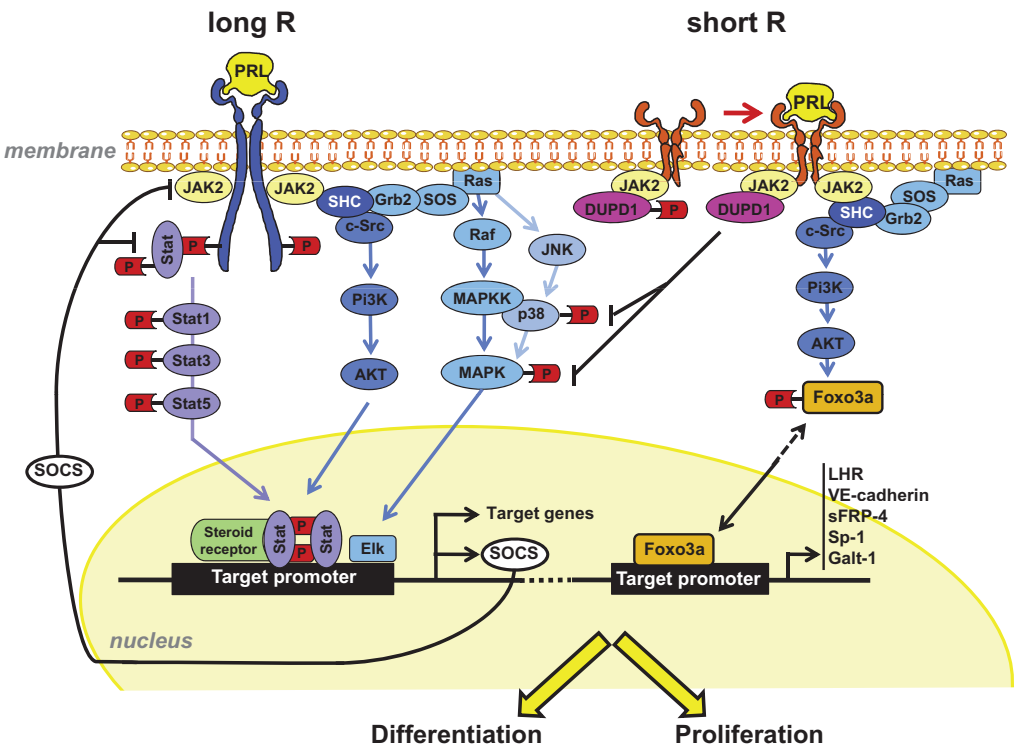


Fig. 2. Major signaling cascades triggered by long and short PRLR isoforms. Ligand-induced activation of the PRLR triggers several signaling cascades. The main pathway involves the tyrosine kinase Jak2, which in turn activates two members of the Stat family, Stat5 a and b. The MAPK and PI3 K pathways are other important cascades activated by the PRLR. They involve the Shc/Grb2/Sos/Ras/Raf intermediaries upstream to MAPK kinases and the kinase Akt, respectively. Activation of other signaling pathways has been reported; among these, Src kinases are known to play an important role in proliferation.

tyrosine-phosphorylated, which prevents this isoform from interacting directly with SH2-containing proteins, such as Stat factors. Recent results have established a role for PRL-RS in PRL activation/deactivation of specific transcription factors. Sp1 is one of the few transcription factors whose DNA binding activity, nuclear localization, and expression is repressed by PRL *in vivo* and *in vitro*. These events appear to involve the calmodulin-dependent protein kinase pathway. These data demonstrate that the short-R activates a signaling pathway distinct from that of the long-R (Devi et al., 2009).

6. Lessons from PRLR manipulated mice

Lactogenic hormones (Soares et al., 2007) (placental lactogens and prolactin) play a critical role in rodent reproductive function. Among these functions the best established is the key role in maintaining the ovarian corpus luteum (CL) and progesterone production through the long-R since this form is predominantly expressed (Risk and Gibori, 2001; Stocco et al., 2007). Even a number of PRL key functions have been clarified by studies of transgenic and knockout model mice, no long-R knockout model mouse is currently available.

7. Ovary and PRLR−/− model

PRL−/− (Horseman et al., 1997) and PRLR−/− (Ormandy et al., 1997) female mice have been described as completely infertile. After mating with fertile males, no litters were produced although each female mated repeatedly at irregular intervals. PRLR−/− ovaries are normal and do not present differences in either follicular development or ovulation and fertilization rate when compared to wild type animals (Grosdemouge et al., 2003). These observations led to the conclusion that PRL is essential for corpus luteum (CL) function (Bachelot and Binart, 2005, 2007; Horseman et al., 1997). Activation of the luteinizing hormone (LH) receptor (LHR) in follicular cells by the preovulatory LH surge causes ovulation and rapidly initiates a program of terminal differentiation of the ovulated follicle into a CL through a process termed luteinization. In rodents, the CL plays a central role in pregnancy maintenance, by synthesizing the steroid progesterone (Stocco et al., 2007). One of the most important changes during luteinization is the alteration in the cellular responsiveness to external signals allowing luteal cells to respond to a new set of hormones, the most important being PRL and LH. Luteinization and CL formation do take place in the absence of PRLR; however, two days after mating, PRLR−/− mice exhibited corpora lutea undergoing regression and displaying strong DNA cleavage associated to low indications of vascularization and absence of sufficient progesterone level to support implantation and subsequent placental development and maintenance (Grosdemouge et al., 2003). This was due to the absence of down regulation by PRL of 20α-hydroxy steroid dehydrogenase (20α-HSD), which is responsible for progesterone catabolism. Since the CL is the main source of progesterone production in rodents, progesterone administration rescues preimplantation embryo development and implantation in PRLR−/− females (Binart et al., 2000). The PRLR is thus a key component regulating ovarian function and governing the regulation of progesterone secretion and, indeed PRL triggers an early signal that induces the survival and steroidogenic capacity of the CL.

During luteinization, there is an alteration in the cellular responsiveness to external signals allowing luteal cells to respond to LH and PRL. The expression of the LHR increases after luteinization and becomes highly abundant in the CL. This up-regulation of LHR during CL formation has been shown to be linked to PRL both *in vivo* (Gafvels et al., 1992; Segaloff et al., 1990) and *in vitro*

(Albarracin et al., 1994; Piquette et al., 1991). In rodents, semi-circadian surges of PRL secretion are induced by cervical stimuli, which are believed to be responsible for the conversion of the CL to the corpus luteum of pregnancy leading to increase CL life span and its capacity to secrete sufficient amount of progesterone to maintain pregnancy (Gunnet and Freeman, 1983, 1984). This conversion is thought to involve distinct luteotropic effects of PRL: upregulation of LHR expression as well as progesterone secretion (Gibori and Richards, 1978) and repression of 20αHSD (Albarracin et al., 1994). To determine whether the stimulation of LHR and progesterone production are independent events both mediated by PRL, or whether progesterone production only depends on high expression of LHR and LH stimulation, we studied the luteal expression of LHR and steroidogenesis in PRLR−/− mice treated by hCG. We found out that LH/hCG can stimulate the expression of its cognate receptor in the CL and stimulate the expression of enzymes that are involved in steroidogenesis in the absence of PRL signaling (Bachelot et al., 2009).

8. Phenotype of mice over-expressing only one short isoform of the PRLR

Whereas PRL regulation of CL is thought to take place through activation of the long-R, the impact of short-R activation on ovarian development is not at all known. To examine the putative role of the short-R *in vivo*, we generated PRLR−/− females expressing only the PR-1 short mouse isoform, as referred as PRLR−/−short-R (Halperin et al., 2008).

The number of secondary, pre-antral, and antral follicles is markedly increased in PRLR−/−short-R ovaries, indicating that premature follicular development occurs at a young age in these females. A severe follicular death begins at 4 weeks of age; histological examination shows follicular death where the mural granulosa cells are disorganized and the oocytes devoid of cumulus. From the age of 5 months, the ovaries are almost completely depleted of functional follicles; this likely reflects widespread follicular initiation followed by follicular cell death. PRL signaling through short-R profoundly impacts follicular survival and causes a severe follicular impairment leading to primary ovarian insufficiency (POI) (Halperin et al., 2008). Numerous mutant mouse models have been established for the study of ovarian development (Edson et al., 2009; Jagarlamudi et al., 2010), they have provided clues about what molecules may be involved in the development of POI in humans.

Both PRLR−/− and PRLR−/−short-R females ovulate and form CL during pregnancy, but regression of these CLs is seen within 2.5 days, and pregnancy cannot be sustained (Bachelot et al., 2009). Implantation of progesterone pellets in PRLR−/−short-R females allowed a partial rescue of embryos (Binart et al., 2000; Halperin et al., 2008). Because similar expression of both the long and short isoforms is found in CL (Russell and Richards, 1999; Telleria et al., 1997), a role for short-R on CL was suggested. However, the inability of the short-R to rescue the CL in pregnant PRLR−/−short-R females clearly establishes a key role for long-R in the PRL-maintenance of a functionally progesterone producing CL.

PRL cannot activate Jak2/Stat pathway through the short-R, but does activate other pathways including PI3 kinases pathways. Recent work from JS Richards et al showed that MAPK is essential for normal follicular development (Fan et al., 2009), this pathway is critically inhibited by PRL in reproductive tissues of PRLR-/PRLR−/−short-R mice (Fig. 2). Thus, the phosphorylation of MAPK downstream targets is also severely inhibited by PRL without affecting immediate upstream kinases, suggesting involvement of MAPK specific phosphatase in this inhibition. A 27 kDa protein binding to the intracellular domain of short-R has been identified

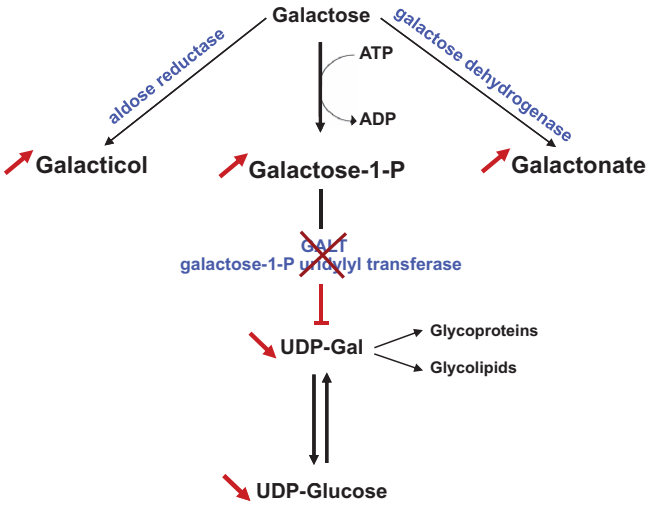


Fig. 3. Pathway of galactose metabolism. Classic galactosemia is caused by impairment of GALT leading to an increased accumulation of galactose, Galt-1P, galacticol and galactonate, in cells. GALT is also important for regulating the supply of uridine diphosphate (UDP) sugars that are necessary for post translational glycosylation of proteins, then its absence leads to glycosylation defects.

as dual specific phosphatase DUDP1. PRL does not induce expression of DUDP1 but represses its phosphorylation. A physical association of this phosphatase with ERK1/2 and p38 MAPK has been identified. Using an *in vitro* phosphatase assay and overexpression studies, DUDP1 has been demonstrated as a MAPK phosphatase. These very recent results strongly suggest that deactivation of MAPK by short-R contributes to the severe ovarian defect observed in PRLR−/−short-R mice and demonstrate the novel association of short-R with DUPD1 (Devi et al., 2011).

PRL signals through short-R in the ovary and actively regulates the expression of several genes identified by microarray analysis (Halperin et al., 2008). Interestingly, Galt, whose mutation induces galactosemia (Forges et al., 2006), is down-regulated in PRLR−/−short-R ovaries in contrast to their PRLR−/− littermates.

The mouse *Galt* promoter sequence contains a number of putative forkhead transcription factor sites, five of them being FOXO3 sites that may regulate *Galt* transcription. GALT participates in the metabolism of galactose to glucose (Onuma et al., 2006) and is highly expressed in ovaries and liver, which are the major sites of expression for this enzyme (Liu et al., 2000). Classic galactosemia is an autosomal recessive disorder that results from profound impairment of galactose-1-phosphate uridylyltransferase, the second enzyme in the pathway of galactose metabolism (Fig. 3). Accumulation of galactose-1-phosphate is thought to inhibit the enzymes that are involved in glucose metabolism leading to deficient glycosylation reactions and a decrease in energy production in ovarian cells. In women, either mutations in *Galt* or a deficiency in enzyme activity cause galactosemia associated with POI (Forges et al., 2006). Young women with this disease are fertile early in life but become sterile in their late 20's, displaying ovaries formed by interstitial cells and devoid of follicles, similar to those seen in PRLR−/−short-R mice.

Interestingly, short-R activation downregulates both Foxo3 and Galt, two genes known to be critical for normal ovarian development (Castrillon et al., 2003; Forges et al., 2006; Hosaka et al., 2004). The negative regulation of Foxo3-Galt by PRL through short-R provides a mechanism that mediates the development of the acute ovarian defect displayed in PRLR−/−short-R transgenic females and also provides a link to the similar POI displayed by the Foxo3−/− mice and by women with GALT mutation (Halperin et al., 2008).

9. Fertility and prolactin in humans

Circulating serum prolactin is thought to reflect almost entirely pituitary PRL secretion, while other extra pituitary sources probably contribute primarily to local tissue PRL levels. Unlike rodents, the role of PRL in human function is unclear, largely because no disruptive mutations of human *PRL* or the human *PRLR* have ever been identified in reproductive pathologies.

Hyperprolactinemia in men can lead to infertility, impotence or reproductive disturbances, suggesting that PRL contributes to optimal reproduction in human. However, no clear function could be ascribed to PRL in male mammals, including humans (Bole-Feysot et al., 1998). Data have suggested that, generally, this hormone positively modulates several aspects of testicular function. Thus, PRL has been presented as being involved in the maintenance of cellular morphology (Nag et al., 1981) and in the up-regulation of LH receptor number on Leydig cells (Dombrowicz et al., 1992; Purvis et al., 1979). The PRLR−/− model has allowed demonstrating that none of the male reproductive tract organ parameters or functions was affected (Binart et al., 2003b).

There is some evidence that a PRL surge occurs during ovulation coincident with the secretory peak of LH as in rodents, although the extent seems to be weaker in women than in rats (Ben Jonathan et al., 2008). The normal daily PRL secretory profile is characterized by a rise during nocturnal sleep and a rapid fall after awakening but it is still controversial whether this surge follows the sleep-wakening cycle or the circadian rhythm. High levels of circulating PRL, in physiology and pathological situations, are known to cause infertility. Dysovulation is the most common disorder of the hyperprolactinemia, but the precise mechanisms by which PRL influences the neuroendocrine axis are yet to be deciphered. Hyperprolactinaemia results in inhibition of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) release pulsatility from the hypothalamus and subsequent inhibition of LH and follicle stimulating hormone (Bouchard et al., 1985; Zinaman et al., 1995), leading to inhibition of ovarian function. Nevertheless, a small proportion of GnRH neurons in mouse express *PRLR* while there is a high level of *PRLR* expression in brain regions involved in the control of GnRH secretion. A recent study in mouse, suggests that PRL actions on GnRH neurons are predominantly mediated indirectly through afferent pathways as kisspeptin (Kokay et al., 2011). Kisspeptin is a new fundamental actor of the gonadotrope axis in both rodents and human, and the most important stimulator of GnRH, this regulation might explain PRL-induced dysovulation in women. Moreover, KiSS-1/kisspeptin and its receptor KiSS1R are expressed in both human and non human primate ovary but the local role on ovarian physiology in mammals has to be elucidated (Gaytan et al., 2009).

Furthermore, no study has yet compared the distribution of PRLR in human ovaries to that in murine ovaries or examined the PRL signaling pathway in human tissue. A recent review summarized what we can learn from rodents about prolactin in humans on reproductive cycle, pregnancy and fetal development and mammary gland (Ben Jonathan et al., 2008). There is no evidence that PRL is luteotropic in the human CL; instead, pituitary LH supports luteal development and steroidogenesis during the menstrual cycle. Moreover, in women hCG secretion by the embryonic trophoblast serves a function that is analogous to PRL in sustaining the CL during early pregnancy (Devoto et al., 2009). Nevertheless, both PRL and the PRLR are expressed in the luteinised human ovary (Schwarzler et al., 1997; Vlahos et al., 2001), while PRL acting as a survival factor in granulosa cells (Perks et al., 2003). POI is a common cause of infertility and premature aging in women, with an estimated 1% incidence; the vast majority of cases of POI are idiopathic, but the possibility that POI results from a mutation in long-R is intriguing and deserves further investigation. Nevertheless, despite clear evidence of PRLR involvement in folliculogenesis in mice, we were unable to find any *PRLR* mutations associated with non-syndromic POI in nearly 100 women (Bachelot et al., 2010).

10. Conclusions

PRL is an incomparable hormone with important implications for reproduction and sexual behavior. This review aims to highlight essential findings on novel PRL signaling, and to discuss the implications for reproductive function. In a broad sense, PRL is critical for reproduction in both rodents and humans, given that lactation represents a continuum of the reproductive process. Although it is not yet clear how PRL signals in the human ovary, signaling pathways induced by prolactin through its short form should be an interesting avenue for research. Such studies may provide greater insight into normal processes of ovarian development and function as well as causes of ovarian dysfunction.

The precise tissue distribution, interactions, and specific signaling pathways that are mediated by the various PRLR isoforms in human cells should also be undertaken.

Acknowledgments

We would like to acknowledge current and former members of our laboratory for their valuable contributions and discussions. This work was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. J.B. and C.S. were supported by the Lilly and Ipsen laboratories and by la Fondation pour la Recherche Médicale, respectively.

References

Albarracin, C.T., Parmer, T.G., Duan, W.R., Nelson, S.E., Gibori, G., 1994. Identification of a major prolactin-regulated protein as 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. Endocrinology 134, 2453–2460.

Ali, S., Chen, Z., Lebrun, J.J., Vogel, W., Kharitonenkov, A., Kelly, P.A., Ullrich, A., 1996. PTP1D is a positive regulator of the prolactin signal leading to b-casein promoter activation. EMBO J. 15, 135–142.

Bachelot, A., Beaufaron, J., Servel, N., Kedzia, C., Monget, P., Kelly, P.A., Gibori, G., Binart, N., 2009. Prolactin independent rescue of mouse corpus luteum life span: identification of prolactin and luteinizing hormone target genes. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 297, E676–E684.

Bachelot, A., Binart, N., 2005. Corpus luteum development: lessons from genetic models in mice. Curr. Top. Dev. Biol. 68, 49–84.

Bachelot, A., Binart, N., 2007. Reproductive role of prolactin. Reproduction 133, 361–369.

Bachelot, A., Bouilly, J., Liu, Y., Rebourcet, D., Leux, C., Kuttenn, F., Touraine, P., Binart, N., 2010. Sequence variation analysis of the prolactin receptor C-terminal region in women with premature ovarian failure. Fertil. Steril. 94, 2772–2775.

Ben Jonathan, N., Lapensee, C.R., Lapensee, E.W., 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? Endocr. Rev. 29, 1–41.

Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L., Steinmetz, R.W., 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. Endocr. Rev. 17, 639–669.

Berlanga, J.J., Garcia-Ruiz, J.P., Perrot-Applanat, M., Kelly, P.A., Edery, M., 1997a. The short form of the prolactin receptor silences prolactin induction of the b-casein gene promoter. Mol. Endocrinol. 11, 1449–1457.

Berlanga, J.J., Gualillo, O., Buteau, H., Applanat, M., Kelly, P.A., Edery, M., 1997b. Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. J. Biol. Chem. 272, 2050–2052.

Biener, E., Martin, C., Daniel, N., Frank, S.J., Centonze, V.E., Herman, B., Djiane, J., Gertler, A., 2003. Ovine placental lactogen-induced heterodimerization of ovine growth hormone and prolactin receptors in living cells is demonstrated by fluorescence resonance energy transfer microscopy and leads to prolonged phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (STAT)1 and STAT3. Endocrinology 144, 3532–3540.

Binart, N., Helloco, C., Ormandy, C.J., Barra, J., Clement-Lacroix, P., Baran, N., Kelly, P.A., 2000. Rescue of preimplantatory egg development and embryo implantation in prolactin receptor-deficient mice after progesterone administration. Endocrinology 141, 2691–2697.

Binart, N., Imbert-Bollore, P., Baran, N., Viglietta, C., Kelly, P.A., 2003a. A short form of the prolactin receptor is able to rescue mammopoiesis in heterozygous prolactin receptor mice. Mol. Endocrinol. 17, 1066–1074.

Binart, N., Melaine, N., Pineau, C., Kercret, H., Touzalin, A.M., Imbert-Bollore, P.,

Kelly, P.A., Jegou, B., 2003b. Male reproductive function is not affected in prolactin receptor-deficient mice. Endocrinology 144, 3779–3782.
Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P.A., 1998. Prolactin and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice. Endocr. Rev. 19, 225–268.
Bouchard, P., Lagoguey, M., Brailly, S., Schaison, G., 1985. Gonadotropin-releasing hormone pulsatile administration restores luteinizing hormone pulsatility and normal testosterone levels in males with hyperprolactinemia. J. Clin. Endocrinol. Metab. 60, 258–262.
Brockman, J.L., Schroeder, M.D., Schuler, L.A., 2002. PRL activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/Stat pathway. Mol. Endocrinol. 16, 774–784.
Brown, R.J., Adams, J.J., Pelekanos, R.A., Wan, Y., McKinstry, W.J., Palethorpe, K., Seeber, R.M., Monks, T.A., Eidne, K.A., Parker, M.W., 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.
Castrillon, D.H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J.W., DePinho, R.A., 2003. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. Science 301, 215–218.
Chan, C.B., Liu, X., Ensslin, M.A., Dillehay, D.L., Ormandy, C.J., Sohn, P., Serra, R., Ye, K., 2010. PIKE-A is required for prolactin-mediated STAT5a activation in mammary gland development. EMBO J. 29, 956–968.
Clevenger, C.V., 2004. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. Am. J. Pathol. 165, 1449–1460.
Clevenger, C.V., Furth, P.A., Hankinson, S.E., Schuler, L.A., 2003. The role of prolactin in mammary carcinoma. Endocr. Rev. 24, 1–27.
Clevenger, C.V., Gadd, S.L., Zheng, J., 2009. New mechanisms for PRLr action in breast cancer. Trends Endocrinol. Metab. 20, 223–229.
Davis, J.A., Linzer, D.H., 1989. Expression of multiple forms of the prolactin receptor. Mol. Endocrinol. 3, 674–680.
Demaria, J.E., Lerant, A.A., Freeman, M.E., 1999. Prolactin activates all three populations of hypothalamic neuroendocrine dopaminergic neurons in ovariectomized rats. Brain Res. 837, 236–241.
Devi, Y.S., Seibold, A.M., Shehu, A., Maizels, E., Halperin, J., Le, J., Binart, N., Bao, L., Gibori, G., 2011. Inhibition of MAPK by prolactin signaling through the short form of its receptor in the ovary and decidua: involvement of a novel phosphatase. J. Biol. Chem. 286, 7609–7618.
Devi, Y.S., Shehu, A., Stocco, C., Halperin, J., Le, J., Seibold, A.M., Lahav, M., Binart, N., Gibori, G., 2009. Regulation of transcription factors and repression of Sp1 by prolactin signaling through the short isoform of its cognate receptor. Endocrinology 150, 3327–3335.
Devoto, L., Kohen, P., Munoz, A., and Strauss, J.F., III, 2009. Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. Reprod. Biomed. Online 18(Suppl. 2), 19–24.
Dombrowicz, D., Sente, B., Closset, J., Hennen, G., 1992. Dose-dependent effects of human prolactin on the immature hypophysectomized rat testis. Endocrinology 130, 695–700.
Edson, M.A., Nagaraja, A.K., Matzuk, M.M., 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. Endocr. Rev. 30, 624–712.
Fan, H.Y., Liu, Z., Shimada, M., Sterneck, E., Johnson, P.F., Hedrick, S.M., Richards, J.S., 2009. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. Science 324, 938–941.
Forges, T., Monnier-Barbarino, P., Leheup, B., Jouvet, P., 2006. Pathophysiology of impaired ovarian function in galactosaemia. Hum. Reprod. Update 12, 573–584.
Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G., 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiol. Rev. 80, 1523–1631.
Gadd, S.L., Clevenger, C.V., 2006. Ligand-independent dimerization of the human prolactin receptor isoforms: functional implications. Mol. Endocrinol. 11, 2734–2746.
Gafvels, M., Bjurulf, E., Selstam, G., 1992. Prolactin stimulates the expression of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid in the rat corpus luteum and rescues early pregnancy from bromocriptine-induced abortion. Biol. Reprod. 47, 534–540.
Gaytan, F., Gaytan, M., Castellano, J.M., Romero, M., Roa, J., Aparicio, B., Garrido, N., Sanchez-Criado, J.E., Millar, R.P., Pellicer, A., Fraser, H.M., Tena-Sempere, M., 2009. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 296, E520–E531.
Gertler, A., Grosclaude, J., Strasburger, C.J., Nir, S., Djiane, J., 1996. Real-time kinetic measurements of the interactions between lactogenic hormones and prolactin-receptor extracellular domains from several species support the model of hormone-induced transient receptor dimerization. J. Biol. Chem. 271, 24482–24491.
Gibori, G., Richards, J.S., 1978. Dissociation of two distinct luteotropic effects of prolactin: regulation of luteinizing hormone-receptor content and progesterone secretion during pregnancy. Endocrinology 102, 767–774.
Goffin, V., Binart, N., Touraine, P., Kelly, P.A., 2002. Prolactin: the new biology of an old hormone. Annu. Rev. Physiol. 64, 47–67.
Grattan, D.R., Kokay, I.C., 2008. Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. J. Neuroendocrinol. 20, 752–763.
Grosdemouge, I., Bachelot, A., Lucas, A., Baran, N., Kelly, P.A., Binart, N., 2003. Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. Reprod. Biol. Endocrinol. 1, 1–12.
Gunnet, J.W., Freeman, M.E., 1983. The mating-induced release of prolactin: a unique neuroendocrine response. Endocrinol. Rev. 4, 44–61.
Gunnet, J.W., Freeman, M.E., 1984. Hypothalamic regulation of mating-induced prolactin release. Effect of electrical stimulation of the medial preoptic area in conscious female rats. Neuroendocrinology 38, 12–16.
Halperin, J., Devi, S.Y., Elizur, S., Stocco, C., Shehu, A., Rebourcet, D., Unterman, T.G., Leslie, N.D., Le, J., Binart, N., Gibori, G., 2008. Prolactin signaling through the short form of its receptor represses forkhead transcription factor FOXO3 and Its target gene galt causing a severe ovarian defect. Mol. Endocrinol. 22, 513–522.
Herman, A., Bignon, C., Daniel, N., Grosclaude, J., Gertler, A., Djiane, J., 2000. Functional heterodimerization of prolactin and growth hormone receptors by ovine placental lactogen. J. Biol. Chem. 275, 6295–6301.
Horseman, N.D., Zhao, W., Montecino-Rodriguez, E., Tanaka, M., Nakashima, K., Engle, S.J., Smith, F., Markoff, E., Dorshkind, K., 1997. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. EMBO J. 16, 6926–6935.
Hosaka, T., Biggs III, W.H., Tieu, D., Boyer, A.D., Varki, N.M., Cavenee, W.K., Arden, K.C., 2004. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2975–2980.
Hu, Z.Z., Meng, J., 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.
Hugo, E.R., Brandebourg, T.D., Comstock, C.E., Gersin, K.S., Sussman, J.J., Ben Jonathan, N., 2006. LS14: a novel human adipocyte cell line that produces prolactin. Endocrinology 147, 306–313.
Jagarlamudi, K., Reddy, P., Adhikari, D., Liu, K., 2010. Genetically modified mouse models for premature ovarian failure (POF). Mol. Cell Endocrinol. 315, 1–10.
Kline, J.B., Clevenger, C.V., 2001. Identification and characterization of the prolactin-binding protein in human serum and milk. J. Biol. Chem. 276, 24760–24766.
Kline, J.B., Roehrs, H., Clevenger, C.V., 1999. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. J. Biol. Chem. 274, 35461–35468.
Kokay, I.C., Petersen, S.L., Grattan, D.R., 2011. Identification of prolactin-sensitive GABA and Kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. Endocrinology 152, 526–535.
Kossiakoff, A.A., 2004. The structural basis for biological signaling, regulation, and specificity in the growth hormone-prolactin system of hormones and receptors. Adv. Protein Chem. 68, 147–169.
Kulkarni, M.V., Tettamanzi, M.C., Murphy, J.W., Keeler, C., Myszka, D.G., Chayen, N.E., Lolis, E.J., Hodsdon, M.E., 2010. Two independent histidines, one in human prolactin and one in its receptor, are critical for pH-dependent receptor recognition and activation. J. Biol. Chem. 285, 38524–38533.
Langenheim, J.F., Chen, W.Y., 2009. Development of a novel ligand that activates JAK2/STAT5 signaling through a heterodimer of prolactin receptor and growth hormone receptor. J. Recept. Signal. Transduct. Res. 29, 107–112.
Lesueur, L., Edery, M., Ali, S., Paly, J., Kelly, P.A., Djiane, J., 1991. Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin induced milk protein gene transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 824–828.
Li, Y., Kumar, K.G., Tang, W., Spiegelman, V.S., Fuchs, S.Y., 2004. Negative regulation of prolactin receptor stability and signaling mediated by SCF(beta-TrCP) E3 ubiquitin ligase. Mol. Cell Biol. 24, 4038–4048.
Liu, G., Hale, G.E., Hughes, C.L., 2000. Galactose metabolism and ovarian toxicity. Reprod. Toxicol. 14, 377–384.
Lucas, B.K., Ormandy, C., Binart, N., Bridges, R.S., Kelly, P.A., 1998. Null mutation of prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. Endocrinology 139, 4102–4107.
Ma, L., Gao, J.S., Guan, Y., Shi, X., Zhang, H., Ayrapetov, M.K., Zhang, Z., Xu, L., Hyun, Y.M., Kim, M., Zhuang, S., Chin, Y.E., 2010. Acetylation modulates prolactin receptor dimerization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 19314–19319.
Nag, S., Sanyal, S., Ghosh, K.K., Biswas, N.M., 1981. Prolactin suppression and spermatogenic developments in maturing rats. A quantitative study. Horm. Res. 15, 72–77.
Nagano, M., Kelly, P.A., 1994. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression: quantitative analysis by polymerase chain reaction. J. Biol. Chem. 269, 13337–13345.
Onuma, H., Vander Kooi, B.T., Boustead, J.N., Oeser, J.K., O'Brien, R.M., 2006. Correlation between FOXO1a (FKHR) and FOXO3a (FKHRL1) binding and the inhibition of basal glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription by insulin. Mol. Endocrinol. 20, 2831–2847.
Ormandy, C.J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B.K., Buteau, H., Edery, M., Brousse, N., Babinet, C., Binart, N., Kelly, P.A., 1997. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. Genes Dev. 11, 167–178.
Palm, I.F., van der Beek, E.M., Swarts, H.J., Van der Vilet, J., Wiegant, V.M., Buijs, R.M., Kalsbeek, A., 2001. Control of the estradiol-induced prolactin surge by the suprachiasmatic nucleus. Endocrinology 142, 2296–2302.
Perks, C.M., Newcomb, P.V., Grohmann, M., Wright, R.J., Mason, H.D., Holly, J.M., 2003. Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells. Hum. Reprod. 18, 2672–2677.
Perrot-Applanat, M., Gualillo, O., Pezet, A., Vincent, V., Edery, M., Kelly, P.A., 1997. Dominant negative and cooperative effects of mutant forms of prolactin receptor. Mol. Endocrinol. 11, 1020–1032.
Pezet, A., Ferrag, F., Kelly, P.A., Edery, M., 1997. Tyrosine docking sites of the rat prolactin receptor required for association and activation of Stat5. J. Biol. Chem. 272, 25043–25050.
Piquette, G.N., LaPolt, P.S., Oikawa, M., Hsueh, A.J., 1991. Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth

factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. Endocrinology 128, 2449–2456.
Prigent-Tessier, A., Tessier, C., Hirosawa-Takamori, M., Boyer, C., Ferguson-Gottschall, S., Gibori, G., 1999. Rat decidual prolactin. Identification, molecular cloning, and characterization. J. Biol. Chem. 274, 37982–37989.
Purvis, K., Clausen, O.P., Olsen, A., Haug, E., Hansson, V., 1979. Prolactin and Leydig cell responsiveness to LH/hCG in the rat. Arch. Androl. 3, 219–230.
Qazi, A.M., Tsai-Morris, C.H., 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. 8, 1912–1923.
Risk, M., Gibori, G., 2001. Mechanisms of luteal cell regulation by prolactin. In: Horseman, N.D. (Ed.), Prolactin. Academic Publishers, pp. 265–295.
Russell, D.L., Richards, J.S., 1999. Differentiation-dependent prolactin responsiveness and stat (signal transducers and activators of transcription) signaling in rat ovarian cells. Mol. Endocrinol. 13, 2049–2064.
Saunier, E., Dif, F., Kelly, P.A., Edery, M., 2003. Targeted expression of the dominant-negative prolactin receptor in the mammary gland of transgenic mice results in impaired lactation. Endocrinology 144, 2669–2675.
Schwarzler, P., Untergasser, G., Hermann, M., Dirnhofer, S., Abendstein, B., Berger, P., 1997. Prolactin gene expression and prolactin protein in premenopausal and postmenopausal human ovaries. Fertil. Steril. 68, 696–701.
Segaloff, D.L., Wang, H.Y., Richards, J.S., 1990. Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. Mol. Endocrinol. 4, 1856–1865.
Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C., Weiss, S., 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. Science 299, 117–120.
Soares, M.J., Konno, T., Alam, S.M., 2007. The prolactin family: effectors of pregnancy-dependent adaptations. Trends Endocrinol. Metab. 18, 114–121.
Stocco, C., Telleria, C., Gibori, G., 2007. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. Endocr. Rev. 28, 117–149.
Stricker, P., Grueter, R., 1928. Action du lobe antérieur de l'hypophyse sur la montée laiteuse. C.R. Soc. Biol. 99, 1978–1980.
Swaminathan, G., Varghese, B., Fuchs, S.Y., 2008a. Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast cancer. J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia. 13, 81–91.
Swaminathan, G., Varghese, B., Thangavel, C., Carbone, C.J., Plotnikov, A., Kumar, K.G., Jablonski, E.M., Clevenger, C.V., Goffin, V., Deng, L., Frank, S.J., Fuchs, S.Y., 2008b. Prolactin stimulates ubiquitination, initial internalization, and degradation of its receptor via catalytic activation of Janus kinase 2. J. Endocrinol. 196, R1–R7.
Tan, D., Johnson, D.A., Wu, W., Zeng, L., Chen, Y.H., Chen, W.Y., Vonderhaar, B.K., 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 receptors in living human cells. Mol. Endocrinol. 19, 1291–1303.
Tan, D., Walker, A.M., 2010. Short form 1b human prolactin receptor down-regulates expression of the long form. J. Mol. Endocrinol. 44, 187–194.
Telleria, C.M., Parmer, T.G., Zhong, L., Clarke, D.L., Albarracin, C.T., Duan, W.R., Linzer, D.I., Gibori, G., 1997. The different forms of the prolactin receptor in the rat corpus luteum: developmental expression and hormonal regulation in pregnancy. Endocrinology 138, 4812–4820.
Trott, J.F., Hovey, R.C., Koduri, S., Vonderhaar, B.K., 2004. Multiple new isoforms of the human prolactin receptor gene. Adv. Exp. Med. Biol. 554, 495–499.
Varghese, B., Barriere, H., Carbone, C.J., Banerjee, A., Swaminathan, G., Plotnikov, A., Xu, P., Peng, J., Goffin, V., Lukacs, G.L., Fuchs, S.Y., 2008. Polyubiquitination of prolactin receptor stimulates its internalization, postinternalization sorting, and degradation via the lysosomal pathway. Mol. Cell Biol. 28, 5275–5287.
Vlahos, N.P., Bugg, E.M., Shamblott, M.J., Phelps, J.Y., Gearhart, J.D., Zacur, H.A., 2001. Prolactin receptor gene expression and immunolocalization of the prolactin receptor in human luteinized granulosa cells. Mol. Hum. Reprod. 7, 1033–1038.
Xu, J., Zhang, Y., Berry, P.A., Jiang, J., Lobie, P.E., Langenheim, J.F., Chen, W.Y., Frank, S.J., 2011. Growth hormone signaling in human T47D breast cancer cells: potential role for a growth hormone receptor–prolactin receptor complex. J. Clin. Endocrinol. Metab. 96, 872.
Zinaman, M.J., Cartledge, T., Tomai, T., Tippett, P., Merriam, G.R., 1995. Pulsatile GnRH stimulates normal cyclic ovarian function in amenorrheic lactating postpartum women. J. Clin. Endocrinol. Metab. 80, 2088–2093.

Article 4

Prolactin regulates anterior pituitary cell renewal during estrous cycle

Ferraris Jimena, Zarate Sandra, Jaita Gabriela, Boutillon Florence, Bernadet Marie, **Auffret Julien**, Ogando Mora, Seilicovich Adriana, Binart Nadine, Goffin Vincent, Pisera Daniel.

American Journal of Physiology (En cours de soumission)

Prolactin regulates anterior pituitary cell renewal during the estrous cycle

Jimena Ferraris[1], Sandra Zárate[1], Gabriela Jaita[1], Florence Boutillon[2], Marie Bernadet[2], Julien Auffret[3], Mora Ogando[1], Adriana Seilicovich[1], Nadine Binart[3], Vincent Goffin[2], Daniel Pisera [1]

1- Instituto de Investigaciones Biomédicas, UBA-CONICET, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

2- Inserm, U845, Centre de Recherche "Croissance et Signalisation", Equipe "Physiopathologie des hormones PRL/GH", and Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, site Necker, Paris, F-75015 France.

3- Inserm U693 and Université Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, UMR-S693, Le Kremlin-Bicêtre, F-94276 France.

Abbreviated title: Prolactin and anterior pituitary cell renewal

Corresponding author: Pisera, Daniel. dpisera@fmed.uba.ar. Facultad de Medicina, Paraguay 2155, Piso 10, Lab. 10 (1422) CABA-Argentina. +54 11 5950 9500 #2156

Abstract

The cell turnover in anterior pituitary of female rats is coordinated by circulating levels of gonadal steroids. During proestrus the rate of anterior pituitary apoptosis is the highest and a peak in circulating levels of prolactin (PRL) occurs. Since we have previously demonstrated that PRL exert autocrine/paracrine actions on anterior pituitary cells inducing apoptosis and decreasing proliferation, the aim of this study was to investigate the in vivo effect of PRL on female anterior pituitary cell proliferation and apoptosis rates.

The administration of PRL and sulpiride-induced hyperprolactinemia decreased proliferation and increased apoptosis in anterior pituitary gland of ovariectomized rats. Apoptosis in anterior pituitary gland of female mice was higher during proestrus than during diestrus. These variations were not observed in PRLR KO mice, suggesting that PRL is involved in the peak of anterior pituitary cell apoptosis that occurs during proestrus.

We evaluated if PRL receptor (PRLR) expression varies along the estrous cycle and if PRL regulates its own receptor expression in the anterior pituitary gland, using female transgenic mice that systemically express PRLR antagonist Δ1-9-G129R-hPRL (TG). PRLR isoforms expression, measured by real time PCR, was variable along the estrous cycle and PRLR antagonism modified the expression of PRLR in an isoform-specific manner. These results suggest that endogenous PRL regulates its anterior pituitary actions by modifying the expression of PRLR isoforms.

Our observations suggest that PRL is involved in the maintenance of cell renewal in the anterior pituitary that occurs during each estrous cycle in females. Alterations in this physiological role of PRL could contribute to pituitary tumor development.

Keywords: prolactin, anterior pituitary, apoptosis and proliferation, estrous cycle, prolactin receptor isoforms, PRLR KO, Δ1-9-G129-hPRL.

Introduction

Prolactin (PRL) is a hormone secreted by lactotrope cells in the anterior pituitary. Since many pituitary cells, including lactotropes, express the PRL receptor (PRLR) (10, 19, 20, 32), PRL is assumed to participate in the regulation of anterior pituitary functions including its own tissue homeostasis. However, the mechanisms involved in anterior pituitary cell renewal remain largely uncharacterized. In male mice, we recently demonstrated that endogenous PRL exerts an antiproliferative effect in the anterior pituitary. In addition, we reported that in vitro blockade of PRLR activation using a specific PRLR antagonist increased cell proliferation and decreased apoptosis of anterior pituitary cells (11). These findings strongly support the hypothesis that PRL secreted by lactotropes participates in anterior pituitary cell turnover as an autocrine/paracrine antiproliferative and proapoptotic factor. The regulation of pituitary homeostasis is a more complex process in females, in which the anterior pituitary gland undergoes remodeling along the estrous cycle (7) and under many physiological conditions such as pregnancy and lactation, when it has to respond to physiological demands (15). Anterior pituitary cell turnover is about 1.5% per day in male rats (22), whereas mitotic activity doubles this value in the anterior pituitary gland of cycling female rats (23). During each estrous cycle, a peak of proliferation occurs at estrus (14) whereas the highest rate of apoptosis is observed at proestrus (35, 36). This cell turnover is a highly regulated process in which several factors, such as estradiol (37, 38), dopamine, (26, 27), and 16 kDa PRL (12), were demonstrated to participate.

PRLR belongs to Class I cytokine receptor family and exists as at least two isoforms referred to as long and short PRLR, resulting from alternative splicing of primary transcripts. In mice, one long ($PRLR_{long}$) and three short isoforms ($PRLR_{short}$), called S1, S2 and S3 have been identified (2). The expression of PRLR isoforms varies in different tissues and under different physiological conditions. Short and long variants are co-expressed in many tissues, including the rat pituitary (20) and male mouse anterior pituitary gland (11). These receptor isoforms differ in their C-terminal intracellular domain (4), which modulates their respective signaling capabilities through JAK/STAT, MAPK and PI3K/Akt pathways (2, 5). Consequently, the relative amount of the distinct PRLR subtypes expressed in a tissue may ultimately impact on PRL actions (4). PRLR expression is a hormone-regulated process, and interestingly, the ratio of short and long

isoforms has been reported to vary along the estrous cycle in ovary, uterus, hypothalamus and rat pituitary (20).

Since a surge in PRL secretion occurs at proestrus, this hormone could be involved in the control of anterior pituitary cell turnover taking place along each estrous cycle in females. Therefore, in this study we designed a series of in vivo experiments to investigate the effects of PRL in anterior pituitary cell proliferation and apoptosis in female rats and mice. In addition, as PRL regulates the expression of its own receptor in male anterior pituitary (11), we evaluated the variations of PRLR expression in the anterior pituitary from female mice at proestrus and diestrus, and the effect of endogenous PRL in those variations using transgenic mice systemically expressing the pure PRLR antagonist Δ1-9-G129R-hPRL.

Materials and Methods

Drugs

All drugs, media and supplements were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) except from fetal calf serum (Natocor, Argentina), amphotericin B, essential aminoacids and gentamicin, (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), all terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling (TUNEL) reagents (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), anti-bromodeoxyuridine antibody (anti-BrdU) (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) and the reagents described below.

Animals

This study was approved by the Comité Régional d'Éthique pour l'Expérimentation Animale, Ile-de-France, Université Paris Descartes, by the Ministère de l'Agriculture and the Institutional Animal Care and Use Committee of the School of Medicine, University of Buenos Aires. Mice and rats were housed in controlled conditions of light (12-hour light-dark cycles) and temperature (20–22 ºC), and were fed ad libitum.

In vivo treatments of female rats

Adult Wistar female rats (200-220 g) were ovariectomized (OVX) under ketamine (100 mg/kg, i.p.) and xylazine (10 mg/kg, i.p.) anesthesia and ketoprofen (5mg/kg) for analgesia 2 weeks before treatments.

Rats were injected with ovine PRL (oPRL) (1 mg/kg, i.p) or vehicle (NaCl 0.9%. This dose of PRL induces serum concentrations of about 700 ng/ml at 30 min and 500 ng/ml 1 h after i.p. administration (17). After 1 h, rats were injected with bromodeoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg) (11) and euthanized 5 h later.

In other experiment, rats were injected with the D2R antagonist sulpiride (5 mg/kg, i.p.) (28) and BrdU (50 mg/kg) and killed 6 h later. Anterior pituitary glands were removed within minutes after decapitation. Cells were dispersed and fixed. For this procedure, anterior pituitary glands were washed with Dulbecco Eagle's Modified Medium (DMEM) with 3 mg/ml bovine serum albumin (DMEM-BSA). Then, anterior pituitaries were cut into small fragments, and dispersed enzymatically by successive incubations in DMEM-BSA containing 0.75% trypsin, 10% charcoal-dextran adsorbed fetal calf serum (FCS) and 45 U/ml deoxyribonuclease type I (DNAse). Finally, the cells were dispersed by extrusion through a Pasteur pipette in Krebs buffer without Ca^{2+} and Mg^{2+}. Dispersed cells were washed and resuspended in DMEM with 10% FCS. In all procedures, cell viability as assessed by trypan blue exclusion was over 90%. Cells were fixed using ice-cold 70% ethanol in PBS overnight at -20ºC. Then, cells were processed for cell cycle analysis and BrdU incorporation detection.

Genetically-modified mouse models

This study was performed using two complementary PRLR-related genetically-modified mouse models. First, to evaluate the role of PRLR signaling in the control of anterior pituitary apoptosis along the estrus cycle, we used PRLR knockout (KO) mice in which PRLR signaling is totally abolished due to the absence of PRLR expression. These mice were generated on C57BL/6 genetic background as previously described (24). Two to 3 month-old cycling female mice (PRLR KO and wild type (WT) littermates) were euthanized by cervical dislocation at diestrus or proestrus, as determined by daily vaginal smears. Pituitaries were removed within minutes, weighed and processed for TUNEL assay. To evaluate the role of PRL in the control of PRLR expression, we used

Δ1–9-G129R-hPRL transgenic (TG) female mice in which systemic expression of the pure PRLR antagonist Δ1–9-G129R-hPRL impairs PRLR signaling. These mice were generated on BALB/c-J background as previously described (29). Twelve month-old TG female mice and WT littermates were sacrificed at proestrus or diestrus and pituitaries removed as described above. After neurointermediate lobe removal, anterior pituitaries were processed for RNA extraction.

Cell cycle analysis by flow cytometry

After fixation, cells were centrifuged and DNA was stained with propidium iodide (PI, 50 μg/ml) in PBS containing ribonuclease (10 μg/ml) for 20 min at 37 °C. Fluorescence intensity of ≥ 6,000 gated cells/tube was analyzed by flow cytometry (FACS) using a FACScan (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Cells with a PI staining intensity lower than the G0/G1 peak were considered hypodiploid. Analysis of DNA content and determination of Sub G0/G1 (hypodiploid cells), G0/G1, S and G2/M-phases of the cell cycle was performed using WinMDI 98 and Cylcherd 1.2 softwares.

BrdU incorporation detection by flow cytometry

BrdU incorporation detection was performed by FACS. After fixation in ice-cold ethanol as described above, cells were centrifuged and incubated in a solution containing 1% paraformaldehyde (PFA), 0.01% Tween-20 1 h at 20ºC. Then, cells were incubated with DNAse I 100 U/ml diluted in NaCl 0.15 M, $MgCl_2$ 4.2 M pH 5 for 25 min at 37ºC, centrifuged and incubated with a fluorescein (FITC)-conjugated anti-BrdU antibody or the corresponding isotype control (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) for 40 min at 20ºC. Cells were washed with PBS and incubated with 1% PFA for 15 min. After centrifugation, cells were resuspended in PBS until FACS analysis. Fluorescence intensity of ≥6,000 gated cells/tube was analyzed by flow cytometry using a FACScan (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Analysis of BrdU positive cells was performed using WinMDI 98 software.

TUNEL assay

Pituitaries were removed within minutes, weighed, fixed in 4% PFA in PBS (pH 7.4) for 4 h and embedded in paraffin. Sections (4 μm) were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded ethanol. Antigen retrieval was performed by microwave irradiation. For TUNEL assay, DNA strand breaks were labeled with digoxigenin-

deoxyuridine triphosphate using terminal deoxynucleotidyl transferase (0.18 U/µl) according to the manufacturer's protocol. After incubation with 10% sheep serum in PBS for 90 min, sections were incubated with antidigoxygenin- FITC antibody (1:10) to detect incorporation of nucleotides into the 3'-OH end of damaged DNA. Sections were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) containing 4, 6 diamidino-2-phenylindoledihydrochloride (DAPI) for DNA staining and visualized in a fluorescent light microscope (Axiophot, Carl Zeiss, Jena, Germany). Since the number of TUNEL-positive cells in sections from in vivo studies was very low, apoptosis was expressed as the number of TUNEL-positive cells/field as previously described (11, 25). Cells from the neurointermediate lobe were excluded from the count. TUNEL-positive anterior pituitary cells were counted on 10–20 fields (x 400) in anterior pituitary sections from each mouse. The mean of TUNEL-positive cells per field from each mouse was considered an individual value (11, 25)

RNA extraction and Real-Time PCR

Anterior pituitaries were extracted, washed in RNAeasy Solution (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA, USA) and immediately frozen in liquid nitrogen. RNA was extracted using RNAeasy Micro Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. Briefly, frozen anterior pituitaries were homogenized using a cold mortar and pestle and placed in 350 µl of RTL lysis buffer (Qiagen) containing β-mercaptoethanol, re-homogenized with a needle and centrifuged. The supernatant was washed with 70% ethanol, centrifuged, and transferred onto an RNAeasy spin column (Qiagen). RNA was collected with 14 µl RNAse-free water and stored at -80 ºC. Reverse transcription was performed using SuperScript II Reverse Transcriptase according to the manufacturer's protocol. One hundred twenty five ng of total RNA were reverse transcribed. After incubation for 5 min at 65 ºC with 1 µl oligo (dT) and 1 µl of dNTP Mix, RNA samples were incubated for 2 min at 42 ºC with a mix containing DTT and RNAse OUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After addition of 1 µl SuperScript II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), samples were incubated for 50 min at 42 ºC and the reaction was heat-inactivated (70 ºC for 15 min). Finally, samples were treated with RNAse H (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to remove any possible RNA complementary to cDNA.

For Real Time PCR, we used a forward primer mapping mouse PRLR extracellular domain (ECD) common to all isoforms, and a reverse primer specific to intracellular

domains (ICD) of mouse $PRLR_{long}$, S1, S2 or S3 $PRLR_{short}$ isoforms (11); cyclophilin was used as a reference as previously described (11). All primers were obtained from Eurogentec (Angers, France).

Real Time PCR was performed using an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System. For each reaction, 25 µl of solution containing 5 µl cDNA, 0.25 µl of 20 µM forward and reverse primers and 12.5 µl Power SyberGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) were used. All reactions were performed in duplicate. Negative controls included amplification of RNA (without reverse transcription) and water. Amplification was initiated by a 2 min pre-incubation at 50 °C, followed by 40 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 1 min, 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, terminating at 95 ºC for the last 15 s (melting).

Expression levels were normalized to mouse cyclophilin expression, performed in parallel as endogenous control (11). Real Time-PCR data were analyzed by calculating the $2^{-\Delta Ct}$ value for each experimental unit, Ct being the cycle threshold number and ΔCt being the difference between the Ct values for each PRLR isoform and cyclophilin (11). In Table 1, the percentage of expression of each PRLR isoform was calculated relative to the expression of total PRLR in WT or TG mice for each estrous cycle stage. In Fig. 6, data for each PRLR isoform mRNA were expressed relative to PRLR expression in proestrus WT mice.

Statistical Analysis

Data were expressed as mean ± SEM. The significance of the differences between means was determined by Student's *t* test or two-way ANOVA followed by Tukey's test. Differences were considered significant if $p<0.05$. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4 software.

Results

In vivo effects of PRL on apoptosis and proliferation of anterior pituitary cells from female rats

In order to study the effect of PRL treatment on apoptosis and proliferation of anterior pituitary cells, rats were injected with oPRL (11). Female rats were previously ovariectomized to ensure low and stable plasma levels of endogenous prolactin. Apoptosis, as determined by the percentage of cells with hypodiploid DNA content, significantly increased under oPRL treatment (Fig. 1). When we studied cell-cycle progression, we observed that oPRL treatment decreased the number of anterior pituitary cells in G2/M phase without altering the percentage of cells in G0/G1 or S-phase (Fig. 2 A-C). Proliferation was also assessed by BrdU incorporation. In vivo oPRL treatment decreased the percentage of BrdU-positive cells (Fig. 2D). These results indicate that PRL induces proapoptotic and antiproliferative effects in the anterior pituitary gland of female rats.

Effects of sulpiride on apoptosis and proliferation in the anterior pituitary gland of female rats

Besides its inhibitory action on PRL secretion, dopamine modulates anterior pituitary cell turnover by inducing apoptosis and decreasing proliferation of lactotropes (1, 27). Hypothalamic dopaminergic neurons express PRLR, and variations in serum PRL levels induce changes in the dopaminergic tone (1). Since PRL administration leads to an increase in dopamine reaching the anterior pituitary (13), the alteration of anterior pituitary cell turnover observed under oPRL administration could be due, at least in part, to the action of dopamine. To avoid such a dopamine effect, we induced hyperprolactinemia by the administration of sulpiride, a dopamine D2R antagonist. Similary to what was observed in rats injected with oPRL, sulpiride treatment increased the percentage of apoptotic anterior pituitary cells (Fig. 3). Although no significant changes were observed at any phase of the cell cycle (Fig. 4 A-C), administration of sulpiride decreased BrdU incorporation in the anterior pituitary gland (Fig. 4 D). These

results suggest that it is PRL itself and not dopamine which directly exerts antiproliferative and proapoptotic actions in anterior pituitary cells.

Effect of PRL on anterior pituitary cell apoptosis during the estrous cycle

Prolactin plasma levels are relatively constant during the estrous cycle, except at proestrus, when a sharp increase in PRL secretion occurs as a result of high circulating levels of estrogens (13). The proestrus PRL peak coincides with the highest rate of apoptosis in the anterior pituitary. To evaluate whether the proapoptotic effect of PRL is involved in anterior pituitary cell renewal occurring in each estrous cycle, we determined the rate of apoptosis in the anterior pituitary gland from PRLR KO mice euthanized at proestrus or diestrus (Fig. 5). As expected in 2-3 month old mice, no difference in pituitary weight was observed in PRLR KO mice versus WT littermates (33) (Fig. 5 A, B).

In WT female mice, anterior pituitary cell apoptosis was higher at proestrus than at diestrus, as occurs in female rats (14, 36) (Fig. 5A). In sharp contrast, when PRLR signaling is totally abolished (i.e. in PRLR KO mice), the number of apoptotic anterior pituitary cells is markedly decreased compared to WT mice at both proestrus and diestrus (Fig. 5 C). These results strongly suggest that PRL is involved in the peak of apoptosis observed in the pituitary gland at proestrus.

Expression of PRLR isoforms in the anterior pituitary along the estrous cycle and effect of PRL on PRLR expression

The ultimate effect of a given hormone depends on the number and subtypes of receptors expressed in target cells under different conditions. We have previously reported that PRL regulated the expression of its own receptor in the anterior pituitary of male mice, increasing the expression of the long PRLR isoform (11). Since apoptosis in the anterior pituitary varies during the estrous cycle, and since our present observations suggest that PRL is involved in this process, we studied PRLR expression in anterior pituitaries of female mice during the estrous cycle. This analysis was performed using WT and TG mice expressing the pure PRLR antagonist Δ1-9-G129R-hPRL, which competes with endogenous PRL for PRLR activation (11, 29) .

Chronic blockade of PRLR signaling by the PRLR antagonist resulted in an increased pituitary weight in 12 month-old female TG mice (Fig 6A), whereas the body weight was not different between WT and TG mice (Fig. 6B).

In WT, the expression of $PRLR_{short}$ isoform was lower at diestrus than at proestrus, whereas $PRLR_{long}$ expression did not change. The expression of $PRLR_{long}$ in TG mice at diestrus was approximately 6 times higher than in WT mice (Fig. 6 C), while the expression of $PRLR_{short}$ during proestrus was inhibited by the chronic blockade of PRLR (Fig. 6 D). PRLR expression varied during the estrous cycle. Whereas at proestrus, WT female mice expressed similar amounts of $PRLR_{long}$ and $PRLR_{short}$, the long isoform was the major isoform expressed in the anterior pituitary at diestrus as a result of the reduction of $PRLR_{short}$ expression at this stage of the estrous cycle (Table 1). These results show that the expression of PRLR isoforms varies along the estrous cycle, and suggest that PRL modulates its own receptor expression.

Discussion

In the present study we explored the action of PRL on cell renewal in the female anterior pituitary gland using different rat and mouse models. We show that PRL induces apoptosis and acts as an antiproliferative factor in anterior pituitary cells of females, as we previously reported for males (12).

PRL synthesis and secretion is mainly controlled by dopamine. This catecholamine also regulates lactotrope proliferation and apoptosis through its interaction with dopaminergic D2 receptors (D2R) (1, 27). Hypothalamic dopamine reaches the anterior pituitary gland via long and short portal vessels and tonically inhibits PRL secretion. When the dopaminergic tone decreases, serum PRL levels rise. Hypothalamic dopaminergic neurons express PRLR and are able to respond to changes in circulating PRL levels (21). As PRL rises, these neurons are stimulated to increase the dopaminergic tone, which in turn decreases lactotrope secretory activity (1). Lactotrope hyperplasia observed in D2R KO mice was initially attributed to the hyperprolactinemia resulting from the lack of dopaminergic signaling, suggesting that PRL could act as an autocrine growth factor for anterior pituitary cells (32). However, the fact that both PRL KO (9) and PRLR KO (33) mice develop pituitary hyperplasia indicated that PRL activity was not required for inducing pathological growth of lactotropes. Therefore, it

was suggested that the sole lack of dopamine signaling, as a result of either D2R inactivity or low activity of hypothalamic dopaminergic neurons because of the failure of PRL feedback, was sufficient to explain the dysregulation of lactotrope growth in these mouse models (9). However, in the present study we demonstrate that PRLR signaling actually induces an increase in apoptosis and a reduction in proliferation in the anterior pituitary gland from OVX rats, in accordance with our previous in vitro observations (11). In other words, PRL acts as an antiproliferative and proapoptotic autocrine/paracrine factor in the pituitary, which explains that abrogation of PRLR signalling in PRL KO or PRLR KO mice contributes to pituitary hyperplasia.

The administration of exogenous PRL alters the dopaminergic tone leading to an increase in the amount of dopamine arriving at the anterior pituitary gland. Considering that dopamine intrinsically exerts proapoptotic and antiproliferative effects on anterior pituitary cells (27, 32), the possibility that the rise in dopaminergic activity participates in the effects caused by PRL administration in vivo has to be considered. We showed that the administration of sulpiride, a D2R antagonist which induces hyperprolactinemia by D2R blockade, resulted in the same effects as PRL administration, i.e. increased apoptosis and decreased proliferation of anterior pituitary cells. These findings definitely confirm the direct effects of PRL on anterior pituitary cell turnover. It has been shown that PRLR/D2R double KO mice exhibited more marked pituitary hyperplasia and increased pituitary weight compared to single PRLR or D2R KO mice (33). Based on the evidence provided here that PRL, like dopamine, regulates anterior pituitary homeostasis by controling cell proliferation and apoptosis, our findings further support the earlier hypothesis of Schuff et al (33) that abrogation of these two individual pathways results in additive effects on the development of pituitary tumors in PRLR/D2R double KO mice.

In female rats, the homeostasis of anterior pituitary cell population is a closely hormone-regulated process. Cyclic changes in hormone profiles defining each stage of the estrous cycle are reflected not only in organs such as the uterus or ovary, but also in other sexual hormone-responsive tissues like the anterior pituitary gland. In the latter, apoptotic and proliferation rates vary along the estrous cycle: a peak in anterior pituitary cell proliferation takes place at estrus, whereas apoptosis is the highest at proestrus (14, 35). About 2.5% of lactotropes proliferate during estrus and therefore a similar number of these cells might die in order to maintain the size of the lactotrope

subpopulation (38). Different factors such as dopamine, (26, 27), estradiol (37, 38), 16 kDa PRL (12), TNF-α (6) and FasL (18) participate in this cell renewal. Since a surge of PRL secretion occurs during proestrus (13, 30), proapoptotic and antiproliferative effects of this hormone could be involved in anterior pituitary cell turnover during the estrous cycle. We found that, as occurs in rats (14, 23), the apoptotic rate varies during the estrous cycle in mice, being higher at proestrus compared to diestrus. The reduction in the anterior pituitary apoptosis rate and the lack of changes in apoptosis between proestrus and diestrus observed in PRLR KO female mice strongly suggest that PRL acts as a proapoptotic signal during the estrous cycle. At proestrus, the high circulating levels of estrogens induce an increase in PRL secretion (13) which, together with estradiol itself (37), induces apoptosis of anterior pituitary cells. Furthermore, PRL stimulates dopamine release from hypothalamic dopaminergic neurons to the portal vessels (1). Dopamine reaching the anterior pituitary could also contribute to the apoptosis observed in the gland at this stage of the estrous cycle. Estradiol also increases PRL cleavage into 16 kDa N-terminal fragments, which in turn induce apoptosis in an estrogen-dependent manner (12). In addition, PRL (11), dopamine (32) and 16 kDa PRL (12) are all antiproliferative factors for anterior pituitary cells, and their combined actions could explain the lowest rate of mitosis observed at proestrus (14). Finally, we showed that chronic blockade of PRLR by the prolactin receptor antagonist Δ1-9-G129R-hPRL increased the pituitary weight in TG female mice, as previously reported in males (31).

In summary, this study provides evidence that PRL participates in the regulation of anterior pituitary cell turnover along the estrous cycle.

Since different PRLR isoforms exhibit different capabilities to activate intracellular signaling pathways (16), the ultimate effect of PRL depends on the number and isoforms of receptors expressed in a target tissue. In the mouse ovary, the long isoform of PRLR is the most abundant, followed by S2 and S3 short isoforms (8). Mice expressing only the short PRLR isoform exhibit impaired follicular and corpora lutea development (3, 5), whereas mice expressing only the long isoform of the receptor present normal follicular but abnormal corpora lutea development, suggesting that the latter requires the expression of both PRLR isoforms . In the rat ovary, the ratio of long versus short PRLR expression varies during the estrous cycle (20). It has been reported that in the rat pituitary, the long isoform of the receptor is predominant both at proestrus

and diestrus, whereas overall PRLR expression is higher at diestrus (20). In the present study we show that the anterior pituitary from female mice expresses both PRLR isoforms, and that this expression varies along the estrous cycle. We observed that similar levels of short and long isoforms are expressed at proestrus, and that the reduction in the expression of the short isoform occurring during diestrus makes the long isoform the most abundant at this stage of the estrous cycle. These variations in anterior pituitary PRLR expression suggest that this phenomenon is modulated by fluctuating levels of circulating hormones along the estrous cycle.

We found that the main PRLR isoform expressed at diestrus was the $PRLR_{long}$ in female WT animals, similarly to our findings in male mice (11). It has been previously reported that the main isoform of PRLR expressed in anterior pituitaries from prepuberal female mice was $PRLR_{short}$ and that PRL treatment increased the expression of both isoforms of the receptor (34). The absence of variations in the endocrine context during estrous cycle in those animals could explain the discrepancies with our findings. We previously showed that PRLR blockade resulted in an increased expression of $PRLR_{long}$ in male TG mice (11). The present study shows that regulation of pituitary PRLR isoforms is more complex in females, as PRLR blockade resulted in an increased expression of $PRLR_{long}$ at diestrus, but decreased $PRLR_{short}$ expression at proestrus. In agreement with what was previously proposed (20), our findings suggest that PRL modulates the expression of its own receptor along the estrous cycle in an isoform-specific manner. The functional outcome and physiological relevance of such a complex PRLR regulation are currently unknown and deserves further investigation.

In conclusion, our studies demonstrate that PRL participates in maintaining anterior pituitary homeostasis through the control of cell turnover. Hence, we propose that chronic lack of physiological proapoptotic and antiproliferative actions of PRL, or changes in PRLR expression, could lead to pituitary hyperplasia and tumor development.

Acknowledgements

Grants

This work was supported by PICT 092 and PICT 0088 *Agencia Nacional de Promoción de Ciencia y Técnica* (ANPCYT) (PICT 092), *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas* (CONICET) (PIP 2010-2012) and University of Buenos Aires (UBACYT M057), Argentine; INSERM-CONICET *project conjoint de cooperation international* 2009-2010, Argentine and France; Association for International Cancer Research (AICR grant #05-0603), the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* and University Paris Descartes, France. Ferraris Jimena obtained fellowships from the ANPCyT (Argentina), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) (Argentina) and a *Bourse Doctorale Universitaire de Mobilité* from the *Université Paris Descartes* (France).

We also wish to thank Sophie Berissi, Christine Kayser and the personnel of the Animal Core Facility of Necker Faculty, and Cristina Deparci from Instituto de Investigaciones Biomédicas and Plácida Blas and Ariel Billordo, form Hospital de Clínicas, for their competence.

References

1. **Ben-Jonathan N, and Hnasko R**. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine reviews* 22: 724-763, 2001.
2. **Ben-Jonathan N, LaPensee CR, and LaPensee EW**. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine reviews* 29: 1-41, 2008.
3. **Binart N, Imbert-Bollore P, Baran N, Viglietta C, and Kelly PA**. A short form of the prolactin (PRL) receptor is able to rescue mammopoiesis in heterozygous PRL receptor mice. *Mol Endocrinol* 17: 1066-1074, 2003.
4. **Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, and Kelly PA**. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine reviews* 19: 225-268, 1998.
5. **Bouilly J, Sonigo C, Auffret J, Gibori G, and Binart N**. Prolactin signaling mechanisms in ovary. *Molecular and cellular endocrinology* 356: 80-87, 2012.
6. **Candolfi M, Jaita G, Zaldivar V, Zarate S, Pisera D, and Seilicovich A**. Tumor necrosis factor-alpha-induced nitric oxide restrains the apoptotic response of anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 80: 83-91, 2004.
7. **Candolfi M, Zaldivar V, Jaita G, and Seilicovich A**. Anterior pituitary cell renewal during the estrous cycle. *Frontiers of hormone research* 35: 9-21, 2006.
8. **Clarke DL, and Linzer DI**. Changes in prolactin receptor expression during pregnancy in the mouse ovary. *Endocrinology* 133: 224-232, 1993.
9. **Cruz-Soto ME, Scheiber MD, Gregerson KA, Boivin GP, and Horseman ND**. Pituitary tumorigenesis in prolactin gene-disrupted mice. *Endocrinology* 143: 4429-4436, 2002.
10. **Chiu S, Koos RD, and Wise PM**. Detection of prolactin receptor (PRL-R) mRNA in the rat hypothalamus and pituitary gland. *Endocrinology* 130: 1747-1749, 1992.
11. **Ferraris J, Boutillon F, Bernadet M, Seilicovich A, Goffin V, and Pisera D**. Prolactin receptor antagonism in mouse anterior pituitary: effects on cell turnover and prolactin receptor expression. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 302: E356-364, 2012.
12. **Ferraris J, Radl DB, Zarate S, Jaita G, Eijo G, Zaldivar V, Clapp C, Seilicovich A, and Pisera D**. N-terminal prolactin-derived fragments, vasoinhibins, are proapoptoptic and antiproliferative in the anterior pituitary. *PloS one* 6: e21806, 2011.
13. **Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, and Nagy G**. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological reviews* 80: 1523-1631, 2000.
14. **Hashi A, Mazawa S, Kato J, and Arita J**. Pentobarbital anesthesia during the proestrous afternoon blocks lactotroph proliferation occurring on estrus in female rats. *Endocrinology* 136: 4665-4671, 1995.
15. **Hodson DJ, Schaeffer M, Romano N, Fontanaud P, Lafont C, Birkenstock J, Molino F, Christian H, Lockey J, Carmignac D, Fernandez-Fuente M, Le Tissier P, and Mollard P**. Existence of long-lasting experience-dependent plasticity in endocrine cell networks. *Nat Commun* 3: 605, 2012.
16. **Jabbour HN, and Kelly PA**. Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. *Reviews of reproduction* 2: 14-18, 1997.
17. **Jahn GA, Daniel N, Jolivet G, Belair L, Bole-Feysot C, Kelly PA, and Djiane J**. In vivo study of prolactin (PRL) intracellular signalling during lactogenesis in

the rat: JAK/STAT pathway is activated by PRL in the mammary gland but not in the liver. *Biology of reproduction* 57: 894-900, 1997.
18. **Jaita G, Candolfi M, Zaldivar V, Zarate S, Ferrari L, Pisera D, Castro MG, and Seilicovich A**. Estrogens up-regulate the Fas/FasL apoptotic pathway in lactotropes. *Endocrinology* 146: 4737-4744, 2005.
19. **Morel G, Ouhtit A, and Kelly PA**. Prolactin receptor immunoreactivity in rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 59: 78-84, 1994.
20. **Nagano M, and Kelly PA**. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *The Journal of biological chemistry* 269: 13337-13345, 1994.
21. **Neill JDN, GM**. Prolactin secretion and its control. In: *The Physiology of Reproduction*, edited by KNOBIL EN, J.D. Raven Press, LTD, 1994, p. 1833-1860.
22. **Nolan LA, Kavanagh E, Lightman SL, and Levy A**. Anterior pituitary cell population control: basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment. *Journal of neuroendocrinology* 10: 207-215, 1998.
23. **Oishi Y, Okuda M, Takahashi H, Fujii T, and Morii S**. Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: influences of sex, estrous cycle, and circadian change. *Anat Rec* 235: 111-120, 1993.
24. **Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, and Kelly PA**. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes & development* 11: 167-178, 1997.
25. **Pisera D, Candolfi M, Navarra S, Ferraris J, Zaldivar V, Jaita G, Castro MG, and Seilicovich A**. Estrogens sensitize anterior pituitary gland to apoptosis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 287: E767-771, 2004.
26. **Radl DB, Ferraris J, Boti V, Seilicovich A, Sarkar DK, and Pisera D**. Dopamine-induced apoptosis of lactotropes is mediated by the short isoform of D2 receptor. *PloS one* 6: e18097, 2011.
27. **Radl DB, Zarate S, Jaita G, Ferraris J, Zaldivar V, Eijo G, Seilicovich A, and Pisera D**. Apoptosis of lactotrophs induced by D2 receptor activation is estrogen dependent. *Neuroendocrinology* 88: 43-52, 2008.
28. **Recouvreux MV, Guida MC, Rifkin DB, Becu-Villalobos D, and Diaz-Torga G**. Active and total transforming growth factor-beta1 are differentially regulated by dopamine and estradiol in the pituitary. *Endocrinology* 152: 2722-2730, 2011.
29. **Rouet V, Bogorad RL, Kayser C, Kessal K, Genestie C, Bardier A, Grattan DR, Kelder B, Kopchick JJ, Kelly PA, and Goffin V**. Local prolactin is a target to prevent expansion of basal/stem cells in prostate tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 15199-15204, 2010.
30. **Ryan KD, and Schwartz NB**. Changes in serum hormone levels associated with male-induced ovulation in group-housed adult female mice. *Endocrinology* 106: 959-966, 1980.
31. **S JF**. Encephalitis in the pediatric population. *Pediatr Rev* 33: 122-133, 2012.
32. **Saiardi A, Bozzi Y, Baik JH, and Borrelli E**. Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. *Neuron* 19: 115-126, 1997.
33. **Schuff KG, Hentges ST, Kelly MA, Binart N, Kelly PA, Iuvone PM, Asa SL, and Low MJ**. Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of clinical investigation* 110: 973-981, 2002.

34. **Shao R, Nutu M, Weijdegard B, Egecioglu E, Fernandez-Rodriguez J, Tallet E, Goffin V, Ling C, and Billig H**. Differences in prolactin receptor (PRLR) in mouse and human fallopian tubes: evidence for multiple regulatory mechanisms controlling PRLR isoform expression in mice. *Biology of reproduction* 79: 748-757, 2008.
35. **Yin P, and Arita J**. Proestrous surge of gonadotropin-releasing hormone secretion inhibits apoptosis of anterior pituitary cells in cycling female rats. *Neuroendocrinology* 76: 272-282, 2002.
36. **Zaldivar V, Magri ML, Zarate S, Jaita G, Eijo G, Radl D, Ferraris J, Pisera D, and Seilicovich A**. Estradiol increases the Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 90: 292-300, 2009.
37. **Zarate S, Jaita G, Zaldivar V, Radl DB, Eijo G, Ferraris J, Pisera D, and Seilicovich A**. Estrogens exert a rapid apoptotic action in anterior pituitary cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 296: E664-671, 2009.
38. **Zarate S, Zaldivar V, Jaita G, Magri L, Radl D, Pisera D, and Seilicovich A**. Role of estrogens in anterior pituitary gland remodeling during the estrous cycle. *Frontiers of hormone research* 38: 25-31, 2010.

Figure legends

Fig. 1 PRL increases anterior pituitary cell apoptosis in vivo

Ovariectomized rats (n=4 rats/group) were injected with ovine PRL (oPRL) (1 mg/kg, 6 h) or saline.

A: Apoptosis was determined by flow cytometry as the percentage of hypodiploid cells, using propidium iodide (IP). Each column represents the mean ± SEM of the percentage of sub-G1 cells.

*p< 0.05 vs. respective control animals injected with vehicle, Student's *t* test B: Representative histograms of fluorescence intensity of DNA content in anterior pituitary cells from OVX rats injected with vehicle or oPRL.

Fig. 2 PRL decreases anterior pituitary cell proliferation in vivo

Ovariectomized rats (n=4 rats/group) were injected with ovine PRL (oPRL) (1 mg/kg, 6 h) and BrdU (50 mg/kg, 5h) or saline.

A-C: Cell cycle was analyzed by flow cytometry using IP. Each column represents the mean ± SEM of the percentage of A: G0/G1-phase cells, B: S-phase cells and C: G2/M-phase cells. * p< 0.05 vs. respective control animals injected with vehicle, Student´s *t* test.

D: Proliferation rate was determined by BrdU incorporation and flow cytometry analysis. Each column represents the mean ± SEM of the percentage of BrdU-positive cells. *p< 0.05 vs. respective control animals injected with vehicle, Student´s *t* test.

E: Representative histograms of DNA content in anterior pituitary cells from control or oPRL-injected rats.

Fig. 3 Sulpiride increases anterior pituitary cell apoptosis in vivo

Ovariectomized rats (n=6 rats/group) were injected with sulpiride (5 mg/kg, 6 h) or saline.

A: Apoptosis was determined by flow cytometry as the percentage of hypodiploid cells, using IP. Each column represents the mean ± SEM of the percentage of sub-G1 cells. *p< 0.05 vs. respective control animals injected with vehicle, Student's *t* test.

B: Representative histograms of fluorescence intensity of DNA content of anterior pituitary cells from OVX rats injected with vehicle or sulpiride.

Fig. 4 Sulpiride decreases anterior pituitary cell proliferation in vivo

Ovariectomized rats (n=5-7 rats/group) were injected with sulpiride (5 mg/kg, 6 h) or saline, and with BrdU (50 mg/kg, 5h).

A-C: Cell cycle was analyzed by flow cytometry using IP. Each column represents the mean ± SEM of the percentage of A: G0/G1-phase cells, B: S-phase cells and C: G2/M-phase cells.

D: Proliferation rate was determined by BrdU incorporation and flow cytometry analysis. Each column represents the mean ± SEM of the percentage of BrdU-positive cells. *p< 0.05 vs. respective control animas injected with vehicle, Student *t* test.

E: Representative histograms of DNA content in anterior pituitary cells from control or sulpiride-treated rats.

Fig. 5 Anterior pituitary cell apoptosis varies along the estrous cycle and is decreased in PRLR KO mice

Wild type and PRLR KO mice (4-11 animals per group) were sacrificed at proestrus or diestrus. Apoptosis was determined by TUNEL assay in tissue sections.

A, B: Body weight (A) and pituitary weight (B) of WT and PRLR KO mice at proestrus or diestrus, expressed as mean ± SEM, two-way ANOVA.

C: Each column represents the percentage ± SEM of TUNEL-positive cells/field. *p<0.05 vs proestrus. ^^ p<0.01, ^p<0.05 vs respective proestrus or diestrus WT. Two-way ANOVA, followed by Tukey's test.

D: Representative microphotographs of anterior pituitaries from WT or KO mice euthanized at proestrus. Arrows heads indicate TUNEL-positive cells.

Fig. 6 PRLR antagonism increases the expression of the long isoform and decreases the expression of the short isoform of PRLR.

A, B: Body weight (A) and pituitary weight (B) of WT and TG, * p<0.05, Student's *t* test.

C, D: Expression of PRLR isoforms in the anterior pituitary from WT and TG mice expressing the PRLR antagonist Δ1-9-G129R-PRL, sacrificed at proestrus or diestrus. Real Time PCR was performed using specific primers for the PRLRs long and short (S1, S2, S3) isoforms. The Short 1 isoform is not expressed. Each column represents the relative increment ± SEM with respect to the expression of $PRLR_{long}$ (C) or $PRLR_{short}$ (D) in WT mice at proestrus (n≥5 animals/group). *p<0.05 vs respective proestrus, ^^p< 0.01 versus respective WT diestrus (C) or WT proestrus (D). Two-way ANOVA, followed by Tukey test.

Table 1

Relative percentage of each PRLR isoform expressed at proestrus or diestrus in WT or TG mice expressing the PRLR antagonist Δ1-9-G129R-PRL. ND: Not detected.

Table 1

	WT		TG	
%	**PROESTRUS**	**DIESTRUS**	**PROESTRUS**	**DIESTRUS**
$PRLR_{long}$	**55.0**	**97.31**	**71.65**	**98.28**
S1-$PRLR_{short}$	**ND**	**ND**	**ND**	**ND**
S2-$PRLR_{short}$	**0.93**	**1.68**	**0.74**	**0.18**
S3-$PRLR_{short}$	**44.07**	**1.01**	**27.61**	**1.54**
TOTAL	**100**	**100**	**100**	**100**

Fig. 1

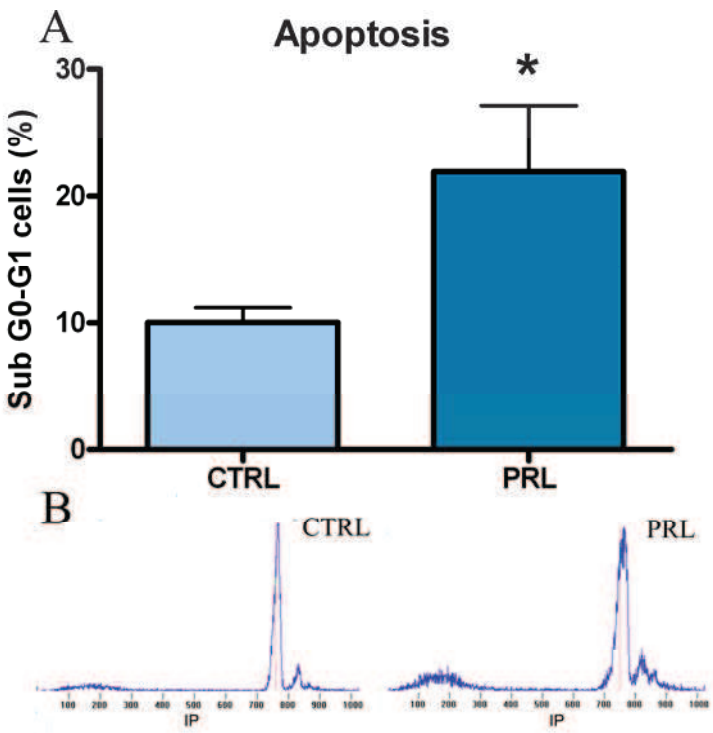


Fig. 2

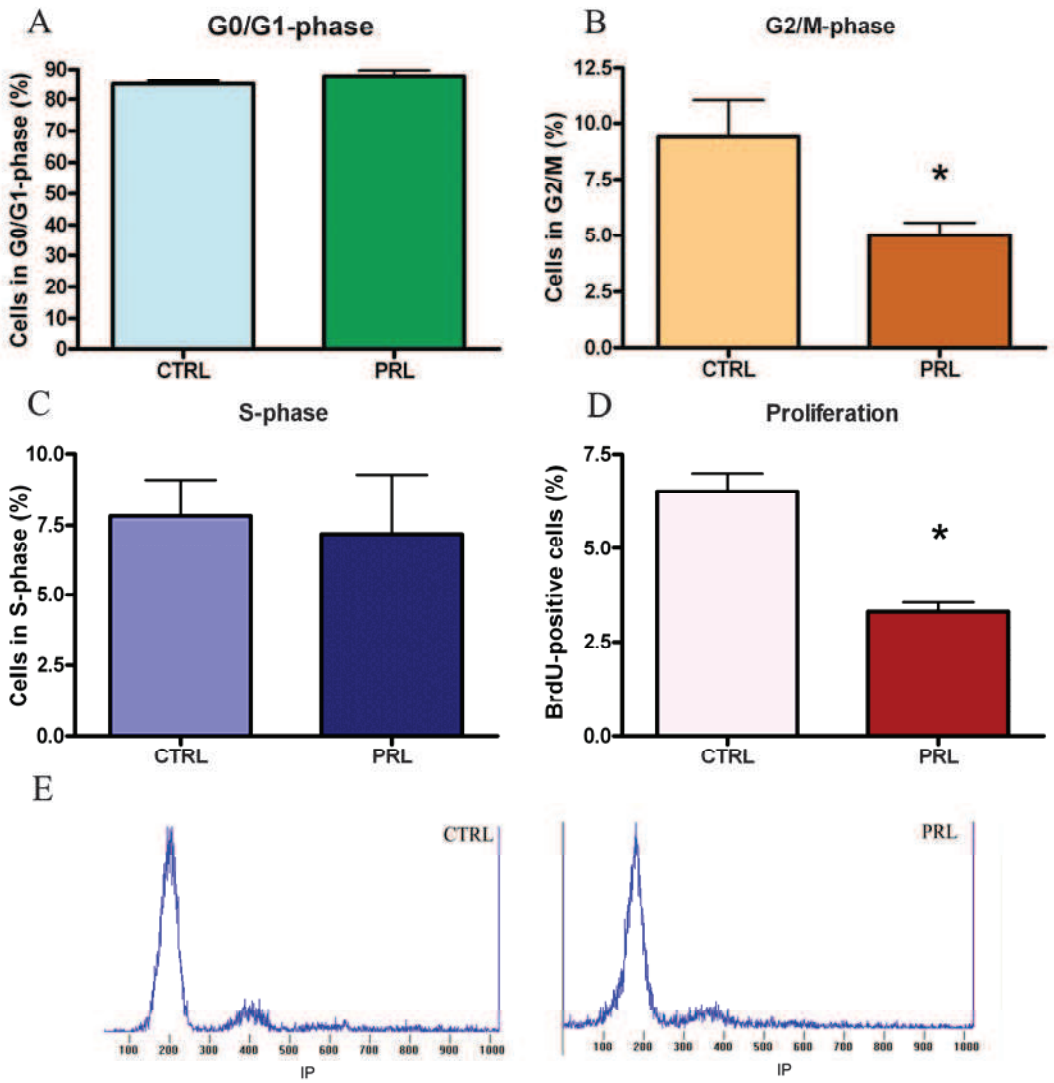

A
G0/G1-phase
Cells in G0/G1-phase (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CTRL
PRL
B
G2/M-phase
Cells in G2/M (%)
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
*
CTRL
PRL
C
S-phase
Cells in S-phase (%)
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
CTRL
PRL
D
Proliferation
BrdU-positive cells (%)
7.5
5.0
2.5
0.0
*
CTRL
PRL
E
CTRL
PRL
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
IP

Fig. 3

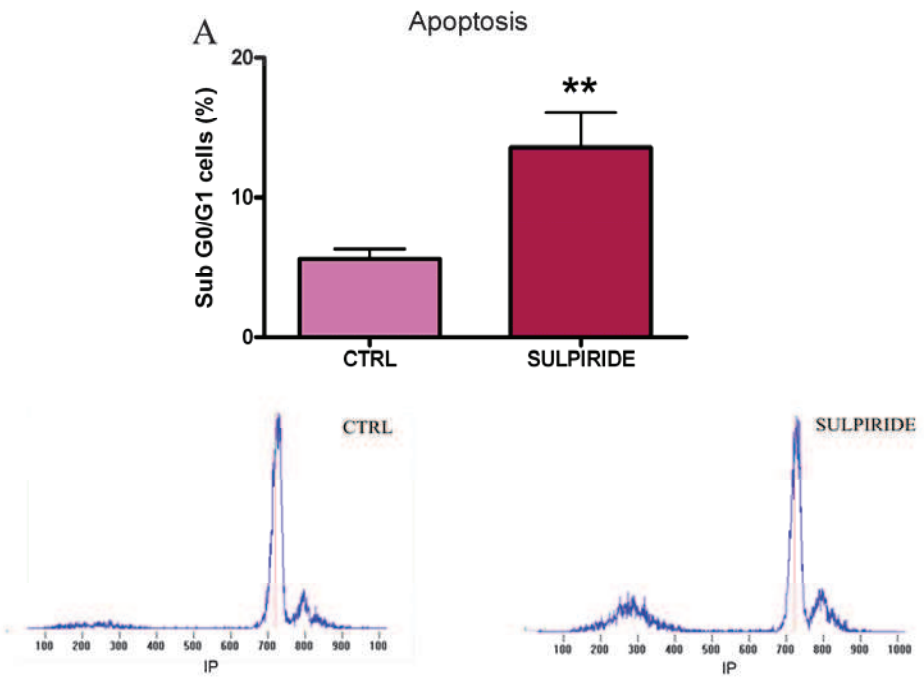

A
Apoptosis
Sub G0/G1 cells (%)
20
10
0
**
CTRL
SULPIRIDE
CTRL
SULPIRIDE
IP
IP

Fig. 4

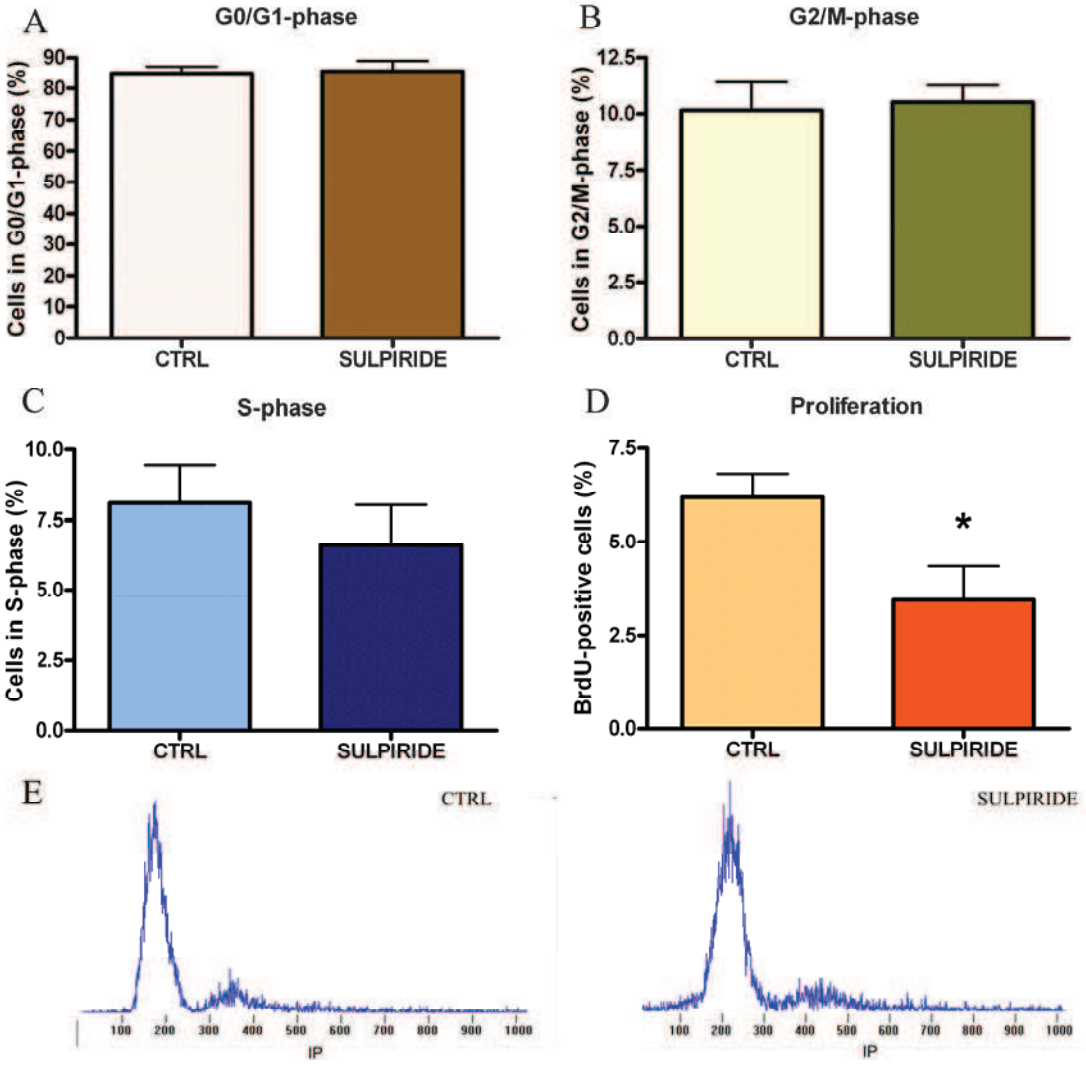

A
G0/G1-phase
Cells in G0/G1-phase (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CTRL
SULPIRIDE
B
G2/M-phase
Cells in G2/M-phase (%)
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
CTRL
SULPIRIDE
C
S-phase
Cells in S-phase (%)
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
CTRL
SULPIRIDE
D
Proliferation
BrdU-positive cells (%)
7.5
5.0
2.5
0.0
*
CTRL
SULPIRIDE
E
CTRL
100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000
IP
SULPIRIDE
100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000
IP

Fig. 5

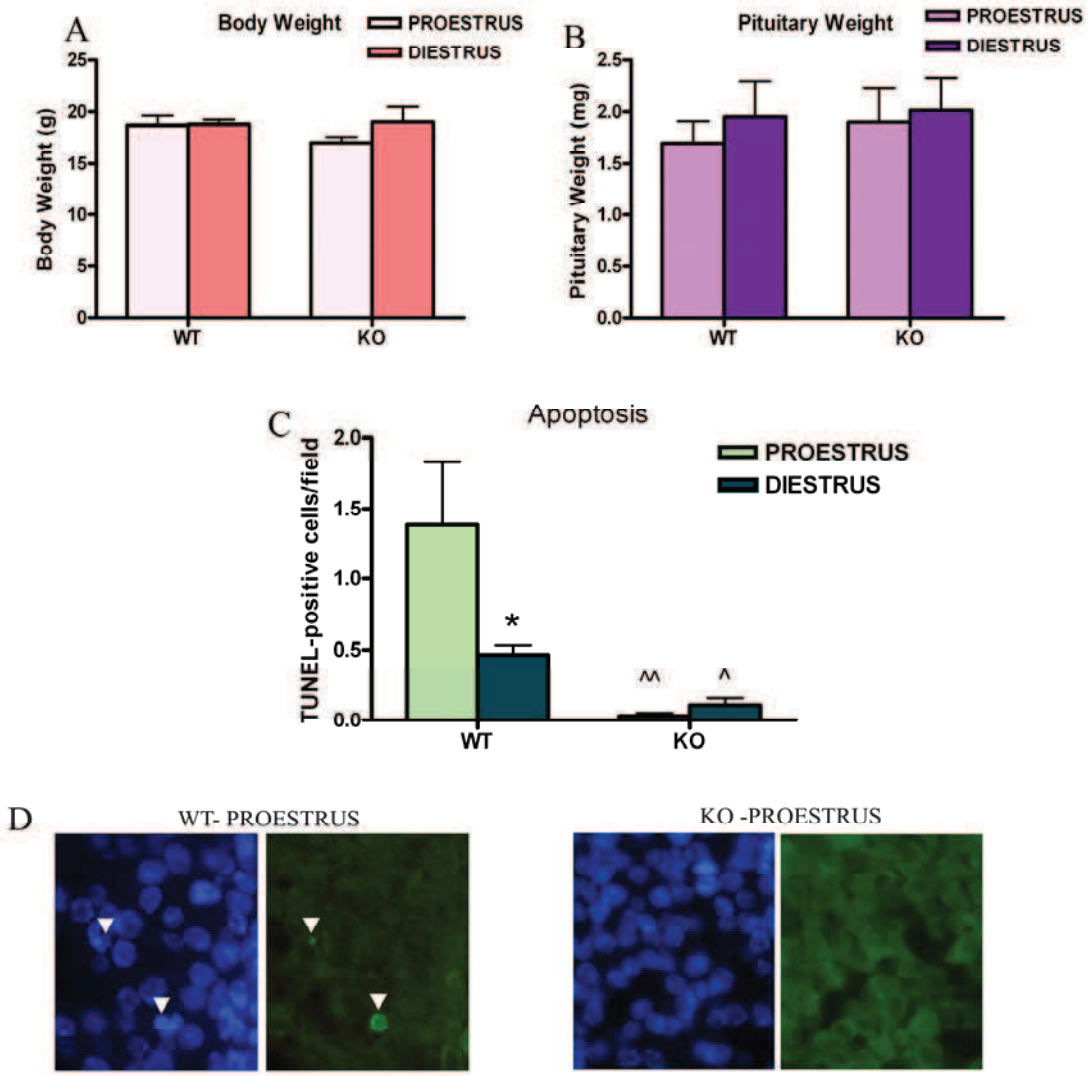
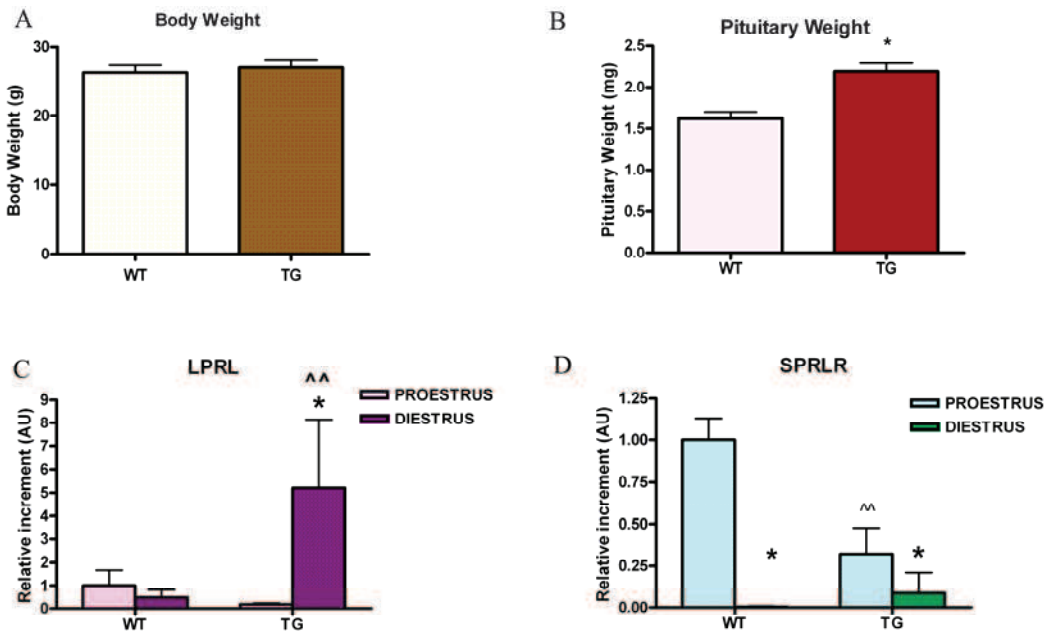

A
Body Weight
PROESTRUS
DIESTRUS
Body Weight (g)
25
20
15
10
5
0
WT
KO
B
Pituitary Weight
PROESTRUS
DIESTRUS
Pituitary Weight (mg)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
WT
KO
C
Apoptosis
PROESTRUS
DIESTRUS
TUNEL-positive cells/field
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
^^
^
WT
KO
D
WT- PROESTRUS
KO -PROESTRUS

Fig. 6


A
Body Weight
Body Weight (g)
30
20
10
0
WT
TG
B
Pituitary Weight
Pituitary Weight (mg)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
WT
TG
C
LPRL
Relative increment (AU)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
^^
*
PROESTRUS
DIESTRUS
WT
TG
D
SPRLR
Relative increment (AU)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
PROESTRUS
DIESTRUS
*
^^
*
WT
TG

Résumé

Pour étudier l'impact de la signalisation de la prolactine (PRL), une hormone impliquée dans la prolifération cellulaire sur l'adipocyte et la cellule β pancréatique, deux types cellulaires impliqués dans la balance énergétique, nous avons caractérisé le phénotype de souris déficientes en récepteur de la PRL (R PRL$^{-/-}$) sous différentes conditions physiopathologiques. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact du R PRL sur le développement d'une obésité induite par un régime obésogène. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'impact du R PRL sur l'ontogenèse des cellules β durant les adaptations périnatales. Nous avons aussi évalué son rôle sur la sécrétion d'insuline à l'âge adulte.

Notre première étude montre que les souris R PRL$^{-/-}$ sous régime obésogène ont une prise de poids réduite et une augmentation de la dépense énergétique comparées à celles des souris sauvages. Nous montrons que des adipocytes beiges, une nouvelle classe d'adipocytes thermoactifs récemment caractérisés et exprimant la protéine découplante UCP1, émergent dans le tissu adipeux blanc périrénal des souris R PRL$^{-/-}$ soumises à un régime gras. Nous avons démontré que le R PRL contribue à l'apparition des adipocytes beiges en modulant la voie de signalisation pRb/FoxC2 permettant la résistance à l'obésité induite par le régime gras.

Notre deuxième étude montre que la souris R PRL$^{-/-}$ et le rat GK, un modèle de diabète de type 2, ont un défaut d'adaptation de la masse des cellules β en période périnatale. Cette altération est corrélée à un défaut d'expression d'*igf2* (Insulin-like Growth Factor 2), une cible de la PRL. A partir d'îlots de Langherans de souris adultes, nous avons confirmé que le R PRL est essentiel à la sécrétion d'insuline.

Les résultats obtenus ont permis de mieux comprendre le rôle de la PRL sur la balance énergétique. Ces travaux ouvrent des perspectives nouvelles pour le développement de stratégies thérapeutiques dans la lutte contre l'obésité et le diabète de type II.

Abstract

In order to study the impact of prolactin (PRL) signaling on pancreatic β-cell and adipocyte, two cell types involved in energy balance, we characterized the phenotype of PRL receptor deficient mice (PRL R$^{-/-}$) under different physiopathological conditions. First, we studied the impact of PRL R on the development of obesity induced by a high fat diet. Second, we investigated the impact of PRL R on β-cell ontogenesis during perinatal adaptation and its role in insulin secretion during adulthood.

Our first study shows that PRL R$^{-/-}$ mice under obesogenic diet have a reduced weight gain and an increase of energy expenditure as compared to those of wild-type mice. We showed that beige adipocytes, a new class of thermogenic adipocytes recently characterized expressing uncoupling protein UCP1, emerged in the perirenal white adipose tissue of PRL R$^{-/-}$ mice challenged with a high fat diet. Altered expression of pRb/FoxC2 suggests that PRL R contributes to the development of beige adipocytes modulating this signaling pathway for resistance to high fat diet induced obesity.

Our second study shows that PRL R$^{-/-}$ mice do not adapt β-cell mass in perinatal period and this alteration is associated with a lack of *igf2* (Insulin-like Growth Factor 2) expression, a PRL target. We confirmed that R PRL is essential for insulin secretion using β islets in adult animals.

These results lead to a better understanding of the PRL role on energy balance, and open new perspectives for the development of therapeutic strategies in obesity and type II diabetes.

Discipline : Endocrinologie Cellulaire et Moléculaire

Mots clés : Récepteur de la prolactine, adipocyte, thermogenèse, régime obésogène, cellule β, adaptations périnatales.

Intitulé et adresse du laboratoire où la thèse a été réalisée :

Inserm U693

Récepteurs Stéroïdiens, Physiopathologie Endocrinienne et Métabolique.

Faculté de Médecine Paris-Sud, 63 rue Gabriel Péri, 94276 Le Kremlin-Bicêtre.

Directeur du laboratoire: Dr Marc LOMBES

Directeur de thèse : Dr Nadine BINART