



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DE NANCY I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I
OPTION "BIOCHIMIE"



par

Franck FELDEN

Pharmacien-Biologiste, Assistant Hospitalo-Universitaire

**CARACTERISATION D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE
DE L'ANDROGEN-BINDING PROTEIN
AU NIVEAU EPIDIDYMAIRE ET TESTICULAIRE CHEZ LE RAT**

Travaux effectués sous la direction du Professeur J.L. GUEANT dans le Laboratoire de Biochimie
Nutritionnelle de la Faculté de Médecine de Nancy

Soutenu publiquement le 31 Octobre 1992 devant la commission d'examen composée de :

Président	J.L. GUEANT	Professeur à l'Université de Nancy I
Rapporteurs	H. DEGRELLE, E.A. NUNEZ	Professeur à l'Université de Paris VI Professeur à l'Université de Paris VII
Examineurs	M. DAUCA H. GERARD G. GRIGNON M. METCHE P. NABET J.P. NICOLAS	Professeur à l'Université de Nancy I Professeur à l'Université de Nancy I Professeur à l'Université de Nancy I Professeur à l'Institut Polytechnique de Lorraine Professeur à l'Université de Nancy I Professeur à l'Université de Nancy I

A Christine et à "ma bouille"
pour le bonheur et l'énergie
qu'elles me procurent,

A la mémoire de ma Mère,

A mon Père qui m'a appris la réflexion et le sens de la
vie,

A Brice, mon frère et ami de toujours,

A ma famille et belle-famille,

A tous mes amis.

A mon Directeur de thèse et Président du Jury,
Monsieur le Professeur Jean-Louis GUEANT:

Ce travail a pu voir le jour et se développer grâce à vos qualités scientifiques, votre grande ouverture d'esprit et votre dynamisme. C'est grâce à la passion que vous manifestez pour la recherche et à votre aide constante que j'ai trouvé la force de mener à bien ce travail. Je voudrais vous exprimer ici ma profonde gratitude et vous assurer de ma sincère amitié .

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre NICOLAS:

Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire il y a quatre ans à l'occasion d'une année-recherche au cours de mon internat et, depuis, je ne l'ai plus quitté. J'ai toujours apprécié, dans des circonstances professionnelles et extra-professionnelles, vos grandes qualités humaines et scientifiques. Je vous exprime ici ma reconnaissance et vous remercie de l'amitié que vous voulez bien me manifester.

A Monsieur le Professeur Pierre NABET:

Je vous remercie de m'avoir accepté comme assistant hospitalo-universitaire au sein de votre service hospitalier. J'ai toujours apprécié l'étendue de vos connaissances en biochimie et votre grande pédagogie. Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Emmanuel-Adrien NUNEZ:

Vous m'avez permis de travailler dans votre laboratoire. J'ai été très sensible à l'étendue de votre culture scientifique et à vos grandes qualités humaines. Je tiens à vous remercier de vous être impliqué de façon importante dans la correction de ce mémoire, de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et d'en être rapporteur. Je vous exprime ici ma profonde estime.

A Monsieur le Professeur Hervé DEGRELLE:

Vous m'avez toujours reçu avec beaucoup d'hospitalité et de gentillesse dans votre laboratoire lors de nos entrevues. Vous me faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail et d'en être rapporteur sur un sujet où vos travaux sont une référence.

A Monsieur le Professeur Hubert GERARD et madame Anne GERARD:

Vous avez été à l'origine de ce travail auquel vous avez participé activement. Votre grande compétence dans la biologie cellulaire des "binding-proteins" et l'intérêt immense que vous porter à ces recherches ont toujours été un soutien efficace pour mon travail de recherche. C'est grâce à votre dynamisme que ce travail a pu être mené à bien. Je vous adresse ici ma plus sincère gratitude et vous remercie, monsieur le professeur, de juger cette thèse.

A Monsieur le Professeur Georges GRIGNON:

Le travail et la compétence des chercheurs de votre laboratoire ont contribué notablement à la réalisation de ce mémoire. Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Michel DAUÇA:

Je vous remercie de l'accueil que vous m'avez réservé lors de notre entrevue dans votre laboratoire. Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de participer à ce jury.

A Monsieur le Professeur Maurice METCHE:

Qu'il me soit permis ici de vous témoigner ma gratitude pour la gentillesse avec laquelle vous avez accepté de bien vouloir juger cette thèse.

A Madame Marie-élie MARTIN

Je te remercie vivement de ton accueil, de ton aide, de ton grand savoir-faire et de ta gentillesse permanente. C'est grâce à ta participation active que ce travail a pu être mené à bien.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes du laboratoire de biochimie nutritionnelle et plus particulièrement à Sophie Frémont, Daniel Lambert, Hervé Schohn et Dominique Guillaume.

Je remercie Claudine Bennassayag et toutes les personnes de l'Unité U 224 pour l'accueil qu'elles m'ont réservé lors de mes fréquents passages au laboratoire.

Je tiens également à remercier Bruno Leheup pour notre collaboration et sa grande connaissance de la biologie, et madame Monique Egloff.

Enfin je remercie toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail.

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Biochimie Nutritionnelle (Faculté de Médecine, Université de Nancy I), sous la direction du Professeur J.L. Guéant. Elle fait référence aux publications qui sont citées dans le texte (en chiffres romains) et qui figurent *in extenso* à la fin de chaque chapitre:

I. FREMONT S., GUEANT J.L., FELDEN F., EGLOFF M., GERARD A., NICOLAS J.P. (1990)

Dihydrotestosterone binding capacity of androgen-binding protein in tissue extract using high performance size exclusion chromatography.

Journal of Chromatography, 526, 186-193.

II. GUEANT J.L., FREMONT S., FELDEN F., NICOLAS J.P., GERARD A., LEHEUP B., GERARD H., GRIGNON G. (1991)

Evidence that androgen-binding protein endocytosis in vitro is receptor-mediated in principal cells of the rat epididymis.

Journal of Molecular Endocrinology, 7, 113-122.

III. FELDEN F., LEHEUP B., FREMONT S., BOUGUERNE R., EGLOFF M., NICOLAS J.P., GRIGNON G., GUEANT J.L. (1992)

The plasma membrane of epididymal epithelial cells has a specific receptor which binds to androgen-binding protein and sex steroid-binding protein.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 42, 279-285.

IV. FELDEN F., GUEANT J.L., ENNYA A., FREMONT S., GERARD A., NICOLAS J.P., GERARD H. (1992)

Photoaffinity labelled rat androgen-binding protein and human sex-steroid binding protein bind specifically to rat germ cells.

Journal of Molecular Endocrinology, 2, 39-46.

V. GERARD A., ENNYA A., FELDEN F., GUEANT J.L., EGLOFF M., DEGRELLE H., DURRIEZ T., WERRY A., LARCHER J.J., LECLERE J., GERARD H. (1992)

Steroid-binding proteins endocytosis (SBP, ABP) in germ cells of rodents and primates.

Ninth International Congress of Endocrinology, P 13.03.058. (Publication en cours)

VI.FELDEN F., MARTIN M.E., GUEANT J.L., BENASSAYAG C., NUNEZ E.A. (1992)
Free fatty acid-induced alterations in the steroid-binding properties of rat Androgen-binding protein.

Biochemical and Biophysical Research Communications - Soumis à publication.

VII.FREMONT.S., GUEANT J.L., FELDEN F., EGLOFF M., TALLOT B.,
NICOLAS J.P. (1989)

Mesure de la capacité de fixation de la dihydrotestostérone sur l'androgen-binding protein (ABP) au niveau d'extrait de testicules de rat par chromatographie d'exclusion haute performance.

In : Biologie Perspective, GALTEAU M.M., SIEST G., HENNY J., (Eds), J. Libbey and Co, pp. 435-438.

Autre publication sur le thème :

VIII.BOUKHZER E., ENNYA A., FELDEN F., GERARD A., NICOLAS J.P., NEXØ E.,
GERARD H., GUEANT J.L. (1992)

Transcobalamin II-cobalamin binding sites are present on rabbit germ cells.

Biochimica et Biophysica Acta - Acceptée n° BRE 4167.

INTRODUCTION

Les hormones stéroïdes sont synthétisées par différentes glandes endocrines (ovaires, testicules...) et elles exercent leur action au niveau d'organes cibles. Il existe un certain nombre de protéines susceptibles de lier ces hormones et de les acheminer vers leur site d'action.

Au niveau plasmatique, l'albumine est la plus concentrée mais présente peu de spécificité pour les hormones stéroïdes. La sex-steroid binding protein (SBP), glycoprotéine d'origine hépatique, présente en revanche une forte affinité de liaison pour les androgènes et les oestrogènes chez la plupart des mammifères (elle est absente chez le rat).

Au niveau testiculaire, il existe une autre protéine d'origine extra-hépatique l'androgen-binding protein (ABP). Elle a été isolée au départ dans l'épididyme mais son origine est testiculaire grâce à la cellule de Sertoli. Cette protéine partage avec la SBP la propriété de lier avec une grande affinité les androgènes et les oestrogènes et présente une forte homologie structurale et une origine génomique commune avec la SBP.

Ces deux protéines (ABP, SBP), de par leurs propriétés de liaison, ont un rôle dans la régulation du rapport hormone libre/hormone liée, elles assurent la protection de l'hormone contre un catabolisme accru et transportent le stéroïde vers sa cellule cible.

Des travaux récents laissent à penser, de façon évidente, que ces protéines auraient d'autres rôles physiologiques potentiels qu'il reste à élucider. En effet, il a été montré que la SBP plasmatique, tout comme la protéine de liaison des glucocorticoïdes (CBG), se fixent sur des cellules cibles au niveau de sites récepteurs membranaires spécifiques. Cette liaison serait, selon certains auteurs, suivie d'une stimulation de l'activité adénylate cyclasique et, selon d'autres travaux, d'une pénétration du complexe "protéine de liaison-stéroïde" dans la cellule cible par un mécanisme spécifique d'endocytose.

L'ABP testiculaire est également internalisée de façon spécifique au niveau des cellules principales épидидymaires. Des travaux préliminaires dans notre laboratoire ont montré que cette endocytose pourrait être récepteur-dépendante.

L'objectif de ce travail est de montrer que la fixation de l'ABP testiculaire de rat sur la membrane épидидymaire est spécifique et qu'elle s'accompagne par l'endocytose du complexe "ABP-stéroïde" dans les cellules principales épидидymaires et dans les différents stades de maturation de la lignée germinale testiculaire chez le rat.

Cette étude a nécessité, dans une première étape, la semi-purification d'ABP à partir de testicules de rat et le marquage de cette protéine, soit à l'iode 125, soit de façon spécifique et covalente par photoaffinité. Cette protéine marquée nous a ensuite permis de chercher à caractériser un site récepteur spécifique de l'ABP à la fois sur des cellules isolées androgénosensibles et sur des fractions membranaires concentrées ou solubilisées.

Afin de préciser davantage la spécificité de ce site de liaison membranaire, nous avons cherché à savoir si une protéine de forte homologie structurale et fonctionnelle provenant d'une autre espèce, la SBP humaine, pouvait être reconnue par le récepteur de l'ABP de rat. D'autres protéines non hormonodépendantes ont également été testées. Nous avons ensuite confirmé les résultats biochimiques obtenus en étudiant la liaison et la cinétique de pénétration de l'ABP de rat, ou de la SBP humaine, sur différents stades de maturation de la lignée germinale par des méthodes autoradiographiques.

Dans le but de mieux comprendre le rôle biologique de cette protéine au cours du développement, nous avons étudié les caractéristiques de la liaison ABP-récepteur chez le rat immature et chez le rat adulte.

Enfin, dans une dernière partie, nous nous sommes intéressé à certains facteurs comme les lipides pouvant moduler cette liaison. En effet, il est maintenant clairement établi que les acides gras libres, en changeant la conformation des protéines de liaison des stéroïdes telles que la SBP ou la CBG sériques, pouvaient inhiber ou potentialiser la liaison protéique à leurs stéroïdes. Après avoir analysé la composition en acides gras libres d'un extrait épидидymaire de rat, nous avons étudié, à doses physiologiques, l'effet de plusieurs classes d'acides gras sur la liaison de l'ABP à la dihydrotestostérone marquée. Cette étude a été menée dans le but de préciser si le changement conformationnel de l'ABP, au contact des acides gras libres, pouvait se répercuter sur la reconnaissance de la protéine par son récepteur.

La caractérisation de cette endocytose par récepteur, au niveau de la cellule principale épидидymaire et de la lignée germinale de rat, confirme les rôles physiologiques potentiels joués par l'androgen-binding protein au niveau cellulaire, de la même façon que pour les protéines de liaison des stéroïdes sériques.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

STRUCTURE ET FONCTIONS DU TESTICULE ET DE L'EPIDIDYME

1.1 GENERALITES

L'appareil de reproduction mâle (figure n°1) comprend :

- deux testicules
- des voies excrétrices génitales (épididyme et canal déférent)
- des glandes annexes (vésicules séminales, prostate et glandes bulbo-urétrales)
- le pénis

Le testicule est un organe glandulaire doué d'une double fonction :

- la gamétogénèse avec la production de spermatozoïdes à partir de la lignée germinale : c'est la fonction exocrine du testicule.

- Une fonction endocrine exprimée par la glande interstitielle. Cette dernière est constituée d'éléments cellulaires dont les cellules de Leydig. Leur fonction principale est la production de testostérone nécessaire à la spermatogénèse et au maintien des caractères sexuels secondaires.

1.2 LE TESTICULE

Au cours des premières semaines de la vie embryonnaire, les ébauches primitives des organes génitaux sont appelées "crêtes sexuelles". Les testicules sont constitués de deux lignées cellulaires : les gonocytes qui engendreront la lignée germinale et les éléments du mésoblaste qui formeront le tissu interstitiel, la paroi des tubes séminifères et les cellules de Sertoli.

Au cours du 5e mois de la vie intra-utérine, l'ébauche des testicules migre de la cavité péritonéale vers le canal inguinal. Ils sont alors suspendus dans le scrotum, à l'extrémité du cordon spermatique, entourés par une enveloppe appelé "tunique vaginale" ou albuginée.

Cette enveloppe est constituée d'une capsule blanche, épaisse et résistante, parcourue par des vaisseaux sanguins. Cette structure est formée de tissu conjonctif riche en collagène et en fibres musculaires lisses. Elle s'épaissit et forme un espace triangulaire dans la profondeur de l'organe "le corps de Highmore" (figure n°2).

Cette structure est perforée par de nombreux canaux constituant le "Rete testis". On note la présence de cloisons constituant les lobules testiculaires entre l'albuginée et le corps de Highmore. Un testicule normal humain renferme 200 à 300 lobules, souvent inter - communicants. Chaque lobule contient 2 à 3 tubes séminifères qui sont des structures flexueuses. Chez l'homme, le nombre total de tubes séminifères est proche du millier (0,9 m de long x $3,5 \cdot 10^{-4}$ m de diamètre). Les tubes convergent vers le corps de Highmore où ils se rejoignent dans le Rete Testis en tube droit.

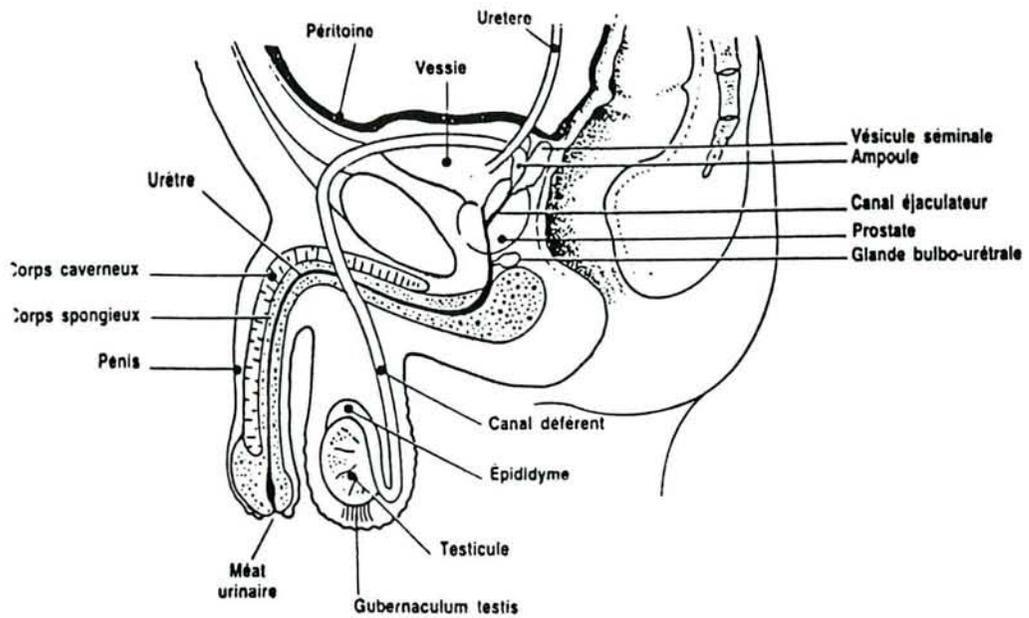


Figure n° 1: Structure générale de l'appareil reproducteur mâle

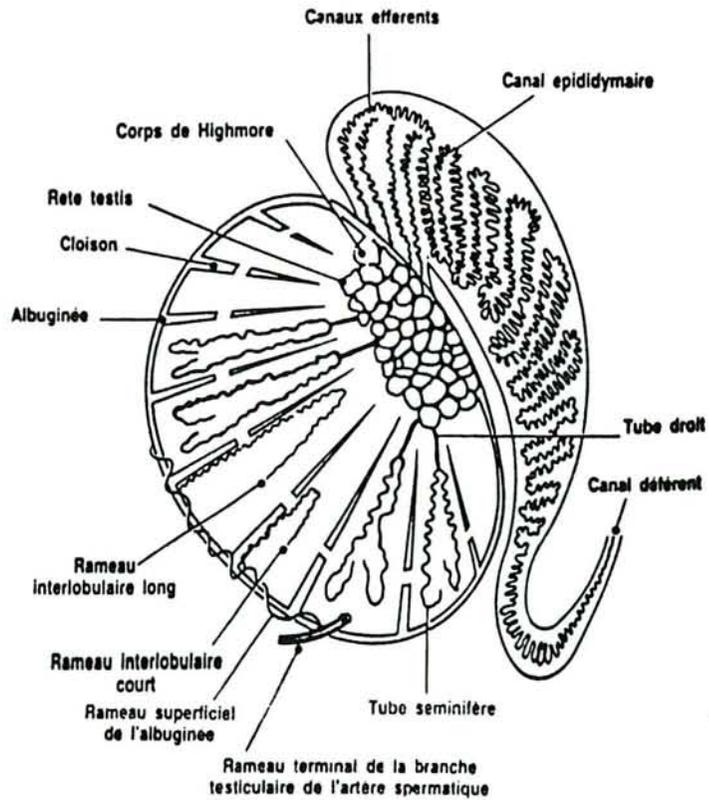


Figure n° 2 : structure et organisation d'un testicule humain

Un tissu conjonctif lâche occupe l'espace existant entre les tubes séminifères, avec une vascularisation et une innervation importantes : c'est dans cette structure que l'on trouve les cellules de Leydig .

La vascularisation de chaque testicule est assurée par deux artères testiculaires, à partir de l'artère spermatique. Les artères se divisent dans les différents lobules testiculaires et se regroupent en veines à la face interne du testicule avec les veines de l'épididyme : l'ensemble forme le plexus spermatique antérieur. L'innervation est constituée de deux types de fibres: fines et épaisses, dérivant des rameaux du plexus spermatique.

1.3 LA LIGNEE GERMINALE

Les cellules de la lignée germinale s'étendent de la membrane basale jusqu'à la lumière du tube séminifère. Les stades successifs de maturation des spermatogonies aboutissent à la formation des spermatozoïdes : c'est la spermatogénèse. Les différents types de cellules germinales sont successivement les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides (figure n° 3). Au départ les spermatogonies se divisent par mitose en donnant naissance aux spermatocytes ($2n$ chromosomes). Les spermatocytes se divisent par méiose et aboutissent aux spermatides (n chromosomes). Enfin, dans une troisième phase, la spermiogénèse permet la différenciation des spermatides en spermatozoïdes.

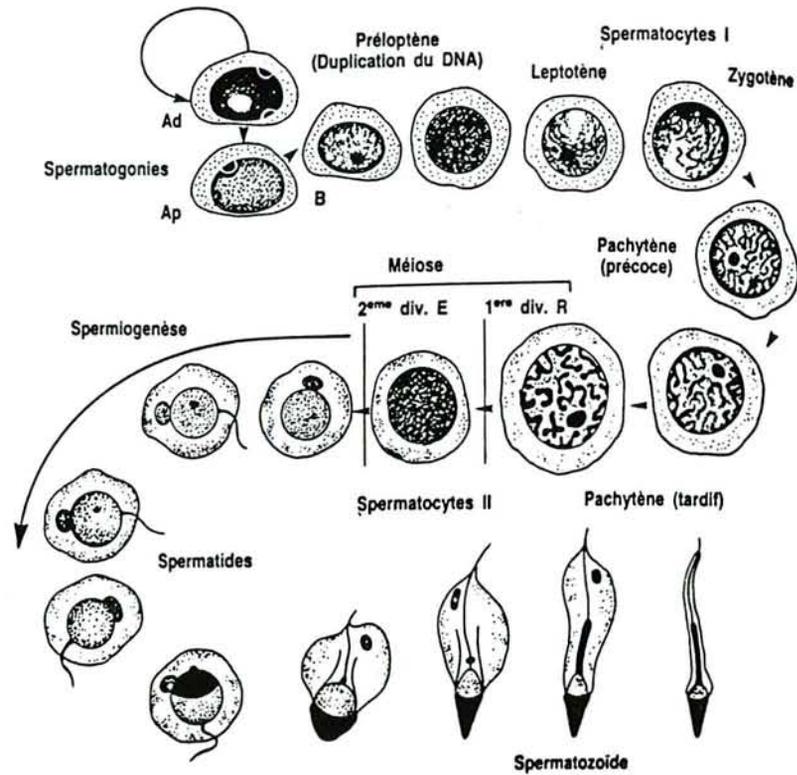


Figure n° 3 : Composition et évolution chronologique des cellules de la lignée germinale

Les spermatogonies

Les cellules initiales de la spermatogenèse sont situées au voisinage de la membrane basale, entre les cellules de Sertoli. Elles sont peu nombreuses, avec un diamètre de 12 μm , un noyau arrondi riche en chromatine fine et granuleuse. Une vacuole centrale est souvent visible. La multiplication des cellules germinales, à partir des spermatogonies, est continue au cours de l'âge adulte chez l'homme. Il existerait plusieurs types de spermatogonies "Ad" (foncées) qui seraient les cellules souches de réserve et le types "Ap" (pâles) et B qui seraient le premier stade de renouvellement.

Les spermatocytes

Les spermatogonies de type "Ap" et B donnent naissance aux spermatocytes de premier ordre puis subissent une phase de croissance et deviennent de grandes cellules ovalaires. Elles entrent alors dans une méiose pour passer chez l'homme de 46 chromosomes (44 + XY) à 23 chromosomes (22 + X ou 22 + Y). Au cours de la prophase, la cellule passe par cinq stades successifs:

- leptotène
- zygotène
- pachytène (16 jours/homme)
- diplotène
- diacinèse

Les trois autres stades de la division cellulaire suivent normalement (métaphase, anaphase et télophase). On obtient alors des spermatocytes de deuxième ordre qui entrent rapidement dans la deuxième division de la méiose.

Des cellules haploïdes nées de la division des spermatocytes II donnent naissance aux spermatozoïdes.

Les spermatides

Les spermatides se transforment en spermatozoïdes au cours de la spermiogénèse. Les spermatides jeunes sont des cellules de petite taille, ovoïdes, avec un noyau clair et une ou deux masses nucléaires. Tout en se rapprochant de la lumière du tube séminifère, elles s'allongent et présentent un noyau, orienté selon le grand axe de la cellule, qui se condense progressivement. On peut distinguer chez l'homme, cinq étapes principales de formation des spermatozoïdes :

- des granules pro-acrosomaux se forment dans l'appareil de Golgi et aboutissent à la formation d'une grande vésicule unique : la vésicule acrosomale. Cette structure devient homogène et s'étale en capuchon à la surface du noyau. L'espace sous-acrosomal délimite les membranes de l'acrosome et du noyau,

- les deux centrioles migrent en formant le centriole proximal le plus proche du noyau et le centriole distal d'où va naître le flagelle,

- le cytoplasme glisse vers le flagelle et le recouvre en partie, tout en expulsant des fragments de cytoplasme : les corps résiduels qui sont phagocytés par les cellules de Sertoli,

- en même temps, les mitochondries se regroupent autour du noyau, se disposent en spirales autour de la portion initiale de la queue qui constitue la pièce intermédiaire,

- une élongation du noyau, ainsi qu'une condensation de la chromatine donnent à la tête du spermatozoïde sa forme spécifique.

Les spermatozoïdes

C'est l'aboutissement de la lignée germinale et ils se disposent à la partie supérieure des cellules de Sertoli. Ils sont libérés ensuite dans la lumière des tubes séminifères au cours de la spermiation. Ils sont alors transportés par le fluide testiculaire vers les voies spermatiques intratesticulaires et gagnent les voies génitales excrétrices qui commencent par l'épididyme.

1.4 L'EPIDIDYME

Les conduits qui transportent les spermatozoïdes, du testicule jusqu'au méat urinaire, sont constitués successivement par les voies spermatiques intratesticulaires, les canaux éfférents, le canal épидидymaire, le canal déférent et l'urètre (figure n° 4).

Les voies spermatiques intratesticulaires comprennent les tubes droits et le rete testis. Ce dernier est connecté à la tête de l'épididyme par une dizaine de canaux traversant l'albuginée : les canaux éfférents.

La progression des spermatozoïdes vers la portion proximale de l'épididyme dépend de trois facteurs :

- la pression exercée par le fluide du rete testis,
- les courants liquidiens engendrés par le battement ciliaire des cellules épithéliales de la paroi,
- les contractions péristaltiques de la musculature lisse.

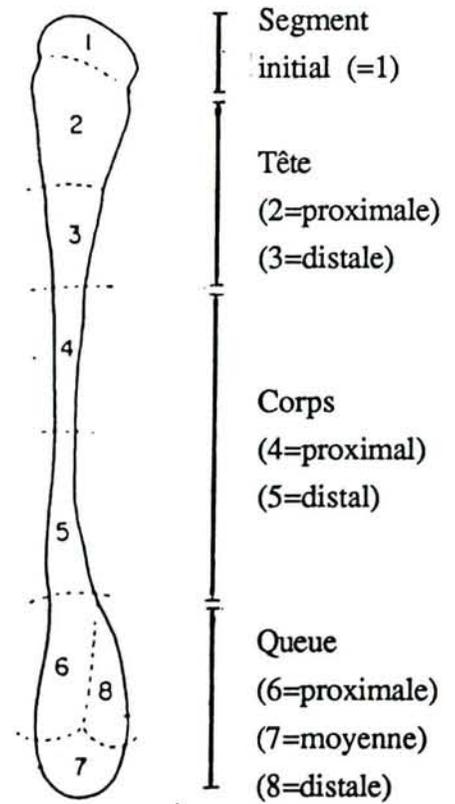


Figure n°4 : Schéma général d'un épидидyme de rat (d'après Turner et coll., 1990)

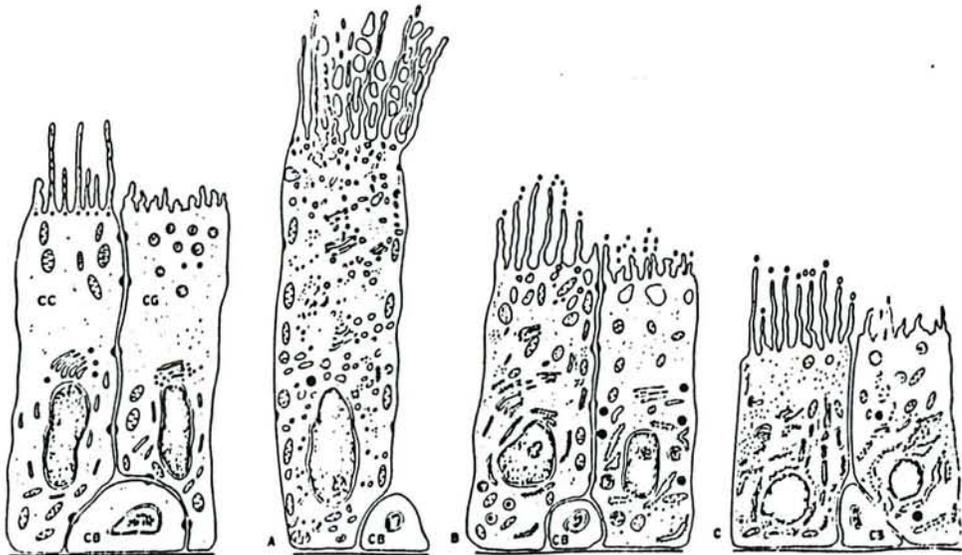


Figure n° 5 : Schéma de l'ultrastructure des cellules principales de l'épithélium de revêtement : canaux éfférents. CC : cellule ciliée ; CG : cellule glandulaire ; canal épидидymaire. A : tête ; B : corps ; C : queue ; CB : cellule basale.

Le canal épидидymaire est un tube long de plusieurs mètres, pelotonné et divisé en trois segments (figure n° 4)

- la tête, située au pôle supérieur du testicule,
- la queue, située au pôle inférieur du testicule,
- le corps qui réalise une jonction étroite entre la tête et la queue.

Il existe une zone individualisée "le segment initial" compris entre les canaux éfférents et la partie proximale.

Le canal épидидymaire est bordé par un épithélium prismatique pseudostratifié composé en majorité par deux types cellulaires : les cellules principales et les cellules basales, reposant sur une membrane basale (figure n° 5). Il peut exister d'autres types cellulaires chez l'animal et des lymphocytes sont souvent présents entre les cellules épithéliales. Le nombre de cellules principales diminue de la partie proximale à la zone distale. Les cellules présentent des stéréocils à leur face apicale. Ces fins prolongements sont plus courts dans la partie caudale.

L'épididyme présente, au niveau de son revêtement épithélial, toutes les structures nécessaires à l'absorption (vésicules de pinocytose, vésicules d'endocytose...).

Les fonctions biologiques de l'épididyme sont essentiellement de deux types :

- une fonction de transport des spermatozoïdes (12 jours de transit épидидymaire chez l'homme) et de stockage au niveau caudal avant éjaculation,
- un rôle qui semble de plus en plus important dans la maturation des spermatozoïdes dûe à la composition du fluide épидидymaire.

Il existe, à ce niveau, un certain nombre de réactions de type sécrétion/absorption et la perméabilité du canal épидидyme montre un rôle important dans la concentration de molécules de différenciation ou de facteurs de maturation dont la composition et les fonctions exactes ne sont pas encore complètement connues.

Les spermatozoïdes, au cours de leur transport épидидymaire, deviennent mobiles et fécondants, prêts à induire le développement embryonnaire.

En conclusion, malgré la connaissance encore incomplète de son rôle physiologique exact, l'épididyme se révèle être un site indispensable à la maturation et à la fécondité des spermatozoïdes.

1.5 REGULATION DE LA SPERMATOGENESE

La régulation de la fonction testiculaire, au niveau de la spermatogénèse, est sous le contrôle de l'hypophyse et plus particulièrement des gonadotrophines. Cependant, malgré l'importance de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de la testostérone, la maturation de l'épithélium séminifère nécessite la participation de multiples mécanismes de régulation paracrine et autocrine. Les interactions cellules à cellules entre lignée germinale, cellules de Sertoli, cellules de Leydig et cellules périvitubulaires, semblent actuellement de plus en plus importantes pour le déroulement normal de la spermatogénèse. Un certain nombre de facteurs (P-ModS, ABP, transférase...) sécrétés par les cellules testiculaires influencent le déroulement et la maturation des spermatozoïdes (Skinner, 1991). La régulation endocrine de la fonction testiculaire fait l'objet actuellement de nombreuses investigations et la compréhension de ces mécanismes permettra, sans aucun doute, d'établir des thérapeutiques nouvelles capables de corriger un certain nombre de troubles de la fertilité.

CHAPITRE II

LA CELLULE DE SERTOLI

2.1 INTRODUCTION

Au niveau de la partie exocrine du testicule, les cellules de Sertoli représentent une partie très importante de l'épithélium germinale, assurant un rôle sécrétoire majeur et produisant des protéines et des facteurs nécessaires au développement normal de la lignée germinale. Ces sécrétions représentent un outil d'investigation très performant pour l'étude de cette partie du testicule (tableau n° 1).

Les travaux les plus récents sur les cellules de Sertoli indiquent que leurs activités sécrétoires multiples assurent des fonctions importantes, aussi bien au niveau des tubes séminifères que dans l'ensemble du testicule, et certainement même au - delà !

En 1865, Enrico Sertoli a décrit, pour la première fois, l'existence de cellules ramifiées dans les tubes séminifères du testicule humain.

Il paraît évident, dès cette époque, que ces cellules sont essentielles au bon déroulement de la spermatogénèse et toutes les études biochimiques ultérieures ont confirmé cette hypothèse.

L'étude ultrastructurale de cellules de Sertoli (Fawcett, 1975) montre que le noyau de ces cellules contient assez peu d'hétérochromatine en comparaison avec les autres cellules somatiques. Cette observation montre qu'une grande partie du génôme est biologiquement actif, ce qui expliquerait ses multiples fonctions. Il semble que les produits de sécrétion sertolienne soient excrétés hors de la cellule immédiatement après leur synthèse (il existe peu de granules sécrétoires dans leur cytoplasme).

Un certain nombre d'observations morphologiques pourraient expliquer leurs rôles physiologiques (figure n°6) :

- il existe un grand nombre de lysosomes primaires, de vacuoles autophagiques et hétérophagiques qui montreraient la participation active des cellules de Sertoli dans la phagocytose et la digestion des cellules germinales qui dégénèrent au cours de leur développement,
- la présence d'une quantité importante de réticulum endoplasmique lisse suggère une synthèse de stéroïdes,
- des altérations morphologiques des cellules de Sertoli, le long des tubes séminifères, tendent à prouver leur participation dans la spermatogénèse,
- les types de jonctions entre les cellules de Sertoli (tight-jonction) permettent de maintenir l'intégrité de l'épithélium tubulaire et constituent le composant épithélial de la barrière sang-testicule.

Principales sécrétions sertoliennes	Fonctions	Références bibliographiques
. ANDROGEN BINDING PROTEIN (ABP)	transport des androgènes autres ?	HANSSON et Coll., 1975
. INHIBINE	agent de régulation paracrine	DE JONG et Coll., 1985
. TRANSFERRINE	transport du fer	SKINNER et Coll., 1980
. CERULEOPLASMINE	transport du cuivre	SKINNER et Coll., 1983
. RETINOL-BINDING PROTEIN	transport du rétinol	HUGGENVIK et Coll., 1981
. SOMATOMEDINE/IGF-1	facteur de croissance et de différenciation	HALL et Coll., 1983
. INTERLEUKINE-1	facteur de régulation	KHAN et Coll., 1987
. LAMININE, COLLAGENES IV et I, PROTEOGLYCANNES	composant de la matrice extracellulaire	SKINNER et Coll., 1985
. $\alpha 2$ MACROGLOBULINE	inhibiteur de protéase	CHENG et Coll., 1990

Tableau n° 1 : Liste des principales sécrétions des cellules de Sertoli.

Ces jonctions complexes divisent l'épithélium des tubes séminifères en deux compartiments :

- une partie basale contenant les spermatogonies et les spermatocytes jeunes,
- une partie plus interne contenant les stades plus avancés jusqu'aux spermatides.

La partie basale est en relation avec les cellules myoïdes, le compartiment sanguin et lymphatique de l'espace interstitiel.

La partie plus interne (ou luminale) est en relation avec le rete testis, les canaux éfférents et l'épididyme.

En conclusion, toute substance présente dans le compartiment basal ne peut entrer dans le compartiment luminal que par l'intermédiaire du cytoplasme des cellules de Sertoli et vice-versa. Cette structure morphologique particulière démontre le rôle clé joué par la cellule de Sertoli et permet d'entrevoir sa pluralité fonctionnelle.

2.2 LES FONCTIONS SERTOLIENNES

Maintien de la barrière sang - testicule

Les tubes séminifères composent la partie proximale du système reproducteur mâle (figure n° 7). Les conduits formant un lobule (2 ou 3) se terminent par un tube droit dont la paroi est constituée d'un épithélium simple cubique. La zone de jonction entre les tubes séminifères et le tube droit est uniquement constituée par les cellules de Sertoli. Les tubes droits se jettent dans le rete testis, réseau serré de canalicules de diamètre irrégulier également limités par un épithélium simple cubique. Le tube séminifère est un épithélium complexe composé de cellules de Sertoli et de cellules germinales reposant sur une lame basale (figure n° 7).

La présence d'une barrière sang - testicule (Dym et coll., 1970), est mise en évidence par une composition très différente entre le fluide des tubes séminifères et celle retrouvée dans le sang ou la lymphe testiculaire. (Mufly et coll., 1985).

Le fluide séminal contient plus de protéines que dans le rete testis mais beaucoup moins que dans le sérum (Dym et coll., 1970). La production du fluide testiculaire chez la plupart des espèces animales correspondant à un rapport de 15 μ l / gramme de testicule / heure (Free et coll., 1979) et elle ne subit pas de variation circadienne, mais subit l'influence de différentes hormones (Setchell et coll., 1973).

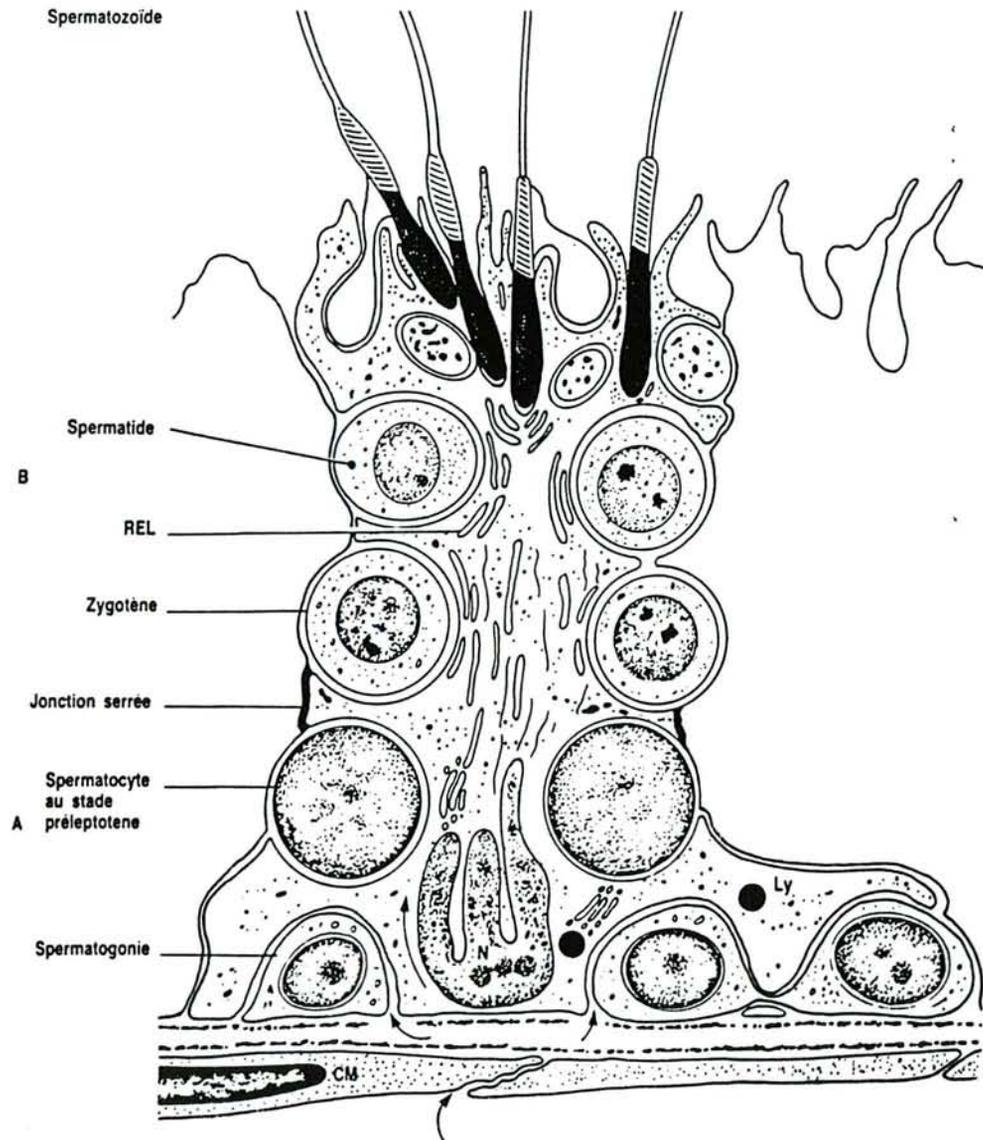


Figure n° 6 : Schéma de l'ultrastructure de la cellule de Sertoli et des deux compartiments intratubulaires : le compartiment basal (A) et le compartiment central (B). L'oxygène et les métabolites transitent nécessairement par le cytoplasme sertolien (flèche) pour atteindre les cellules germinales situées au-delà des jonctions serrées. N: noyau; REL: réticulum endoplasmique, Ly: lysosome, CM: cellule myoïde. (D'après Fawcett, 1975)

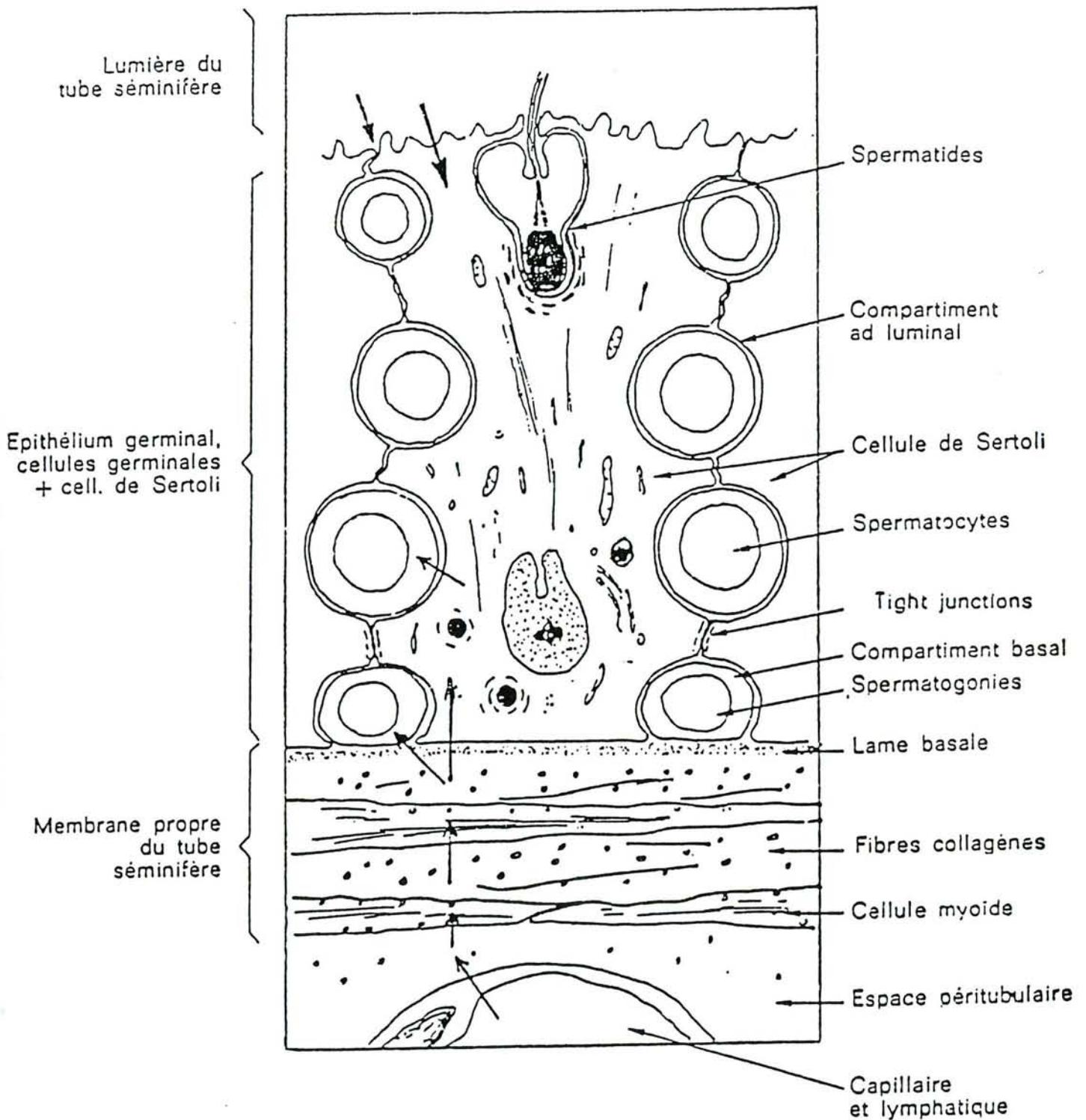


Figure n° 7 : Organisation générale du tube séminifère. Relations entre cellules germinales et cellules de Sertoli (d'après Fawcett, 1975).

Il existe une composition inhabituelle en protéines, ions et petites molécules dans le fluide séminal qui montre que la perméabilité des tubes séminifères et du rete testis est sélective (Setchell, 1978). Ce gradient est maintenu grâce à la présence de récepteurs spécifiques, d'influences hormonales et certainement d'autres facteurs restant à déterminer. La plupart des protéines du fluide séminal proviennent des cellules de Sertoli (Mather et coll., 1983) et permettent de créer un micro-environnement propice au développement de la lignée germinale en maintenant cette barrière sang - testicule (Mather et coll., 1983). Il est également probable que l'immunogénicité du sperme est ainsi préservée vis-à-vis des cellules immunocompétentes du sang circulant.

Sécrétions de protéines, peptides et autres facteurs

L'androgen-binding protein (ABP) a été la première protéine spécifique de la sécrétion sertolienne isolée et caractérisée (Hansson et coll., 1971, Ritzen et coll., 1971, Vernon et coll., 1974). Les études chez le rat ont montré que 80 % de l'ABP sécrétée est déversée dans la lumière des tubes séminifères jusqu'à l'épididyme (Pelliniemi et coll., 1981; Attramadal et coll., 1981), alors que les 20 % restant s'acheminent vers le compartiment sanguin par la partie basale de la cellule de Sertoli (Gunsalus et coll., 1980).

Il existe également d'autres protéines sertoliennes qui ne sont pas spécifiques du testicule et que l'on retrouve au niveau sérique (tableau n° 1). L'existence de ces protéines sériques dans les tubes séminifères et le rete testis est connue depuis longtemps, cependant la preuve de leur origine sertolienne est assez récente (1980 - 1985). Ces observations confirment le concept selon lequel la cellule de Sertoli peut sécréter la plupart des protéines nécessaires à la maturation et au développement des cellules germinales.

L'androgen-binding protein (ABP)

La caractérisation de cette glycoprotéine sera développée dans le chapitre III .

Les protéines de transport des métaux

La cellule de Sertoli synthétise les protéines de transport du fer et du cuivre appelées respectivement transferrine et céruléoplasmine testiculaire (Skinner et coll., 1980 - 1983). La présence de ces deux protéines dans le fluide séminal suggère le transport du fer et du cuivre dans les cellules de la lignée germinale au niveau du compartiment adluminal (figure n° 7) (Mather, 1983).

Si l'on compare la séquence protéique des transferrines testiculaire et sérique, la seule différence réside en une composition variable en carbohydrates (Skinner et coll., 1983). Ce résultat suggère une origine génique commune et des modifications post-traductionnelles spécifiques. On peut noter, à ce niveau, une différence semblable entre ABP testiculaire et sérique chez le rat (Danzo et coll., 1988). En l'absence de fer, la transferrine n'est pas capable d'assurer un rôle de facteur de croissance (Perez - Infante et coll., 1986). Cependant, la cellule de Sertoli synthétise et secrète de la transferrine dans la lumière des tubes séminifères et transporte le Fe^{3+} pour le développement des cellules germinales (Skinner et coll., 1980). Il existe également des récepteurs spécifiques de la transferrine sur les spermatocytes (Holmes et coll., 1983) et certainement sur les spermatides. La transferrine testiculaire peut servir d'index de fécondité car un taux faible de cette protéine est souvent retrouvé chez les patients atteints d'oligo ou d'azoospermie (Orlando et coll., 1985).

L'ensemble de ces observations montre que la transferrine, contrairement à l'ABP, passe dans le canal épидидymaire et peut être mesurée dans le sperme.

Les facteurs de croissance

Un grand nombre de facteurs ayant un pouvoir mitogène et induisant la synthèse cellulaire de DNA ont été isolés à partir de cultures de cellules testiculaires de souris (Feig et coll., 1980):

- un fibroblaste growth factor (FGF) a été purifié par chromatographie d'affinité sur héparine - sépharose (Böhlen et coll., 1985). Ce facteur existe également dans la rétine et le cerveau et correspond au type "acide" de FGF.

- l'insulin - like growth factor de type 1 (IGF1) représente un modèle où la sécrétion sertolienne a été identifiée, ainsi que la présence de récepteurs spécifiques, à la surface de la lignée germinale (Vanelli et coll., 1988).

- les cellules de Sertoli produisent enfin du $TGF\alpha$ et β (transforming growth factor α et β), (Skinner et coll., 1989a - 1989b), du NGF (nerve growth factor) (Ayer - Le Lievre et coll., 1988) et la liste est loin d'être terminée !

Les hormones

Les protéines et peptides produits par les cellules de Sertoli, et décrits précédemment, font l'objet de régulations autocrine et paracrine au niveau testiculaire.

Il existe également des hormones sertoliennes qui sont sécrétées dans le courant sanguin et peuvent agir sur des tissus cibles. La plus importante de ces sécrétions est l'inhibine.

L'existence de sécrétions hydrosolubles d'origine gonadique agissant sur la sécrétion de FSH a été suspectée depuis longtemps (Mc Cullagh, 1932). Ce n'est qu'en 1985 (Channing et coll.) que cette hormone appelée inhibine fut parfaitement caractérisée. Les premiers peptides appelés inhibine-like ont été isolés par Ramasharma et coll. (1984) et Seidah et coll. (1984) à partir de fluide séminal humain. Robertson et coll. (1985) ont montré que l'inhibine d'origine bovine est une protéine de poids moléculaire de 56 000 Da, formée de deux chaînes polypeptidiques de 14 000 et 46 000 Da respectivement, liée par des ponts disulfures. Plus récemment, la partie amino-terminale de ces deux sous-unités (appelées α et β inhibine) a été identifiée par des méthodes de biologie moléculaire (Mason et coll., 1985). Ces auteurs ont montré qu'il existe une grande homologie entre séquence de l'inhibine β et le TGF β .

La synthèse de stéroïdes par les cellules de Leydig, et plus particulièrement de testostérone, est bien connue (Steinberger et coll., 1970).

L'hypothèse selon laquelle les cellules de Sertoli peuvent participer également à la biosynthèse de stéroïdes a été émise à partir de quelques observations :

- les cellules de Sertoli d'origine tumorale sécrètent des stéroïdes (Steinberger et Coll., 1975),
- l'étude ultrastructurale de ces cellules montre qu'elles possèdent des organelles typiques de la stéroïdogénèse (Fawcett, 1975),
- les cellules sertoliennes isolées possèdent de nombreuses enzymes utiles au métabolisme des stéroïdes (Welsh et coll., 1978).

Ces cellules peuvent métaboliser la progestérone en testostérone, par exemple (Tcholakian et coll., 1979), sous le contrôle de la FSH et de façon différente selon l'âge de la cellule de Sertoli. Cette sécrétion en fonction de l'âge semble être l'inverse de celle exprimée par les cellules de Leydig (Welsh et coll., 1978).

En conclusion, les cellules de Sertoli participent à la production de stéroïdes qui sont importants au niveau épидидymo-testiculaire. Leur activité "5- α réductase" est importante et semble contribuer au développement normal de la lignée germinale (Dorrington et coll., 1975).

2.3 REGULATION DE LA CELLULE DE SERTOLI

Les différents mécanismes de régulation hormonale de l'épithélium séminifère dépendent surtout de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de la testostérone. Cependant, en dehors de ces deux composés principaux, un certain nombre d'autres substances interviennent et l'environnement interne du testicule contrôlé par les fonctions sertoliennes est lui-même régulé par un grand nombre de facteurs hormonaux et cellulaires complexes.

Régulation hormonale

L'hormone folliculo - stimulante (FSH)

La FSH administrée à des rats hypophysectomisés induit des changements dans la morphologie du noyau des cellules de Sertoli (Murphy, 1965). Il existe des récepteurs à FSH sur les cellules de Sertoli représentant le site majeur de fixation de l'hormone dans le testicule. (Steinberger et coll., 1974).

C'est un récepteur de poids moléculaire 146.000 Da (Branca et coll., 1985), multimérique, de même nature que le récepteur à LH (Dattatreyamurty et coll., 1983). Il active une voie de type adénylate cyclasique, avec une augmentation de l'AMP cyclique intra-cellulaire (Kuehl et coll., 1970). La FSH induit la production de RNA (Lamb et coll., 1982) et la synthèse protéique par les cellules de Sertoli (Dorrington et coll., 1975). Cette régulation sertolienne à FSH est de type "down - régulation" (Conti et coll., 1986). Elle agit à la fois sur la production protéique comme, par exemple, la sécrétion d'ABP (Vernon et coll., 1974) sur la différenciation cellulaire et sur le métabolisme énergétique de la cellule (Hall et coll., 1984, Mita et coll., 1982) ainsi que sur la division cellulaire en augmentant l'incorporation de thymidine marquée dans l'ADN des cellules de Sertoli du rat fœtal (Orth., 1984).

La testostérone

Un grand nombre d'hormones stéroïdes sont connues pour leur interaction avec les cellules de Sertoli car elles possèdent des récepteurs spécifiques aux stéroïdes. La plus connue est la testostérone. Il a cependant été montré que les estrogènes (Nakhla et coll., 1984), l'hydrocortisone et la progestérone peuvent également moduler le métabolisme de la cellule de Sertoli notamment en augmentant la sécrétion d'ABP in vitro (Rich et coll., 1983).

Les cellules de Sertoli possèdent des récepteurs aux androgènes (Sanborn et coll., 1977) et les effets produits par la testostérone peuvent avoir des actions identiques, ou inverses, de ceux produits par la FSH. La testostérone engendre un effet global sur l'activité transcriptionnelle (Lamb et coll., 1981) en augmentant de façon rapide (15 minutes) l'activité de la RNA polymérase. Les cellules de Sertoli en culture sécrètent de l'ABP quand le milieu contient des taux physiologiques de testostérone (Rich et coll., 1983). Les effets, *in vivo*, sont plus difficiles à apprécier mais ils semblent varier avec le stade de maturation de la lignée germinale et le niveau de différenciation du tube séminifère. En réalité, si la cellule de Sertoli est complètement différenciée, ses fonctions peuvent être maintenues par la testostérone seule alors que, dans les stades ultérieurs, la FSH doit principalement être activée (Louis et coll., 1979). Des études poursuivies par Tsutsui et coll. (1980) ont montré que, dans certaines espèces, les androgènes peuvent réguler le nombre de récepteurs à FSH sur les cellules de Sertoli.

Enfin, il semble que les cellules myoïdes aient un rôle important à jouer dans les réponses sertoliennes aux androgènes (Skinner et coll., 1985), ce qui montre la complexité des mécanismes de régulation de cette lignée cellulaire et établit l'existence d'une intrication étroite entre régulation hormonale et cellulaire.

Les autres facteurs

Un certain nombre de polypeptides, comme l'insuline, sont connus pour avoir un rôle essentiel au niveau de la régulation de la lignée sertolienne.

L'insuline est considérée comme un facteur essentiel au niveau de la croissance et de la différenciation de ces cellules (Karl et coll., 1980). Son action stimule l'incorporation de poly RNA (Griswold et coll., 1982) et semble importante à différents niveaux comme au cours de la sécrétion de transferrine ou d'ABP chez le rat (Karl et coll., 1980). Les IGF I et II sont également très actifs sur le métabolisme des cellules de Sertoli (Mita et coll., 1985). Le glucagon (Eikvar et coll., 1985) et la calcitonine (Naklha et coll., 1986) jouent également un rôle dans leur maturation.

Régulation cellulaire

- Cellules germinales et cellules de Sertoli

L'étude des interactions entre cellules germinales et cellules de Sertoli est définie selon le stade de développement de la ligne germinale. La succession des différents stades de maturation de cette lignée nous donne le cycle spermatogénique dont la durée est spécifique pour chaque espèce (rat = 12 jours). Il existe des interactions différentes, selon le type de cellule germinale, avec les cellules de Sertoli (Parvinen, 1982). La morphologie nucléaire et cytoplasmique des cellules de Sertoli a montré des variations importantes également en fonction du stade du cycle spermatogénique avec lequel elle se trouvait en contact, grâce à des études histochimiques (Hilschler et coll., 1979).

Ces différences peuvent être étudiées en isolant des segments spécifiques de tubes séminifères. Les récepteurs à FSH à la surface des cellules de Sertoli varient en fonction de la maturation (Parvinen, 1982). Les sécrétions protéiques sertoliennes, comme l'ABP, sont également variables (Gunsalus et coll., 1981).

Tous ces résultats montrent que la morphologie et les fonctions biologiques des cellules de Sertoli varient avec l'épithélium germinal et correspondent à un microenvironnement spécifique propre à chaque étape de l'évolution du cycle spermatogénique (Wright et coll., 1983).

- Cellules myoïdes et cellules de Sertoli

Les cellules myoïdes interagissent également avec les cellules de Sertoli et influencent leurs sécrétions (Skinner et coll., 1985); celles d'ABP et de transferrine sont augmentées.

L'action de la testostérone sur les cellules de Sertoli semble être indirecte par l'intermédiaire des cellules myoïdes (Skinner et coll., 1985).

Il semble que la présence de cellules myoïdes n'influence pas la qualité de sécrétions sertoliennes mais la module. Elles peuvent, par exemple, augmenter de 3 à 5 fois la sécrétion d'ABP (Mather et coll., 1983).

- Cellules de Leydig et cellules de Sertoli

Les interactions entre cellules de Leydig et cellules de Sertoli semblent exister grâce à la présence de "facteurs" capables de moduler l'activité sécrétoire de l'une ou de l'autre des lignées cellulaires (Sharpe et coll., 1981). Les cellules de Sertoli sécrètent un facteur capable de stimuler la production de stéroïdes par les cellules de Leydig, sous le contrôle de la FSH : cette substance pourrait être l'inhibine.

En conclusion, la régulation des cellules de Sertoli est complexe. Elle se décompose principalement selon trois voies :

- les régulations hormonales principales (FSH, testostérone),
- les régulations hormonales secondaires (insuline, facteurs de croissance, vitamines),
- les régulations de type cellulaire avec les lignées germinales, myoïdes et les cellules de Leydig.

Cette régulation multifactorielle, qui n'est pas encore complètement élucidée, montre cependant le rôle clé joué par ces cellules lesquelles représentent un véritable carrefour métabolique du testicule.

CHAPITRE III
LES PROTEINES DE LIAISON
DES STEROIDES

GENERALITES

Les hormones stéroïdes dérivent, pour la plupart, du cholestérol sanguin (figure n° 8) et sont présentes à tous les niveaux d'évolution. Elles sont synthétisées par un groupe d'organes appelé "stéroïdogène" et se répartissent en quatre groupes principaux :

- les glucocorticoïdes
- les minéralocorticoïdes
- les androgènes surrénaliens et testiculaires
- les oestrogènes.

L'activité biologique des hormones stéroïdes s'exerce au niveau d'organes spécifiques dits "cibles" dont la localisation est souvent très éloignée du lieu de synthèse de ces hormones.

Au niveau plasmatique, il existe plusieurs protéines liant les hormones stéroïdes chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales. Au niveau plasmatique, ces protéines sont synthétisées essentiellement par le foie et elles diffèrent entre elles par leur affinité, leur capacité et leur spécificité de liaison (Tableau n°2).

L'albumine est la plus concentrée au niveau sérique, elle possède une grande capacité de liaison pour ces hormones stéroïdes mais une faible affinité ($K_a = 10^4 \text{ M}^{-1}$).

Il existe par contre d'autres protéines de spécificité plus étroite liant les hormones stéroïdes avec des affinités plus élevées ($K_a = 10^7$ à 10^8 M^{-1}).

Au niveau cellulaire, les hormones stéroïdes se lient spécifiquement aux récepteurs membranaires ou cytosoliques des organes cibles. Ces récepteurs ont une affinité 100 à 1000 fois plus élevée que celle des protéines de liaisons plasmatiques.

L'hormone peut agir sous forme libre au niveau de sa cellule cible et le rôle biologique des protéines plasmatiques est de protéger l'hormone contre un catabolisme précoce et d'assurer son transport jusqu'à l'organe cible.

Depuis les travaux de Partridge et Coll.(1981), il est probable que l'hormone stéroïde liée à sa protéine de transport puisse également avoir un rôle biologique. Ces protéines de liaison seraient donc directement impliquées dans les mécanismes d'action hormonale en dirigeant l'hormone liée vers l'organe cible et en facilitant sa pénétration. De nombreux travaux ont montré la localisation intracellulaire cytoplasmique de diverses protéines de liaison des stéroïdes (SBP, CBG...) et la découverte de récepteurs membranaires spécifiques à ces molécules confirme leur action cellulaire en suggérant fortement l'existence d'un mécanisme spécifique d'endocytose par récepteur.

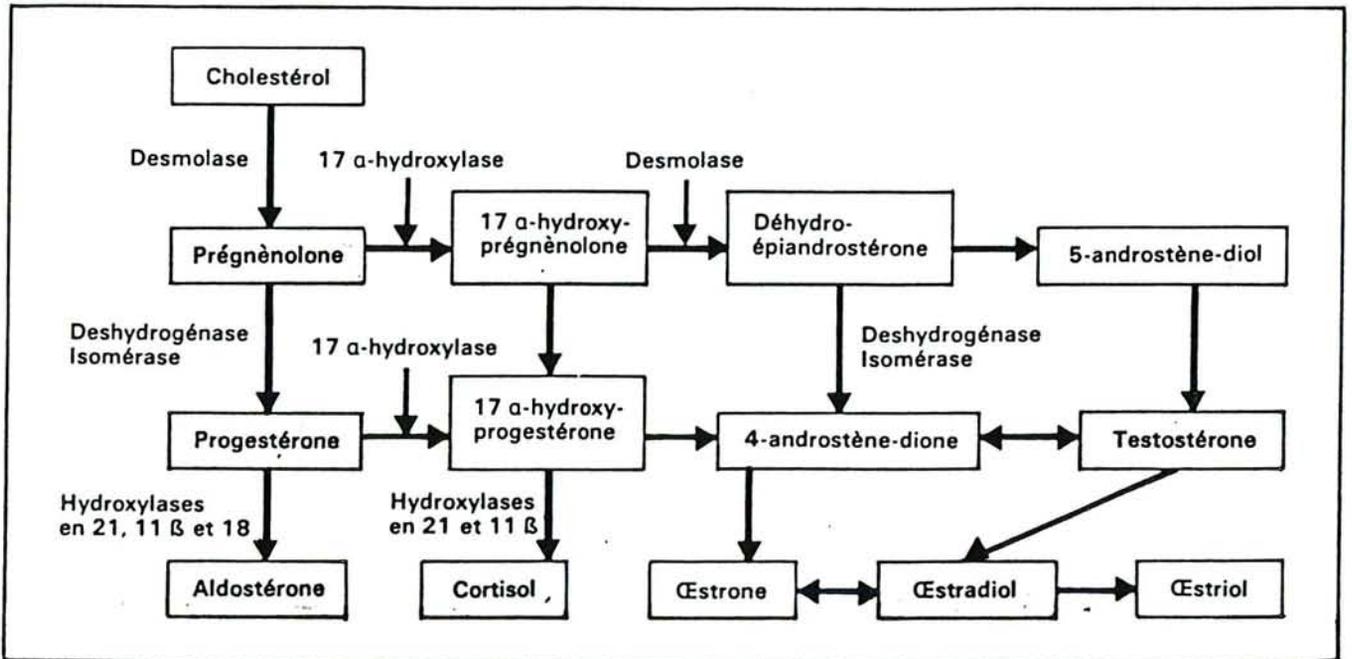


Figure n° 8 : Principales hormones stéroïdes dérivant du cholestérol

**A) LA PROTEINE DE LIAISON SERIQUE DES
ANDROGENES ET DES OESTROGENES :**

**La Sex-Hormone Binding Globulin (SHBG)
ou Sex-steroid Binding Protein (SBP)**

INTRODUCTION

La sex steroid-binding protein (SBP) ou sex-hormone binding globulin (SHBG) encore appelée testostérone - estradiol - binding globulin (TeBG) a été découverte chez l'homme dans le milieu des années soixante (Mercier - Bodard et coll., 1965 ; Rosenbaum et coll., 1966). Cette glycoprotéine lie spécifiquement la 5α dihydrotestostérone (5α - DHT) et la testostérone (T) avec une haute affinité, ainsi que la 17β - oestradiol (E2) avec une affinité plus faible. (Kato et coll., 1968. ; Vermeulen et coll., 1968). La SBP est présente chez un grand nombre d'espèces comme le chien (Tabei et coll., 1978), le lapin (Mickelson et coll., 1978) et le hamster (Gustafson et coll., 1989). Elle n'est pas détectée chez la souris (Renoir et coll., 1980) et le rat (Corvol et coll., 1973). Il est à noter que chez les vertébrés non mammifères, elle est présente chez le poussin, les amphibiens et les reptiles mais semble absente chez les oiseaux (Corvol et coll., 1973).

Noms	Abréviations	Principales hormones naturelles liées
Corticosteroid binding globulin	CBG, Transcortine	Cortisol, progestérone
Sex steroid - binding globulin	SBP, TeBG, SHBG	(Dihydro) - testostérone, estrogènes
Progesterone binding protein	PBP	Progestérone
Androgen - binding - protein	ABP	(Dihydro) - testostérone
Vitamine D binding protein	DBP	(1-25) Dihydroxy-cholécalciférol
α - foetoprotein (murine)	α - FP	Estradiol, estrone

Tableau n° 2 : Liste des principales protéines de transport des stéroïdes

METHODES DE PURIFICATION

Les premières études suggéraient la présence de deux SBP différentes dans le sérum humain : l'une étant spécifique de la testostérone (Pearlman et coll., 1966, Vermeulen et coll., 1968) et l'autre de la 17β - oestradiol (Rosenbaum et coll., 1966, Van Baelen et coll., 1968). En fait, les travaux ultérieurs ont montré qu'il n'existait qu'une seule SBP ayant un même site de liaison pour les différents stéroïdes mais une affinité spécifique (Pearlman et coll., 1968).

Au départ, un grand nombre de laboratoires obtenaient seulement des préparations incomplètement purifiées de SBP (Mercier - Bodard et coll., 1970, Rosner et coll., 1969, Hansson et coll., 1972). La meilleure méthode pour isoler de la SBP humaine très pure est obtenue par chromatographie d'affinité (Michelson et coll., 1975). Ces techniques ont permis de caractériser cette protéine chez un grand nombre d'espèces, dont l'homme (Petra et coll., 1980) et le singe macaque (Turner et coll., 1984).

Les méthodes de purification peuvent se diviser en deux groupes :

- les méthodes utilisant comme support d'affinité la DHT ou la T liée à une matrice insoluble (Petra et coll., 1980),
- les méthodes ayant pour support chromatographique des immunoadsorbants (Fernelund et coll., 1981).

L'intérêt de la première méthode est d'obtenir de la SBP biologiquement active, par le principe même de sa technique de purification, alors que la seconde peut aboutir à la purification de SBP inactive vis à vis de son stéroïde. Il faut noter à ce niveau que les techniques utilisant des chromatographies à caractère hydrophobe, ou de lectine - affinité, ne sont pas considérées comme biospécifiques car elles ne séparent pas la SBP par son activité biologique de liaison. Il est donc important, dans ce cas, de vérifier l'activité de liaison spécifique par des méthodes radio-immunologiques.

CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE

Cette protéine diffère en fonction de l'espèce étudiée comme le montre le tableau n° 3 . C'est une glycoprotéine dimérique d'un poids moléculaire moyen de 90 000 Da. Petra (1979) montre le premier le caractère dimérique de la SBP. Plus récemment, la séquence primaire en acides aminés, chez l'homme et le lapin, démontre la présence d'une seule chaîne polypeptidique et son caractère homodimérique (Walsh et coll., 1986). Il semble donc que la SBP soit codée par un seul gène chez l'homme et très vraisemblablement dans l'ensemble des espèces étudiées, gène situé sur le chromosome 11 chez la souris (Joseph et coll., 1991).

La structure dimérique de cette glycoprotéine est stable, même en condition dénaturante : elle demande 2,5 mole de guanidine/HCl pour séparer les monomères (Casali et coll., 1990). Cette dissociation est réversible après élimination de l'agent dénaturant et ne provoque pas de dommages irréversibles. En effet, les homodimères ainsi reconstitués sont toujours capable de lier la testostérone, ou la 17 β -oestradiol, si le stéroïde se trouve dans la solution de reconstitution de la molécule. Ces résultats récents montrent l'importance et l'action directe des stéroïdes au cours de la formation de la structure dimérique de la SBP biologiquement active (Namkung et coll., 1990). Ils impliqueraient le rôle important joué par ces molécules au cours de la biosynthèse de la SBP endogène et dans son processus de dimérisation.

	Homme	Singe	Lapin
Masse moléculaire (Da) de la SBP dimérique	85 600	85 600	85 800
Masse moléculaire (Da) du monomère	44 000	47 000	43 000
Teneur en carbohydrates (%)	14	12	9
Site de liaison du stéroïde par dimère	0.93	0.64	0.94
Kd - DHT (nM)	0.30	0.90	0.85

Tableau n° 3 : Comparaison de la SBP chez trois espèces différentes.

SEQUENCE PRIMAIRE ET HOMOLOGIE AVEC L'ABP :

La séquence primaire de la SBP humaine est présentée sur la figure n° 9 et elle est comparée à celle trouvée chez le lapin. La structure monomérique humaine de la protéine est constituée par un polypeptide de 373 acide aminés contenant des sites de N, de O - glycosylations et 2 ponts disulfures (Walsh et coll., 1986). Le monomère humain est plus glycosylé que chez le lapin mais ils comportent tous les deux un seul résidu tyrosine. La localisation, chez l'homme, des deux ponts disulfures a été étudiée par analyse peptidique de la SBP native et ils sont situés différemment chez les deux espèces (Walsh et coll., 1986). Une séquence particulière est à noter, chez l'homme et le lapin, de la leucine 248 à la glycine 291 (figure n° 9, numérotation de la hSBP). Ce segment est hydrophobe, il contient une alternance inhabituelle de leucine et pourrait être impliqué dans le site de liaison du stéroïde (Petra et coll., 1988). Cependant, deux travaux récents donnent des domaines différents (Namkung et coll., 1990, Khan et coll., 1990). Le segment répétitif de leucine pourrait contribuer à la stabilisation de la forme dimérique. La séquence primaire de la SBP humaine a été ensuite confirmée grâce à l'étude d'ADN complémentaire et au clonage du gène (Gershagen et coll., 1987 ; Hammond et coll., 1989). Si l'on compare les séquences polypeptidiques de la SBP chez ces deux espèces (figure n° 9), 79 % de résidus sont identiques et l'utilisation de programmes informatiques de type ALIGN (Dayhoff et coll., 1983) confirme l'homologie des deux glycoprotéines et leur origine commune à partir d'un même gène ancestral (Griffin et coll., 1989).

Actuellement, il est établi que la SBP humaine présente une homologie de séquence avec l'ABP de rat. Elles sont codées par le même gène (Hammond et coll., 1989) et elles dérivent d'un gène ancestral commun (Joseph et Coll., 1991).

Il n'existe aucune homologie entre la SBP humaine et les séquences déduites d'ADN complémentaires codant pour un certain nombre de récepteurs des stéroïdes (Bardin et coll., 1988). Ce résultat est confirmé par la structure du récepteur aux androgènes et montre clairement qu'il existe au moins trois familles géniques différentes, pour les protéines de transport des stéroïdes, la troisième étant constituée par la corticostéroïd - binding globulin (CBG) qui n'est pas homologue à la SBP (Hammond et coll., 1987). L'alignement des séquences polypeptidiques de l'ABP de rat et de la SBP humaine, ou de lapin, n'est toutefois pas suffisant pour affirmer une complète similitude et demanderait une analyse structurale tridimensionnelle car un certain nombre de résidus polypeptidiques, situés à des positions éloignées en structure primaire, peuvent interagir au niveau de la structure spécifique du site de fixation du stéroïde. Si tel est le cas, aucune étude de ce genre n'a encore été réalisée avec la SBP et les autres récepteurs des stéroïdes.

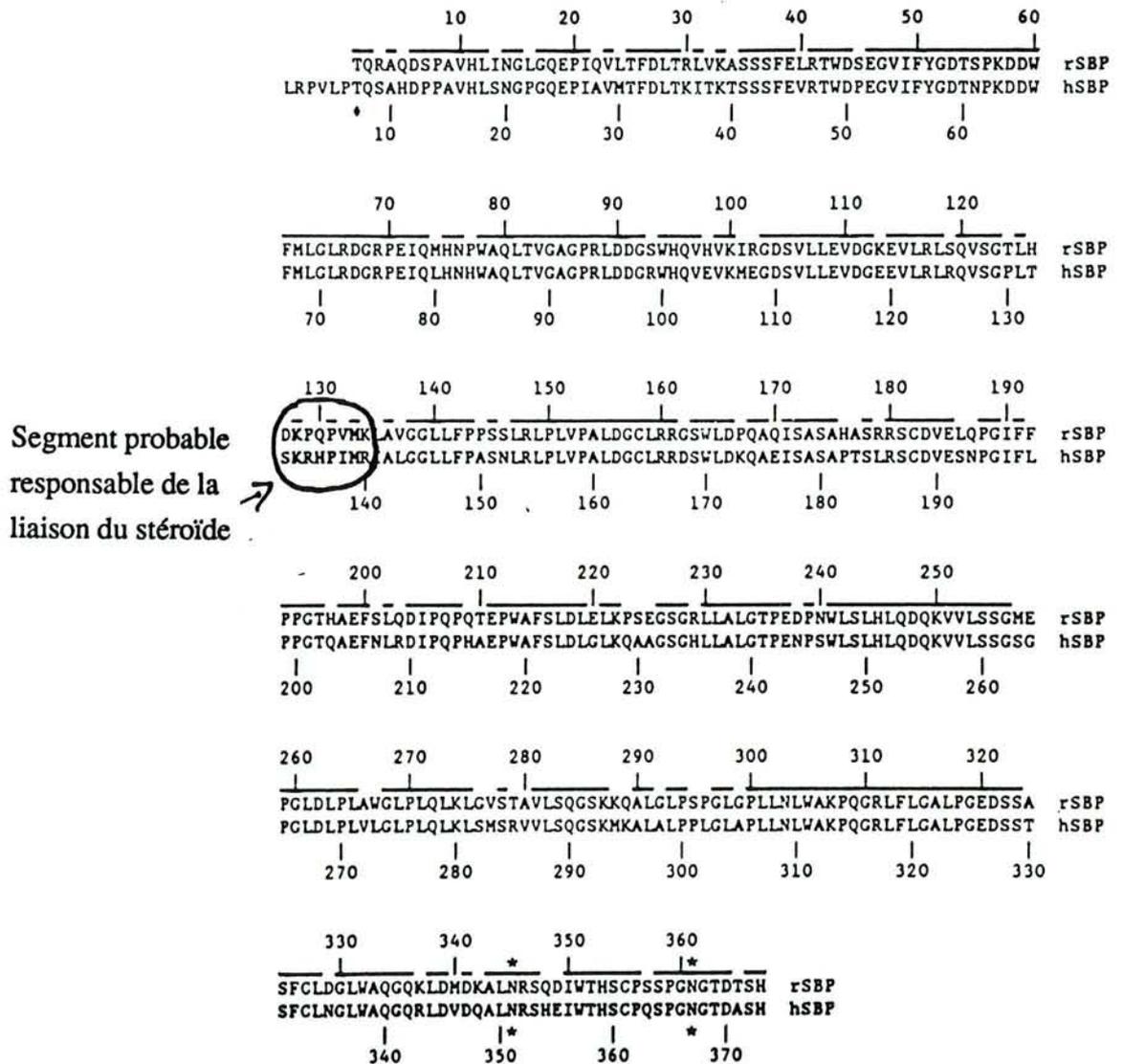


Figure n° 9 : Séquences polypeptidiques de la SBP humaine (hSBP) et de lapin (pSBP) (d'après Griffin et coll., 1989) . Les lignes en traits pleins indiquent les séquences identiques, les étoiles montrent les sites de N- glycosylation et les losanges les sites de O-glycosylation.

Enfin, il semble de plus en plus clair que l'action physiologique de la SBP ne s'arrête pas aux transports des stéroïdes (cf rôles physiologiques), ce qui expliquerait la faible partie du domaine polypeptidique impliqué dans ce rôle.

Après la découverte de l'homologie existante entre SBP/ABP, Baker et coll. (1987) montrent que l'ABP de rat présente également une grande homologie avec la protéine S bovine, impliquée dans le système de la coagulation sanguine, vitamine K dépendante. Elle a été récemment séquencée (Dahlbäck et coll., 1986). La SBP humaine présente également des homologies au niveau C terminal avec la protéine S bovine (Gershagen et coll., 1987) et humaine (Que et coll., 1987). Cette homologie avec un cofacteur de la protéine C, conduisant à une protéine dégradant les facteurs Va et VIIIa de la cascade enzymatique de la coagulation sanguine, demeure incomprise et des résultats récents montrent que la protéine S humaine purifiée n'est pas capable de lier la DHT.

Une découverte très récente (Joseph et coll., 1992) démontre l'existence d'une homologie importante entre le groupe ABP (rat), SBP (humaine), protéine S (humaine) et deux protéines de structure des membranes basales, la laminine et la mérosine. Cette homologie de structure polypeptidique est très importante au niveau de la partie carboxy - terminale (figure n°10). Il n'est pas encore sûr que cette homologie soit en rapport avec des rôles physiologiques communs à ces deux groupes de protéines. Si tel était le cas, le faible domaine polypeptidique responsable de la liaison aux androgènes pourrait impliquer l'existence d'autres rôles physiologiques possibles pour le reste de la séquence, comme par exemple dans la différenciation et le développement cellulaire, comme pour le cas de la laminine et la mérosine (Joseph et coll., 1992).

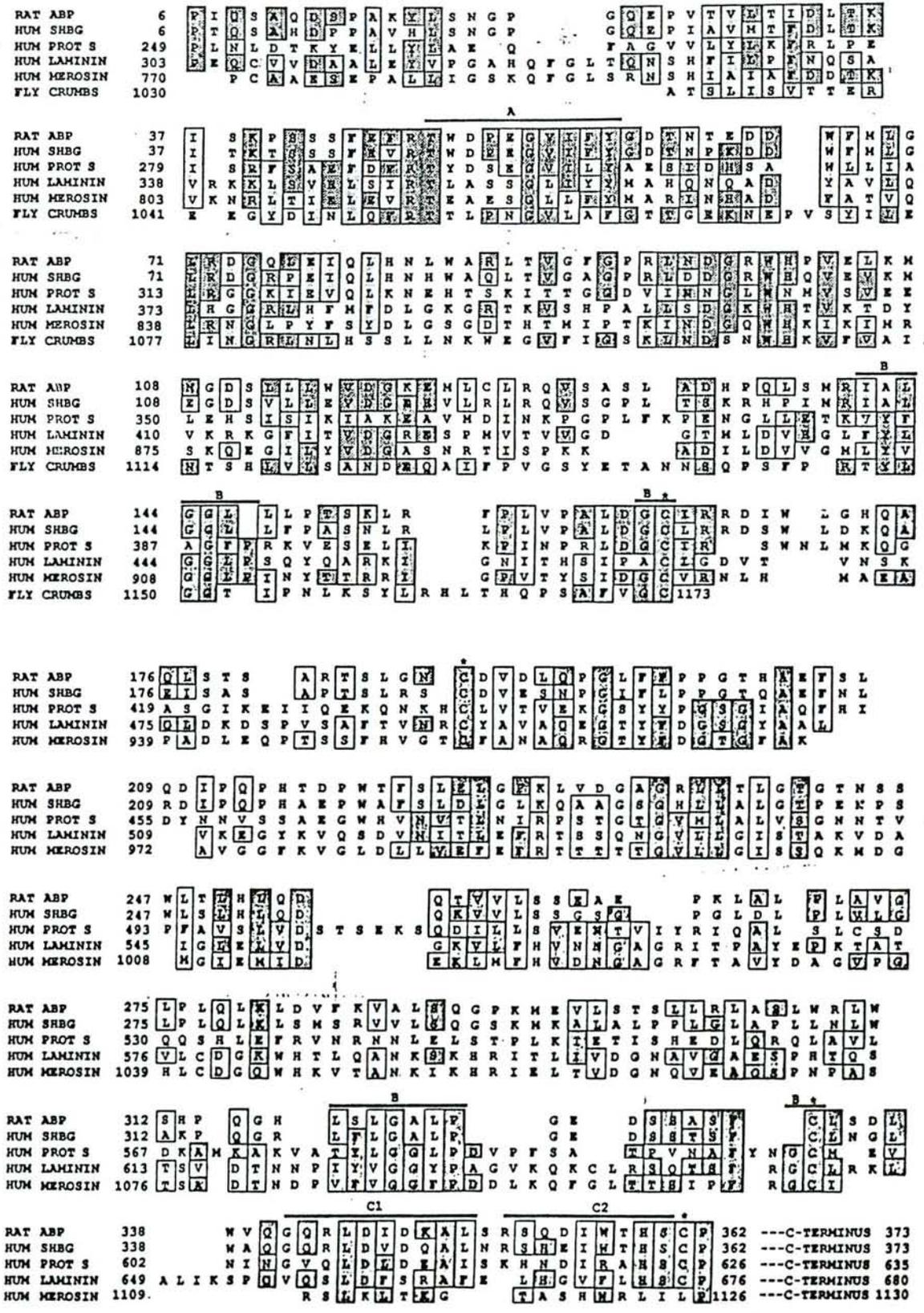


Figure n° 10 : Homologies (encadrement) entre ABP/SBP et laminine/mérosine. Le segment A correspond à la séquence reconnaissant le récepteur membranaire de la SBP. (D'après Joseph et coll., 1992).

MICROHETEROGENEITE DE LA SBP

La structure homodimérique de la SBP décrite précédemment pose un problème lorsque cette protéine subit une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (PAGE - SDS). En effet, on observe plusieurs bandes démontrant la microhétérogénéité de la protéine (Strel 'chyonok et coll., 1990). Cette caractéristique s'observe également pour l'ABP (Danzo et coll., 1988). En réalité, c'est la composition en glucides et la formation des chaînes en forme d'antennes qui sont responsables de cette microhétérogénéité, liée à la différence relative en séquences polypeptidiques primaires à la partie N-terminale, et à la position différente des ponts disulfures (Walsh et coll., 1986). L'ensemble de ces variations engendre la présence de monomères de SBP migrant en PAGE - SDS autour de 44 000 Da avec de légères différences (Gershagen et coll., 1987). Il existe également des variations génétiques chez l'homme et près de 20 % de la population possède trois bandes de poids moléculaires supérieurs à 44Kda en PAGE-SDS (Gershagen et coll., 1987). Chaque bande obtenue est constituée par un ensemble de monomères que l'on peut visualiser par une électrophorèse bidimensionnelle (Danzo et coll., 1989). La notion de promoteur "lourd et léger" pour la SBP, ou l'ABP, n'est pas correcte car elle impliquerait que les deux glycoprotéines soient composées de deux monomères différents, codés par deux gènes différents (Cheng et coll., 1985), ce qui n'est pas le cas.

En conclusion, il existe trois sites de liaison des chaînes glucidiques pour la SBP humaine et deux chez le lapin.

La microhétérogénéité observée n'est pas due à l'existence d'autres sites de liaison, mais à la différence de composition en carbohydrates au sein d'un même site. Ces chaînes oligosaccharidiques peuvent subir des transformations, ou des altérations, au cours des différentes étapes de purification de la protéine.

Le rôle de ces chaînes glucidiques n'est pas encore parfaitement connu. Elles ne semblent pas interférer dans le site de liaison du stéroïde comme le montre l'utilisation de N et de O - glycanases (Danzo et coll., 1989) où la SBP semble toujours en mesure de lier son stéroïde. Ces expériences demandent à être confirmées en utilisant une SBP entièrement déglycosylée, codée par une bactérie. Cette étude est en cours.

ETUDE DU SITE DE LIAISON DU STEROÏDE

La dihydrotestostérone (DHT) est le ligand naturel de la SBP ayant le plus d'affinité pour la protéine ($K_d \sim 0.3$ nM). Un certain nombre d'autres structures chimiques stéroïdes dérivées ont été testées vis à vis de leur capacité de fixation sur la SBP, elles donnent des informations spécifiques sur la topologie du site de fixation du stéroïde (Dun et coll., 1980., Ferlund et coll., 1990). Ces composés peuvent subir des modifications du cycle A ou D essentiellement (figure n°11), et une substitution en position 17, sans changer l'affinité de liaison de la SBP. Ces études ont permis la réalisation de colonnes d'affinité utilisées pour la purification de la SBP (Petra et coll., 1980). Cependant, la base moléculaire de reconnaissance du site spécifique de liaison par le stéroïde est complexe. Les premiers travaux ont montré que le site de liaison possédait une cavité contenant une ou plusieurs structures accepteuses de protons à l'aide d'estrogènes fluorescents comme le groupe de l'équilenine (Ross et coll. 1982., Orstan et coll., 1986).

Depuis la connaissance de la séquence polypeptique primaire de la molécule, l'étude du site de liaison du stéroïde devenait possible à partir de digestions enzymatiques spécifiques, en utilisant différents ligands marqués (Sweet et coll., 1987).

La delta - 6 testostérone, très utilisée pour la purification de l'ABP comme nous le verrons dans le chapitre suivant, a également été utilisée pour la SBP et semble lier de façon spécifique et covalente la méthionine en position 139 de la SBP humaine (Grenot et coll., 1988).

L'étude de la liaison par affinité de la SBP humaine par la DHT homoacétylée (DHTBr) a donné lieu à deux travaux contradictoires sur le site de liaison du stéroïde : une lysine 134 pour Namkung et coll. (1990) et une histidine 235 pour Khan et coll. (1990). Il semble qu'une erreur dans la dégradation d'Edman se soit produite lors de la deuxième étude. Un éclaircissement sur ce point serait intéressant pour conclure à ce sujet.

Si l'on retient le résultat de Namkung, un modèle de liaison du stéroïde est présenté sur la figure n° 11 . Il semble exister une structure "sandwich" des deux sous-unités de la SBP, plaçant le stéroïde à l'interface entre les deux monomères (figure n° 12). Il est possible que l'azote amino-terminal de la lysine 134 forme une liaison par hydrogène grâce à son doublet électronique libre avec l'hydrogène de l'hydroxyle du stéroïde en 17β (figure n° 11). Ces résultats demandent à être confirmés. Le mécanisme supposé de liaison du stéroïde à pH neutre implique la complète non ionisation de la lysine 134, d'où un faible pK créant au sein du milieu une faible constante diélectrique, ce qui semble être le cas (Orstan et coll., 1986). L'alkylation de la lysine 134 impliquerait donc la perte de l'activité de liaison pour le stéroïde de la protéine. Une étude préliminaire chez le lapin fournit des résultats similaires avec la même position du résidu lysine et la présence d'une méthionine serait déterminante (Namkung et coll., résultats non publiés). L'utilisation de la diffraction aux rayons X serait utile pour permettre de comprendre avec certitude le mécanisme responsable de la spécificité de la liaison du stéroïde sur sa protéine de transport.

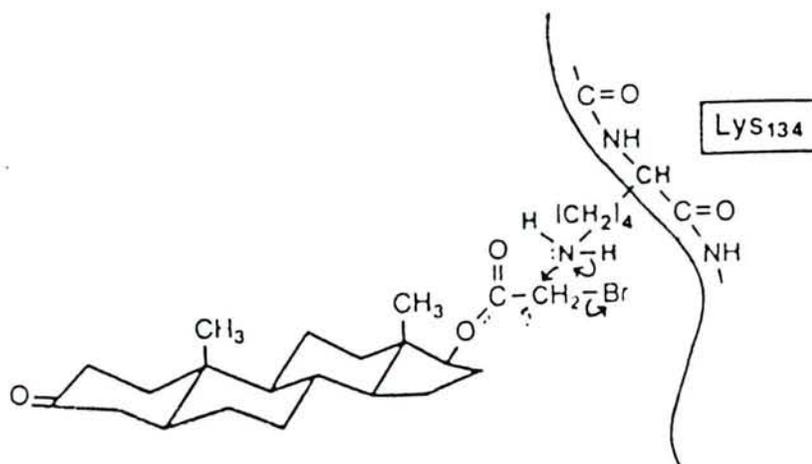


Figure n°11 : Site de liaison le plus probable (lysine 134) de la SBP pour son stéroïde (d'après Namkung et coll, 1990).

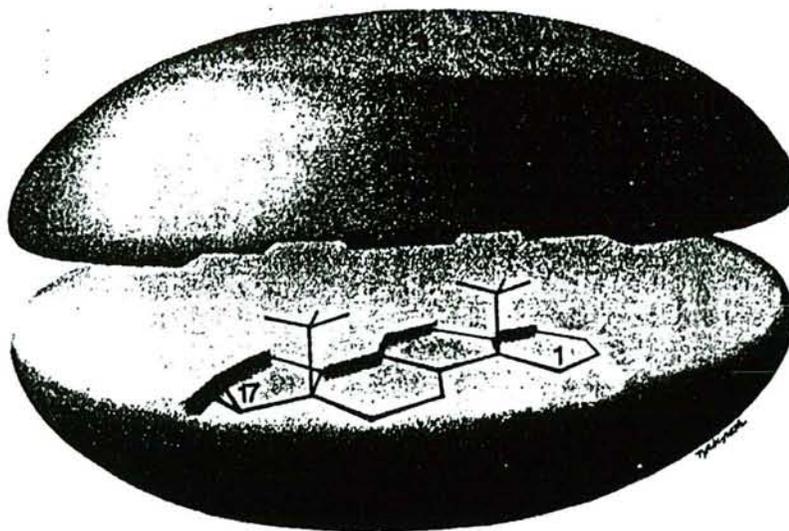


Figure n° 12 : Structure hypothétique de la SBP représentant le stéroïde encastré dans la structure dimérique de la protéine (d'après Petra, 1991).

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET STRUCTURE GENOMIQUE

L'exploration de la structure et des rôles physiologiques de la SBP nécessitait l'utilisation des outils de la biologie moléculaire.

Ces dernières années, les progrès les plus significatifs ont été obtenus à partir du clonage et du séquençage d'un grand nombre d'ADN complémentaires et de la découverte des structures du gène de la SBP humaine et de l'ABP de rat.

Gershagen et coll. (1987) ont isolé un clone λ gt 11 à partir d'une banque d'ADN complémentaires de foie humain grâce à l'utilisation d'anticorps anti-SBP humaine. Ce fragment était composé de 1,1 kilobases (kb) codant pour une séquence de 356 acides aminés. D'autres études ont confirmé ce résultat avec quelques modifications (Hammond et coll. 1987, Que et coll, 1987), à partir de deux autres cDNA. Plus récemment, des ARN messagers (mRNA) de 1,6 kb (Gershagen et coll., 1989) et de 2,5 kb (Hammond et coll., 1989) furent isolés à la fois aux niveaux hépatique et testiculaire chez l'homme. Aucun message transcriptionnel ne fut isolé à partir de cellules cancéreuses de tumeurs du sein (MCF - 7), de l'endomètre (RL 9J-2) ou même de la prostate (LN-Ca P) (Mercier - Bodard et coll., 1989).

La structure du gène humain codant pour la SBP a été découverte indépendamment par deux équipes (Gershagen et coll., 1989, Hammond et coll., 1989). Il est constitué de 8 exons séparés par 7 petits introns. Le premier exon code pour 29 acides aminés et l'exon IV représente une partie du site de fixation du stéroïde (Namkung et coll., 1990). L'analyse par Southern-Blot montre qu'un seul gène code pour la SBP dans le génome humain (Hammond et coll., 1989). Il est situé sur le bras court du chromosome 17 (Berudé et Coll., 1990).

Joseph et coll. (1988) ne différencient pas de promoteur distinct au niveau du gène codant pour l'ABP chez le rat. En fait, les deux mêmes équipes (Gershagen et coll., 1987, Hammond et coll., 1987) ont montré que l'homologie entre ABP et SBP est confirmée par les séquences codantes des deux protéines, se différenciant par la suite grâce à des modifications post - transcriptionnelles.

FACTEURS DE REGULATION

La régulation de la biosynthèse de la SBP chez l'homme n'est pas très bien connue. La plupart des hypothèses de régulation viennent des variations observées lors de situations physiologiques particulières (grossesse) ou au cours de différentes pathologies (tableau n°4). L'absence physiologique de SBP sérique chez l'homme n'a jamais été décrite, malgré une étude sur un million de sujets (Hammond et Coll., 1985). L'oestradiol augmente son taux plasmatique et la testostérone l'abaisse (Schultz et coll., 1985). L'insuline et la prolactine peuvent inhiber sa production au niveau hépatique (Plymate et Coll., 1988). L'IGF1 et d'autres facteurs de croissance ont été proposés récemment comme des régulateurs potentiels de sa synthèse (Schoultz et coll., 1989). Une étude plus complète sur lignée Hep G2 (cellules hépatiques cancéreuses humaines) montre que le taux d'ARN messagers est augmenté en présence d'oestrogènes et ce phénomène n'est pas réversible par administration d'anti-oestrogènes de type tamoxifène (Mercier-Bodard et coll., 1989). Des facteurs non hormonaux semblent également impliqués dans le contrôle de la SBP, son taux est bas chez les obèses et augmente au cours de la perte de poids (Pugeat et coll., 1988). A l'inverse, la SBP augmente au cours de la dénutrition par anorexie mentale et diminue au cours de la reprise de poids (Estour et coll., 1986). Il semble donc que la SBP soit soumise à une régulation multifactorielle complexe et encore controversée. Le statut nutritionnel pourrait avoir un rôle prépondérant dans ce processus (Pugeat et coll., 1991).

En conclusion, la biologie moléculaire s'est révélée très utile pour la SBP et offre de nouvelles perspectives d'étude. Les bases moléculaires d'expression et régulation de la protéine ne sont pas encore parfaitement connues mais l'utilisation de ces nouveaux outils permettra certainement de mieux comprendre ces mécanismes.

AUGMENTATION DU TAUX CIRCULANT DE SBP	DIMINUTION DU TAUX CIRCULANT DE SBP
<p>Hormones thyroïdiennes et hyperthyroïdie Hyperoestrogénie Grossesse Phase lutéale du cycle menstruel Administration d'oestrogènes Phénytoïne Tamoxifène Stress prolongé Carcinome de la prostate Anorexie mentale Vieillesse Régime hypoglucidique</p>	<p>Obésité Hirsutisme Hypogonadisme Hyperprolactinémie Ménopause Administration de progestogènes Danazol Glucocorticoïdes Insuline IGF 1</p>

Tableau n° 4 : Listes des principales situations physiopathologiques impliquant une variation du taux circulant de la SBP.

METHODES DE DOSAGE

METHODES INDIRECTES

Elles sont basées sur la mesure de la SBP après saturation par un androgène et l'on dose une capacité de liaison. L'androgène le plus utilisé est la DHT, présentant une affinité plus forte vis à vis de la SBP que la testostérone et elle ne se lie pas à la CBG, contrairement à cette dernière.

A partir de ce principe, il existe un certain nombre de techniques utilisées :

- la dialyse à l'équilibre : c'était la méthode de référence avant la mise au point des méthodes radio-immunologiques (RIA). Elle permet de mesurer la fraction hormonale libre et liée à la SBP et son coefficient d'affinité pour l'hormone,

- l'électrophorèse en gel de polyacrylamide : elle consiste à mesurer la radioactivité d'un stéroïde marqué, lié à la SBP après séparation des autres protéines sériques sur gel de polyacrylamide (Corvol et coll., 1971),

- la précipitation au sulfate d'ammonium : à une concentration déterminée elle permet de séparer la SBP des autres protéines sériques et de la quantifier ensuite par saturation à l'aide d'un stéroïde marqué (Rosner, 1972),

- l'isolement de la SBP par la concanavoline A : elle a la propriété d'absorber certaines glycoprotéines (Nisula et coll., 1978).

METHODES DIRECTES

Lorsque l'on a su isoler la SBP à l'état suffisamment pur, afin d'obtenir des anticorps spécifiques, les méthodes RIA sont apparues, sachant que la SBP possède deux résidus tyrosine par monomère susceptibles d'être iodés. Le premier test RIA a été mis au point par Mercier et coll (1979). D'autres techniques ont ensuite été décrites (Cheng et coll., 1983., Mercier-Bodard et coll., 1985., Khan et coll., 1982).

Des dosages immunoradiométriques (IRMA) utilisant une méthode sandwich avec un anticorps sur un support solide, et un deuxième anticorps marqué, ont nettement abaissé le seuil de détection (Alexander et coll., 1985).

Actuellement, les dosages immuno-enzymatiques de type "ELISA" (Bordin et coll., 1982) sont les plus utilisés.

L'intérêt de la mesure de la SBP sérique est qu'elle fait le plus souvent partie d'un bilan androgénique (hirsutisme, hyperandrogénie). L'index de testostérone libre (ou le rapport testostérone totale / SBP) est intéressant pour l'approche biologique des hyperandrogénies (See et coll., 1988). C'est également un marqueur de l'activité des hormones thyroïdiennes permettant de détecter la survenue d'une hyperthyroïdie ou d'une résistance périphérique aux hormones.

Enfin, la découverte récente de son homologie avec les protéines de structure des membranes basales des tissus laisse supposer son utilité en tant que marqueur de la différenciation cellulaire en cancérologie (Pugeat et coll., 1988).

ROLES PHYSIOLOGIQUES

La SBP est très souvent appelée "protéine de transport" des androgènes en raison de son rôle dans le maintien de l'équilibre entre stéroïdes libres et liés à son site de liaison, ou encore à l'albumine. La testostérone (T), et surtout son dérivé actif la dihydrotestostérone (DHT), se lient très fortement à la SBP. La concentration sérique en SBP régule l'équilibre de la fraction libre de DHT (Burke et coll., 1972) et contrôle la diffusion de l'hormone à travers les vaisseaux sanguins jusqu'à leurs tissus cibles (Vermeulen et coll., 1969). Les différentes études cliniques confirment cette hypothèse : la clearance métabolique de la DHT, chez des patients présentant un faible taux sérique de SBP, est plus importante que chez des sujets ayant des valeurs élevées (Bardin et coll., 1967). Une étude chez le singe montre, après injection de SBP purifiée ou d'anticorps anti-SBP, un résultat similaire (Plymate et coll., 1990).

Ce modèle explique le rôle joué par la SBP dans la régulation de la libération des stéroïdes au niveau circulatoire pour qu'ils puissent exercer leur action hormonale au niveau des tissus cibles.

Il est désormais certain que les protéines de transport des stéroïdes (SBG, CBG) agissent de façon spécifique dans un certain nombre de tissus et ne servent pas uniquement de réservoir passif d'hormones stéroïdes (Rosner, 1990). L'interaction spécifique de ces protéines avec des récepteurs membranaires sera présentée dans le chapitre V.

Il semble donc que la SBP possède plus d'un rôle physiologique et la découverte récente de son homologie de séquence polypeptidique avec des protéines de structure des lames basales (laminine, mérosine) permet d'entrevoir de nouvelles perspectives dans la physiologie de la SBP (différentiation et développement cellulaire...). Les études futures utilisant les outils modernes de la biologie moléculaire pourront certainement permettre de mieux comprendre l'étendue exacte du rôle physiologique joué par la SBP.

**B) LA PROTEINE DE LIAISON TESTICULAIRE
DES ANDROGENES :**

L'Androgen-Binding Protein (ABP)

INTRODUCTION

L'androgen-binding protein (ABP) a été isolée pour la première fois à partir d'épididymes de rat (Hansson et coll., 1971, Ritzen et coll., 1971). Ce n'est que deux ans plus tard que son origine testiculaire fut démontrée (French et coll., 1973). L'ABP représente une sécrétion majeure des cellules de Sertoli (Hagenas et coll., 1975) et son étude apporte un bon reflet sur la physiologie sertolienne dans l'appareil reproducteur mâle (Gunsalus et coll., 1980). Les récents progrès, accomplis grâce à l'essor des nouvelles techniques de biologie moléculaire, ont montré son étroite homologie avec la SBP sérique (Joseph et coll., 1987). L'ABP appartient à la famille des protéines de transport des stéroïdes et, plus particulièrement, des androgènes (dihydrotestostérone - testostérone). Cette propriété est également l'apanage de la SBP sérique. L'ABP existe chez un grand nombre d'espèces mais c'est le rat qui a été l'animal de choix en raison de l'absence physiologique de SBP dans cette espèce (pas d'interférence dans le dosage). Un certain nombre d'études récentes montrent le rôle potentiel joué par l'ABP (et la SBP) au niveau des tissus cibles grâce à la présence de récepteurs spécifiques au niveau membranaire. Enfin, son homologie importante avec des protéines de structure des membranes basales (laminine, mérosine), de découverte très récente (Joseph et coll., 1992), laisse à penser que l'ABP (et la SBP) pourraient jouer un rôle dans le développement et la différenciation cellulaire.

METHODES DE PURIFICATION

Le rat a été longtemps l'animal de prédilection pour la purification de l'ABP : cette espèce, en effet, ne contient pas de SBP sérique pouvant interférer avec l'ABP (Corvol et Coll., 1973).

Actuellement, le développement de méthodes chromatographiques utilisant des lectines (concanavaleine A...) permet de caractériser spécifiquement ABP et SBP dans la plupart des espèces animales étudiées et chez l'homme. (Danzo et coll., 1988, Hsu et coll., 1978, Danzo et coll., 1990).

Un certain nombre de techniques de purification ont été utilisées depuis sa découverte (1971) :

- l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (Ritzen et coll., 1974),
- les méthodes utilisant sa capacité de liaison avec la DHT marquée, après destéroïdation (Musto et coll., 1976),
- les tests radio-immunologiques et immuno-enzymatiques (Gunsalus et coll., 1978).

Malgré la pluralité de ces méthodes, l'ABP n'était pas obtenue dans des conditions de pureté satisfaisante car elle ne représente que 0,02 % de l'ensemble des protéines testiculaires.

En 1977, Musto et coll développent une colonne de chromatographie d'affinité par couplage de DHT au sépharose. Le rendement est excellent (80 %), l'activité spécifique est de 5000 pmoles/mg de protéine et cette méthode laisse supposer l'existence de la nature dimérique de la protéine.

En 1980, la même équipe améliore cette technique qui permet enfin d'obtenir une protéine pure à 98 %. L'électrophorèse de polyacrylamide en présence de SDS (PAGE - SDS) confirme la présence de deux sous - unités de 41 et 45 Kda (tableau n°5).

Les deux travaux précédents concernent l'ABP épидидymaire de rat qui est 10 fois plus concentrée que dans le testicule.

Une méthode utilisant également la chromatographie d'affinité a permis la purification de l'ABP épидидymaire de lapin (Cheng et coll., 1982). Cette espèce contient à la fois de la SBP sérique et de l'ABP épидидymaire et testiculaire, d'où la nécessité de coupler l'étape de chromatographie d'affinité à un deuxième passage sur une colonne de concanavaleine A sépharose qui sépare les deux protéines à partir de leurs résidus différents en carbohydrates.

En 1981, Larrea et coll purifièrent l'ABP testiculaire de rat par chromatographie d'affinité et montrèrent qu'il existe des différences avec l'ABP épидидymaire. Elles sont essentiellement dues à la partie glucidique de la protéine (Danzo et coll., 1988).

Les méthodes utilisant la chromatographie d'affinité présentent un triple intérêt :

- purification d'une protéine capable de lier son stéroïde,
- conservation de ses propriétés immunologiques,
- la masse moléculaire obtenue est proche de 90 Kda pour l'ABP native.

En 1986, Guéant et coll purifient de l'ABP testiculaire de rat par CLHP en 4 étapes.

Cette technique chromatographique a permis d'obtenir les résultats suivants :

- l'ABP testiculaire de rat a été purifié 87 500 fois après 4 étapes chromatographiques avec un faible rendement de 14 %,
- la molécule d'ABP obtenue est pure à 99 % avec une activité spécifique de 16 500 pmoles/mg de protéine,
- la molécule d'ABP marquée à l'iode 125, selon la technique de Markwell (1982), a permis une estimation de la masse moléculaire (92 600 Da), du rayon de Stokes (4,1 nm), des points isoélectriques (4,7 ; 4,9 ; 5,3) et du coefficient de sédimentation (4,7 s).

Plus récemment, Barbey et coll (1990) ont purifié de l'ABP épидидymaire de taureau en couplant la chromatographie d'affinité et la CLHP. Ils ont obtenu un bon facteur de purification (7667) mais avec un faible rendement (9 %).

En conclusion, l'ABP est très difficile à purifier en raison de sa faible concentration. Les méthodes couplant l'affinité, le passage sur concanavaleine A et la CLHP, permettent d'obtenir une protéine alliant à la fois un bon degré de pureté, le maintien de son intégrité protéique et de son immunogénicité.

CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE MICROHETEROGENEITE

L'ABP de rat est une glycoprotéine dimérique d'un poids moléculaire proche de 90 Kda. Elle est formée de deux sous-unités hétérogènes de 41 et 45 Kda (Musto et coll., 1977). Les deux monomères sont appelés sous-unités lourde (H) et légère (L) et sont représentés dans un rapport de 3/1 respectivement. (Musto et coll., 1982). La différence entre ces deux monomères n'est pas due à la séquence polypeptidique (Larrea et coll., 1981) mais à une différence dans la composition en résidus sucrés (Danzo et coll., 1990).

L'ABP retrouvée chez les autres espèces (lapin, homme) semble très proche des résultats précédents avec de légères variations de poids moléculaire pouvant s'expliquer par les différentes techniques utilisées pour sa purification (Danzo et coll., 1973, Hsu et coll., 1978).

La microhétérogénéité retrouvée dans la plupart des travaux concernant l'ABP s'explique par la différence de glycosylation inter-espèce et intra-espèce comme, par exemple, pour l'ABP sérique, épидidymaire et testiculaire chez le rat (Danzo et coll., 1988).

La signification de cette hétérogénéité a longtemps été incomprise. Il semble actuellement qu'elle puisse jouer un rôle dans la reconnaissance des cellules cibles comme cela a déjà été montré dans l'hormone gonadotrophine chorionique (Ryan et coll., 1987).

L'analyse polypeptidique a été étudiée par Tindall et coll (1980), Feldman et coll (1981). La leucine est l'acide aminé le plus représenté (19 g/100 g peptide) comme c'est également le cas pour la SBP, la teneur en acide aminé apolaire étant de 51 % ce qui donne une hydrophobicité moyenne.

L'étude de l'ABP de rat, avec des glycosydases, indique que la protéine contient de l'acide sialique, du galactose, du mannose et de la N-acétyl glucosamine avec une moyenne de 20% pour la sous-unité H et de 11% pour la sous-unité L (Danzo et coll, 1991). La chromatographie sur lectines montre une structure oligosaccharidique complexe avec des formations tri et tetra antennées. Il semble que ces glucides complexes n'interviennent pas dans la liaison du stéroïde à l'ABP.

En effet, le marquage de la protéine par photoaffinité est possible sur des protéines différemment glycosylées (Danzo et coll., 1989). Il n'est toutefois pas impossible que telle ou telle glycosylation puisse faire varier l'affinité de l'ABP pour son stéroïde. Il semble donc que la différence en carbohydrates puisse être responsable de rôles physiologiques différents, notamment entre ABP et SBP, mais également entre ABP testiculaire et épидидymaire d'un même individu !

Taylor et coll (1980) ont développé une méthode de fixation covalente de la Δ_6 -testostérone sur l'ABP par photoexcitation (ou photoaffinité). Cette technique a permis de démontrer que les deux sous-unités H et L peuvent être radiomarquées (Larrea et coll., 1987) et possèdent donc chacune un site de liaison pour le stéroïde.

La microhétérogénéité des deux sous - unités ne montre aucune différence dans l'activité spécifique de la liaison du stéroïde (Schmidt et coll., 1981).

L'ABP est capable de lier la dihydrotestostérone avec une constante d'affinité variant de 0,5 à 1 nM⁻¹ selon la méthode utilisée (French et coll., 1973, Tindall et coll., 1980, Larrea et coll., 1981). Elle est également capable de lier la testostérone avec une affinité plus faible et, de façon plus générale, le groupe des 17 β - hydroxystéroïde. (Kirchhoff et coll., 1979).

BIOLOGIE MOLECULAIRE

Un certain nombre de travaux récents de biologie moléculaire sont communs à l'ABP de rat et à la SBP humaine, en raison de leur homologie de séquence (Joseph et coll., 1987) et de leur origine génomique commune (Hammond et coll., 1989, Gershagen et coll., 1989). La plupart des résultats de biologie moléculaire sont donc exposés dans le chapitre correspondant sur la SBP. Des clones de cDNA ont été isolés à partir de testicules de rat et séquencés (Reventos et coll., 1988). A l'exception d'un seul nucléotide dans le codon (G à la place de A) produisant les 317 acides-aminés de la protéine, les résultats obtenus sont identiques à ceux publiés par Joseph et coll (1987). Les résultats plus récents n'ont jamais établi avec certitude la séquence amino-terminale des deux formes d'ABP (I et II) séparées sur concanavaleine A. Il semble cependant que ces deux formes soient très proches de la SBP humaine avec 68 % d'homologie en séquence primaire (Joseph et coll., 1987). La masse moléculaire de l'ABP de rat est plus légère que celle de la SBP humaine (~ 6 KDa). L'ABP présente, comme la SBP, une homologie de séquence avec la partie carboxy-terminale des protéines S bovine et humaine (Becker et coll., 1987) et avec des protéines de structure des membranes basales (Joseph et coll., 1992). Le site de liaison du stéroïde par l'ABP (et la SBP) est situé entre le 107^e et le 130^e acide aminé à partir de l'extrémité N-terminale (Picardo-Léonard et coll., 1988). Danzo et coll (1991) ont montré que le site de liaison pour la Δ_6 -testostérone de l'ABP chez le rat était situé entre le 171 et le 181 acide aminé du précurseur. Après digestion trypsique, un peptide isolé par CLHP donne la séquence suivante : Ile - Ala - Leu - Gly - Gly - Leu - Leu - Leu - Pro - Thr - Ser. Il semble donc que, contrairement aux études effectuées sur la SBP humaine (Namkung et coll., 1990), le site de liaison du stéroïde à l'ABP soit composé par plusieurs acides aminés. Cette région est immédiatement adjacente à celle contenant la lysine 134 de la SBP humaine (Namkung et coll., 1990) et la méthionine 139 (Grenot et coll., 1988). Cette étude confirme que chaque monomère est capable de lier le stéroïde alors qu'un seul peptide majeur est isolé par photoaffinité. Les études par représentation de Scatchard (1949) ne donnent qu'un seul site de liaison par molécule (Danzo et coll, 1973).

Un ARN messager de 1,7 Kb a été détecté dans les testicules de rat avec un ADN complémentaire de l'ABP (Reventos et coll., 1988). Il est plus abondant chez le rat de 20 jours que chez l'adulte et il est indétectable dans les extraits de foie, de rein ou d'épididyme. L'action directe de la FSH augmente le taux d'ARNm et la testostérone augmente l'effet de la FSH sur le testicule entier. Sur les cultures de cellules de Sertoli, l'action indirecte de la testostérone sur l'induction du taux d'ARNm est certainement due à l'action du P Mod-S (Skinner et coll., 1985). La comparaison de l'organisation des gènes de la SBP humaine et de l'ABP de rat (figure n° 13) présente une grande conservation et ils diffèrent surtout au niveau de la taille, la

séquence faisant apparaître des introns différents entre les exons 5 à 8 (Hammond, 1990). L'ADN complémentaire de l'ABP possède une extrémité 5' inhabituellement longue qui n'est pas homologue à celle de la SBP humaine (Joseph et coll., 1988). Cette différence reste actuellement inexpliquée. Une étude par Southern-Blot montre que le gène codant pour l'ABP et la SBP est situé sur le chromosome 11 chez la souris (Joseph et coll., 1991) et sur le chromosome 17 chez l'homme (Berude et coll., 1990). Une protéine recombinante capable de lier avec une haute affinité la DHT a été préparée très récemment par Hagen et coll (1992).

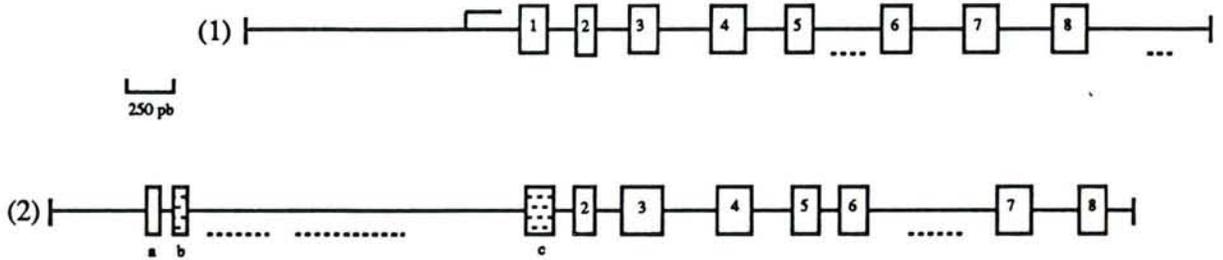


Figure n° 13 : Comparaison de l'organisation structurale des gènes de l'ABP de rat (1) et de la SBP humaine (2). Les exons sont numérotés de 1 à 8 et la partie a à c de la SBP correspond à l'extrémité 5' plus longue que celle du gène de l'ABP. (D'après Hammond, 1990).

ONTOGENIE - REGULATION HORMONALE

L'ABP, chez le rat, a montré une variation quantitative en fonction de l'âge (Carreau, 1986). La protéine est détectable chez le rat de 5 jours (RIA), son taux est maximal entre dix et vingt jours et diminue à l'âge adulte. L'ABP biologiquement active semble être maximale à vingt jours pour disparaître après quarante jours (Danzo et coll., 1985).

En réalité, il faut tenir compte de l'expression des résultats obtenus et de la méthode utilisée pour le dosage de la protéine (RIA, capacité de liaison) et (fmole/g de tissu ou par organe).

Ces variations sont dues à la régulation hormonale complexe de l'ABP. En effet, Danzo et coll (1990) ont montré que les gonadotrophines (FSH) et la testostérone jouent un rôle important. Si l'on administre de la FSH seule, l'augmentation de l'ABP est observée chez le rat de trente jours, mais pas à vingt jours. La testostérone est capable, même en présence d'antagoniste, de stimuler la production d'ABP au niveau testiculaire et cela quel que soit l'âge de l'animal. Ces auteurs concluent que la testostérone est le régulateur principal de la synthèse d'ABP *in vivo*.

Le dosage radioimmunologique de l'ABP a également été utilisé dans le liquide amniotique fœtal (Gunsalus et coll., 1978). La protéine est détectée au 19^e jour de gestation aussi bien chez le mâle que chez la femelle. D'autres lieux de synthèse ont été recherchés et il semble actuellement que l'ABP, en dehors des cellules de Sertoli, soit potentiellement produite par l'épididyme (Becker et coll., 1984), la prostate (Larriva-Sahd et coll., 1991) ou le cerveau (Wang et coll., 1990).

La liaison de l'ABP, chez le rat, à la concanavaline A permet de séparer deux types d'ABP (I et II) selon la présence ou l'absence de liaison à la lectine (Hansson, 1981). Cheng et coll (1986) ont montré que l'ABP de type I est préférentiellement sécrétée dans la lumière des tubes séminifères alors que le type II se retrouve essentiellement dans le flux sanguin. Ces résultats montrent que la sécrétion d'ABP dans le sang, chez le rat, est liée à la présence d'une copule glucidique spécifique. Cependant, le mécanisme de régulation métabolique qui conduit à la présence de l'ABP de type I et II est encore inconnu.

Quelle que soit l'espèce étudiée, l'ABP est synthétisée avant la maturation finale de la cellule de Sertoli. Sa sécrétion au niveau épидидyme représente un signe de maturation testiculaire.

Le premier facteur de régulation de l'ABP semble être la testostérone, surtout chez le jeune rat, et la FSH prend le relais chez l'adulte. Cependant, la FSH et la testostérone coopèrent de façon à faciliter le transport de l'ABP vers l'épididyme.

METHODES DE DOSAGE

L'intérêt clinique du dosage de l'ABP sérique ou épидидymo-testiculaire reste encore largement débattu. En effet, un certain nombre de travaux montrent que la valeur de sa concentration serait un bon reflet de la physiologie des tubes séminifères (Gunsalus et coll., 1978) et de la fonction sertolienne (Gunsalus et coll., 1981).

La très faible concentration de l'ABP dans les différents composants biologiques a limité le nombre de techniques utilisées pour son dosage. La mise au point de colonnes d'affinité de DHT-sépharose (Musto et coll., 1977-1980) a permis d'obtenir une protéine suffisamment pure et antigénique pour immuniser des animaux. Les méthodes développées dans ce chapitre utilisent donc soit son activité de liaison, soit un anticorps polyclonal anti-ABP.

Dosage par activité de liaison

L'ABP, comme la plupart des protéines de liaison des stéroïdes (SBP, CBG, ...), diffère au niveau de sa concentration dans les différents fluides biologiques mais également dans ses capacités de liaison à tel ou tel stéroïde; on observe une variation d'affinité pour le même stéroïde. On caractérise donc des paramètres correspondant à la capacité de liaison spécifique de la protéine de transport. Ces constantes sont évaluées de différentes façons selon le modèle et la méthode mathématique utilisés. La capacité de liaison de la DHT à l'ABP a été étudiée avec par de nombreuses techniques comme, par exemple, la liaison de la DHT marquée au tritium ($^3\text{HDHT}$) avec une méthode à l'équilibre en "batchwise" avec du gel de séphadex G-25, ou la méthode au charbon-dextran.

L'interprétation de la capacité de liaison de l'ABP à son stéroïde est étudiée par la représentation de Scatchard (1949). Cette analyse graphique permet d'établir une relation linéaire directe entre le stéroïde lié à l'ABP en fonction du rapport de la quantité de stéroïde lié / stéroïde libre. La correction graphique de Rosenthal (1967) permet de définir l'existence de plusieurs sites de liaison. On élimine la liaison non spécifique à la protéine par un excès de stéroïde non marqué. Ces études de Scatchard ont été utilisées dans toutes les publications de ce mémoire.

Le dosage de l'ABP par capacité de liaison a été également analysé par l'outil informatique (Munson et coll., 1980). Ce programme permet de mesurer les concentrations en site de liaison spécifique du stéroïde à la protéine de transport, et son affinité, dans des échantillons contenant d'autres substances.

La quantification de l'ABP par cette méthode présente toutefois des inconvénients en raison de la présence possible de contaminants dans l'échantillon de dosage pouvant interférer avec la liaison du stéroïde de l'ABP, comme par exemple la présence de stéroïdes endogènes. Il faut donc destéroïder l'échantillon avant le dosage et tenir compte des limitations de cette méthode comme, par exemple, le taux de liaison non spécifique qui définit la limite inférieure de détection de l'ABP.

Dosage par radio-immunologie

Ces méthodes ont pu voir le jour grâce à la purification de quantités suffisantes d'ABP afin d'immuniser des animaux (lapins, souris) pour obtenir des anticorps polyclonaux (Gunsalus et coll., 1978). Ces tests radio-immunologiques sont faciles chez le rat qui ne possède pas de SBP sérique. En effet, chez les espèces contenant à la fois SBP et ABP, un anticorps spécifique de chacune des deux protéines doit être purifié. Les études de purification d'anticorps polyclonaux anti-ABP, ou monoclonaux (Kovacs et coll., 1988, Felden, 1988), montrent que les immunosérums obtenus sont capables de reconnaître les deux protéines homologues. La plupart des études de dosage de l'ABP, avec un anticorps anti-ABP radiomarké, ont donc été réalisées chez le rat ou à partir de cultures primaires de cellules de Sertoli (Perez-Infante et coll., 1986).

Ce test radio-immunologique permet de détecter 0,1 ng d'ABP avec un faible coefficient de variation (5 %). Il présente une sensibilité 100 fois supérieure aux méthodes par capacité de liaison (Gunsalus et coll., 1986).

Dosage par immuno-enzymologie

Le principe de cette méthode non isotopique repose sur la technique "sandwich" remplacée par l'avidine-biotine à la place du second anticorps (Guesdon et coll, 1979). Cette méthode, développée par Gunsalus et coll (1978), permet de détecter 0,08 ng d'ABP dans l'échantillon avec un coefficient de variation de 7 %.

En conclusion, le développement d'anticorps monoclonaux ou oligoclonaux après passage sur lectine (concanavoline A ...) de l'ABP permettra dans un avenir proche le développement de test radio ou immuno-enzymatique très spécifiques, sensibles et permettant de doser séparément ABP et SBP.

ROLES PHYSIOLOGIQUES

Les rôles physiologiques de l'ABP, malgré tous les travaux effectués, ne sont pas encore parfaitement connus.

Il semble qu'au niveau de l'axe testiculo-épididymaire, l'ABP soit importante pour le pouvoir fécondant des spermatozoïdes, surtout lors de leur passage épидидymaire (Anthony et coll., 1984).

Les premières hypothèses décrites par Hansson et coll (1975) indiquent que l'ABP produite par les cellules de Sertoli, sous l'action de la FSH, favorise une accumulation d'androgènes dans les tubes séminifères permettant à la dihydrotestostérone de pénétrer dans les cellules cibles. Cette stimulation accroît surtout le transport des androgènes au niveau de la tête de l'épididyme.

Il semble que cette glycoprotéine concentre également les androgènes à proximité de la lignée germinale, permettant ainsi une régulation de la spermatogénèse (Rommerts et coll., 1976). Le rôle joué par l'ABP (ou la SBP) dans le transport des androgènes vers leur site actif, ainsi que la possibilité de passer à travers les vaisseaux sanguins ou d'autres systèmes membranaires, a été proposé pour la première fois par Westphal en 1983 à partir d'expériences de perfusions de testostérone radiomarquée, seule ou en présence d'ABP, et d'études de captage épидидymaire du stéroïde. Le taux d'ABP augmente significativement la concentration en testostérone par rapport à son administration sans protéine. Ces premières études prouvent l'effet indéniable de l'ABP comme régulateur de la distribution tissulaire d'androgènes. L'immunolocalisation d'ABP dans les cellules principales de l'épididyme (Pelliniemi et coll., 1981 ; Attramadal et coll., 1981) montre, pour la première fois, la présence de la protéine à l'intérieur d'un tissu. Ce mécanisme est dû à une internalisation spécifique (Gérard et coll., 1988) grâce à la présence de récepteurs épидидymaires pour l'ABP (Guéant et coll., 1988) en quantité beaucoup plus importante au niveau de la partie proximale. Une étude plus complète de l'interaction spécifique ABP et récepteurs membranaires sera présentée dans le chapitre V. Des immunolocalisations spécifiques ont également montré la présence d'ABP dans le tissu prostatique chez le rat (Larriva-Sahd et coll., 1991). Cette même équipe a démontré que le contenu en ABP le long de l'épididyme était très variable, ce que confirme le rôle joué par la protéine dans l'importation hormonale intra-cellulaire, aussi bien dans l'épididyme que dans la prostate chez le rat. Des études de castration et de ligature montrent que l'ABP n'est plus retrouvée dans l'épididyme ce qui confirme la sécrétion d'ABP bidirectionnelle par les cellules de Sertoli (Danzo et coll., 1985). Cette synthèse bidirectionnelle est influencée par la lignée

germinale (Morris et coll., 1987) ce qui implique une extrême complexité dans la régulation et dans le(s) rôle(s) physiologique(s) joué(s) par cette protéine.

En conclusion, l'ABP est utile à l'afflux de stéroïdes dans un tissu cible (épididyme). Cette protéine peut-être internalisée pour délivrer un message hormonal, ou peut-être autre chose? La glycosylation de la protéine, et d'autres facteurs présents dans l'environnement sont des régulateurs potentiels de ses actions biologiques. Son évaluation donne un bon index de la fonction sertolienne et récemment on a découvert son homologie avec des protéines de structure des membranes basales (laminine, mérosine). Enfin, une synthèse possible d'ABP par la prostate chez le rat est proposée (Larriva-Sahd et coll., 1991) comme elle a été démontrée récemment dans le cerveau (Wang et coll., 1990).

Actuellement, il est donc encore difficile, malgré la vingtaine d'années qui nous sépare de la découverte de l'ABP (1971), de définir exactement la pluralité de ses rôles physiologiques et de ses fonctions au sein de l'organisme.

CHAPITRE IV

MECANISMES SPECIFIQUES DE L'ENDOCYTOSE PAR RECEPTEUR

4.1 GENERALITES

Les cellules échangent avec le milieu qui les entoure des petites molécules (ions, glucides...) et des macromolécules dont la taille peut atteindre le micromètre (bactérie).

L'endocytose et la phagocytose sont les deux voies possibles permettant aux cellules d'ingérer un certain nombre de grosses molécules présentes dans leur environnement (figure n° 15).

Le terme de phagocytose s'applique à l'incorporation de macromolécules en s'attachant à la surface cellulaire. La membrane plasmique de la cellule s'étale à la surface de la particule cible, émet des prolongements et l'englobe totalement.

Ce mécanisme nécessite la participation d'un certain nombre de microfilaments (actine...) contrairement au deuxième type d'absorption : l'endocytose.

L'endocytose se divise en deux modes distincts : (figure n°14)

- la pinocytose qui concerne l'absorption de particules (le plus souvent liquidiennes) dans une vésicule dite "d'endocytose" mais de façon non spécifique et proportionnelle à la concentration particulaire du milieu intra-cellulaire,

- l'endocytose spécifique, ou "récepteur - dépendante", qui est liée à la présence de récepteurs spécifiques sur la membrane plasmique de la cellule.

Ce dernier mécanisme intéresse les protéines de transport des stéroïdes (ABP / SBP) et constitue donc l'essentiel de cet exposé. Il faut noter, à ce sujet, qu'une même cellule peut choisir l'une ou l'autre de ces deux voies selon la capacité offerte à la particule de reconnaître, ou non, un récepteur spécifique au niveau membranaire.

L'endocytose récepteur - dépendante (ou récepteur - médiée) est sélective, spécifique, saturable en fonction du nombre et de l'affinité du ligand (= macromolécule) pour son récepteur membranaire.

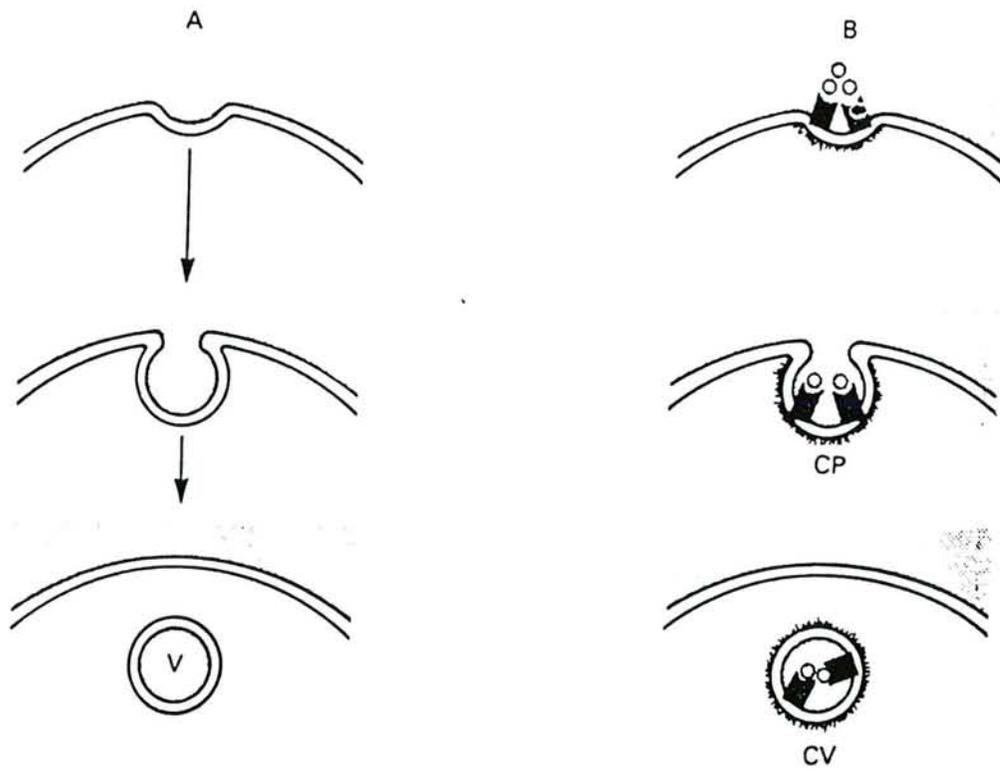


Figure n° 14 : Les deux types d'endocytose : en phase liquide (A), au hasard et sans direction. L'endocytose avec récepteur (B) avec des puits recouverts (CP) de clathrine et des vésicules recouvertes (CV) = vésicule de pinocytose.

4.2 CLASSIFICATION DES MECANISMES D'ENDOCYTOSE PAR RECEPTEUR

La plupart des cellules eucaryotes montrent à leur surface des invaginations présentant une couche dense en microscopie électronique du côté cytoplasmique. A l'intérieur de ces cellules, des vésicules ayant la même apparence sont présentes à différents niveaux cytosoliques. Pearse et coll. (1981) ont obtenu une préparation homogène de vésicules et leur analyse en électrophorèse, sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, montre une homogénéité quelle que soit l'origine de la préparation. Ces vésicules sont toutes constituées par de la clathrine (Keen et coll., 1979).

L'endocytose récepteur-médiée peut être classée en différents groupes selon la destinée finale à la fois du récepteur et de son ligand (Brown et coll., 1983, Goldstein et coll., 1985, Mikhailov, 1989).

classe I : le récepteur et son ligand sont dissociés l'un de l'autre, le récepteur est recyclé à la surface cellulaire alors que son ligand est dégradé dans le compartiment lysosomal (insuline).

classe II : le récepteur et son ligand sont recyclés vers la membrane plasmique (transferrine).

classe III: le récepteur et son ligand sont transportés vers le compartiment lysosomal (EGF).

classe IV : le complexe ligand - récepteur est libéré à la face opposée d'une cellule polarisée, c'est la "transcytose", le ligand est libéré à l'état inchangé alors que son récepteur peut, selon les cas, être dégradé ou recyclé (IgA, IgG...).

L'ensemble de ces processus est résumé sur les figures n° 17-18 et les principaux exemples sont donnés dans le tableau n° 6 .

Mécanismes moléculaires d'induction de l'endocytose

L'endocytose spécifique d'une protéine va nécessiter une étape de reconnaissance grâce à la présence, au niveau membranaire, de la cellule cible d'un récepteur spécifique.

Malgré la grande hétérogénéité structurale et fonctionnelle des récepteurs membranaires, la phase initiale du déclenchement de l'endocytose spécifique est identique pour tous les ligands.

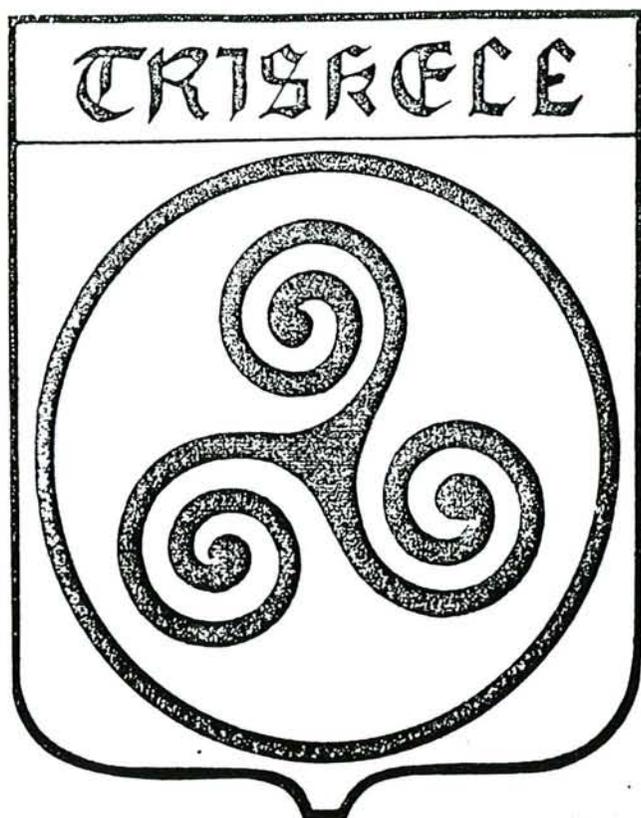


Figure n°15 : Le triskèle celtique diffère de celui de la clathrine par le sens de l'enroulement des bras!

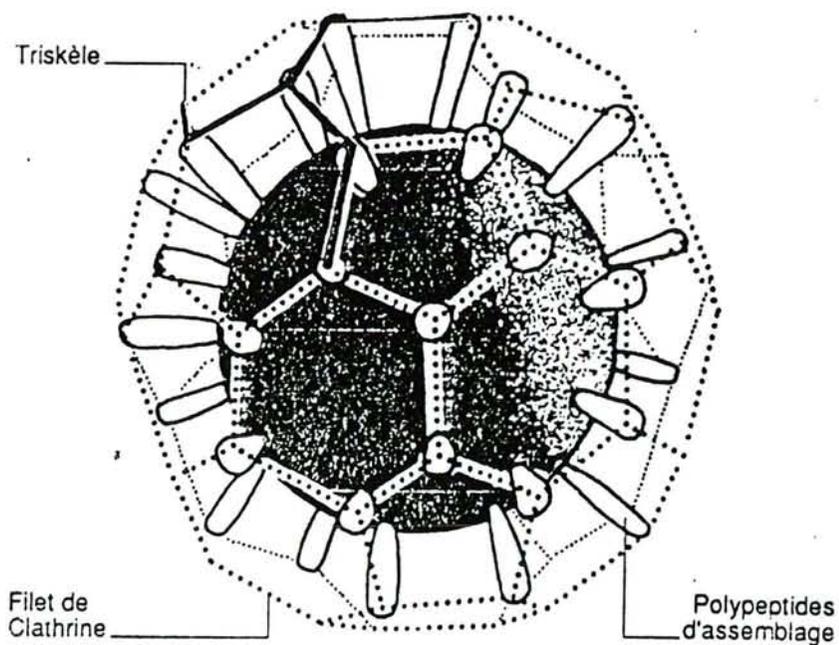


Figure n° 16 : Structure des vésicules recouvertes. Les lignes pointillées représentent le réseau de clathrine, caractérisé par les facettes hexagonales et pentagonales assemblées à la surface de la vésicule. Un triskèle constitutif de ce réseau est représenté en trait plein.

Le complexe ligand - récepteur est ensuite internalisé par l'intermédiaire de puits membranaires recouverts de clathrine. La clathrine est constituée par l'assemblage de sous-unités en forme de triskèle (figure n° 18-19).

Chaque triskèle est composé de trois chaînes lourdes de 180 kDa associées à 3 chaînes légères de 33 et 36 kDa. Il existe, en plus, des polypeptides d'assemblage destinés à promouvoir la polymérisation de la clathrine soluble (Keen et coll., 1979; Pauloin, 1991).

Ces puits recouverts de clathrine contiennent une grande variété de récepteurs. Certains d'entre eux (EGF) sont distribués au hasard sur la surface cellulaire et ne sont engagés dans des puits recouverts que lorsque le ligand se fixe sur son récepteur (Schlessinger et coll., 1978). D'autres récepteurs (LDL) sont internalisés, en présence de clathrine, que le site soit saturé ou non (Brown et coll., 1986). Si l'endocytose spécifique commence à être bien connue d'un point de vue descriptif, son fonctionnement au niveau moléculaire reste encore mal compris. Les mécanismes permettant la reconnaissance des complexes récepteur - ligands susceptibles d'être internalisés sont inconnus. Les polypeptides d'assemblages (= adaptors) ont été purifiés (Keen et coll., 1979) et il en existe deux groupes HA1 et HA2 (Pearse et coll., 1984). Le premier, c'est-à-dire HA1, est situé exclusivement au niveau du golgi alors que le second, c'est à dire HA2, est présent sur la membrane plasmique (Robinson, 1987). Les puits recouverts sont capables de distinguer parmi les protéines membranaires celles qui doivent être internalisées (Brestscher et coll., 1980).

Il semble que ce soit le récepteur lui-même qui porte l'information nécessaire à son internalisation (Lazorovits et coll., 1988). Des résultats récents montrent que les différents récepteurs susceptibles d'être internalisés possèdent sur leur domaine cytoplasmique un site de reconnaissance à HA2 alors que HA1 semble caractériser un domaine différent (Pearse, 1988). Une protéine de 50 kDa (AP50) associée à HA2 est le premier constituant des vésicules recouvertes dont la phosphorylation a été visualisée (Pauloin et coll., 1982). Ces phénomènes de phosphorylation - déphosphorylation (phosphatases) pourraient jouer un rôle majeur dans l'apparition des puits recouverts.

Le complexe ainsi formé subit une internalisation au niveau des invaginations recouvertes de clathrine donnant lieu à l'apparition de "vésicules recouvertes" (Goldstein et coll., 1985).

La clathrine forme alors un maillon protéique de structure hexagonale (figure n° 19) et ce système se déplace vers les différents organites cellulaires. Ce type de transfert existe au niveau intra-cellulaire pour le transport des enzymes lysosomiales (Friend et coll., 1986) et il ne constitue donc pas un mécanisme spécifique de l'endocytose par récepteur.

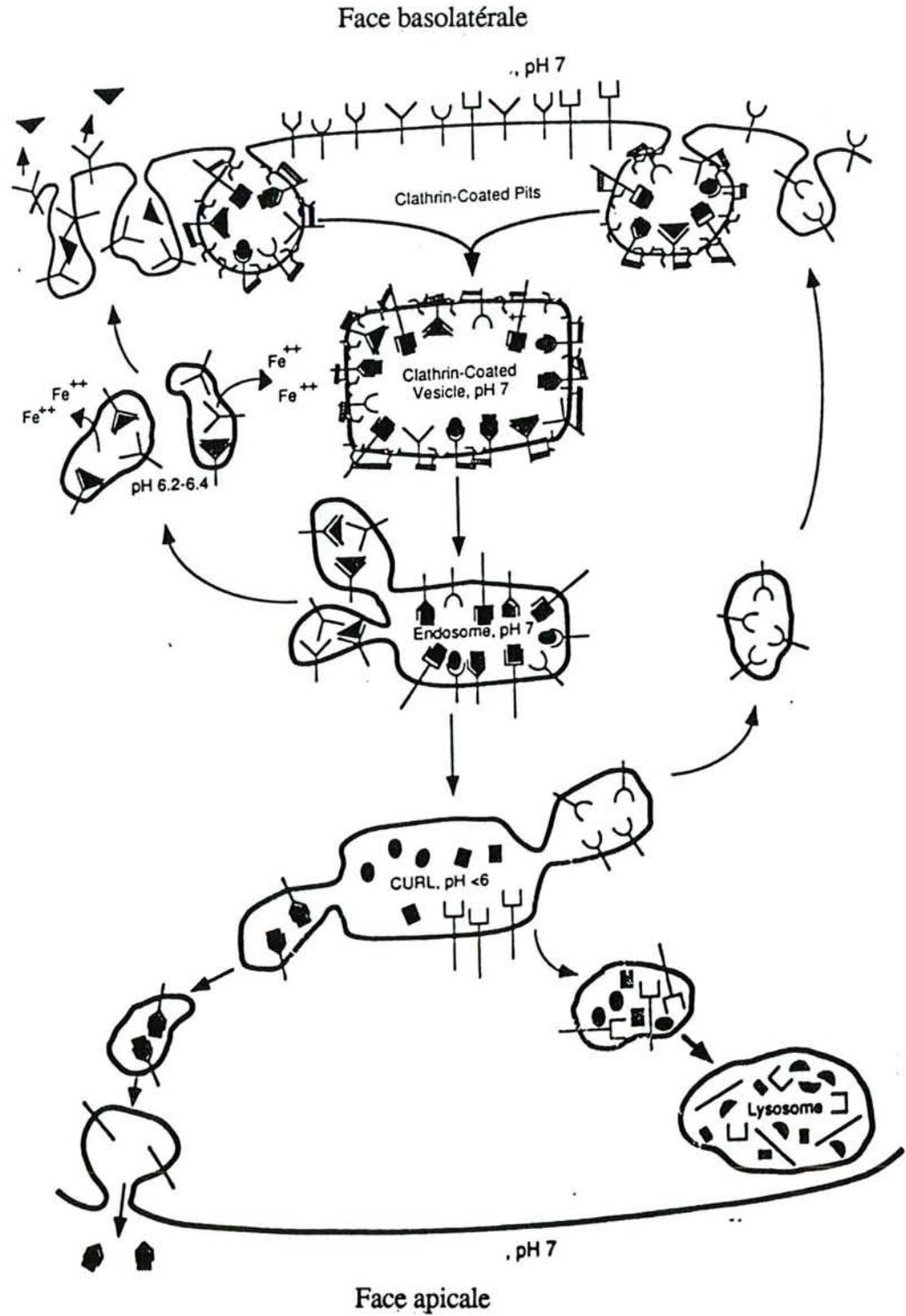


Figure n° 17 : Représentation des différentes voies utilisées par les quatre classes de récepteurs et leurs ligands (d'après Brown et coll., 1991). (CURL : compartiment de coupure entre récepteur et ligand).

4.3 MECANISMES INTRACELLULAIRES D'ENDOCYTOSE SPECIFIQUE

L'induction du mécanisme d'endocytose étant activée, le complexe récepteur - ligand est internalisé sous forme de vésicules recouvertes. Son devenir dans le milieu intracellulaire dépend de la classe à laquelle il appartient, sachant que certaines molécules peuvent appartenir à deux classes différentes ou subir un recyclage différent : l'insuline, par exemple, peut à la fois appartenir aux classes I, III et IV (figures n° 17-18).

Classe I : le ligand lié à son récepteur enchassé dans un puits recouvert de clathrine est invaginé dans une vésicule recouverte (Fine et coll., 1984). Ces vésicules perdent leurs molécules de clathrine et fusionnent ensemble pour former un endosome. La séparation du ligand et de son récepteur se déroule dans des vésicules appelées "CURL" = compartiment pour le découplage du récepteur et de son ligand (Geuze et coll., 1983). Cette dissociation est possible grâce à la baisse du pH à l'intérieur de ces compartiments (pH~6). Les récepteurs sont alors recyclés vers la membrane plasmique alors que les ligands sont dégradés dans le compartiment lysosomal par des enzymes spécifiques de la cellule. Les récepteurs de classe I ont une durée de vie assez longue et semblent indispensables aux cellules pour extraire rapidement les macromolécules du milieu extérieur. L'exemple classique de ce type de récepteurs est celui des lipoprotéines de faible densité (LDL) qui libèrent le cholestérol aux cellules cibles (Anderson et coll., 1982) ou celui des récepteurs au mannose - 6 - phosphate qui distribuent les enzymes lysosomiales extra-cellulaires vers les lysosomes. (Lobel et coll., 1989).

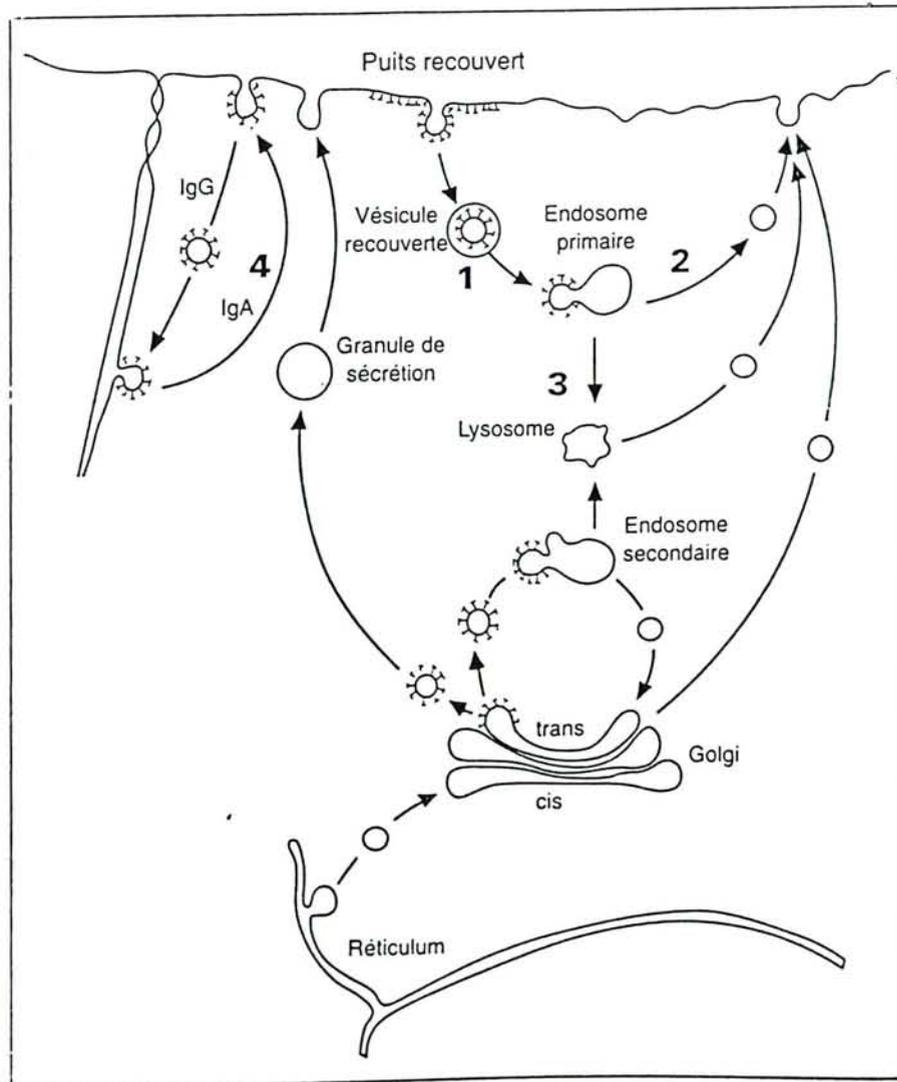


Figure n° 18 : Les différents rôles joués par les vésicules recouvertes dans le transport intracellulaire des protéines. Les numéros renvoient aux différentes classes d'endocytose décrites dans le texte et empruntées par les vésicules recouvertes (d'après Pauloin, 1991).

Classe II : Les récepteurs ayant à la fois un recyclage du ligand et de son récepteur concernent surtout la transferrine. Ces récepteurs servent à libérer le fer de son transporteur à l'intérieur de la cellule (Hopkins et coll., 1983). L'apotransferrine saturée par les molécules de fer se lie aux récepteurs à pH neutre, à la surface cellulaire. Ces complexes sont internalisés dans des puits recouverts et fusionnent en vésicules recouvertes de clathrine (Hanover et coll., 1984). Après perte de la molécule de clathrine et fusion avec les CURL, ou plutôt avec un endosome ayant un pH interne voisin de 6.2, l'acidité libère le fer du complexe (Yamashiro et coll., 1984) et l'apotransferrine en milieu acide montre une affinité importante par son récepteur, le complexe reste donc intact et subit ainsi un recyclage grâce au passage par l'appareil de Golgi. A la surface cellulaire, le pH redevient neutre et l'apotransferrine se dissocie de son récepteur. Ce mécanisme peut se produire plusieurs fois et le récepteur de la transferrine présente une demi-vie assez longue.

Classe III : L'internalisation des récepteurs appartenant à la classe III aboutit à la dégradation conjointe du ligand et de son récepteur (Carpenter et coll., 1979). L'endocytose de ce type de récepteur est utilisée pour obtenir un signal transductionnel comme, par exemple, avec des facteurs de croissance (EGF, PDGF, IGF..), (Heldin et coll., 1982, Geiger et coll., 1989, Beguinot et coll., 1985). Les récepteurs sont internalisés dans des puits et des vésicules recouvertes de clathrine comme dans les autres classes. La différence se situe au niveau de leur passage et de leur fusion avec les CURL où récepteurs et ligands sont retenus plus longtemps dans ce compartiment que pour les autres classes. Ils sont ensuite isolés dans les lysosomes où ils sont dégradés (Cie-Chanover et coll., 1983).

La demie - vie des récepteurs de classe III est beaucoup plus courte que dans le cas des deux classes précédentes et elle est très réduite en présence de son ligand (Keating et coll., 1987).

Classe IV : L'endocytose de la classe IV s'appelle la "transcytose". Elle est impliquée pour des macromolécules transportées à travers des cellules polarisées (Mostov et coll., 1985, Van Deurs et coll., 1990). Dans ce type de transport, le complexe ligand - récepteur fusionne avec des endosomes qui sont ensuite transportés à la face opposée de la cellule polarisée (Bonbel et coll., 1989). Le ligand est libéré intact à la face opposée de la cellule. L'exemple classique de ce type de transport est celui des immunoglobulines de type A (IgA) ou de type G (IgG) à travers les tissus polarisés (Mostov et coll., 1986). Les récepteurs aux IgA sont transportés à la face basolatérale immédiatement après leur biosynthèse et, après liaison avec l'IgA, le complexe est enchassé dans des endosomes et véhiculé vers la face cellulaire apicale.

Le rôle fonctionnel d'un récepteur et de son ligand est déterminé par la classe d'endocytose à laquelle il appartient et qui commande le récepteur. Cependant, un grand nombre de facteurs comme:

- le type de cellule,
- la structure du ligand,
- la valence et la concentration du ligand,
- la distribution spatiale des récepteurs d'endocytose

jouent un rôle déterminant dans la voie suivie par le récepteur. L'insuline, par exemple, possède des récepteurs spécifiques à la surface des adipocytes. Ceux ci peuvent être recyclés (classe I) ou dégradés (classe III), (Marshall, 1985), ou même subir une transcytose (classe IV) dans les cellules polarisées (King et coll, 1984). Les signaux qui régulent la classe d'endocytose suivie par les récepteurs ne sont pas connus.

4.4 FONCTIONS DE L'ENDOCYTOSE PAR RECEPTEUR

La plupart des cellules utilisent l'endocytose récepteur-dépendante pour un certain nombre de fonctions (tableau n° 6). Un des rôles les plus importants concerne l'ingestion de nutriments comme le fer, le cholestérol, la vitamine B₁₂ (Golstein et coll., 1985, Willingham et coll., 1984) ou des facteurs solubles (cytokines) tels que l'interleukine 1,2 ou l'interferon (Grenfell et coll., 1989 ; Smith et coll., 1985 ; Anderson et coll., 1982). L'endocytose participe également à la clearance métabolique de macromolécules comme les protéines, les enzymes ou les glycoprotéines présentes dans le milieu extra-cellulaire (Aswell et coll., 1982).

La transcytose permet une forme de transport de certaines molécules à travers des cellules polarisées (Mostov et coll., 1986), comme le passage des IgA au niveau hépatique (Kuhn et coll., 1982) et les IgG contenues dans le lait maternel qui sont libérées chez le nourrisson pour lui assurer une immunisation passive (Mostov et coll., 1985). Les ligands et leurs récepteurs jouent un rôle important dans la transmission du signal transductionnel avec une augmentation de l'activité de certaines kinases induisant une croissance ou une différenciation cellulaire (Rosen, 1987). Les ligands ainsi internalisés (insuline) peuvent aller se localiser sur des récepteurs nucléaires et être impliqués dans la régulation de la synthèse d'ARN cellulaire. L'endocytose prend toute son importance lorsque l'on s'aperçoit que dans le cas d'absence ou de modifications des récepteurs aux lipoprotéines (LDL), les patients qui en sont atteints souffrent d'hypercholestérolémie familiale de pronostic grave (Goldstein et coll., 1985). Beaucoup d'informations ont été accumulées concernant les mécanismes de l'endocytose par récepteur. Les rôles fonctionnels sont encore incomplètement connus et l'origine exacte de la nature des signaux régulant l'initiation et le déroulement de ce phénomène reste incomprise.

RECEPTEURS	FONCTIONS	REFERENCES
Classe I		
. Low density lipoproteine (LDL)	Libération de cholestérol	Brown et coll (1986)
. Mannose - 6 - phosphate lysosomiales	Transport des enzymes Lobel et coll (1989)	
. Tumor necrosis factor (TNF)	Libération du TNF	Imamura et coll (1987)
. Fibronectine	Libération de la fibronectine	Brestcher (1989)
Classe II		
. Transferrine	Libération du fer	Hopkins et coll (1983)
Classe III		
. Epidermal growth factor (EGF) (facteur de croissance)	Libération de l'EGF (facteur de croissance)	Beguinet et coll (1984)
. Interleukine I (IL1)	Libération de l'IL1 (monokine)	Grenfell et coll(1989)
. Interleukine II (IL2)	Libération de l'IL2 (monokine)	Smith et coll (1985)
Classe IV		
. Immunoglobuline A (IgA)	Transport des anticorps dans l'intestin	Mostov et coll (1986)
. Immunoglobuline G (IgG)	Transport des anticorps dans le foie et le placenta	Mostov et coll (1985)

Tableau n° 6 : Liste des principaux exemples d'endocytose par récepteur dans les différentes classes (d'après Brown et coll., 1991).

CHAPITRE V

RECEPTEURS MEMBRANAIRES AUX PROTEINES DE LIAISON DES STEROIDES (CBG, SBP, ABP)

5.1 GENERALITES

Le plasma humain contient deux glycoprotéines capables de lier les stéroïdes avec une grande affinité: la CBG liant principalement le cortisol à la progestérone et la SBP qui fixe la testostérone, la dihydrotestostérone et l'oestradiol (Anderson, 1974 ; Brien, 1981). Ces deux protéines, en raison de leur capacité de liaison spécifique, ont été très longtemps considérées comme des réservoirs passifs d'hormones stéroïdes liant et délivrant de façon réversible ces molécules en fonction des besoins de l'organisme. Les stéroïdes libres pouvaient alors diffuser passivement, en dehors du compartiment plasmatique, et initialiser leur action hormonale au niveau de leurs tissus cibles. L'ensemble de ce mécanisme ne laissait pas la possibilité à la CBG et à la SBP de jouer d'autres rôles physiologiques. Il est désormais acquis que ces molécules, en dehors de leur rôle indéniable dans la balance et l'équilibre hormonal, ont un effet physiologique propre. En effet, un grand nombre de travaux, datant de ces dix dernières années, montrent de façon certaine leur faculté d'interagir de manière spécifique avec des récepteurs membranaires (tableau n° 7) et il semble que la présence, ou l'absence, de stéroïdes liés à ces protéines puisse moduler leur liaison spécifique au récepteur (Hryb et coll., 1990).

L'axe épидидymo-testiculaire, chez l'homme, renferme une protéine ayant les mêmes propriétés de liaison que la SBP humaine : l'ABP. Le rat possède cette protéine, à la fois au niveau testiculaire mais également au niveau sérique, en raison de l'absence physiologique de SBP chez cette espèce. Quelques travaux ont également montré que l'ABP était capable d'interagir de façon spécifique avec des cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques (Steinberger et coll., 1984 ; Guéant et coll., 1988).

ANNEXE IV : LISTE DES PRINCIPALES PUBLICATIONS SUR L'INTERACTION SPECIFIQUE "PROTEINE DE TRANSPORT" ET
TISSU CIBLE

<i>PROTEINES DE TRANSPORT DES STEROIDES</i>	<i>LIAISON SPECIFIQUE ET/OU INTERNALISATION ET/OU IMMUNOLocalISATION</i>	<i>TISSUS CIBLES</i>	<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>
CBG	Liaison spécifique	Foie humain	Strel'chyonok et coll., 1983
	Liaison spécifique	Prostate humaine	Hryb et coll., 1986
SBP	Induction de l'activité adenylate-cyclasique	Lignée cancéreuse humaine (sein)	Nakhla et coll., 1988
	Liaison spécifique	Rate de rat	Singer et coll., 1988
	Immunolocalisation	Nombreux tissus chez le singe	Bordin et coll., 1980
	Immunolocalisation	Epididyme et testicule humain	Egloff et coll., 1981
	Liaison spécifique	Endomètre humain	Strel'chyonok et coll., 1984
	Immunolocalisation	Lignée cancéreuse humaine	Tardivel-Lacombe et coll., 1984
	Liaison spécifique	Prostate humaine	Hryb et coll., 1985
	Liaison spécifique	Syncytiotrophoblaste humain	Krupenko et coll., 1990
	Accumulation d'adénosine 3',5' monophosphate	Lignée cancéreuse humaine (prostate)	Nakhla et coll., 1990
	Immunolocalisation	Sein normal et cancéreux	Sinnecker et coll., 1990
Internalisation	Epididyme de singe	Gérard et coll., 1990	
Liaison spécifique	Adénocarcinome d'endomètre humain	Fortunati et coll., 1991	
Internalisation	Lignée germinale de singe	Gérard et coll., 1991	
Endocytose	Lignée MCF-7	Porto et coll., 1991	
ABP	Liaison spécifique	Lignée MCF-7	Porto et coll., 1992
	Immunolocalisation	Appareil reproducteur mâle du rat	Attramadal et coll., 1981
	Immunolocalisation	Appareil reproducteur mâle du rat	Pelliniemi et coll., 1981
	Liaison spécifique	Pachytène spermatocyte de rat	Steinberger et coll., 1984
	Internalisation	Epididyme de rat	Gérard et coll., 1988
	Liaison spécifique	Epididyme de rat	Guéant et coll., 1988
Liaison spécifique	Lignée germinale chez le rat	Felden et coll., 1992	

5.2 LES RECEPTEURS DE LA CBG

Il s'est écoulé une trentaine d'années entre la découverte de la CBG (Daughaday, 1956) et celle de sa propriété de se lier à un récepteur membranaire (Hryb et coll., 1986). En utilisant de la CBG purifiée et marquée à l'iode 125, il a été montré que cette protéine est capable de reconnaître un récepteur membranaire au niveau tissulaire chez l'homme. Au départ, cette découverte allait dans le sens d'une plus grande pénétration de stéroïdes dans la cellule cible (Hryb et coll., 1986). Il semble actuellement que ce mécanisme soit d'un autre type : en effet, il existe des systèmes récepteurs de type "hormonal" comme pour l'insuline ou l'ACTH, et des récepteurs de type "nutriment" comme ceux décrits pour la transferrine ou les lipoprotéines. Un certain nombre de différences existent entre ces deux types de récepteurs en fonction de la constante de dissociation et de la concentration en ligand :

— le système de type "hormonal" demande une concentration de ligand proche de la constante de dissociation (K_d). Dans ce système, la population de récepteurs est partiellement occupée et l'effet hormonal induit un changement de la concentration en ligands ou en récepteurs.

— le système de type "nutriment" présente une concentration en ligand très excédentaire à la constante de dissociation. Il en résulte alors une population de récepteurs très saturée par leur ligand. L'internalisation du ligand dépend du taux de récepteurs et non de la concentration en ligand.

Le modèle suivi par la CBG se rapproche du type "hormonal" (Rosen et coll., 1988). Sa liaison membranaire semble, de plus, capable de stimuler le système de second messager (AMPC) comme cela a été montré dans la lignée MCF-7 (Rosner, 1990).

5.3 LES RECEPTEURS DE LA SBP

Strel'chyonok et coll (1984) ont été les premiers à proposer la liaison spécifique de la SBP saturée sur un récepteur membranaire d'endomètre humain. Cette nouvelle découverte laissait supposer que le complexe formé par la SBP, son stéroïde et le récepteur membranaire, permettait d'augmenter le processus de diffusion passive du stéroïde dans le milieu intracellulaire. La présence de SBP dans certains tissus a été supposée depuis les travaux de Bordin et coll (1980). Les anticorps utilisés contre la SBP possèdent une immunogénicité croisée avec l'ABP; la fluorescence observée par immunolocalisation dans certains tissus (testicule, prostate...) peut refléter la présence d'ABP et / ou de SBP (Kovacs et coll., 1988). Depuis ces études préliminaires, la liaison membranaire spécifique de la SBP marquée à l'iode 125 a été retrouvée dans le placenta (Kuprenko et coll, 1990), l'hyperplasie benigne de la prostate (Hryb et coll.,1985) et une lignée cancéreuse humaine de prostate (LNCaP) (Nakhla et coll., 1990). Le groupe de Rosner a montré que la liaison était dépendante de la température: maximale à 37 °C et réduite à 10 % à 4°C. Cette liaison est spécifique pour la SBP et augmente avec le temps pour atteindre un maximum en six heures. L'activité du récepteur décroît après huit heures, certainement en raison de multiples libérations de protéases d'origine membranaire. Le récepteur a été solubilisé par du "CHAPS" (Hryb et coll., 1989) et élué sur une colonne de filtration sur gel en chromatographie : son poids moléculaire est estimé à 167 kda.

Cette même équipe a montré qu'il existe deux types de sites de liaison membranaire pour la SBP sur la prostate humaine (Hryb et coll., 1985).

Avvakumov et coll (1986) ont étudié l'influence du stéroïde sur la capacité de liaison de la SBP à l'endomètre avec différents oestrogènes ou androgènes .

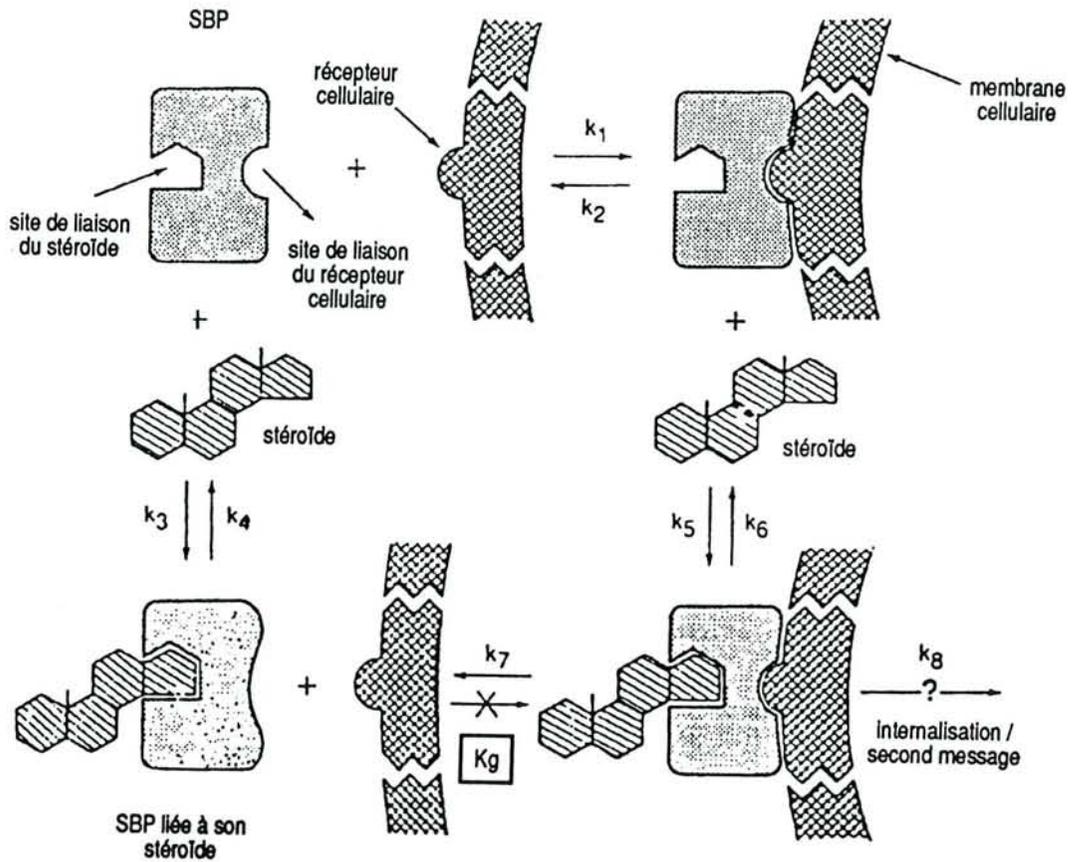


Figure n° 19 : Modèle hypothétique de l'interaction entre stéroïdes, SBP et récepteur membranaire à la SBP, sur la prostate humaine (d'après Hryb et coll., 1990).

Enfin, ils ont montré que la SBP saturée était capable de reconnaître un récepteur spécifique. Une autre interprétation, plus récente, de l'interaction "SBP-récepteurs membranaires" a été proposée par Hryb et coll., (1990). Le principe de ce mécanisme est représenté sur la figure n° 19. Ces auteurs affirment que seule la SBP insaturée est capable de se lier à son récepteur membranaire (prostate) et que le stéroïde régule cette liaison. En effet, dans une seconde étape, le récepteur-membranaire lié à la SBP présente une affinité beaucoup plus importante pour le stéroïde que la SBP seule. L'inhibition exercée par les stéroïdes sur la liaison de la SBP à son récepteur est de type non compétitif (Rosner et coll., 1991).

Ce schéma n'est pas retrouvé dans les autres études. En effet, il existe un certain nombre de points obscurs concernant l'hypothèse précédente:

- la constante de dissociation de la SBP insaturée vis-à-vis des membranes de prostate est plus élevée que celles retrouvées avec la SBP saturée dans les autres études,

- le modèle décrit une transition allostérique réversible de la molécule de SBP induite par les stéroïdes qui élimine le site de reconnaissance membranaire de la molécule. L'addition de stéroïdes à la SBP insaturée liée à son récepteur ne provoque pas la dissociation du complexe,

- la présence de stéroïdes endogènes, au cours des préparations membranaires, est indéniable et leur action n'est pas prise en compte dans ce modèle.

Les résultats retrouvés dans les autres études montrent que la reconnaissance du récepteur membranaire de la SBP requiert la formation préalable du complexe SBP-stéroïde (Strel'chyonok et coll., 1990 ; Fortunati et coll., 1991-1992 ; Guéant et coll., 1988).

La découverte importante de l'interaction spécifique de la SBP avec un récepteur membranaire permettra certainement, dans un avenir proche, de mieux comprendre le rôle physiologique de cette protéine avec ses tissus cibles.

5.4 LES RECEPTEURS DE L'ABP

L'androgen-binding protein a été localisée dans certaines cellules du testicule et de l'épididyme chez le rat par des techniques d'immunohistochimie (Attramadal et coll., 1981 ; Pelliniemi et coll., 1981). En effet, il existe une concentration importante d'ABP entre le rete testis et la tête de l'épididyme (60 à 260 nM) qui diminue très fortement dans la partie caudale épидидymaire (25 nM). Les concentrations d'androgènes (T et DHT) dans l'épididyme suivent le même gradient de concentration. Ces résultats permettent de supposer que l'ABP est une protéine nécessaire au maintien d'une concentration importante d'androgènes dans la partie proximale de l'épididyme (Turner et coll., 1991). Le passage de l'ABP dans les cellules principales de l'épididyme est un processus d'endocytose spécifique par récepteur, (Guéant et coll., 1988 ; Gérard et coll., 1988 a-b). Le marquage à l'iode 125 de l'ABP permet de conclure à sa présence au niveau intracellulaire mais ne donne pas de renseignements sur son caractère saturé ou insaturé. La méthode de purification de la protéine utilisée au cours de ces travaux s'oriente vers une insaturation de l'ABP, en raison de l'acidité du milieu au cours de la dernière étape (phase inverse). L'utilisation d'un marquage covalent de l'ABP permettrait de vérifier l'internalisation de la protéine saturée. Anthony et coll (1984) ont montré que la présence intraluminale d'ABP serait associée à une bonne fertilité du liquide spermatique. Il n'est toujours pas possible de conclure à l'importance de la présence d'ABP ou de DHT dans le maintien fonctionnel de l'épithélium épидидymaire. Il semble donc que la caractérisation de récepteurs spécifiques pour l'ABP, au niveau épидидymaire, puisse faire avancer la compréhension de tous ces mécanismes.

Pour la lignée germinale, seuls Steinberger et coll (1984) ont montré l'existence de sites de liaison pour l'ABP au niveau des pachytènes spermatocytes chez le rat. Cette étude est très incomplète et ne permet pas de conclure quant-à la spécificité de la liaison ou à l'internalisation du complexe. Enfin, la présence de sites de liaison au niveau des différents stades de maturation de la lignée germinale n'a pas été étudiée.

En conclusion, la CBG et la SBP au niveau sérique chez l'homme possèdent des sites de liaison spécifiques dans un certain nombre de tissus cibles. Leur fonction et la régulation de leur expression restent encore à élucider. L'ABP au niveau de l'axe reproducteur mâle chez le rat semble également posséder des récepteurs épидидymaires et testiculaires. L'intérêt biologique reste, lui aussi, totalement incompris.

BUT DU TRAVAIL

Au cours de ce travail, nous allons semi-purifier par chromatographie liquide haute performance de l'ABP testiculaire de rat et marquer la protéine de façon spécifique et covalente par un stéroïde radioactif.

Nous étudierons ensuite sa liaison au niveau d'un site récepteur membranaire de la cellule principale épидидymaire et dans les différents stades de maturation de la lignée germinale de rat.

La SBP humaine, protéine sérique de forte homologie structurale et de parenté génomique commune avec l'ABP de rat, sera préparée dans les mêmes conditions.

La spécificité de ce récepteur membranaire sera étudiée en utilisant de la SBP humaine de façon à examiner si la grande similitude fonctionnelle et structurale de ces deux protéines peut engendrer une reconnaissance croisée du site récepteur .

Nous utiliserons également des méthodes autoradiographiques afin d'étudier la cinétique de pénétration de ces deux protéines dans les différents compartiments cellulaires de la lignée germinale de rat et, de façon préliminaire, chez l'homme.

Enfin, la modulation de ce processus sera envisagée par la liaison de la protéine à son récepteur en fonction de l'âge de l'animal et, grâce à l'étude du rôle des acides gras libres sur la liaison de l'ABP épидидymaire à la dihydrotestostérone, pour examiner la répercussion de leurs actions biologiques sur la reconnaissance de l'ABP par son site de liaison membranaire.

L'ensemble de ces expériences nous permettra de formuler des hypothèses sur le rôle joué par l'ABP au niveau cellulaire.

EXPOSE DES TRAVAUX

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1. ANIMAUX

Nous avons utilisé des rats Wistar adultes (40 à 60 jours) d'un poids moyen compris entre 230 et 280 grammes et des rats immatures (15 jours) d'un poids moyen de 100 grammes.

1.2. SERUMS DE FEMMES GESTANTES

Les sérums de femmes enceintes, au troisième trimestre de leur grossesse, ont été recueillis à la maternité régionale de Nancy. Après rétraction du caillot, le sang est centrifugé et les sérums sont mélangés et stockés à -20°C.

1.3. TESTICULES HUMAINS

Nous avons utilisé des fragments testiculaires après biopsies prélevées dans le service du docteur Larcher.

1.4. PREPARATION DE L'EXTRAIT TESTICULAIRE

Cette méthode est la première étape de purification de l'androgen-binding protein à partir du testicule de rat. Les testicules sont donc prélevés, après sacrifice de l'animal à l'éther, le plus rapidement possible pour éviter toute dénaturation protéique. L'ensemble des étapes ultérieures se déroule sur bain de glace.

Les testicules sont dégraissés et séparés avec soin de l'épididyme. Ils sont ensuite plongés dans un tampon contenant 20 mM de tris-HCl (pH 7,4) avec 10% de glycérol (V/V). Ce mélange est homogénéisé avec un broyeur à des vitesses croissantes. L'homogénat final est centrifugé à 17.000 g pendant deux heures à +4°C. Une précipitation sélective est alors réalisée avec 0,36 g/ml de sulfate d'ammonium ajouté au surnageant pendant douze heures, à 4°C, et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant est ensuite régénéré par une dialyse contre vingt fois son volume en tampon tris-glycérol décrit précédemment et l'échantillon final est concentré dix fois dans une cellule Amicon. Le mélange final , appelé "extrait testiculaire" , sera utilisé dans les étapes ultérieures de chromatographie.

1.5. PREPARATION DE L'EXTRAIT EPIDIDYMAIRE

Les épидидymes de rat adulte (40 à 60 jours) sont prélevés et séparés avec soin des testicules. Ils sont ensuite dégraissés et la préparation de l'extrait épидидymaire suit le même protocole que celui précédemment décrit.

1.6. CELLULES EPIDIDYMAIRES ISOLEES

La préparation de cellules principales épидидymaires est réalisée au laboratoire d'histologie-embryologie I (Pr Grignon) par B. Leheup. Les épидидymes de rats "wistar" immatures, ou adultes, sont séparés en trois parties: la tête, le corps et la queue. Chaque segment épидидymaire est fragmenté et incubé successivement avec différentes solutions enzymatiques: collagénase-dispase, soja-bean trypsin inhibiteur, Dnase de type I dans un tampon phosphate (pH 7,35) pendant vingt minutes, à 37°C, sous agitation. La capsule épидидymaire est ensuite retirée à l'aide de forceps. Les fragments obtenus subissent les mêmes incubations enzymatiques une deuxième fois. Une dissociation plus complète des fragments épидидymaires est obtenue grâce à un passage multiple à travers une seringue. A la fin de cette deuxième partie, une troisième incubation est réalisée pendant 45 minutes pour obtenir une dissociation cellulaire complète. La solution finale est filtrée et les cellules épидидymaires isolées sont suspendues dans un milieu sans calcium avant d'être comptées sur un hématimètre. Elle sera finalement ajustée dans une solution finale à 10^6 cellules /ml.

1.7. CELLULES GERMINALES ISOLEES

La préparation de cellules germinales de rats "wistar" est réalisée au laboratoire d'histologie-embryologie II (Pr Gérard) par A. Gérard. Les testicules sont isolés et coupés en morceaux. Les tubes séminifères sont alors prélevés sous loupe binoculaire et placés dans un milieu RPMI 1640 (pH 7). Les cellules appartenant aux différents stades de maturation de la lignée germinale sont libérées du tissu intestinal par un broyage mécanique lent (Potter), et filtrées à travers du coton cardé pour éliminer les débris tissulaires. Le mélange est ensuite centrifugé à 1000 g pendant dix minutes. Le culot obtenu est suspendu dans le même milieu frais et les cellules sont observées et comptées sous microscope à contraste de phase. Un test de viabilité au bleu trypan nous donne une survie supérieure à 95%. Cette méthode d'isolation est non dénaturante car les cellules germinales sont très fragiles. Un exemple de la composition des suspensions cellulaires obtenues par cette méthode est le suivant:

SPERMATOGONIES	6%
SPERMATOCYTES PRIMAIRES ET SECONDAIRES	34%
SPERMATIDES RONDES	25%
SPERMATIDES ALLONGEES	21%
SPERMATOZOIDES	3%
AUTRES (Corps cellulaires; érythrocytes; cellules de Leydig; cellules de Sertoli...)	11%

Ces cellules sont quantifiées selon leur stade de maturation, par microscopie optique. Elles sont ajustées dans une solution finale à 10^6 cellules/ml.

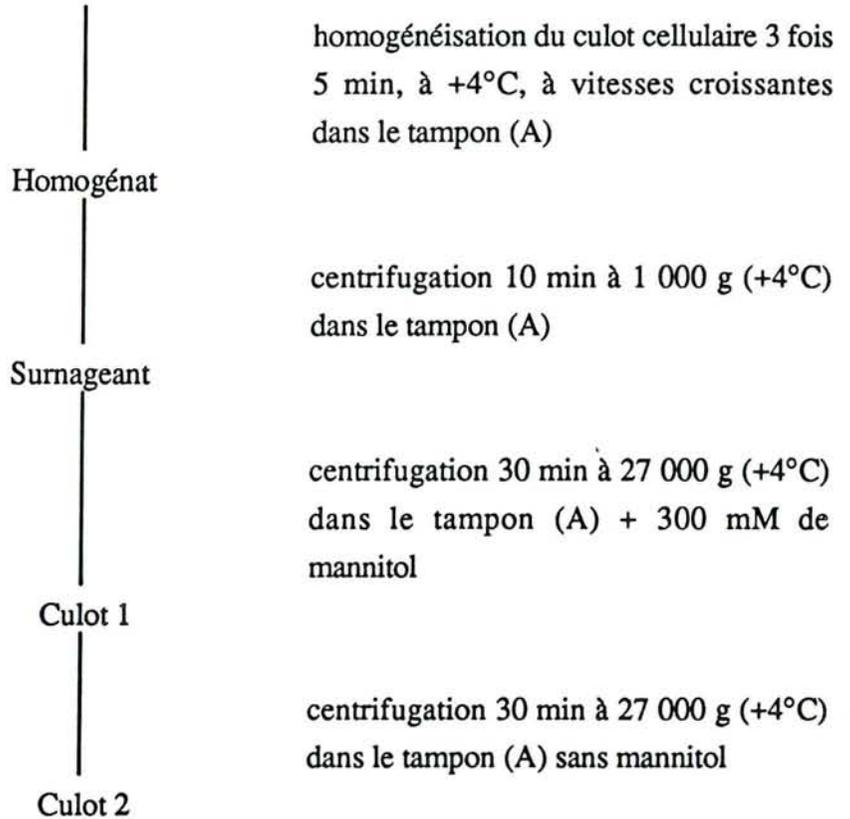
1.8. PREPARATION DE FRACTIONS ENRICHIES EN MEMBRANES PLASMIQUES

Le protocole d'enrichissement utilisé est identique pour les cellules principales épидидymaires ou les cellules de la lignée germinale. La solution calibrée à 10^6 cellules/ml obtenue précédemment est broyée à vitesses croissantes dans un tampon tris-HCl (20 mM) pH 7,4 sur bain de glace. Une solution contenant des antiprotéases (leupeptine, pepstatine...), des antibiotiques (bacitracine) et des antiseptiques est ajoutée dans le milieu réactionnel, pour éviter toute dénaturation protéique, dès le début de la rupture cellulaire par broyage et libération des enzymes cellulaires. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé dix minutes à 1000 g dans le tampon précédent contenant 1 mM de CaCl_2 et de MgCl_2 . Le surnageant obtenu est centrifugé à 27.000 g dans le même tampon contenant 300 mM de mannitol. Le culot obtenu (Culot 1) est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions, sans mannitol.

Enfin, le dernier culot (culot 2) correspond à la préparation enrichie en membranes plasmiques.

Ce protocole est schématisé par la figure n°20. Au cours des différentes étapes de la manipulation, l'activité enzymatique de la 5'-nucléotidase est mesurée et un contrôle en microscopie optique est réalisé.

Cellules (épithéliales épидидymaires ou germinales)
(10^6 cellules/ml)



= préparation enrichie
en fractions membranaires

Figure n°20: Protocole d'enrichissement en membranes plasmiques de cellules principales épидидymaires (Publication III) ou de cellules germinales (Publication IV).

Tampon (A) :

- 20 mM tris - HCl pH 7,4
- 0,4 mM PMSF
- 0,1% aprotinine (V/V)
- 0,01% de bacitracine (V/V)
- 1 mM CaCl₂ et MgCl₂

I.9. EXTRAITS MEMBRANAIRES SOLUBILISES

La préparation d'extrait membranaire solubilisé est réalisée selon deux protocoles différents:

- à partir de l'épididyme entier ou de ses segments (tête, corps, queue),
- à partir de la solution membranaire précédente.

1.9.1. EXTRAITS MEMBRANAIRES SOLUBILISES A PARTIR DE L'EPIDIDYME

La préparation solubilisée est réalisée à partir des différents segments épидидymaires (tête, corps, queue) de rats wistars immatures (15 jours). Ces fragments viennent d'une centaine d'épididymes et sont homogénéisés séparément par segments dans un tampon tris-HCl (20 mM), pH 7,4 contenant 1,5 mM d'EDTA et 10% de glycerol (V/V). Ce mélange est ensuite centrifugé à 17000 g pendant deux heures à 4°C. Le culot est lavé trois fois dans le même tampon. Il est alors incubé en présence de 0,01% de triton X-100 (V/V), 0,4 mM de PMSF et 0,3 mM d'azide de sodium. Le mélange obtenu est passé dans un générateur d'ultra-sons et incubé quarante-huit heures à 4°C. Après ultra-centrifugation à 100 000 g pendant une heure, à 4°C, le surnageant est appelé "extrait protéique membranaire", aliquoté à -80°C avant d'être utilisé au cours des étapes ultérieures.

1.9.2. EXTRAITS MEMBRANAIRES SOLUBILISES A PARTIR DES FRACTIONS MEMBRANAIRES

Le culot 2 précédent, contenant les membranes plasmiques des cellules épидидymaires ou germinales, est incubé en présence d'un tampon tris-HCl (20 mM) pH 7,4 contenant 1% de triton X-100 (V/V), 1 mM de CaCl₂ et 1 mM de MgCl₂ pendant deux heures, à +4°C. Après centrifugation à 15 000 g pendant quinze minutes, à 4°C, le culot est dissous dans le même tampon, sans triton X-100, avant d'être utilisé pour les étapes ultérieures.

1.10 PREPARATION DE FRACTIONS ENRICHIES EN NOYAUX

Deux testicules de rat adulte (60j) sont isolés et une suspension de cellules germinales est obtenue selon le protocole décrit précédemment. Le culot cellulaire est recueilli après centrifugation douce (1000 g pendant dix minutes) et les cellules germinales sont comptées sur un hématimètre. On homogénéise la suspension cellulaire avec 15 ml d'acide citrique à 5% (cette solution réduit la fragilité nucléaire) dans un potter. Le mélange est centrifugé 5 minutes, à 2500 g, et le culot resuspendu dans 5 ml d'acide citrique. L'homogénat obtenu est déposé sur une couche de sucrose 0,88 M dans de l'acide citrique. Le tube est à nouveau centrifugé 5 minutes à 5000 g, sur un rotor angulaire. Les couches supérieures sont éliminées par aspiration et le culot contient la suspension de noyaux. Elle est mélangée dans un tampon tris-HCl (10 mM), contenant 10 mM de NaCl et 25 mM d'EDTA (pH 7,4). La suspension est centrifugée 2 minutes à 2500 g, et subit trois lavages successifs dans les mêmes conditions, jusqu'à un pH voisin de la neutralité. Elle est enfin resuspendue dans le même tampon où l'on ajoute 0,02 M d'azide de sodium pour la conservation. On aliquote enfin le mélange de noyaux et il est congelé à -20°C . Une observation en microscopie optique est réalisée avant la congélation.

II. TECHNIQUES

A. METHODES BIOCHIMIQUES

2.1. SEMI-PURIFICATION DES PROTEINES

L'extrait testiculaire ou épидидymaire, décrit dans le chapitre précédent, est le point de départ pour l'obtention des protéines.

.CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

Les extraits précédents sont injectés successivement sur deux types de colonnes en CLHP.

1°) Chromatographie sur diol 200:

L'échantillon est injecté sur une colonne analytique (250 mm x 7 mm I.D.) ou préparative (250 mm x 25 mm I.D.) de type diol 200 qui permet une séparation des molécules en fonction de leur degré d'hydrophobicité et de leur taille (gel-filtration). L'ABP de rat ou la SBP humaine sont deux protéines fortement hydrophobes. La phase mobile utilisée est un tampon tris-HCl (20 mM) pH 7,4, contenant 10% de glycerol (V/V) et 5 % d'éthylène-glycol (V/V) à un débit de 1 ml/min ou de 10 ml/min pour la colonne analytique ou préparative. L'ensemble des fractions éluées est analysé par prélèvement d'un aliquot (150 µl) donc l'activité de liaison à la dihydro-testostérone tricutée ou la Δ_6 -testostérone est évaluée. Les fractions contenant l'ABP, ou la SBP, sont concentrées sur une cellule d'ultrafiltration (Amicon) avant la deuxième étape chromatographique.

2°) Chromatographie sur supérose 6B.

La fraction concentrée précédente est élevée sur une colonne de gel-filtration de type supérose 6B (300 mm x 10 mm I.D.). La phase mobile utilisée est un tampon tris-HCl (20 mM) pH 7,4 contenant 0,15 M de NaCl, 1 mM de CaCl₂ et 1 mM de MgCl₂. La colonne est calibrée avec du bleu dextran, de l'eau tricutée et un mélange de protéines de poids moléculaires parfaitement déterminés.

2.2. Pré-purification du récepteur membranaire de l'ABP.

1°) A partir de l'extrait membranaire solubilisé épидидymaire

Des quantités croissantes d'ABP iodée, ou marquée par photoaffinité, sont incubées en présence de 0,4 ml d'extrait épидидymaire solubilisé (1.9.1.). Le mélange est complété à 1 ml à l'aide d'un tampon tris-HCl (20 mM) pH 7,4, contenant 10% de glycérol (V/V), 10 mM de CaCl₂, 0,4 mM de PMSF et 0,05% de triton X-100 (V/V). Il est incubé une nuit, à 4°C, sous agitation, avant d'être injecté sur une colonne de supérose 6B du même type que celle décrite précédemment. La phase mobile utilisée est un tampon tris-HCl (20 mM) pH 7,4 contenant 0,15 M de NaCl, 0,4 mM de PMSF et 0,01% de triton X-100 (V/V), à un débit de 1,2 ml/min. Le même protocole est réalisé en présence de 10 mM d'EDTA à la place du CaCl₂ pour étudier l'action du calcium sur la liaison de l'ABP à l'extrait membranaire épидидymaire solubilisé. La fraction radioactive obtenue dans le volume mort de la colonne précédente (au niveau du bleu dextran) est collectée et analysée en ultra-centrifugation sur gradient de saccharose (5 à 35%) à 180.000 g avec des protéines standards, de coefficient de sédimentation connu (thyroglobuline, catalase et sérum albumine bovine).

2°) A partir de l'extrait membranaire solubilisé de fractions membranaires

On incube des quantités croissantes d'ABP de rat ou de SBP humaine, en présence d'extraits solubilisés de membranes ou de cellules épидидymaires, ou germinales (1.9.2.), pendant une heure à 4°C. La liaison non spécifique est évaluée par une pré-incubation de l'extrait avec un excès d'ABP ou de SBP non marquée. L'importance du calcium dans la liaison membranaire est étudiée en remplaçant le CaCl₂ du milieu par 20 mM d'EDTA. L'échantillon est ensuite élué sur une colonne de supérose 6B, dans les mêmes conditions que précédemment (1.9.2.).

2.3. Marquage par photoaffinité de l'ABP de rat et de la SBP humaine.

Cette étape se déroule sur l'extrait testiculaire de rat obtenu précédemment (1.4.) pour le marquage de l'ABP ou sur le sérum de femmes enceintes (1.2.) pour la SBP.

Le marquage par photoaffinité est spécifique et covalent. Il a été mis au point par Taylor et Coll. (1980) pour l'ABP et, plus récemment, par Grenot et Coll. (1988) pour la SBP sérique. Les protéines sont repérées dans le milieu grâce à la photoexcitation en ultra-violet (345nm) qui libère une double liaison de la Δ_6 -testostérone (17 β hydroxy-oxo 3 androstanediène 4,6)-tritiée.

Ainsi 10 ml d'extrait testiculaire ou de sérum de femmes enceintes sont placés dans un tube en pyrex transparent aux longueurs d'ondes ultra-violettes. On ajoute au milieu 1 nanomole de Δ_6 -testostérone tritiée et on illumine par une lampe émettant à 345 nm pendant 4 à 6 périodes de quinze minutes, espacées de dix minutes de repos, sous agitation magnétique, ventilation et en chambre froide (4°C) pour limiter toute dénaturation protéique provoquée par échauffement. Cette longueur d'onde est éloignée de l'absorption du cytosol testiculaire (271 nm) et de la zone de filtration du pyrex (350 nm) pour permettre la photoexcitation. A la fin de cette exposition, l'échantillon est centrifugé à 1500 g pendant quinze minutes et le surnageant contenant la protéine marquée est injecté sur la première colonne chromatographique (diol 200).

2.4. Marquage de l'ABP de rat à l'iode 125.

Le marquage à l'iode 125 de l'ABP est réalisé à partir de la méthode de purification complète de la molécule (Gueant et Coll., 1986). Ce marquage radioactif dérive de la méthode décrite par Marckwell (1982). Deux iodobeads sont lavés dans un tampon tris-HCl (20 mM) contenant 0,5 M de NaCl (pH 7,4) et incubés pendant cinq minutes avec 0,1 mCi d'iode 125 dans 0,2 ml du tampon précédent. On ajoute ensuite 20 µg d'ABP purifiée. Après quinze minutes d'incubation, le mélange est élué sur une colonne de séphadex G-25 pour éliminer l'iode 125 non fixé et les résidus protéiques non marqués.

B. ETUDES DE "BINDING"

2.5. ETUDE DE LA LIAISON DU STEROIDE SUR LA PROTEINE

2.5.1. Etude de la liaison de la dihydrotestostérone à l'ABP épидидymaire de rat

Nous avons étudié la liaison du stéroïde (3 HDHT) à l'ABP épидидymaire, préparé selon le protocole précédemment décrit, en utilisant la méthode de Pearlmann et Crepy (1967). Cette méthode est basée sur le principe de la dialyse à l'équilibre en présence d'une suspension de gel séphadex G 25 jouant le rôle d'une membrane semi-perméable. Elle nous a permis de mesurer les différents paramètres de liaison.

La suspension de gel séphadex G-25 est répartie dans une série de tubes: 0,2 g de gel dans un volume final de 2 ml en tampon phosphate 0,06 M pH 7,4. Ce mélange est laissé à gonfler deux heures à température ambiante avant toute manipulation ultérieure. Le ligand libre (U) se répartit ainsi entre le volume externe du gel et le volume interne alors que le ligand lié à la protéine (B) reste dans le volume externe. L'équilibre de dialyse est atteint en une heure, à température ambiante, sous agitation douce.

Le pourcentage de ligand lié à la protéine et le rapport B/U sont obtenus en calculant :

- la radioactivité totale dans chaque tube, grâce à une série de quatre tubes sans séphadex.

- le coefficient de partage du ligand (K') est déterminé pour chaque expérience par une série de quatre tubes avec séphadex mais sans protéine.

—> $K' = x/a-x$ où a est la radioactivité totale ajoutée dans le tube et x la radioactivité mesurée dans le volume externe du tube sans protéine.

Cette technique permet de calculer la constante d'association (Ka) et le nombre de sites de liaison par molécule de protéine, en utilisant la représentation graphique de Scatchard (1949) avec la correction de Rosenthal (1967) pour éliminer la liaison non spécifique.

Lorsque ces études de liaison étaient réalisées en présence d'acides gras libres (AGL), ceux-ci étaient déposés au fond du tube et évaporés à sec, sous azote. Ils étaient alors repris par 1 ml de tampon phosphate une goutte d'éthanol, bouchés et placés sous agitation une nuit, à 4°C. Le gel de séphadex (0,2 g) est ajouté le lendemain et laissé à gonfler deux heures avant d'ajouter la protéine et le ligand. Les stéroïdes endogènes présents dans l'extrait épидидymaire sont éliminés par l'action de charbon activé (Norit) à la concentration de 5%, une heure, à 20°C, avant toute manipulation.

Les études en présence d'AGL ont été réalisées à l'aide de deux concentrations protéiques différentes d'extrait épидидymaire afin de calculer, grâce à la représentation graphique de Dixon, les constantes d'inhibition (Ki) des AGL sur la liaison de la DHT à la protéine.

2.5.2. Etude de la capacité de liaison de la dihydrotestostérone à l'ABP testiculaire par CLHP.

Les échantillons sont préparés à partir de 400 µl dans un volume total de 500 ml de tampon tris-HCl (20 mM) , pH 7,4 pendant 18 heures, à 4°C, sous agitation rotative. Les quantités de dihydrotestostérone ajoutées varient de 11 à 176 pmoles par échantillon. Ce mélange est injecté sur une colonne analytique diol 200, du même type que celle décrite précédemment, mais avec un débit de 1 ml/min. Cette technique permet de séparer la DHT liée à l'ABP testiculaire du stéroïde libre. L'utilisation des méthodes graphiques de Scatchard (1949) nous donne les paramètres de liaison de l'ABP.

2.6. ETUDE DE LA LIAISON MEMBRANAIRE DES PROTEINES DE LIAISON DES STEROIDES

Ces études ont été réalisées à la fois sur cellules isolées, préparations enrichies en membrane plasmique, extraits protéiques membranaires solubilisés à partir de cellules principales épидидymaires et de cellules de la lignée germinale. Le protocole réalisé suit un déroulement logique, identique pour les deux modèles cellulaires.

Les étapes utilisées sont successivement:

- une cinétique d'association-dissociation,
- une étude de liaison en fonction de la température, du pH, de la présence de calcium ou d'enzymes ou encore de poisons cellulaires,
- une représentation graphique de Scatchard (1949) avec une correction de Rosenthal (1967) pour caractériser les paramètres de liaison,
- une épreuve de spécificité de la liaison avec différentes protéines,
- une étude par CLHP de la liaison en mini-colonne de gel-filtration.

Nous allons étudier successivement toutes ces étapes.

2.6.1. Cinétique d'association-dissociation

L'étude cinétique de la liaison de l'ABP marquée par photoaffinité avec son récepteur membranaire a été réalisée en incubant une quantité déterminée de protéine marquée par photoaffinité avec 10 millions de cellules (ou l'équivalent en fractions membranaires soit 2,5 mg de protéine) dans un volume final de 10 ml (tampon tris-HCl, pH 7,4). Ce mélange est placé à 4°C, sous agitation et 1 ml de la suspension est prélevé à des temps d'incubation allant de 2 à 120 minutes. L'aliquot prélevé est immédiatement centrifugé, le culot est lavé deux fois avec le tampon précédent et centrifugé à nouveau pour éliminer l'ABP non liée à la membrane cellulaire. Le dernier culot est alors compté en scintillation β par addition de 3 ml de liquide scintillant.

Une seconde étude est effectuée de la même façon, mais après quinze minutes d'incubation, une quantité très excédendaire d'ABP non radioactive est ajoutée au milieu pour étudier la réversibilité de la liaison à 4°C.

Cette étude cinétique est réalisée sur cellules entières et fractions membranaires.

2.6.2. Etude physicochimique de la liaison protéique

Nous avons étudié la liaison membranaire de l'ABP de rat ou de la SBP humaine en faisant varier différentes conditions physicochimiques:

- . une étude cinétique d'association identique à celle précédemment décrite à été effectuée en parallèle, à deux températures 4°C et 34°C,

- . une étude sur l'action du pH dans la liaison membranaire a été réalisée en incubant la protéine et les fractions membranaires pendant deux heures à 4°C en présence de différentes solutions tampons:

- 0,02 M tris-HCl pH 8,
- 0,1 M phosphate de sodium pH 7 et 6,
- 0,05 M acétate de sodium pH 5 et 4,
- 0,02 M citrate de sodium pH 3 et 2.

Le pH final du milieu réactionnel est ajusté, avant l'incubation, au pH du tampon correspondant.

- . L'importance du calcium dans la liaison est évaluée en présence, ou en absence, de 10 à 20 mM d'EDTA dans la solution tampon.

- . L'action de la trypsine (10 mg/ml), de la chaleur (60°C) et de différentes substances médicamenteuses (streptozotocine, chloroquine...) est étudiée.

2.6.3. Estimation des paramètres de liaison membranaire

L'ABP de rat ou la SBP humaine, marquées par photoaffinité en concentration croissante, sont incubées en présence de 10^6 cellules par tube (ou l'équivalent en fractions membranaires), en double, pendant une heure, à 4°C. Le volume final de l'incubat est fixé à 1 ml avec du tampon tris-HCl (20 mM) pH 7,4, contenant 0,15 M de NaCl., 1 mM de CaCl₂ et 1 mM de MgCl₂ (et des antibiotiques pour les fractions membranaires).

La radioactivité du surnageant est mesurée en scintillation β . La représentation de Scatchard (1949) avec la correction de Rosenthal (1967) sont utilisées pour étudier les paramètres de liaison (K_a , nombre de site/cellule, nombre de site/mg de protéine...).

La même expérience est réalisée en présence d'un excès d'ABP froide, préincubée une heure auparavant avec le matériel cellulaire pour évaluer la liaison non spécifique. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 20 000 g pour les fractions membranaires et à 2500 g pour les cellules entières. On élimine le surnageant et le culot est à nouveau lavé avec du tampon frais deux ou trois fois.

2.6.4. Spécificité de la liaison

La liaison spécifique de l'ABP de rat avec les cellules isolées, ou les fractions membranaires, est étudiée par préincubation de 10^6 cellules (ou l'équivalent) avec des solutions protéiques contenant 0,1 nmole de lactotransferrine humaine, serotransferrine, asialofétuine, fétuine et sérum albumine bovine. Chaque solution protéique est incubée avec le matériel biologique pendant une heure, à 4°C, dans un tube différent. On ajoute ensuite une pmole d'ABP marquée par photoaffinité dans chaque tube. On incube à nouveau la solution dans les mêmes conditions et on compte le culot cellulaire après centrifugation et deux lavages. On étudie la reconnaissance croisée du site récepteur par préincubation de l'extrait cellulaire avec de la SBP humaine non marquée ou, inversement, avec de l'ABP de rat froide, avant d'ajouter de la SBP marquée.

Les résultats sont exprimés en pourcentage maximum d'inhibition de la liaison membranaire par rapport à un échantillon incubé dans les mêmes conditions avec de l'ABP radioactive.

2.6.5. Etude de la liaison de l'extrait membranaire solubilisé par CLHP.

L'extrait membranaire solubilisé par du triton X-100 (0,5 ml) est incubé pendant une heure, à 4°C, avec de l'ABP ou de la SBP marquée (1,5 pmole). A la fin de cette période, le mélange est injecté sur une mini-colonne de gel-filtration (0,46 cm x 20 cm) rempli de supérose 6B. Les fractions éluées sont collectées et analysées en scintillation β .

Cette méthode nous a également permis d'étudier la spécificité de la liaison (par préincubation de l'extrait solubilisé avec de l'ABP ou de la SBP non radioactive), l'action du calcium (en ajoutant de l'EDTA dans le mélange réactionnel) ou encore l'effet du pH (en ajustant le pH du milieu à 5 au lieu de 7,4).

C. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

2.7. ETUDE DE LA LIAISON ET DE LA CINETIQUE DE PENETRATION CELLULAIRE DE LA PROTEINE MARQUEE PAR AUTORADIOGRAPHIE.

Ces techniques histologiques ont été réalisées dans le laboratoire d'histologie-embryologie II (Pr Gérard) sur différents stades de maturation de la lignée germinale de rat et, de façon préliminaire, chez l'homme.

Les cellules de la lignée germinale sont préparées, selon la méthode décrite précédemment, à partir des tubes séminifères isolés: 10^6 cellules (homme) ou $4 \cdot 10^6$ cellules (rat) sont incubées dans 150 μ l de milieu MEM + HAM F₁₂ (50%, V/V), à 34°C, sous agitation, avec de l'ABP de rat (0,25 pg) ou de la SBP humaine (30 ng), pendant une durée allant de 10 à 30 minutes selon les clichés. Un contrôle de la spécificité du mécanisme, ou de la dépendance au calcium, est réalisé avec une préincubation des cellules 30 minutes avec de l'ABP non marquée, à + 4°C, ou en présence d'EDTA.

Les cellules sont alors fixées avec 2,5% de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,2), à + 4°C, pendant trois heures puis fixées dans de l'acide osmique (2%) pendant une heure, lavées dans le tampon cacodylate précédent et incluses dans de l'Epon. Des coupes (80 nm) sont recouvertes de l'émulsion L₄ (Ilford) et sont révélées après 3 mois d'exposition à l'abri de la lumière (+4°C), soit avec du Microdol-x (Kodak) soit avec un révélateur "grain fin" (Agfa). Elles sont enfin observées avec un microscope équipé d'un système de mesure (Philips) permettant la localisation des grains d'argent correspondant à la source radioactive. Les images sont analysées qualitativement et quantitativement. Une étude statistique utilisant le test de Student est destinée à comparer le nombre de grains d'argent par unité de surface en fonction du stade de la cellule germinale.

2.8. ETUDE DE LA PENETRATION EPIDIDYMAIRE PAR MICROINJECTIONS INTRALUMINALES D'ABP

Des petits fragments d'épididymes de rat, appartenant à la partie proximale ou caudale, sont placés dans un milieu de survie (HANKS 199.) à température ambiante. Des microinjections d'ABP iodée (20 à 40 ng), ou marquée par photoaffinité (18 à 36 ng), sont effectuées au niveau de la lumière du tube épидидymaire sous contrôle microscopique.

Une étude cinétique est effectuée en incubant le traceur, à 4°C, durant des périodes allant de 2 à 75 minutes. Un contrôle de la spécificité de la liaison est effectué par une injection préalable d'ABP non marquée 5 minutes avant la protéine radioactive.

L'action de l'EDTA est également étudiée en l'ajoutant dans le milieu injecté. On évalue aussi l'effet de deux poisons cellulaires: la cycloheximide et la chloroquine injectées séparément 15 à 120 minutes avec le traceur.

Après ces microinjections, un protocole de révélation, identique à celui décrit précédemment, est réalisé pour obtenir des clichés. Une étude statistique du nombre de grains d'argent par unité de surface cellulaire est également effectuée.

D. DOSAGE DES ACIDES GRAS LIBRES EPIDIDYMAIRES

Cette méthode est réalisée dans le laboratoire de biochimie du Pr Nunez (Inserm U224).

Un volume de l'extrait épидидymaire et du sérum de rat adulte (60 jours) est extrait par un mélange de cyclohexane/acétate d'éthyle (V/V) et chromatographié sur une colonne de séphadex LH 20. Les AGL contenus dans la première fraction sont analysés qualitativement et quantitativement par chromatographie en phase gazeuse. Après dérivation méthylique et chauffage, le mélange réactionnel est extrait trois fois par 1 ml d'hexane. Il est ensuite évaporé à sec, repris dans 0,1 ml d'hexane et injecté sur une colonne capillaire méthyl/silicone, avec une programmation de température de 5°C/min de 175°C à 250°C.

Les concentrations en AGL sont mesurées par rapport à un étalon interne : l'acide heptadécanoïque (C17:0).

Une analyse enzymatique globale de la teneur quantitative en AGL a été effectuée par le test WAKO lorsque l'analyse qualitative de chaque classe d'AGL n'était pas nécessaire.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. SEMI-PURIFICATION DE L'ABP TESTICULAIRE ET MARQUAGE PAR PHOTOAFFINITE (PUBLICATION I)

1.1. But de l'étude

L'ABP testiculaire de rat a été purifiée dans notre laboratoire à partir de quatre étapes en CLHP (Guéant et Coll., 1986). Cette méthode permettait d'obtenir une protéine de très grande pureté (99%) avec un faible rendement (14%) dû principalement aux conditions dénaturantes de la dernière étape chromatographique (phase inverse).

Nous avons donc développé une méthode de semi-purification de l'ABP en utilisant uniquement les deux premières étapes chromatographiques, et cela dans un double but :

- mesurer la capacité de liaison de la protéine avec des quantités croissantes de DHT tritiée,
- pré-purifier de l'ABP marquée par photoaffinité afin d'étudier, par la suite, son activité de liaison membranaire. La publication I fait référence essentiellement à la première étape (mesure de la capacité de liaison) et nous avons modifié le marquage de la protéine (photoaffinité) pour la seconde étape (étude de la liaison membranaire).

1.2. Résultats

Le profil chromatographique de l'extrait testiculaire incubé avec des concentrations croissantes de DHT tritiée nous donne deux pics chromatographiques majeurs (figure n°1). Le premier (10-11 minutes) correspond à de l'ABP caractérisée, lors de la deuxième étape, en gel filtration (supérose 6B) qui nous montre que la protéine obtenue est un mélange de monomère (45 kda) et de dimère (90 Kda).

Le deuxième pic est constitué par l'hormone libre (18 min). L'étude par représentation de Scatchard (1949) indique que cette méthode permet d'évaluer les paramètres de liaison de l'ABP testiculaire à la DHT tritiée. En effet, une capacité de liaison de 16 nmole/l ($K_d = 71,4$ nmole) est retrouvée lorsque l'extrait testiculaire est traité par le chlorydrate de guanidine. Elle est de 7,8 nmole/l ($K_d = 35,7$ nmole) dans le cas contraire (figure n°2).

Cette méthode a ensuite été utilisée dans un but de semi-purification de l'ABP testiculaire en marquant l'extrait testiculaire de départ par photoaffinité. La première étape préparative chromatographique nous donne un profil présentant deux pics se chevauchant à six minutes et à dix minutes (figure n°3). Les fractions correspondantes ont été collectées et concentrées avant d'être déposées sur une colonne de gel-filtration. Le chromatogramme obtenu (figure n°21) nous montre trois pics majeurs. Le pic à dix-neuf minutes (au niveau du bleu dextran) correspond à des agrégats protéiques de haut poids moléculaire. Le dernier pic (45 min) représente une liaison non spécifique, peut-être due à une dénaturation de l'ABP au cours de la préparation. Seul le pic majeur à 34-36 minutes correspond au poids moléculaire de l'ABP (90 Kd). Ces fractions concentrées nous donne deux bandes majeures en condition dénaturantes (SDS) à 52500 Da et 46000 Da (figure n°21). Les valeurs obtenues sont proches de celles retrouvées dans les autres études (Musto et Coll. 1977-1980).

1.3. Discussion

Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité de liaison stéroïdienne de l'ABP testiculaire par CLHP.

La plupart des autres travaux ont étudié la capacité de liaison de l'ABP épидидymaire, en concentration beaucoup plus importante (Tindall et Coll., 1974; Taylor et Coll., 1980; Musto et Coll., 1980). Le testicule représente le lieu de synthèse de la protéine et il était intéressant d'étudier la capacité de liaison de l'ABP testiculaire. Les différences structurales entre ABP testiculaire et épидидymaire étant essentiellement dues à la partie glucidique de la protéine, les résultats obtenus dans notre étude confirment que la composition de la copule glucidique n'intervient pas dans la liaison du stéroïde à la protéine (Danzo et Coll., 1991). Le marquage covalent de la protéine, par photoaffinité, apporte une bonne stabilité à celle-ci permettant de la détecter au cours des étapes chromatographiques. Nous avons étendu les résultats de la publication I afin de mieux pré-purifier la protéine en ajoutant une étape de gel-filtration. L'élimination de chlorure de guanidine dans la préparation de l'extrait testiculaire permet de diminuer la dénaturation protéique. Cette étape semble interférer sur la reconnaissance de l'ABP par les sites de liaisons membranaires étudiés ultérieurement.

La réduction du nombre d'étapes chromatographiques, par rapport à notre première étude, nous permet d'obtenir une protéine suffisamment pure, marquée de façon spécifique et covalente, pour étudier son action au niveau membranaire.

Nos résultats sont très proches de ceux trouvés par Larrea et Coll. (1981), aussi bien sur l'activité spécifique de la protéine que sur son degré de pureté (45%).

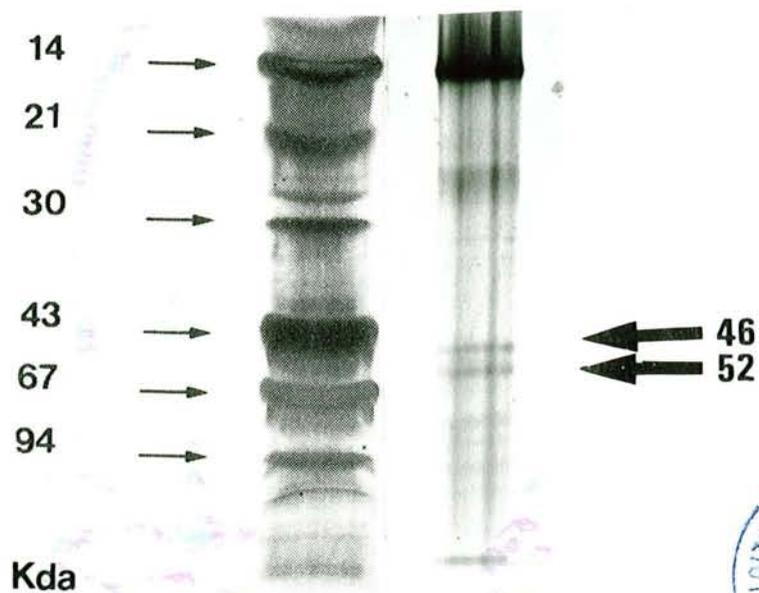
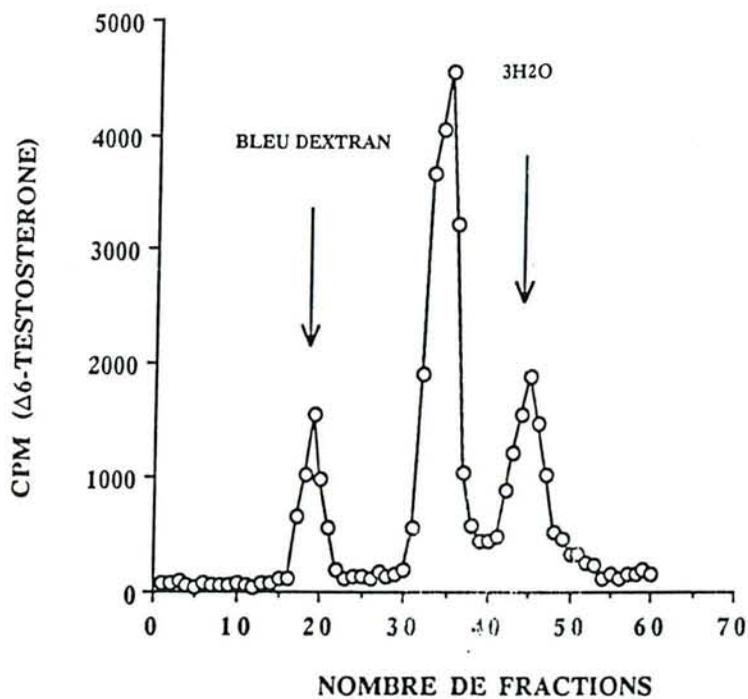


Figure n ° 21 : Profil obtenu à partir d'une fraction concentrée de supérose 6B (fraction 36), et analysé par électrophorèse de polyacrylamide en présence de SDS.



Journal of Chromatography, 526 (1990) 186-193
Biomedical Applications
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 5081

Note

Dihydrotestosterone binding capacity of androgen-binding protein in tissue extract using high-performance size exclusion chromatography

SOPHIE FRÉMONT, JEAN-LOUIS GUÉANT* and FRANCK FELDEN

Equipe de Biochimie-Immunologie, Unité Inserm U 308, Faculté de Médecine, Université de Nancy I, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex (France)

MONIQUE EGLOFF

Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, Rue des Saints-Pères, 75006 Paris (France)

ANNIE GÉRARD

Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Faculté de Médecine, Université de Nancy I, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex (France)

and

JEAN-PIERRE NICOLAS

Equipe de Biochimie-Immunologie, Unité Inserm U 308, Faculté de Médecine, Université de Nancy I, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex (France)

(First received August 2nd, 1988; revised manuscript received October 17th, 1989)

Androgen-binding protein (ABP) was first discovered in rat epididymis. This glycoprotein is synthesized by Sertoli cells from rat testis. Most of it is released into the lumen of the tubules. The function and the fate of ABP in seminiferous tubules and in epididymis remain uncertain. We have recently purified this protein from rat testis and demonstrated that it is internalized by the principal cells of the caput of epididymis, using electron microscopy radioautography [1]. The purification as well as the study of the metabolism of ABP requires a reliable method for determination of its binding capacity in biological fluids and tissue extracts. Various methods have been used to quantitate ABP. The electrophoretic methods of Corvol et al. [2] and Ritzen et al. [3] determine the dihydrotestosterone (DHT) binding capacity of ABP from β -counting of

slices corresponding to bound and free [^3H]DHT. Other methods, such as radioimmunoassay and radioisotope dilution assay with dextran-coated charcoal, are less reliable [4,5]. Recently, another method was described which uses ion exchange on mini-columns [6].

This paper describes the use of high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine the [^3H]DHT binding capacity of ABP from tissular extracts.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

5 α -Dihydro-[1,2,5,6,7- ^3H]testosterone (180 Ci/nmol) was obtained from the Radiochemical Centre (Amersham, U.K.) and Δ_6 -testosterone (17 β -4,6-hydroxy-[1,2- ^3H](N)-androstane-3-one) (48.6 Ci/mmol) was obtained from NEN Research Products (Boston, MA, U.S.A.).

Scintran[®] (for scintillation counting) was from BDH (Poole, U.K.) and glycerol and guanidine hydrochloride from Merck (Darmstadt, F.R.G.). All other reagents were obtained as described previously [7].

Preparation of tissue extracts

Testes were obtained from 250-g adult Wistar rats. Organs were decapsulated and homogenized in ice-cold 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 10% (v/v) glycerol (TG buffer) with a tissue ratio of 1:2, using a Polytron homogenizer. The suspension was centrifuged at 105 000 g for 1 h at 4 °C. ABP was precipitated from the supernatant by slowly adding ammonium sulphate to a final concentration of 0.36 g/ml. The mixture was incubated overnight at 4 °C under rotative agitation, and it was centrifuged at 17 000 g for 2 h at 4 °C. The pellet was dissolved in buffer and centrifuged again. The supernatant was used as a testis extract for the determination of the DHT binding capacity of ABP. One part of this sample was dialysed against 20 volumes of TG buffer. The other part was dialysed in an additional step, against 5 M guanidine hydrochloride, in order to remove the endogenous androgens, which could saturate ABP in the tissue extract, according to a procedure previously described [8]. The sample was then renaturated against 20 volumes of TG buffer.

High-performance size exclusion chromatography

The injected samples were prepared by incubating 400 μl of tissue extract with [^3H]DHT in a total volume of 500 μl of TG buffer for 18 h at 4 °C under rotative agitation. The experiment was repeated under the same conditions with the amount of [^3H]DHT increased from 11 to 176 pmol. The binding capacity of ABP and its dissociation constant (K_D) for [^3H]DHT were determined using a Scatchard plot [9].

The HPLC analysis was performed using a two-pump gradient system

(Waters Assoc., Milford, MA, U.S.A.). The injector was a Rheodyne 655-0890 valve fitted with a 1-ml loop. The separation of bound and free tritiated androgens was performed on a Diol 200 (7 μm , 250 mm \times 7 mm I.D.) column (Merck). The mobile phase was TG buffer containing 10% (v/v) ethyleneglycol, and the flow-rate was 1.0 ml/min. The eluted tritiated androgens were collected in 1-ml fractions using a Frac-100 fraction collector (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Tritiated androgens were quantified by liquid scintillation spectrometry (Packard Model 5780), using 5 ml Scintran for 50 μl of each fraction, with a counting efficiency of 30%.

Gel permeation fast protein liquid chromatography (FPLC)

The fractions of ABP- ^3H testosterone eluted from the Diol 200 column were pooled and poured onto a Superose 6TM column (30 cm \times 1.0 cm I.D.). The column was eluted with TG buffer at a flow-rate of 0.5 ml/min using an FPLC system (Pharmacia) with two P-2500 pumps. The fractions were collected and treated as described above for liquid scintillation spectrometry. The column was calibrated using tritiated water, dextran blue 2000 and standard proteins, as described previously [10].

Electrophoresis

Disc polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was used for determination of bound and free tritiated androgens according to the method of Corvol et al. [2]. A 50- μl volume of tissue extract was incubated with ^3H DHT (0.5 μCi , 2.7 pmol) for 2 h. A dense solution (saccharose at saturation) and a drop of bromophenol blue were added. A 50- μl aliquot of this mixture was poured onto the top of the gel. Migration was performed at 4°C, at 1 mA per gel. The gel was cut, and each slice was incubated with 1 ml of toluene and 4 ml of Scintran prior to liquid scintillation spectrometry. Analysis of the protein content of the tissue extract and of the fractions of ^3H DHT-ABP collected from the Diol 200 column were performed in sodium dodecyl sulphate (SDS) PAGE using an automated Phast SystemTM (Pharmacia). The polyacrylamide gradient was 8–25%, and 2.5% SDS and 5.0% β -mercaptoethanol were added to each sample. The sample was heated at 100°C for 5 min and poured onto the gel after the addition of bromophenol blue. Reference proteins for molecular mass estimation were phosphorylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor and α -lactalbumin.

Photoaffinity labelling

A 10-ml volume of the dialysed testicular extract were incubated overnight with 1 nmol J_6 - ^3H testosterone at 4°C under rotative agitation. After exposure to UV light (345 nm) for four 15-min periods under controlled temperature, the sample was ready for injection, in order to separate the covalently bound J_6 - ^3H testosterone from the remaining free J_6 - ^3H testosterone. The separation was performed on a preparative Diol 200 column (10 μm , 250 mm \times 25 mm I.D.) at a flow-rate of 10.0 ml/min.

RESULTS AND DISCUSSION

An example of an HPLC elution profile of [^3H]DHT from the Diol 200 column is given in Fig. 1. When [^3H]DHT was incubated with the tissue extract, [^3H]DHT bound to ABP was eluted in two peaks with retention times of 6.8 ± 0.6 and 10.6 ± 0.7 min (Fig. 1). The retention times of these peaks did not change when samples of different concentrations were injected. The minor peak was the first to be eluted and it could correspond to a specific binding of DHT to a carrier protein rather than to absorption of [^3H]DHT on albumin, because it disappeared when [^3H]DHT was incubated with the tissue extract

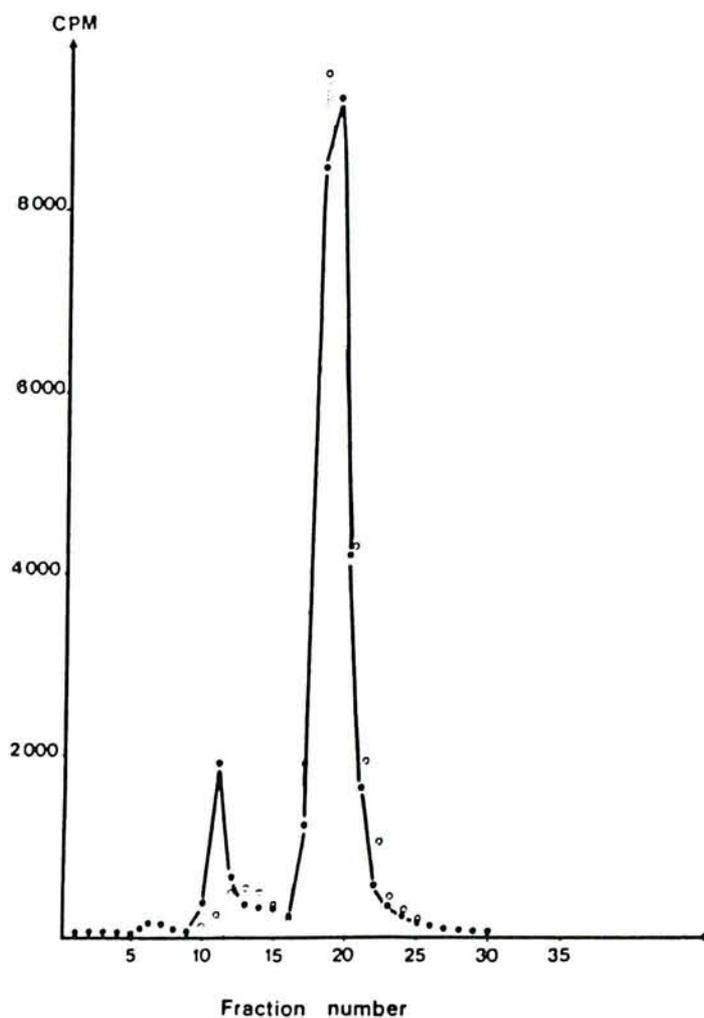


Fig. 1. Chromatogram (Diol 200 column, 250 mm \times 7 mm I.D.) obtained with [^3H]DHT incubated with 400 μl of rat testicular cytosol extract (\bullet). [^3H]DHT bound to ABP and free [^3H]DHT are eluted at 10.6 and 18.1 min, respectively. A control analysis is shown (\circ) for the injection of [^3H]DHT alone, in which no peak for [^3H]DHT appears at 10-11 min. The same elution profile was obtained when 400 μl of rat testicular cytosol extract were incubated with labelled and unlabelled DHT in a molar ratio of 1:200.

in excess of non-labelled DHT (Fig. 1). Its DHT binding capacity was estimated to ca. 0.13 pmol/mg of protein, and its K_D ca. 47.6 nM.

When a part of the second peak of bound [^3H]DHT eluted from the Diol 200 column was injected on to a Superose 6 gel permeation column, it was eluted as a main peak corresponding to an estimated relative molecular mass of 45 000. A minor peak corresponding to an estimated molecular mass of 95 000 was also observed. It was therefore concluded that the peak of bound [^3H]DHT which was eluted with a retention time of 10–11 min from the Diol 200 column corresponded mainly to a monomer of ABP. The dissociation of dimeric ABP was not complete, since a minor peak corresponding to the dimer was observed in Superose 6 gel permeation. The dissociation may be the result of unspecific interaction of the protein with the solid phase of the column. The retardation of elution could be also due to an interaction of ABP with the matrix.

Free [^3H]DHT was eluted from the Diol 200 column with a retention time of 18.1 ± 0.9 min. The between-run coefficients of variation of the retention times of bound and free [^3H]DHT were estimated as 6.5 and 4.8%, respectively ($n=10$). When [^3H]DHT and tissue extract were successively injected and filtered through the Diol 200 column, no radioactivity was removed in the second analysis. This was carried out to verify that no [^3H]DHT remained adsorbed on the column after each analysis.

The Scatchard plot demonstrated that [^3H]DHT was specifically bound to ABP with a binding capacity of 3.3 pmol/mg of protein, using the guanidine hydrochloride dialysed testis extract (Fig. 2). This result was higher than the binding capacity of 2.6 pmol/mg estimated with the method of Corvol et al. [2]. In fact, the method of Corvol et al. [2] is known to underestimate the DHT binding capacity [3]. The [^3H]DHT binding capacity of ABP was estimated to be 0.54 pmol/mg in the non-treated testis extract. A similar result has been obtained by Larrea et al. [11] for the specific activity of ABP in rat testis extract treated by ammonium sulphate precipitation, using a radioisotopic dilution assay with dextran-coated charcoal.

The enhancement of ABP specific activity in testis extract after dialysis with guanidine hydrochloride can be explained by the desaturation of ABP [8]. Guanidine hydrochloride dialysis has a mild effect on the binding site of ABP after renaturation of the extract since the K_D was double that determined with the untreated extract: K_D was estimated to be 71.4 and 35.7 nM for ABP from the testis cytosol extract treated with guanidine hydrochloride and from the untreated extract, respectively. These values are ten-fold higher than those obtained by other techniques [5,6], but the tissue extract was different because it was obtained after ammonium sulphate precipitation of the ABP fraction. One may assume that such a procedure modifies the affinity of DHT for ABP, either by denaturation of ABP or by enhancement of the ionic strength of the medium; a part of dimeric ABP is dissociated and eluted as a monomer in our

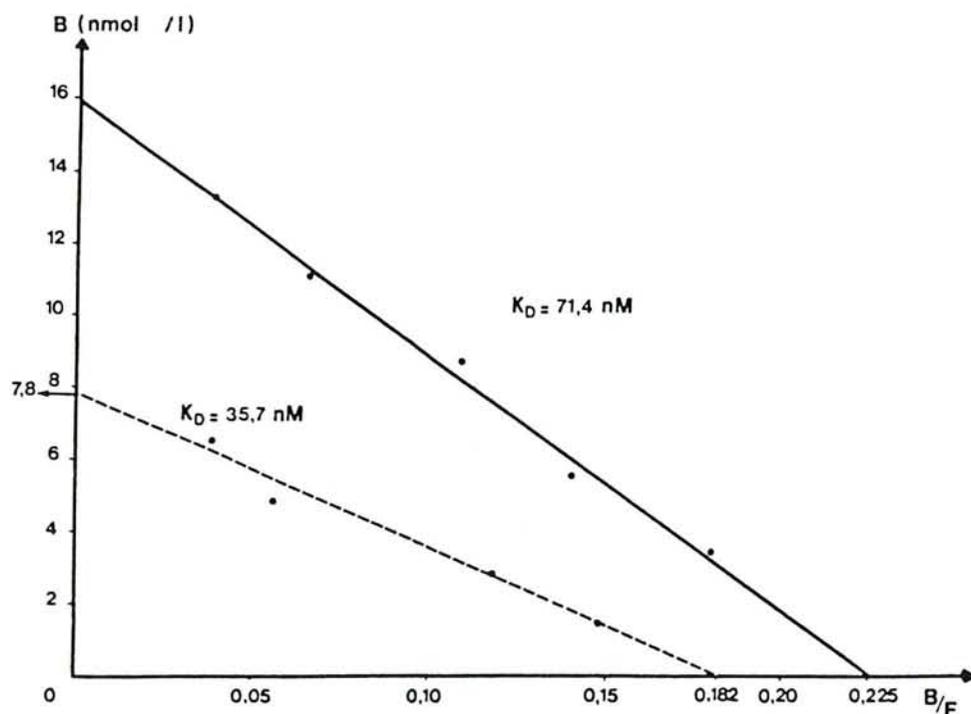


Fig. 2. Scatchard plot of dialysed (—) and non-dialysed (- - -) cytosol extract from rat testis incubated with increasing amounts of [^3H]DHT.

HPLC method (Fig. 1). Another explanation for the low K_D of the ABP-DHT complex could be that DHT has a lower affinity for monomeric ABP than for the dimer.

A Diol 200 column (with a preparative column) was also used to separate Δ_5 -testosterone bound the ABP from free Δ_5 -testosterone after photoaffinity labelling of ABP from tissue extract. Two peaks of bound Δ_5 -testosterone were eluted with retention times of 6 and 10 min (Fig. 3). When free Δ_5 -testosterone alone was injected under these conditions it was eluted with a retention time of 18 min. When a part of the fractions corresponding to the peaks 1 and 2 (Fig. 3) were injected on a Superose 6 gel permeation column, they were eluted in positions corresponding to estimated relative molecular masses (M_r) of 95 000 and 49 000, respectively. Peaks 1 and 2 therefore corresponded to the monomer and the dimer of photoaffinity-labelled ABP.

The photoaffinity labelling of ABP in crude tissue extracts has been previously described by Taylor et al. [12]. These authors used dialysis to separate free from bound Δ_5 -testosterone. The Diol chromatography is more rapid and easier to perform.

SDS-PAGE of the fraction of monomeric Δ_5 -testosterone-ABP eluted from the Diol 200 column showed that proteins and peptides were simultaneously present in the fractions (Fig. 4); two protein bands (46 800 and 52 500) had M_r values close to that of the monomers of ABP [7,11]. Using the Diol 200 column, ABP was well separated from albumin, which had a retention time of

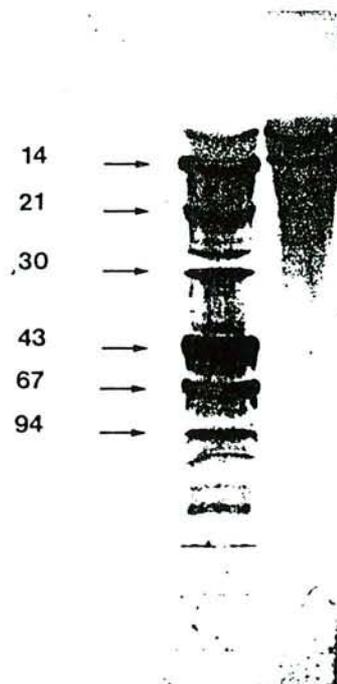
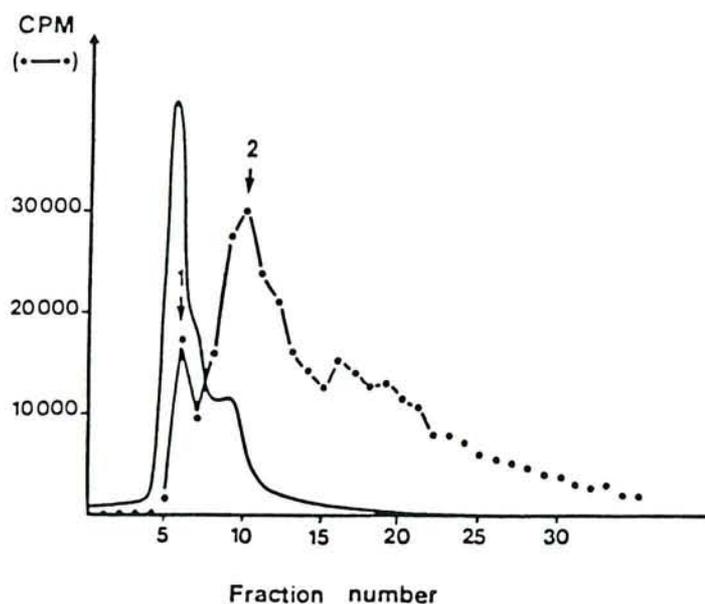


Fig. 3. Chromatogram (preparative Diol 200 column, 250 mm \times 25 mm I.D.) obtained with testosterone incubated with 3 ml of rat testicular cytosol extract. Photoaffinity labelling was performed as described in the text. The preparative column was eluted at a flow-rate of 10 ml/min. The photoaffinity-labelled ABP was eluted as both dimer and monomer, with respective retention times of 6 and 10 min. Absorbance detection (ABS, —) was performed at 280 nm (1.0 a.u.f.s.).

Fig. 4. SDS electrophoresis of the fraction of [^3H]DHT-ABP complex collected from Diol 200 chromatography. Two protein bands have M_r values (46 800 and 52 500) close to that of a monomer of ABP. The presence of abundant contaminating peptides was noticed. M_r values were estimated using phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor and α -lactalbumin as reference molecules (right lane). Their M_r (10^{-3}) values are indicated by arrows.

ca. 6.6 min, even though its M_r is close to that of albumin. From calibration of the Diol 200 column with standard molecules, it was also observed that ABP was eluted in a position corresponding to that of glucagon [13].

In conclusion, we have improved a rapid and reliable HPLC method for separating the free androgens from androgens bound to ABP in tissue extracts. This method has been used to measure the binding capacity of ABP and to prepare semi-purified photolabelled ABP from rat testis extract.

REFERENCES

- 1 A. Gerard, J. Khanfri, J.L. Gueant, S. Fremont, J.P. Nicolas, G. Grignon and H. Gerard, *Endocrinology*, 122 (1988) 1297.
- 2 P. Corvol, A. Chrambach, D. Rodbard and C.W. Bardin, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 3435.
- 3 E.M. Ritzen, F.S. French, and V. Hansson, *J. Biol. Chem.*, 249 (1974) 6597.
- 4 G.L. Gunsalus, N.A. Musto and C.W. Bardin, *Science*, 200 (1978) 65.
- 5 B.E.P. Murphy, *J. Clin. Endocrinol.*, 27 (1967) 973.

- 6 P. Barbey, S. Fradin, S. Carreau and M.A. Drodowsky, *Anal. Biochem.*, 167 (1987) 167.
- 7 J.L. Gueant, I. Kouvonen, J.C. Michalski, C. Masson, R. Grasbeck and J.P. Nicolas, *FEBS Lett.*, 184 (1985) 14.
- 8 J.L. Gueant, J. Khanfri, H. Gerard, S. Fremont, A. Gerard, G. Grignon and J.P. Nicolas, *FEBS Lett.*, 207 (1986) 280.
- 9 C. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51 (1949) 660.
- 10 J.L. Gueant, B. Monin, M. Djalali, V. Wahlstedt, F. Bois and J.P. Nicolas, *Biochim. Biophys. Acta*, 957 (1988) 390.
- 11 F. Larrea, N.A. Musto, G.L. Gunsalus, J.P. Mather and C.W. Bardin, *J. Biol. Chem.*, 256 (1981) 566.
- 12 C.A. Taylor, H.E. Smith and B.J. Danzo, *J. Biol. Chem.*, 255 (1980) 7769.
- 13 F. Bois, M.B. Gabel, J.L. Gueant, C. Masson and J.P. Nicolas, *Biomed. Pharmacother.*, 38 (1984) 404.

II. CARACTERISATION D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE L'ABP DE RAT AU NIVEAU EPIDIDYMAIRE (PUBLICATION II)

2.1. But de l'étude

Des résultats préliminaires avaient montré, en 1988, dans notre laboratoire (Gueant et coll.), que l'ABP pouvait reconnaître des sites de liaison membranaire avant d'être internalisée de façon spécifique dans les cellules principales de l'épididyme de rat (Gérard et Coll., 1988 a-b).

Afin de montrer la présence d'un récepteur membranaire spécifique de l'ABP au niveau épидидymaire, nous avons étudié la liaison de cette protéine iodée, ou marquée par photoaffinité, sur l'épididyme de rat immature (15 jours) par trois voies différentes:

- sur un extrait protéique membranaire solubilisé,
- par une étude sur cellules entières isolées,
- grâce à une cinétique de microinjections et de pénétration de la protéine par un suivi autoradiographique.

2.2. Résultats

2.2.1 Liaison de l'ABP avec l'extrait membranaire solubilisé

Le profil d'élution de l'ABP marquée par photoaffinité, et incubée avec des extraits membranaires solubilisés par du triton X-100, de la tête de l'épididyme de rat nous donne un pic à 19 min. correspondant à une masse moléculaire de l'ordre de 2000 Kda, (figure 1a). Le complexe est bien séparé de l'ABP marquée seule (32 min). Ce pic, obtenu sans extrait membranaire, correspond à une masse moléculaire de 90 KDa qui est celle de la molécule d'ABP native. Ces expériences ont donné des résultats similaires avec de l'ABP marquée à l'iode 125, cependant la stabilité au cours du temps est beaucoup moins bonne.

La présence d'EDTA (10 mM) ou l'excès d'ABP froide inhibent fortement la formation du pic récepteur (19 min) de 50 % et 80 % respectivement. La liaison de l'ABP à l'extrait membranaire est donc spécifique et la présence de calcium dans le milieu réactionnel est nécessaire à la liaison. La figure 1b nous montre une courbe de saturation d'extrait membranaire solubilisé en présence de quantités croissantes d'ABP iodée. Nous avons ainsi évalué la capacité de fixation de l'extrait membranaire à 7,9 pmole/mg de protéine au niveau de la tête de l'épididyme. La même expérience, réalisée avec le corps et la queue de l'organe, nous donne une nette diminution de la liaison (5 et 10 fois). Le pic récepteur de l'ABP est séparé par ultracentrifugation sur gradient de saccharose, et correspond à des coefficients de sédimentation de 18,4 S et 9 S. (figure 2a).

Enfin, une étude de la liaison de l'ABP iodée avec son récepteur épидидymaire a été réalisée en fonction du pH et présente une fixation maximale pour un pH compris entre 6 et 8 (figure 2b).

Masse moléculaire (Kda)	2000
Coefficients de sédimentation (S)	18,4 et 9
Activité du récepteur (tête / queue)	10 fois supérieure
pH optimum	6 à 8
Calcium dépendant	oui
Constantes d'affinités (Ka) (10^{-9} M)	67,9 et 2,8
Nombre de sites / cellules	1600 / 7700
Inhibiteurs	EDTA / Trypsine / chaleur / cycloheximide
Maximum de liaison	20 min. (+4°C)
Réversibilité	oui
Spécificité	oui
Endocytose par récepteur	oui

Tableau n°8 : Caractérisation physicochimique du récepteur épидидymaire de l'ABP chez le rat de 15 jours

2.2.2 Liaison de l'ABP avec les cellules épидидymaires isolées

L'étude de la liaison de l'ABP marquée par photoaffinité sur les cellules épithéliales épидидymaires se déroule à 4°C et la courbe de cinétique d'association montre un maximum de liaison en 40 min. (figure 4a). Cette liaison est saturable et réversible comme le montre la dissociation du complexe après ajout d'un excès d'ABP froide. La représentation de Scatchard (1949), et la correction de Rosenthal (1967), démontrent la présence de deux sites de liaison avec des constantes d'association respectives de 67,9 et 2,8 nM⁻¹ (figure 3). L'ensemble de ces résultats est résumé dans le tableau n° 8 . Le nombre de sites de liaison de faible affinité est cinq fois plus élevé que ceux de forte affinité. La fixation membranaire de l'ABP est calcium-dépendante comme le montre l'action de l'EDTA (66 % de diminution) .Elle est spécifique car la préincubation de l'extrait avec différentes protéines n'altère pas sensiblement la liaison membranaire à l'ABP.

2.2.3 Etude autoradiographique après microinjections d'ABP dans la lumière épидидymaire

L'ABP marquée est retrouvée au niveau des cellules principales de l'épididyme. La prédominance du traceur (ABP) est située dans la zone apicale après 3 à 5 minutes d'injection d'ABP iodée. Le nombre de grains d'argent (~ 20 /µm d'épididyme) est deux à trois fois plus faible au niveau de la queue épидидymaire par rapport à la partie proximale. Le traitement des animaux avec de la cycloheximide, deux heures avant l'injection d'ABP marquée, diminue significativement le nombre de grains radioactifs retrouvés dans l'épithélium (table 2). Un effet inhibiteur est également observé avec l'injection d'ABP froide ou de l'EDTA.

Une étude de saturation est réalisée en fonction du temps d'incubation (figure 4b). La détection d'ABP marquée dans l'épithélium épидидymaire est très rapide (2 min) et montre une saturation à partir de 20 min.

L'effet de la chloroquine présente dans le milieu, trente minutes avant l'injection de la protéine, induit une augmentation significative du nombre de grains radioactifs retenus par rapport à la préparation témoin (table 3). La densité du marqueur est de 2,5 et 4,5 fois après 10 et 20 minutes d'incubation, respectivement.

2.3. Discussion

Cette étude montre une liaison spécifique, suivie d'une pénétration intra-cellulaire de l'ABP au niveau des cellules principales de l'épididyme de rat immature (15 jours). La gel-filtration de l'extrait membranaire reconnaissant la protéine nous donne un agrégat de haut poids moléculaire (2000 Kda) qui nécessite une purification ultérieure. En effet, ce résultat est dix fois supérieur à celui trouvé par Hryb et Coll. (1989) au cours de la purification du récepteur de la SBP au niveau des membranes prostatiques humaines (167 Kda). La nature protéique du récepteur est fortement suggérée par l'action des protéases (trypsine) et sa sensibilité à la chaleur. Le récepteur épидидymaire étudié sur cellules isolées est spécifique, saturable, réversible et la liaison est calcium-dépendante. L'utilisation d'un marquage covalent de l'ABP diminue de façon très importante les interactions non spécifiques et le choix de la température du milieu d'incubation (4°C) ne permet pas l'endocytose du complexe sur cellules isolées.

L'étude des microinjections, et sa révélation par autoradiographie, nous montre la pénétration de l'ABP dans la cellule principale épидидymaire. L'action de la chloroquine nous apporte quelques éléments de réponse sur le type d'endocytose pouvant être utilisée par l'ABP:

- il existerait une libération de l'ABP et de son récepteur à pH acide, ce qui orienterait le processus vers un recyclage possible du récepteur,
- l'action de la chloroquine, qui diffuse dans le milieu intra-cellulaire et augmente le pH du milieu, provoque une accumulation significative du traceur,
- la présence d'ABP dans le compartiment acide de la cellule induit une libération du stéroïde, comme cela a été montré avec de l'ABP iodée liée à de la DHT tritiée (Guéant et Coll., 1988).

En conclusion, ce travail permet de confirmer et de caractériser les paramètres biochimiques et la cinétique de l'endocytose par récepteur de l'ABP sur les cellules principales épидидymaires.

Par contre, nous n'avons aucun argument concernant le devenir intra-cellulaire de l'ABP, si ce n'est son action possible au niveau de la membrane nucléaire (cf. discussion générale).

Evidence that androgen-binding protein endocytosis *in vitro* is receptor mediated in principal cells of the rat epididymis

J.-L. Guéant, S. Fremont, F. Felden, J.-P. Nicolas, A. Gerard*, B. Leheup*, H. Gerard* and G. Grignon*

Laboratoire de Biochimie Nutritionnelle, INSERM U 308, Faculté de Médecine, Université de Nancy I, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

*Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Faculté de Médecine, Université de Nancy I, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

Requests for offprints should be addressed to J.-L. Guéant)

RECEIVED 12 December 1990

ABSTRACT

We have studied the binding of [¹²⁵I-iodo]androgen-binding protein (ABP) and of [³H]Δ₆-testosterone photoaffinity-labelled ABP to receptors in the plasma membrane of rat epididymal cells in three ways: ABP binding to a Triton X-100-solubilized membrane extract, ABP binding to isolated epithelial cells in suspension and autoradiography of segments of dissected epididymides after *in vitro* intraluminal injection of labelled ABP. The binding of iodinated ABP to the receptor was similar to that of photoaffinity-labelled ABP in gel filtration. The ABP-receptor complex was eluted from Superose 6 gels as an aggregate, with a molecular mass of 2000 kDa. It was separated into two peaks by sucrose gradient ultracentrifugation, with respective sedimentation coefficients of 18.4 and 9.0 s. The activity of the receptor (ABP-binding capacity/mg protein) was tenfold higher in the caput than in the cauda. The binding of ABP to the receptor was pH dependent, being almost abolished at

pH < 4. The binding at 4°C of photoaffinity-labelled ABP to epithelial cells corresponded to two types of binding sites. The numbers of high-affinity and low-affinity sites per cell were 1600 and 7700 respectively; the association constants of these sites were 67.9 and 2.8 litres/nM respectively. The binding was decreased by treatment of the cells with trypsin or incubation in the presence of EDTA. The binding *in vitro* of labelled ABP to the epididymis epithelium reached a maximum after about 20 min at 4°C. In the autoradiographic study the tracer was found to be closely associated with coated pits, coated vesicles, endosomes and pale multivesicular bodies. Treatment of rats with cycloheximide significantly reduced the uptake of the tracer. Perfusion *in vitro* of epididymides with chloroquine produced a fourfold increase of the tracer in endosomes and multivesicular bodies.

Journal of Molecular Endocrinology (1991) 7, 113–122

INTRODUCTION

In the rat testis, androgen-binding protein (ABP) is synthesized by Sertoli cells and secreted mostly into the tubular lumen. ABP is present in seminal fluid (Jansson, Ritzen, French & Nayfeh, 1975) and is also detectable in principal cells of the epididymis, using immunohistochemistry (Feldman, Lea, Strusz *et al.* 1981; Pelliniemi, Dym, Gunsalus *et al.* 1981). Ligation of efferent ductules affects the concentration of ABP in the proximal epididymis, suggesting that the protein is taken up by the cells (French & Ritzen, 1975). This hypothesis has been

recently confirmed by our group, who observed uptake of iodinated ABP by principal cells of the epididymis, using electron microscopy autoradiography (Gerard, Khanfri, Guéant *et al.* 1988). It remains to be determined whether this uptake is receptor mediated. A preliminary study showed the binding of iodinated ABP to a Triton X-100 extract of plasma membranes from rat epididymis epithelium (Guéant, Fremont, Khanfri *et al.* 1988).

In the present work we studied the binding of iodinated and photoaffinity-labelled ABP to the plasma membrane of epididymal cells in three ways: a physicochemical study of ABP binding to a soluble

membrane extract, incubation with isolated cells in suspension, and autoradiography of the epithelium dissected epididymides segments injected *in vitro* with labelled ABP.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Chemicals were obtained as described by Frémont, Réant, Felden *et al.* (1990) and Gérard, Egloff, Gérard *et al.* (1990).

Purification and labelling of ABP

ABP was obtained from homogenized rat testis and purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described elsewhere (Guéant, Anfri, Gérard *et al.* 1986). The purified molecule was iodinated as described by Guéant *et al.* (1986). The specific activity was of the order of 0.2 mCi/mg protein. The physicochemical properties of the iodinated molecule showed the absence of any significant denaturation when determined by Superose 6 gel filtration, sucrose density ultracentrifugation or column isoelectrofocusing (Guéant *et al.* 1986). The photoaffinity-labelled ABP was prepared as described by Frémont *et al.* (1990) according to the method of Taylor, Smith & Danzo (1980). Ten millilitres of the testicular extract were incubated with 1 nmol [³H]Δ₄-testosterone (17β-[1,2-³H(N)]-androxyandrost-4,6-dien-3-one; 48.6 Ci/nmol) overnight at 4°C, under rotary agitation. After exposure to u.v. light for four consecutive periods of 90 min, the sample was injected into a preparative LC column (Diol Lichroprep 200; 25×2.5 cm). The column was eluted with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 5% (v/v) ethyleneglycol at a flow rate of 10 ml/min. The peak of bound [³H]Δ₄-testosterone was eluted with a retention time of 10 min. The corresponding fraction was stored in aliquots at -80°C. Each aliquot was filtered by fast protein liquid chromatography Superose 6 gel filtration prior to use. The gel filtration column (25×50 cm) was eluted with 20 mM Tris-HCl buffer containing 10% (v/v) glycerol and 0.15 M NaCl at a flow rate of 1.2 ml/min. The column was calibrated with dextran blue 2000 and tritiated water as described by Frémont *et al.* (1990). The peak of specific photoaffinity-labelled ABP was eluted with a retention time of 32 min corresponding to an *M_r* of 60 000. It was collected and stored in aliquots, at -80°C, before use. Dim-red illumination was used during the HPLC isolation of photoaffinity-labelled ABP, to avoid any photolysis.

Preparation of membrane protein extract from rat epididymis

One-hundred epididymides from 200 g Wistar rats were cut into three parts corresponding to the caput, the corpus and the cauda. They were homogenized on ice in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1.5 mM EDTA and 10% (v/v) glycerol and centrifuged at 17 000 *g* for 2 h at 4°C. The pellet was washed three times with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 10% glycerol (TG buffer), by centrifugation. The pellet was incubated with four-fold its volume of TG buffer containing 0.05% (v/v) Triton X-100, 0.4 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 0.3 mM NaN₃, sonicated and incubated for 48 h at 4°C. After centrifugation at 100 000 *g* for 1 h at 4°C, the supernatant was used as the protein membrane extract and stored in aliquots at -80°C.

Biochemical study of the binding of iodinated ABP to the membrane protein extract

Increasing amounts (0.5–10 pmol) of the iodinated or photolabelled ABP were incubated with 0.4 ml membrane protein extract and with TG buffer containing 10 mM CaCl₂, 0.4 mM PMSF and 0.05% (v/v) Triton X-100 in a total volume of 1 ml. The incubation was performed overnight at 4°C under rotary agitation. The sample was poured onto a Superose 6 column (1.6×50 cm), eluted with TG buffer containing 0.15 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.4 mM PMSF and 0.01% Triton X-100 at a flow rate of 1.2 ml/min. The same experiment was repeated with the use of 10 mM EDTA, instead of 1 mM CaCl₂, in order to inhibit the calcium-dependent binding of ABP to the membrane protein extract. The column was calibrated as described previously, using thyroglobulin, immunoglobulin G and intrinsic factor as reference proteins (Guéant, Jokinen, Schohn *et al.* 1989).

The radioactive peak which eluted in the position of dextran blue was collected and analysed by sucrose density ultracentrifugation. In another series of experiments, the effect of pH on the binding of iodinated ABP to the soluble receptor was studied. The membrane protein extract (0.4 ml) was incubated with 2 pmol (50 μl) iodinated ABP and 0.45 ml various buffer solutions (0.02 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6, 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5, 0.05 M acetate buffer, pH 4, 0.02 M citrate-HCl buffer, pH 3 and 0.02 M citrate-HCl buffer, pH 2). The pH of the incubation mixture was adjusted to that of the corresponding buffer. After overnight incubation at 4°C under rotary agitation, the sample was studied by centrifuga-

ation (180 000 *g*) through 5–35% (w/v) gradients of sucrose for 16 h. Thyroglobulin, catalase and bovine serum albumin, of known sedimentation coefficients, were used for reference.

Isolation of epididymal epithelial cells

Wistar rats were killed at 15 days of age. The caput epididymis was dissected and trimmed from associated fat. Small fragments were subsequently incubated in a solution of collagenase dispase (500 mg/l), soybean trypsin inhibitor (100 mg/l) and DNase type I; 30 mg/l) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.35) for a period of 20 min at 37°C, while shaking. The epididymal capsule was then torn out using fine forceps. The fragments were subsequently incubated for a second period in the same enzyme solution. The progressive dissociation of the epididymal tubular fragments from the surrounding interstitial tissue was obtained by passing it through a 2 ml syringe several times. At the end of this second period, the epididymal tube fragments were fully incubated in the enzyme solution for 30 min until full cellular dissociation. This was optimized by several passages through an 18-gauge needle. The enzyme solution was then filtered and the isolated cells were pelleted down and resuspended in calcium-free buffer solution before being counted in a haemocytometer.

Binding of the labelled ABP with isolated epididymal cells

Binding of photoaffinity-labelled ABP to the isolated cells was studied by incubating increasing amounts (125–1.0 pmol) of labelled ABP with 10^6 cells/test-tube in TG buffer (pH 7.4) containing 0.12 M Cl⁻, 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂. Incubation volume was 1 ml. The test-tubes were shaken at 4°C for 1 h. The cells were centrifuged at 500 *g* for 5 min and washed three times with the incubation buffer. The radioactivity of the pellet was measured after sonication and addition of 3 ml scintillation fluid. Non-specific binding was determined to be approximately 12% by duplicating the experiment in the presence of non-labelled ABP (100 times the concentration of labelled ABP). Specific binding was calculated by subtraction of non-specific binding from total binding of the tracer to the cell pellet. A second series was prepared in the same conditions, except that 5 mM EDTA was added to the incubation medium instead of divalent cations. A third series was prepared by incubating the cells with 0.1 nmol/ml of lactotransferrin, serotransferrin, asialofetuin, fetuin and bovine serum albumin before adding 0.5 pmol photoaffinity-labelled ABP. The time-course of the uptake of labelled ABP to the cell suspension was studied by incubating 15×10^6 cells

with 7.5 pmol photoaffinity-labelled ABP at 4°C. The incubation volume was 15 ml. Aliquots (1 ml) of the shaken suspension were removed after various incubation times (2–120 min). Bound ABP was estimated by measuring the radioactivity of the pellets as described above. The same experiment was repeated in the same way, except that non-labelled ABP (100 times the amount of labelled ABP) was added to the incubation mixture after 10 min of incubation of cells with the tracer, in order to study the dissociation of labelled ABP.

In-vitro uptake of labelled ABP by epididymis segments

After ether anaesthesia, small fragments of rat epididymis were dissected from the proximal caput or the cauda (zone 2 or 5, as defined by Reid & Cleland (1957)) and placed in culture medium (Hanks' 199; Seromed, Biopro, Strasbourg, France) at room temperature. An operating microscope (Zeiss) and a Leitz micromanipulator were used for the microinjections as previously described (Gérard *et al.* 1988). Each microinjection corresponded to 20–40 ng (+8 nCi) for [¹²⁵I-iodo]ABP and to 18–36 ng (1–2 nCi) for [³H]Δ₆-testosterone. A volume of 0.5–1 μl tracer was carefully infused for 1 min into the epididymis lumen and maintained for different incubation times. The kinetic study was performed at 4°C for 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40 and 75 min. In this study, 20–40 ng iodinated ABP (+8 nCi) were injected per test in the proximal caput fragments.

The protocol for inhibition of the uptake of iodinated ABP by unlabelled ABP consisted of two steps with proximal caput fragments: injection of unlabelled ABP for 5 min into the lumen, and a subsequent injection of labelled ABP in the fragments at 4°C for 5 min. The effect of EDTA was tested by washing the epididymal fragments with 20 mM Tris-HCl buffer containing 10% (v/v) glycerol, 10 μM EDTA and 0.125 M NaCl for 15 min before injection of 1 μl [¹²⁵I-iodo]ABP diluted in the same buffer. The effect of cycloheximide was tested by i.p. injection of 0.5 mg cycloheximide/kg 2 h before the microinjection of labelled ABP in the lumen of dissected epididymis tubules. The effect of chloroquine was tested by perfusing 0.2 mM of the drug in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) + 0.15 M NaCl into the lumen of epididymides 30 min before injection of the tracer.

Tissue processing for electron microscope autoradiography

Injected tubules were fixed for 2 h at 4°C with 2.5% (v/v) glutaraldehyde buffered with 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2), postfixed for 1 h with 2% osmium tetroxide in the same buffer, dehydrated

and embedded in epon. Three or four blocks were made in each experiment. These sections were processed for autoradiographic studies as described previously (Gérard *et al.* 1988). The autoradiographs were exposed for 2 or 3 months, and developed in Microdol-X (Kodak, Rochester, NY, U.S.A.) and examined in a Siemens 102 A transmission electron microscope.

Autoradiographic analysis

Localization of silver grains was performed using either direct analysis on the transmission electron microscope screen (analysis of the whole epithelium) or micrographs (distribution over cytoplasmic organelles by the resolution boundary method) (Salpeter, McHenry & Salpeter 1978); in the latter, silver grains were assigned to each organelle if they were over it, or within one half distance of it. The half distance used here was 90 nm for ^{125}I and 45 nm for ^3H . The scoring of the silver grains overlying the whole epithelium was made directly on the microscope screen at a magnification of 6000 (Gérard *et al.* 1988). The grain number was tabulated on consecutive fields of epithelium. The length of the epithelium was measured with the use of calibrated beads. For each experimental condition (time, interval or drugs), a length of 1000–3000 μm was analysed including three or four different blocks. The number of grains was expressed as the mean number of grains/100 μm length of epithelium in each block, and the deviation for each time was calculated from the sets of data collected. The grain counts were statistically compared using Student's *t*-test. The time-course of grain numbers was assessed by calculating the correlation coefficient between the grain number and the log time from 2–20 min. A one-way analysis of variance followed by Student's *t*-test was used for the statistical assessment of the differences between the time groups.

RESULTS

Binding of labelled ABP to soluble membrane extract

A portion of the iodinated ABP or of the photoaffinity-labelled ABP which was incubated with membrane protein extract, was eluted as an aggregate in Superose 6 gel filtration (Fig. 1*a*). The molecular mass of this aggregate was estimated at about 90 kDa. Incubation in the presence of 10 mM DTA or a 20-fold excess of non-labelled ABP inhibited the formation of the aggregate peak by 50% and 80% respectively. The formation of ABP-receptor complex was studied after incubation of the membrane protein extract with increasing amounts

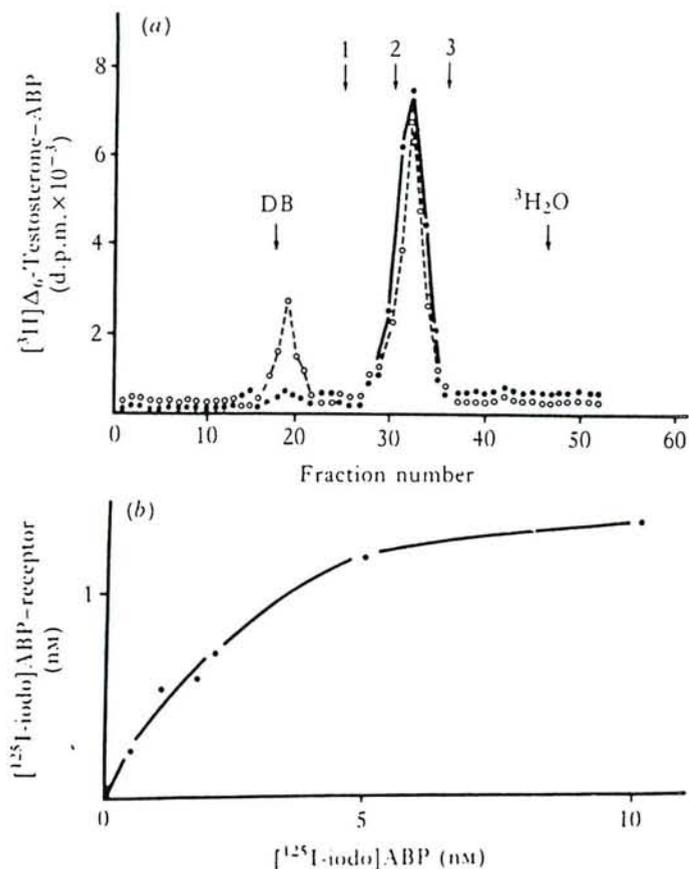


FIGURE 1. (*a*) Elution profile from Superose 6 gel filtration of [^3H] Δ_6 -testosterone- androgen-binding protein (ABP) incubated with the Triton X-100-solubilized receptor from the rat caput epididymis. The ABP-receptor complex was eluted with a retention time of 19 min, corresponding to a molecular mass of the order of 2×10^6 Da; the free labelled ABP was eluted with a retention time of 32 min (\circ). In the absence of receptor extract, the photoaffinity-labelled ABP was eluted in a single peak, with a retention time of 32 min (\bullet), corresponding to a molecular mass of 90 kDa. The same elution profiles were obtained with [^{125}I -iodo]ABP (data not shown). The elution positions of dextran blue 2000 (DB), thyroglobulin (1), IgG (2), intrinsic factor (3) and tritiated water ($^3\text{H}_2\text{O}$) are indicated by arrows. (*b*) Binding of [^{125}I -iodo]ABP to the Triton X-100 receptor extract (0.4 ml), prepared from caput epididymis, as a function of ABP concentration. The bound and free ABP were cleared by Superose 6 gel filtration.

of iodinated ABP. A typical hyperbolic curve was observed, showing a saturation of the binding capacity of the extract (Fig. 1*b*). The binding capacity of the ABP receptor was estimated as 7.9 pmol/mg protein in the extract from the caput. It was respectively ten- and fivefold higher in the caput and the corpus extract than in the extract of the cauda. The ABP-receptor fraction was separated into two peaks by sucrose density ultracentrifugation, corresponding to sedimentation coefficients of

18.4 and 9.0 s respectively (Fig. 2a). The binding of iodinated ABP was dependent upon pH and was maximal at a pH equal to or higher than 6; it was nearly abolished at pH 3.0 (Fig. 2b).

Binding of labelled ABP to isolated cells

The binding at 4°C of photoaffinity-labelled ABP to a cell suspension was studied by Scatchard analysis (Scatchard, 1949; Rosenthal, 1967). It corresponded to two types of binding sites with respective association coefficients of 67.9 and 2.8 litres/nM (Table 1 and Fig. 3). The number of low-affinity binding sites was about five times higher than the number of high-affinity binding sites. After treatment of the cells with trypsin (10 mg/1), the number of low-affinity binding sites was reduced from 7700 to 3700 and the high-affinity binding sites disappeared. Incubation of the cells with EDTA resulted in a 66% decrease in the number of binding sites (3200 sites/cell) (Table 1). No inhibition of the binding of labelled ABP to the cells was observed when the cells were preincubated with lactotransferrin, serotransferrin, bovine serum albumin, asialofetuin or fetuin. The binding of photoaffinity-labelled ABP to the cell suspension reached a maximum in less than 40 min at 4°C. The binding of the tracer to the cell suspension was reversible at 4°C. Complete dissociation of the tracer was observed in about 100 min, when a 100-fold excess of non-labelled ABP was added to the suspension of cells preincubated with labelled ABP (Fig. 4).

Autoradiography of dissected epididymis after *n-vitro* injection of labelled ABP

The label occurred only in principal cells of the epididymis. Autoradiographs showed the predominance of tracer over the apical cytoplasm of the principal cells 3–5 min after injection of iodinated ABP into the epididymis lumen. The number of grains per 100 µm length of epithelium was estimated at 20.12 ± 0.04 for the caput epididymis. It was 2.3 times lower in the epithelium of the cauda. The half-distance analysis showed a close relationship between the tracer and the membrane of endosomes and multivesicular bodies. The same results were obtained when the photoaffinity-labelled ABP was injected instead of iodinated ABP (Fig. 5). Treatment of the animals with cycloheximide for 2 h before injection of the labelled ABP significantly reduced the number of grains over the epithelium (Table 2). An inhibitory effect was observed when the tracer was injected in the presence of unlabelled ABP or in the presence of EDTA (Table 2).

Uptake saturation of the tracer by principal cells as observed by autoradiography when the number

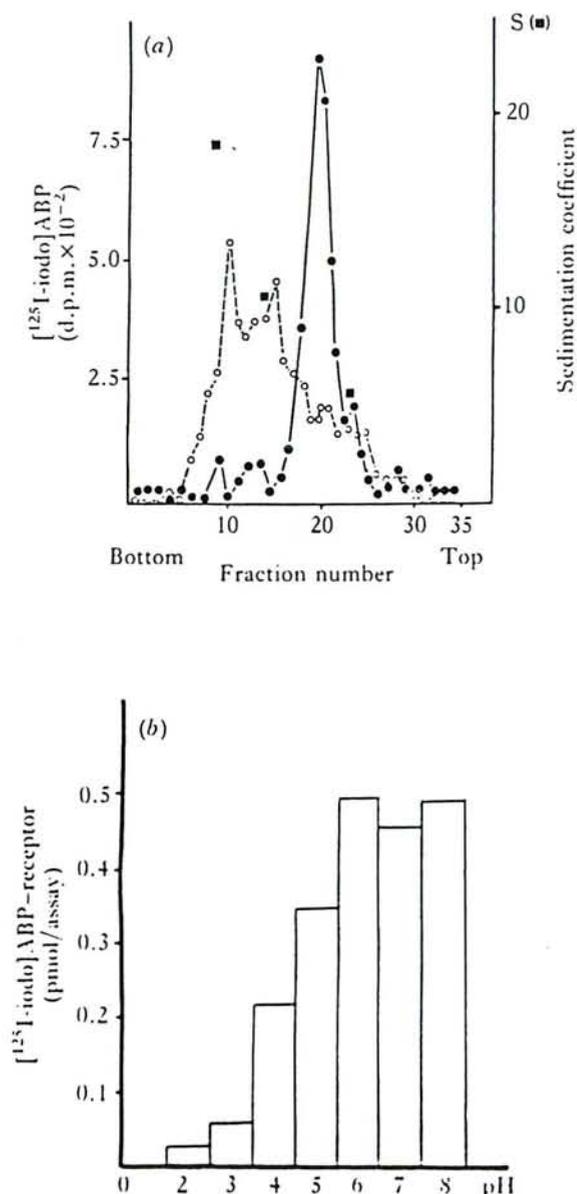


FIGURE 2. (a) Sucrose density gradient ultracentrifugation of the rat [¹²⁵I-iodo]androgen-binding protein (ABP) receptor peak collected from Superose 6 gel filtration. Ultracentrifugation was run either in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) (○) or in 0.02 M citrate-HCl buffer (pH 3.0) (●). Thyroglobulin, catalase and bovine serum albumin, of known sedimentation coefficients, were used as reference proteins (■). The sucrose gradient was 5–35% (w/v). Centrifugation was at 180 000 g for 16 h. At pH 8, the receptor-ABP complex was resolved in two peaks corresponding to sedimentation coefficients of 18.4 and 9.0 s. The receptor was dissociated from ABP at pH 3.0. (b) Binding of 2 pmol [¹²⁵I-iodo]ABP to Triton X-100 receptor extract (0.4 ml) as a function of pH. The receptor-ABP complex was separated from free ABP using sucrose density gradient ultracentrifugation as described above. Each determination is the mean of duplicate experiments.

TABLE 1. Effect of trypsin and EDTA on the association constant and number of binding sites for photoaffinity-labelled androgen-binding protein (ABP) of isolated rat epididymal cells

Treatment	n*	Correlation (r)	Association constant (litres/nmol)	Number of binding sites per cell
Soybean trypsin inhibitor	10		67.9†	1600†
Trypsin	5	0.98	2.8	7700
EDTA	5	0.99	3.4	3700

*The n values refer to the number of test-tubes used for the Scatchard plot. Binding was studied with 10⁶ cells per test-tube incubated with photoaffinity-labelled ABP ([³H]Δ₆-testosterone-ABP) for 1 h at 4°C.

†The binding sites and association constant of this non-linear Scatchard plot were calculated using the graphic analysis of Rosenthal (1967).

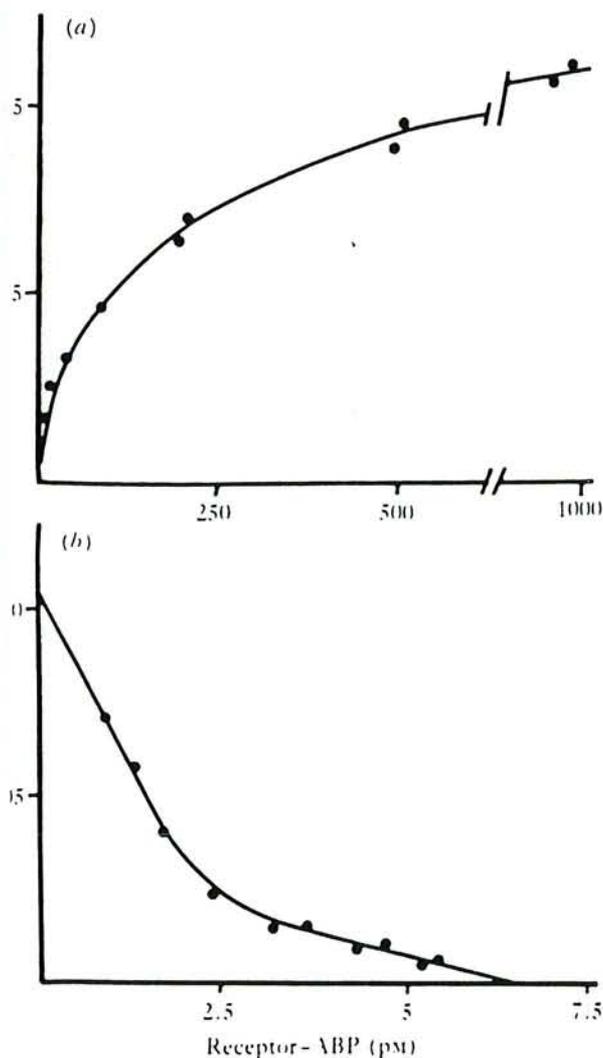


FIG. 3. (a) Binding of [³H]Δ₆-testosterone-androgen protein (ABP) to isolated rat epididymal cells as a function of ABP concentration. The cells (10⁶/tube) incubated with labelled ABP for 1 h at 4°C, centrifuged and washed before counting. Incubation was performed in 0.02 M Tris-HCl buffer containing 0.12 M NaCl, 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂. (b) Scatchard analysis of the experiment described above.

J. Endocrinology (1991)

of grains overlying the cells was studied in relation to incubation time. In the proximal epididymis, scoring of silver grains at each time-interval showed a rapid labelling within 2 min, a progressive increase up to 20 min and a stabilization for longer intervals (Fig. 4). The number of grains was positively correlated with the log time up to 20 min (coefficient of correlation=0.94). The variance analysis of the different scores demonstrated a significant difference between the experimental times 2, 7, 10 and 20 min but no significant difference for the longer incubation times. Silver grains were localized mainly over coated pits and coated vesicles and over uncoated endosomes of principal cells at 2 and 5 min (Fig. 6). After 10 min, additional grains were observed over pale multivesicular bodies. By this time, numerous grains were also found on the Golgi area, especially over the trans-reticular saccules (Fig. 6). Some grains were located on the nuclear membrane and on the periphery of the nucleus, but very few grains were observed in basal cytoplasm. The effect of chloroquine was studied by perfusing pieces of epididymis *in vitro* in the presence of the drug dissolved in sodium phosphate buffer. Compared with controls, chloroquine induced a 2.5-fold and a 4.5-fold increase in grains overlying endosomes and multivesicular bodies after 10 and 20 min of incubation respectively (Table 3).

DISCUSSION

The binding of labelled ABP to the soluble membrane extract was saturable and could be inhibited in the presence of non-labelled ABP. The solubilized receptor-labelled ABP formed a high molecular aggregate in gel filtration and was cleared in two oligomers in sucrose density ultracentrifugation, as observed for other Triton-solubilized receptors such as intrinsic factor receptor (Guéant *et al.* 1989).

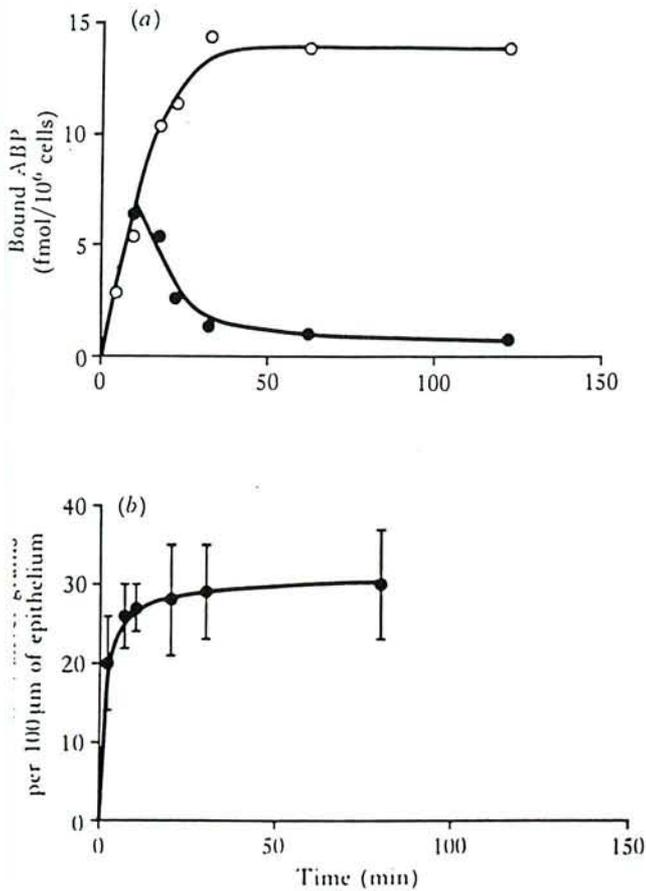


FIGURE 4. (a) Kinetics of binding of photoaffinity-labelled androgen-binding protein (ABP) to a suspension rat epididymal cells at 4°C (○). Maximum binding is observed after 40 min of incubation. In a second series, a 100-fold excess of non-labelled ABP was added after 10 min of incubation of the tracer with the cell suspension (●); complete dissociation of the tracer was observed in about 100 min. Each point is the mean from triplicate experiments. (b) Kinetics of the uptake of [¹²⁵I]-ABP-dihydrotestosterone complex by the head epithelial epithelium of rats after intraluminal microinjection of the tracer. Results are expressed as the mean number of silver grains ± s.d. (*n* = 15) per epithelial length (100 μm). About 1500 μm were analysed for each time-point. Differences were statistically compared using variance analysis followed by Student's *t*-test: from 2 to 20 min, values are significantly different. No significant difference was observed between the values obtained with incubation times exceeding 20 min.

gh- and low-affinity sites were found in the cell suspension. The binding sites had a proteic nature since they were abolished, in part, after treatment of the cells with trypsin. After trypsin treatment, only the low-affinity type of binding site remained (Table 1). This could mean that the two affinity types of binding sites correspond rather to two populations of the same receptor (newly synthesized and recycled receptor) than to two different receptors.

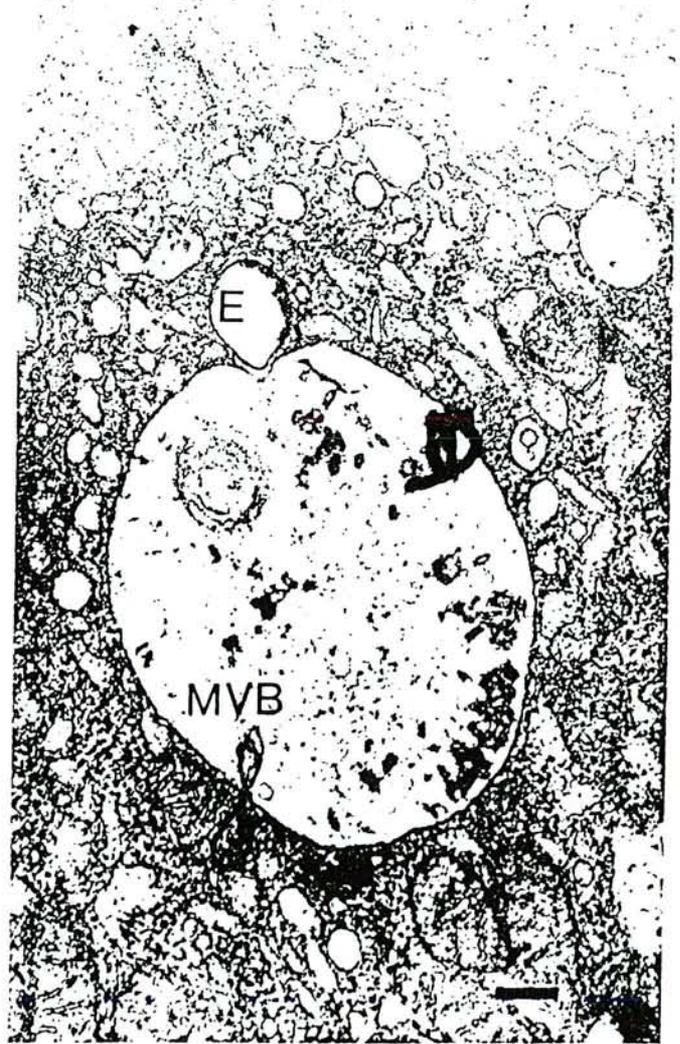


FIGURE 5. Autoradiographic source in a pale multivesicular body (MVB; defined as a large endosome of 925 ± 380 nm in diameter) located in the apical cytoplasm of a rat principal cell 15 min after the intraluminal injection of 1 nCi [³H] Δ_4 -testosterone-tritiated androgen-binding protein (ABP; 0.5 μl; 18 ng ABP). Silver grains were closely associated with the membrane of the organelle. The section was exposed for 3 months at 4°C. E, endosome; scale bar = 0.2 μm.

This phenomenon has also been observed for other receptors such as peptide receptors of epithelial cells (Broyart, Dupont, Laburthe & Rosselin, 1981; Laburthe, Bréant & Rouyer-Fessand, 1984). The autoradiographic analysis of epididymis injected with labelled ABP showed a decrease in the uptake of the tracer after treatment with cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis. These findings, and the observation that treatment of the membrane extract with proteases abolished the binding capacity for labelled ABP (Guéant *et al.*, 1988), proved that the ABP receptor was a proteic receptor. The autoradiography analysis showed that the binding

TABLE 2. Autoradiography of the in-vitro uptake of [¹²⁵I-iodo]androgen-binding protein (ABP)-dihydrotestosterone complex by the head epididymal epithelium of rats under various experimental conditions

	Number of grains per 100 µm length of epithelium				
	4°C	20°C			
		Control	Non-labelled ABP	EDTA	Cycloheximide
Mean ± s.d.	4.0 ± 1.8	23.2 ± 8.2**	3.2 ± 1.4††	12.9 ± 6.2††	17.4 ± 8.6†
Number of experiments	25	36	27	29	46

* P < 0.0001 compared with value at 4°C (Student's *t*-test).

† P < 0.003, †† P < 0.0001 compared with the control value at 20°C (Student's *t*-test).

Incubation time was 5 min for each experiment. Each determination corresponds to 3800 µm of analysed epithelium.

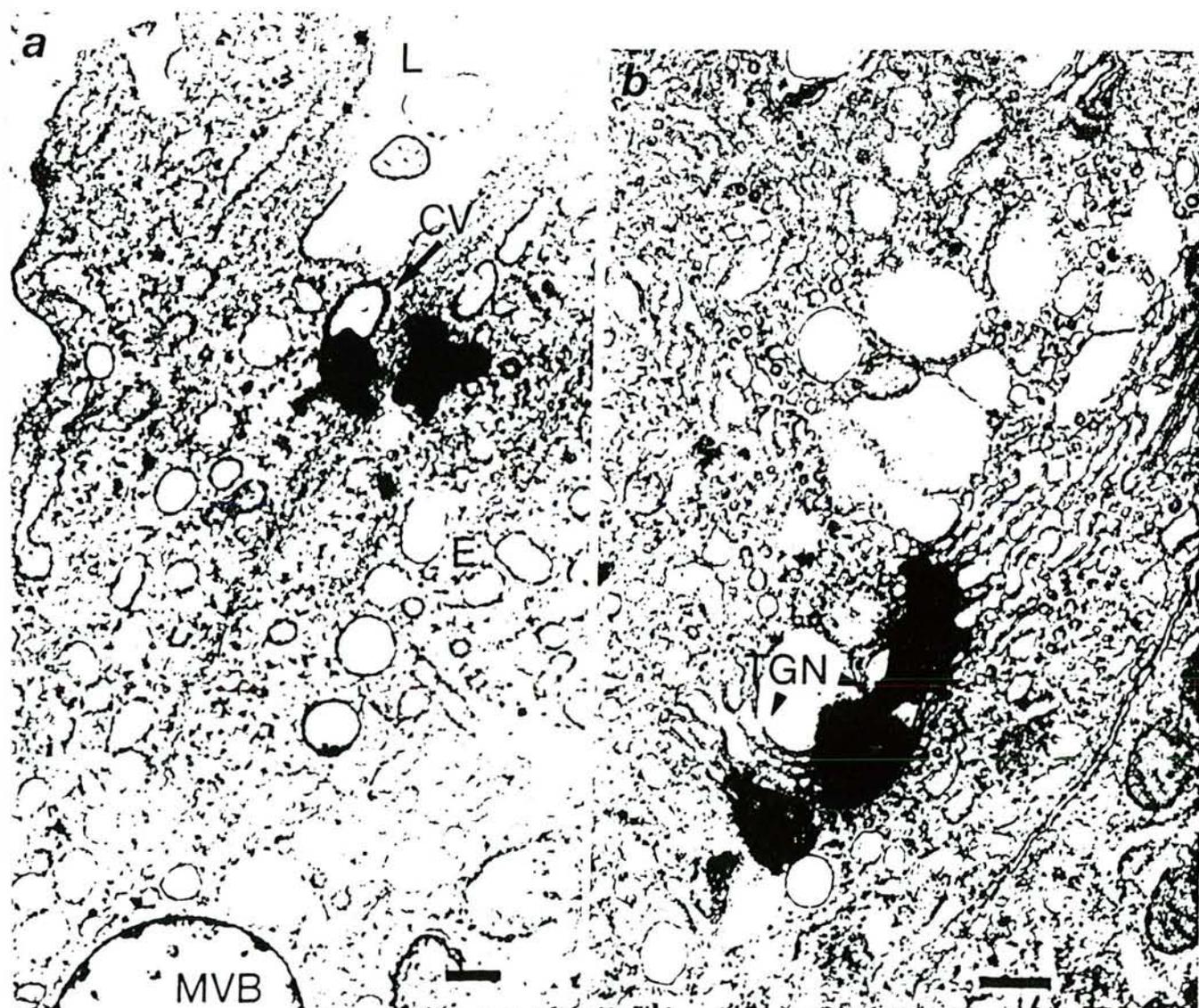


FIGURE 6. (a) Internalization of 4 nCi [¹²⁵I-iodo]androgen-binding protein (ABP; 0.5 µl; 20 ng ABP) 2 min after intraluminally in the rat epididymis. Silver grains were frequently associated with coated vesicles (CV; 20 nm) located in the very apical cytoplasm of principal cells. Sections were exposed for 2 months at 4°C. L, epididymal lumen; E, endosome; MVB, multivesicular body; scale bar = 0.2 µm. (b) Accumulation of silver grains in Golgi area of a principal cell 20 min after the intraluminally injection of 4 nCi [¹²⁵I-iodo] ABP (0.5 µl; 20 ng ABP). Grains were found over the lateral saccules in the trans Golgi network (TGN). Sections were exposed for 2 months at 4°C. Scale bar = 3 µm.

TABLE 3. Effect of chloroquine on the localization of labelled androgen-binding protein (ABP) over multivesicular bodies of rat epididymal cells. Values are means \pm s.d. estimated from four determinations, corresponding to 1500 grains counted; only the grains within 1 half distance of the organelle were counted

	Number of grains per MVB	
	Control	Chloroquine
Incubation time with labelled ABP (min)		
30	2.20 \pm 0.72	5.60 \pm 1.36
60	1.52 \pm 0.67	6.80 \pm 1.40

Chloroquine (0.2 mM in 0.1 M sodium phosphate buffer/0.15 M NaCl) was perfused into the lumen of epididymal tubes 30 min before injection [125 I-iodo]ABP-dihydrotestosterone complex (20 ng ABP; 4 nCi). The control experiment was performed in the same way but in the absence of chloroquine.

te was located on the apical plasma membrane of principal cells. In the presence of EDTA, the binding of labelled ABP to the receptor was significantly reduced. This was observed with the soluble membrane extract, as well as with the cell suspension and also with the autoradiographic study of the epithelium.

The data obtained with the soluble membrane extracts and with the autoradiographic study of the caput and cauda of epididymis showed, in both sexes, a significantly higher concentration of receptor sites in the caput than in the cauda. This could explain the decreasing concentration of ABP observed in cytosol extracts of rat epididymis from the caput to the cauda (Hansson *et al.* 1975).

The receptor could bind to the saturated ABP (i.e. saturable binding of ABP- Δ_6 -testosterone photoaffinity-labelled ABP) was observed when it is studied with a soluble membrane extract, a cell suspension or by autoradiography (Table 1 and Figs 1, 3, 4 and 5). This means that androgens can be internalized by epididymal cells via a receptor-mediated endocytosis of ABP. Such a receptor-binding phenomenon has also recently been observed in other steroid carrier proteins such as cortisol-binding globulin and sex steroid-binding protein (Siiteri, Murai, Hammond *et al.* 1982; Strel'chyonok & Avvakunov, 1983; Hryb, Khan & Rosner, 1985). Target tissues such as decidual dometrium, liver and prostatic cells have been more particularly studied (Strel'chyonok & Avvakunov, 1983; Strel'chyonok, Avvakunov & Survilo, 1984; Hryb, Khan, Komar & Rosner, 1986; Hsu, Siiteri & Kuhn, 1986; Hryb, Khan, Rosner & Rosner, 1989). It remains to determine whether the receptor of rat epididymis is specific for the steroid

carrier protein only, or whether it binds to several proteins. Djakiew, Byers & Dysu (1984) have observed that endocytosis to α_2 -macroglobulin and endocytosis of transferrin are also mediated by a receptor in rat caput epididymal cells. In our study, the uptake of ABP by epididymal cells was not inhibited by an excess of transferrin. This suggests that the receptor for ABP and that for transferrin are different.

The fate of ABP in the apical compartment of epididymis also supports a receptor-mediated endocytosis, since the tracer was found over the membrane of endosomes and multivesicular bodies. The binding of ABP to the solubilized receptor was pH dependent, suggesting that ABP could dissociate from the receptor in the acidic compartment of principal cells. Chloroquine is known to alter the proton pump system and to increase the pH of endosomes and lysosomes (de Duve, Debarsky & Poole, 1974). This could explain the significant increase in the number of grains over the membrane of endosomes and multivesicular bodies after incubation of epididymis fragments in the presence of chloroquine (Table 3). In addition, analysis of the autoradiography data showed that ABP accumulated in the multivesicular bodies as a function of the delay time (Table 3).

In conclusion, the present study has demonstrated that endocytosis of ABP in epididymal cells is receptor mediated. It is a new example illustrating the hypothesis that internalization of steroid hormones in target cells can involve a receptor-mediated endocytosis of the steroid-carrier protein complex.

REFERENCES

- Broyart, J. P., Dupont, C., Laburthe, M. & Rosseim, G. (1981). Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in human colonic epithelial cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **52**, 715-721.
- de Duve, C., Debarsky, T. & Poole, B. (1974). Lysosomotropic agents. *Biochemical Pharmacology* **23**, 2495-2498.
- Djakiew, D., Byers, S. W. & Dysu, M. (1984). Receptor-mediated endocytosis of alpha₂-macroglobulin and transferrin in rat caput epididymal cells *in vitro*. *Biology of Reproduction* **31**, 1073-1085.
- Feldman, M., Lea, O. A., Petrusz, P., Tres, L. L., Kierzenbaum, A. L. & French, F. S. (1981). Androgen-binding protein. Purification from rat epididymis, characterization and immunocytochemical localization. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 5170-5175.
- Fremont, S., Guéant, J. L., Felden, F., Eglhoff, M., Gérard, A. & Nicolas, J. P. (1990). Dihydrotestosterone binding capacity of androgen binding protein (ABP) in testicular extract using high performance exclusion size chromatography. *Journal of Chromatography* **526**, 186-193.
- French, F. S. & Ritzen, E. M. (1973). A high-affinity androgen binding protein (ABP) in rat testis: evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis. *Endocrinology* **93**, 88-95.

- Gérard, A., Egloff, M., Gérard, H., El Harati, A., Domingo, M., Guéant, J. L., Dang, C. D. & Degrelle, H. (1990). Internalization of human sex steroid-binding protein in the monkey epididymis. *Journal of Molecular Endocrinology* **5**, 239-251.
- Gérard, A., Khanfri, J., Guéant, J. L., Frémont, S., Nicolas, J. P., Grignon, G. & Gérard, H. (1988). Electron microscope radioautographic evidence of *in vivo* androgen-binding protein internalization in the rat epididymis principal cells. *Endocrinology* **122**, 1297-1307.
- Guéant, J. L., Frémont, S., Khanfri, J., Gérard, A., Grignon, G., Nicolas, J. P. & Gérard, H. (1988). Biochemical evidences for a receptor mediated uptake of rat androgen binding protein by epididymis. *Steroids* **52**, 347-349.
- Guéant, J. L., Jokinen, O., Schohn, H., Monin, B., Nicolas, J. P. & Gräsbeck, R. (1989). Purification of intrinsic factor receptor from pig ileum, using as affinity medium human intrinsic factor covalently bound to Sepharose. *Biochimica et Biophysica Acta* **992**, 281-288.
- Guéant, J. L., Khanfri, J., Gérard, H., Frémont, S., Gérard, A., Grignon, G. & Nicolas, J. P. (1986). Purification of androgen binding protein from rat testis using high-performance liquid chromatography and physicochemical properties of the iodinated molecule. *FEBS Letters* **207**, 280-286.
- Hansson, V., Ritzen, E. M., French, F. S. & Nayfeh, S. N. (1975). Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis. In *Handbook of Physiology*, sect 7, vol. 5, p. 73. Eds D. W. Hamilton & R. O. Greep. Washington DC: American Physiological Society.
- Hyb, D. J., Khan, M. S., Komar, N. A. & Rosner, W. (1986). Specific binding of human corticosteroid-binding globulin to cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **83**, 3253-3256.
- Hyb, D. J., Khan, M. S., Ronas, N. A. & Rosner, W. (1989). Solubilization and partial characterization of the sex hormone-binding globulin receptor from human prostate. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 5378-5383.
- Hyb, D. J., Khan, M. S. & Rosner, W. (1985). Testosterone-estradiol-binding sites for transcortin in human liver plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **128**, 432-440.
- Li, B. R., Siiteri, P. K. & Kuhn, R. W. (1986). Interactions between corticosteroid-binding globulin (CBG) and target tissues. In *Binding Proteins of Steroid Hormones*, vol. 149. Eds M. G. Forest & M. Pugeat. London/Paris: John Libbey-INSERM.
- Laburthe, M., Bréant, B. & Rouyer-Fessand, C. (1984). Molecular identification of receptor for vasoactive intestinal peptide in rat intestinal epithelium by covalent cross-linking. Evidence for two classes of binding sites with different structural and functional properties. *European Journal of Biochemistry* **139**, 181-187.
- Pelliniemi, L. J., Dym, M., Gunsalus, G. L., Musto, N. A., Bardin, C. W. & Fawcett, D. W. (1981). Immunocytochemical localization of androgen binding protein in the male rat reproductive tract. *Endocrinology* **108**, 925-931.
- Reid, B. L. & Cleland, K. W. (1957). The structure and function of the epididymis: I. The histology of the epididymis. *Australian Journal of Zoology* **5**, 223-246.
- Rosenthal, H. E. (1967). A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Analytical Biochemistry* **20**, 525-532.
- Salpeter, M. M., McHenry, F. A. & Salpeter, E. E. (1978). Resolution in electron microscope autoradiography. IV. Application to analysis of autoradiographs. *Journal of Cell Biology* **76**, 127-145.
- Scatchard, G. (1949). The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **51**, 660-672.
- Siiteri, P. K., Murai, J. T., Hammond, G. L., Nisker, J. A., Raymoure, W. J. & Kuhn, R. W. (1982). The serum transport of steroid hormones. *Recent Progress in Hormone Research* **38**, 457-511.
- Strel'chyonok, O. A. & Avvakunov, G. V. (1983). Evidence for the presence of specific binding sites for transcortin in human liver plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **755**, 514-517.
- Strel'chyonok, O. A., Avvakunov, G. V. & Survilo, I. L. (1984). A recognition system for sex hormone binding protein oestradiol complex in human decidual endometrium plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **802**, 459-468.
- Taylor, C. A., Smith, H. E. & Danzo, B. J. (1980). Characterization of ABP in rat epididymal cytosol using a photoaffinity ligand. *Journal of Biological Chemistry* **225**, 7769-7773.

III. RECONNAISSANCE CROISEE DU RECEPTEUR AUX PROTEINES DE LIAISON DES ANDROGENES (ABP, SBP) A DEUX STADES DE DEVELOPPEMENT DU RAT (PUBLICATION III).

3.1. But de l'étude

Les résultats précédents ont montré l'internalisation récepteur-médiée de l'ABP dans les cellules principales de l'épididyme de rat immature (15 jours).

Dans ce travail nous avons, dans un premier temps, évalué l'influence de différents facteurs physico-chimiques sur la liaison de l'ABP à son site de liaison épидидymaire. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'activité réceptrice chez l'animal adulte (60 jours) en la comparant à celle du rat immature (15 jours). Enfin, la très forte homologie structurale et l'origine génomique commune entre l'ABP de rat et la SBP humaine nous a conduit à étudier la reconnaissance croisée de ces deux protéines liant les androgènes par le récepteur épидидymaire.

3.2. Résultats

La cinétique d'association de l'ABP sur les membranes épидидymaires a été étudiée à partir de fractions enrichies en membrane plasmique. Elle montre un maximum de liaison en trente minutes, à 4°C, chez le rat immature (figure n°1). L'effet de la température sur la liaison membranaire de la protéine a montré une plus grande rapidité de fixation à 4°C par rapport à 34°C (figure n°2). Toutes les études ultérieures seront donc effectuées pendant une heure, à 4°C. La figure 1 confirme la réversibilité de la liaison et son déplacement par un excès d'ABP non marquée. La liaison est maximale à un pH compris entre 6 et 8 et elle décroît très fortement en dessous de pH 5 (figure n°3). L'analyse par la représentation de Scatchard (figure n°4A) nous confirme l'existence de deux sites de liaison membranaire, chez le rat immature, pour l'ABP avec des K_a de $18,2 \text{ nM}^{-1}$ et $1,6 \text{ nM}^{-1}$, respectivement (soit $2,2 \cdot 10^{11}$ sites/mg de protéine et $5,4 \cdot 10^{11}$ sites/mg de protéine). L'évaluation de la liaison non spécifique, au cours de cette étude, est de 15%. L'action de l'EDTA dans le milieu réactionnel, ou de la trypsine, réduit la liaison membranaire spécifique de 65% et 42%, respectivement (figure n°5A). La liaison protéique sur les cellules épидидymaires entières est réduite, par l'action de la streptozotocine, de 39% (figure n°5B). La figure n°22 nous montre la faible activité réceptrice retrouvée dans la partie caudale épидидymaire par rapport à l'extrémité proximale, grâce à une représentation de Scatchard sur des préparations enrichies en membrane plasmique des deux segments épидидymaires.

L'étude, en fonction de deux stades de développement chez le rat, indique que la liaison protéique membranaire est presque deux fois plus faible chez l'animal de 40 jours que chez celui âgé de 15 jours (figure n°4B). Il n'existe plus qu'un seul type de site de liaison chez le rat adulte ($K_a = 3,7 \text{ nM}^{-1}$ et $4,5 \cdot 10^{11}$ sites/mg de protéine).

La SBP humaine, purifiée selon le protocole décrit précédemment pour l'ABP (publication I) à partir de sérums de femmes gestantes, a été étudiée sur les mêmes préparations membranaires d'épididymes de rat immature (15 jours).

Ces études nous montrent que la SBP est capable de se lier de façon spécifique sur le récepteur membranaire (figure n°4C) avec une constante d'association de $2,6 \text{ nM}^{-1}$ (soit $3,8 \cdot 10^{11}$ sites/mg de protéine).

Elle est, de plus, capable de déplacer la liaison épидидymaire de l'ABP si elle est ajoutée en excès dans le milieu réactionnel (figure n°6). Le déplacement est spécifique puisque les autres protéines étudiées (lactotransferrine, serotransferrine ...) ne le permettent pas (figure n°6).

Enfin, dans une dernière partie nous avons étudié la liaison de l'ABP et de la SBP sur un extrait membranaire solubilisé par du triton X-100 et injecté sur une mini-colonne de gel-filtration. Les résultats obtenus au niveau du volume mort de la colonne (bleu dextran) nous confirment par cette technique:

- l'existence d'un site récepteur,
- la spécificité de la liaison,
- l'importance de la présence de calcium et d'un pH compris entre 6 et 8 dans le milieu réactionnel,
- enfin, la reconnaissance croisée des deux protéines par le site récepteur épидидymaire.

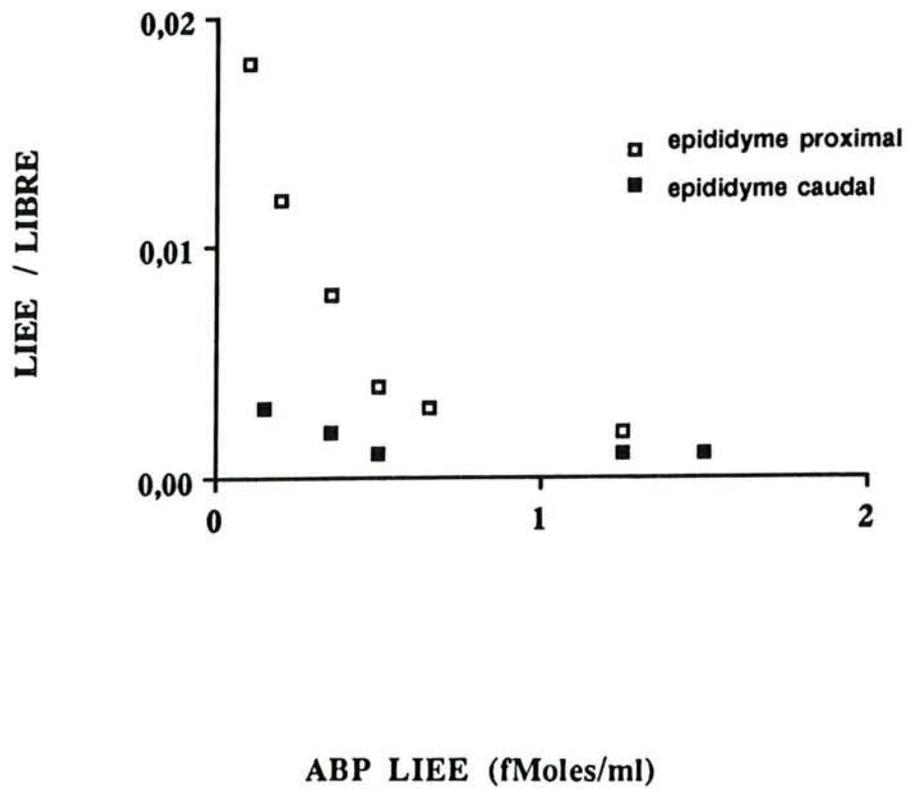


Figure n° 22 : Représentation de Scatchard (1949) sur la liaison de l'ABP en présence de fractions enrichies en membranes d'épididyme de rat (15 j.) de la tête (proximale) et de la queue (caudale).

3.3. Discussion

Les résultats obtenus confirment la présence d'un site de liaison spécifique de l'ABP au niveau de fractions membranaires d'épididymes de rat. La caractérisation de la liaison est proche de celle trouvée avec les cellules entières (publication II) et les différences observées sur les paramètres de liaison sont essentiellement dues à la méthode de préparation du matériel biologique. La plus grande rapidité de liaison, à 4°C, est en contradiction avec les résultats présentés par Rosner (1990) sur les membranes de prostate humaine avec la SBP, mais sont retrouvés pour la vitamine D₃ vis-à-vis de son récepteur testiculaire (Habib et Coll., 1990).

Cette étude montre, pour la première fois, que le récepteur épидидymaire de l'ABP est exprimé différemment chez les rats de 15 jours et de 40 jours respectivement. Danzo et Coll. (1985), ont trouvé une concentration épидидymaire en protéine supérieure à 40 jours par rapport au rat immature. La diminution de l'activité réceptrice, retrouvée à 40 jours, peut s'expliquer par une plus grande saturation du site de liaison due à la plus grande concentration d'ABP retrouvée à cet âge. Ce résultat pourrait associer l'expression du récepteur à une "down-régulation". La présence d'un seul type de site de liaison à l'âge de 40 jours est en faveur d'une telle hypothèse. Il est également possible que les deux types de sites retrouvés à 15 jours n'aient pas la même fonction biologique?

La reconnaissance croisée du site de liaison membranaire par l'ABP de rat et la SBP humaine confirme l'hypothèse du rôle joué par l'homologie structurale inter-espèce retrouvée pour les deux protéines.

En conclusion, quelle que soit la méthode utilisée, il existe un site de liaison spécifique pour l'ABP de rat, reconnaissant également la SBP humaine au niveau de la membrane plasmique de la cellule principale épидидymaire. Son activité de liaison est plus élevée à 15 jours qu'à 40 jours chez le rat.

THE PLASMA MEMBRANE OF EPIDIDYMAL EPITHELIAL CELLS HAS A SPECIFIC RECEPTOR WHICH BINDS TO ANDROGEN-BINDING PROTEIN AND SEX STEROID-BINDING PROTEIN

F. FELDEN,¹ B. LEHEUP,² S. FREMONT,¹ R. BOUGUERNE,¹ M. EGLOFF,³ J. P. NICOLAS,¹ G. GRIGNON²
and J. L. GUEANT^{1*}

¹Laboratoire de Biochimie Nutritionnelle et INSERM U 308, Faculté de Médecine and ²Laboratoire d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique et Microscopie Electronique, Faculté de Médecine, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre Les Nancy Cédex and ³Laboratoire de Biochimie Endocrinienne, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cédex 06, France

(Received 12 July 1991)

Summary—The binding of [³H]Δ₄-testosterone photoaffinity-labelled rat androgen-binding protein (rABP) has been studied in an enriched fraction of plasma membranes of epithelial epididymal cells in immature (15 days) and adult rats (40 days). The binding was maximal in < 30 min and more rapid at 4°C than at 34°C. It was calcium and pH dependent. Scatchard plots of the binding data gave curvilinear plots with two types of binding sites corresponding to a $K_{\text{aff}1}$ of 18.2 nM⁻¹ and $K_{\text{aff}2}$ of 1.6 nM⁻¹ (2.2×10^{11} sites/mg protein and 5.4×10^{11} sites/mg protein, respectively). In adult rats, only one type of binding site was found, with a K_{aff} of 3.7 nM⁻¹ (4.5×10^{11} sites/mg protein). The number of receptors was 5-fold lower in the cauda than in the caput of the epididymis. The pretreatment of the isolated intact cells with streptozotocin induced a 45% reduction of the binding. Only unlabelled rABP and hSBP (human sex steroid-binding protein) but not other proteins (lactotransferrin, serotransferrin, asialofetuin, fetuin and bovine serum albumin) competed with the labelled ligand to bind plasma membranes. The membrane fraction was solubilized by triton X-100. Its incubation with labelled rABP and hSBP provoked the elution of the tracer as an aggregate into the void volume fraction of superose 6B mini-gel filtration columns. Structural homology between hSBP and rABP could be responsible for the common behaviour of the steroid-carrier molecules for the ABP receptor of rat epididymal epithelial cells.

INTRODUCTION

Rat androgen-binding protein (rABP) is synthesized in the testis by Sertoli cells. A transient synthesis has also been demonstrated in fetal liver [1]. ABP production by the testis proceeded from undetectable levels in 10-day-old rats to reach 80–90 μg/testis in 30-day-old rats [2]. The extracellular ABP may play a role in the intraluminal transport of androgens in the male reproductive tract and in the sexual differentiation [3]. A single gene encodes ABP and SBP (sex steroid-binding protein) and the coding region of the gene has been cloned and characterized [4–6]. Recent evidence suggests that rABP and human SBP (hSBP) interact with target cells via membrane receptors [7, 8]. For example, ABP binding to a receptor has been demonstrated in rat epididymal epithelial cells [9]. The receptor-mediated endocytosis of labelled

rat ABP and labelled human SBP has been observed by autoradiography respectively in epididymal epithelial cells of the rat [10] and monkey [11].

In a first study, we have demonstrated *in vitro* that internalization of ABP is receptor-mediated in isolated epithelial cells of rat epididymis [9]. The present work confirms this hypothesis by studying the binding of labelled rABP and hSBP to an enriched fraction of plasma membranes from epithelial epididymal cells of immature and adult rats.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

Mannitol, phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF) and soya-bean trypsin inhibitor (SBTI) were all purchased from Sigma (St Louis, MO, U.S.A.). Collagenase dispase, DNase (Type I) were supplied by Boehringer Mannheim

*To whom correspondence should be addressed.

(Indianapolis, IN, U.S.A.). All other reagents were obtained as described previously [9, 12].

Purification and photoaffinity labelling of rABP

The testes were removed from 200–250 g adult Wistar rats; rABP was purified by HPLC as described in detail previously [12, 13]. The photoaffinity-labelled rABP was prepared as described previously [12] according to Taylor *et al.* [14]. Testicular extract (10 ml) was incubated with 1 nmol Δ_6 [^3H]testosterone ([1.2- ^3H]17 β -hydroxy-4,6-androstadien-3-one: 48.6 Ci/mmol, New England Nuclear Corp., Boston, MA, U.S.A.) overnight at 4°C, under rotary agitation. The sample was photolysed in a reactor using a u.v. light (345 nm), for four 15 min periods under controlled temperature and was injected in preparative HPLC (column Diol Lichroprep 200, 25 \times 2.5 cm) to separate the covalently bound Δ_6 [^3H]testosterone from the remaining free. The peak of photoaffinity-labelled rABP was eluted with a retention time of 7 min and was stored in aliquots at -80°C . Each aliquot was filtered by fast protein liquid chromatography superose 6 gel filtration (Pharmacia, Uppsala, Sweden) prior to use. The peak of dimeric photoaffinity-labelled ABP was eluted with a retention time of 32 min corresponding to a M_r of 90 kDa. It was collected and stored at -80°C , in aliquots, before use.

Purification and photoaffinity labelling of hSBP

The hSBP has been purified from human late-pregnancy serum using a modification of the method described previously [15]. Four steps were performed, including ammonium sulphate precipitation, carboxymethyl cellulose chromatography, DEAE-cellulose chromatography and gel filtration. Purity of hSBP was checked by polyacrylamide gel electrophoresis. Quantitative estimation of hSBP was performed by electroimmunodiffusion using a polyclonal rabbit anti-hSBP serum [11]. The photoaffinity labelling of hSBP was performed as described above for rABP [11].

Iodination of hSBP and of rABP was prepared as described previously for rABP [13] according to Marckwell [16]. Two iodobeads were washed in Tris-HCl buffer (20 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, pH 7.4), and incubated for 5 min with 0.1 mCi ^{125}I in 0.2 ml Tris-HCl buffer. Then, 20 μg of purified protein was added. After 15 min, the iodinated molecule was poured onto a Sephadex G-25 column

(2.5 \times 10 cm, Pharmacia) and eluted in the presence of dextran blue 2000.

Isolation of epididymal epithelial cells and preparation of membrane fractions

Epididymal cells were isolated from testes of 2- and 6-week-old Wistar rats as described in detail previously [9], using collagenase dispase (500 mg/l) and DNase (type I) for cellular dissociation.

The plasma membrane-enriched preparations were obtained from isolated epididymal epithelial cells. About 10×10^6 cells/ml were disrupted in ice-cold buffer (20 mM Tris-HCl/l, pH 7.4 containing 0.4 mM PMSF, 0.1% aprotinin, 0.01% bacitracin, 1 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2), with a mixer (ultraturax IKA[®]), three times for 5 min at 4°C. The homogenate was centrifuged for 10 min at 1000 g and the pellet was discarded. The supernatant was further centrifuged for 30 min at 27,000 g for 30 min at 4°C. The pellet was resuspended in the Tris-HCl buffer described above in the presence of 300 mM mannitol and centrifuged for a second period in the same conditions. The pellet was homogenized in the Tris-HCl buffer described above and was stored at -80°C , in aliquots before use. Protein concentration was measured according to the method of Lowry [17] using bovine serum albumin as standard. Compared to the initial homogenized tissue, the specific activity of 5' nucleotidase (a standard marker for plasma membranes) vs protein concentration was increased 5 times in the plasma membrane fraction. The enriched fractions were also controlled by electron microscopy.

Binding of labelled rABP and of labelled hSBP to the membrane fractions

General protocol. Photoaffinity-labelled rABP and hSBP binding to membrane fractions was studied by incubating increasing amounts (0.05 to 2.5 pmol) of labelled rABP or hSBP with membrane fraction aliquots corresponding to 10^6 cells per test tube, in duplicate and in the presence or absence of a 100-fold excess of unlabelled rABP. After 1 h incubation at 4°C while shaking, separation of bound from free ligand was achieved by centrifugation at 20,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet washed 3 times in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.15 M NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0.01% bacitracin and 1 nM benzamidine/l. The radioactivity of the supernatant and of the pellet

was measured by addition of 3 ml of scintillation liquid (Scintran®) to 50 μ l aliquots. The data were analysed using Scatchard plots of the specific binding (difference between total binding and non-specific binding).

Kinetics of association-dissociation

The time-course of the uptake of labelled rABP by plasma enriched membrane preparations was studied by incubating 2.5 mg protein material (aliquots corresponding to 10×10^6 cells) with 100 fmol of photoaffinity-labelled rABP, in triplicate, in a final volume of 10 ml. 1 ml aliquots of the suspension were collected after shaking at incubation times ranging from 2 to 120 min, at 4 and at 34°C. The bound ABP was separated from free form by centrifugation and washing of the pellet as described above. A second experiment was performed in the same way except that a 100-fold excess of unlabelled rABP was added 15 min after incubating the membrane fractions with the tracer at 4°C, in order to study the dissociation of labelled rABP.

Inhibition of rABP binding to plasma membrane fractions

The binding of rABP to plasma cell membranes was studied in the presence of either 15 mM EDTA or of trypsin (10 mg/ml). Specificity of the binding was studied by incubating the membrane fraction for 1 h at 4°C with 0.1 nmol of human lactotransferrin, serotransferrin, asialofetuin, fetuin and bovine serum albumin prior to the addition of 1 pmol of labelled rABP. The binding was also studied as a function of pH. The membrane fraction aliquots were incubated with labelled rABP for 2 h in the presence of various buffer solutions (0.02 M Tris-HCl buffer pH 8.0; 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7; 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6; 0.05 M sodium acetate buffer pH 5; 0.05 M acetate buffer pH 4; 0.02 M citrate-HCl buffer pH 3; 0.02 M citrate-HCl buffer pH 2). The pH of the incubation mixture was adjusted to the pH of the corresponding buffer.

Effect of streptozotocin

Intact epididymal epithelial cells (from 15-day-old rats) were exposed for 2 h at 4°C with 10 μ g/ml of streptozotocin (Sigma). rABP labelled binding was then performed at different concentrations (0.5 to 1.4 pmol).

Gel filtration of Triton X-100 solubilized rABP and hSBP receptor

Membrane fractions of epididymal epithelial cells were extracted with 20 ml Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1% Triton X-100, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ and 0.4 mM PMSF and 0.1% aprotinin. 0.5 ml of membrane fractions was incubated 1 h with 1.5 pmol of labelled rABP or hSBP. The same protocol was repeated at pH 5 instead of pH 7.5 and also in the presence of 15 mM EDTA instead of CaCl₂. The samples were poured onto a superose 6B mini-gel filtration column 0.46 \times 20 cm (Merck, Germany). The eluate was collected in 0.2 ml fractions using a Frac-100 fraction collector (Pharmacia). The non-specific binding was studied by preincubating the membrane extract with a 100-fold excess of unlabelled rABP.

RESULTS

The kinetics of specific binding reached a maximum after 20–30 min of incubation of labelled rABP with the plasma membrane-enriched fraction of epididymal epithelial cells from 2-week-old rats, at 4°C (Fig. 1). Bound labelled rABP was displaced by an excess of radioinert rABP, demonstrating that the uptake was reversible (Fig. 1). The kinetics of the binding of labelled rABP was more rapid at 4 than at 34°C (Fig. 2). All subsequent incubations were therefore performed at 4°C for 1 h.

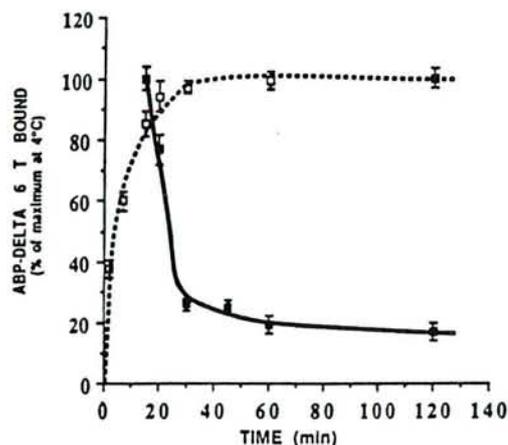


Fig. 1. Time course of association (□) and dissociation (■) of labelled rABP to membrane fractions of epididymal epithelial cells (15 days) at 4°C. Maximum binding was observed after 30 min of incubation. The dissociation was studied by adding a 100-fold excess of non-labelled rABP after 15 min incubation of the tracer with the membrane fractions. The results are expressed as the percentage of maximum binding of labelled rABP (mean \pm SD of triplicate incubation).

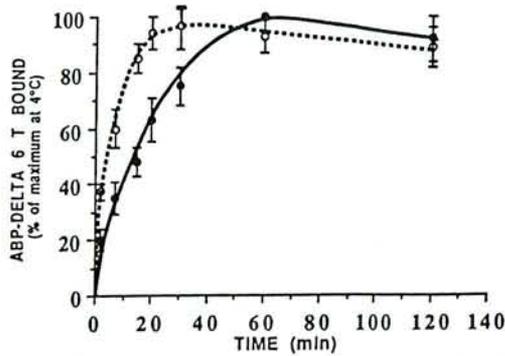


Fig. 2. Effect of time and temperature on specific binding. Membrane fractions of epididymal epithelial cells from 15-day-old rats were incubated with 100 fmol of labelled rABP, in triplicate, at 4°C (○) and 34°C (●). The kinetics of the binding was lower at 34 than at 4°C. The specific binding was determined as described in Experimental (each value represents the mean \pm SD of different experiments).

The binding of labelled rABP was pH-dependent and was maximal of pH 6–8 with a sharp decline at a more acidic pH (Fig. 3).

Scatchard analysis [18] of the binding to membrane fractions was performed with rABP and hSBP at 15 and 40 days old. We found curvilinear plots for immature rats, indicating a double class of binding sites, with $K_{d1} = 18.2 \text{ nM}^{-1}$ and $K_{d2} = 1.6 \text{ nM}^{-1}$ and a number of binding sites of 2.2×10^{11} and 5.4×10^{11} sites/mg protein, respectively [Fig. 4(A)]. With ageing, labelled rABP binding sites in 40-day-old rats showed a single class of binding sites with a K_{d} of 3.7 nM^{-1} and 4.5×10^{11} sites/mg protein [Fig. 4(B)]. The level of non-specific binding ranged between 10 and 20%. Under the same experimental conditions, the binding of hSBP was plotted with a K_{d} of 2.6 nM^{-1} and 3.8×10^{11} sites/mg [Fig. 4(C)]. The number of rABP binding sites of membrane fractions from immature rats (15 days) was higher than that obtained with fractions from mature rats (40 days).

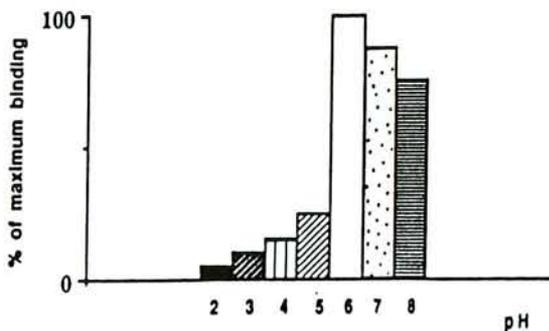


Fig. 3. Effect of pH on the binding of 100 fmol of labelled rABP to membrane fractions of epididymal epithelial cells from 15-day-old rats. Specific binding was pH dependent and maximal at pH 6–8.

EDTA and trypsin pretreatment [Fig. 5(A)] abolished the specific binding (65 and 42%, respectively), indicating that labelled rABP bound to a membrane protein and that the binding was calcium-dependent.

We noted a $38.7 \pm 2.4\%$ inhibition of the binding after preincubation of the intact epithelial cells with streptozotocin [Fig. 5(B)]. The

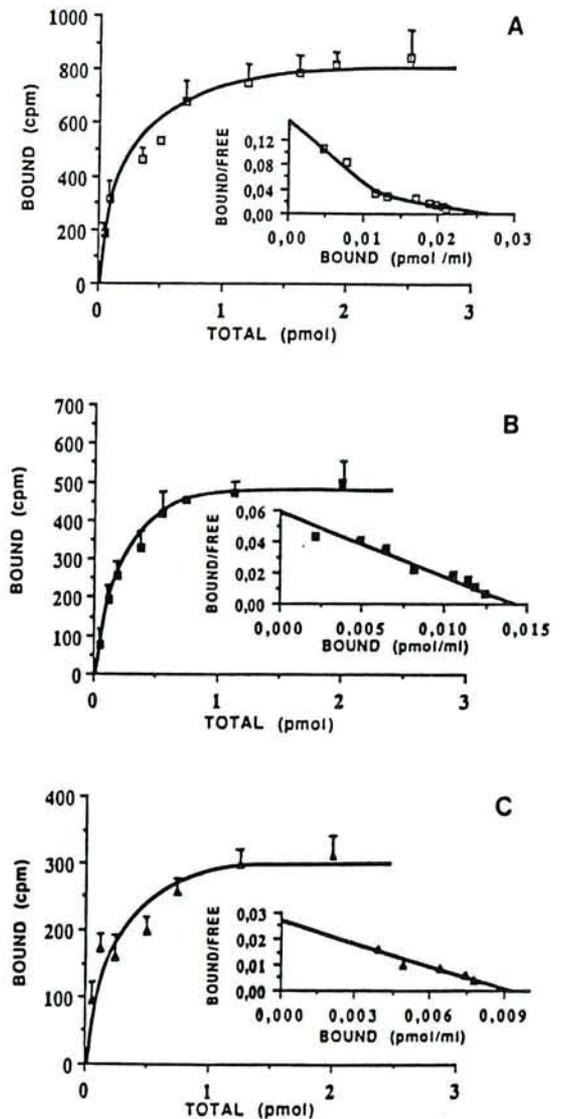


Fig. 4. Saturation curves of photoaffinity-labelled rABP to epididymal cell membrane fractions from (A) 15-day-old rats, (B) 40-day-old rats and of photoaffinity-labelled hSBP (C) to membrane fractions of immature rats (15 days). Binding was studied by incubating 0.05 to 2.5 pmol of labelled rABP or hSBP with membrane fraction aliquots (corresponding to 10^6 cells per test tube) for 1 h at 4°C. Affinity constants (K_{d}) estimated from Scatchard plots were: 18.2 and 1.6 nM^{-1} for plot A, 3.7 nM^{-1} for plot B and 2.6 nM^{-1} for plot C. The curvilinear scatchard plot A was calculated using the graphic analysis of Rosenthal [23]. Non-specific binding was determined to be approx. 15% by duplicating experiments in the presence of a 100-fold excess of cold rABP. The data are shown as the mean of triplicated separate experiments, using a different membrane extract.

Receptor of ABP in epididymal epithelial cells

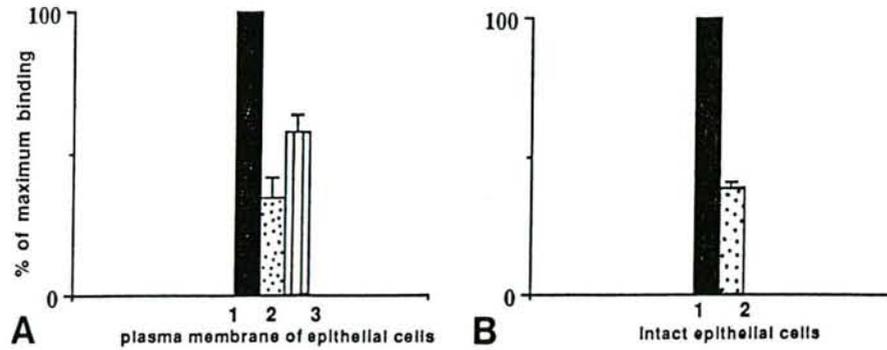


Fig. 5. Inhibiting effect of binding of labelled rABP to membrane fractions of epithelial cells (15 days) by either trypsin (A2) or EDTA (A3) and to intact epithelial cells (15 days) by streptozotocin (B2). Specific binding was evaluated as described in Experimental. Untreated samples represented 100% specific binding (A1, B1). Each value is the mean of triplicate experiments (bars indicate the standard deviation).

binding of rABP to membrane fractions was 5-fold lower with enriched preparation of plasma membranes from the cauda than with plasma membranes from the caput of immature rat epididymis (data not shown).

No competitive inhibition was observed in excess of lactotransferrin, serotransferrin, fetuin, asialofetuin and bovine serum albumin. On the contrary, hSBP was as efficient as cold rABP in inhibiting the binding of labelled rABP to the membrane fraction of epididymal epithelial cells (Fig. 6).

Labelled rABP incubated with Triton X-100 solubilized membranes was eluted as a high molecular mass peak (retention time of 8 min) in Superose 6B mini-gel filtration. The same elution profile was obtained when labelled hSBP was incubated with the solubilized membrane extract (Fig. 7). The 8 min peak was largely abolished in the presence of a 100-fold excess of unlabelled rABP (Fig. 7) or in the presence of

EDTA instead of calcium (data not shown). This peak was not observed when the tracer and the extract were incubated and filtered at pH 5 (data not shown).

DISCUSSION

We have previously demonstrated the presence of a receptor for rABP in epididymal homogenates and in isolated epididymal cells from immature rats [9]. In the present work, we studied the binding of labelled rABP to an enriched fraction of membranes from epididymal epithelial cells of mature and immature rats. The kinetics of binding and dissociation of the tracer in excess of cold rABP were similar to those observed for isolated cells. The binding between the ligand and the receptor was found to be more rapid at 4 than at 34°C. This result

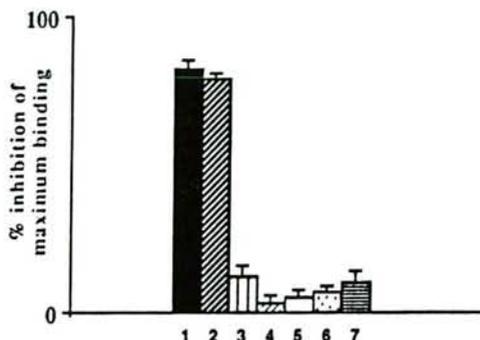


Fig. 6. Inhibition of the binding of labelled rABP to membrane fractions by other proteins. Membrane fractions of epididymal epithelial cells (15 days) were preincubated for 60 min at 4°C in the presence of 0.1 nmol of either hSBP (2), human lactotransferrin (3), serotransferrin (4), fetuin (5), asialofetuin (6) or bovine serum albumin (7) before adding 1 pmol of labelled rABP. Untreated samples (1) represented 100% of specific binding: each determination is the mean of triplicate experiments (bars indicate the standard deviation).

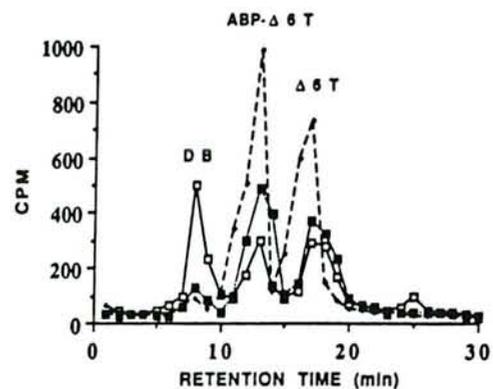


Fig. 7. Elution profile from Superose 6B mini-gel filtration of [^3H] Δ_8 -testosterone-rABP (ABP- $\Delta_8\text{T}$) incubated with the triton X-100 solubilized membrane fractions of rat epididymal epithelial cells (15 days). The ABP-receptor complex was eluted with a retention time of 8 min (\square). This peak was largely abolished when the membrane extract was preincubated for 1 h with a 100-fold excess of radioinert rABP (\blacksquare). ABP- $\Delta_8\text{T}$ and $\Delta_8\text{T}$ were eluted in a retention time of 12 and 17 min, respectively (---). Dextran blue 2000 (DB) was used as a marker eluted into the void volume position.

was not explained but the same difference has also been observed for the binding of 1-25 dihydroxyvitamin D₃ to its receptor, in human testis [19]. The specific capacity of rABP receptor was estimated to be 7.6×10^{11} sites per mg protein. Since the isolated fraction of membranes was prepared from aliquots of 10^7 cells, it was therefore calculated that about 12,000 receptor sites were present per epididymal cell from the immature rat. This capacity was very close to that previously determined with isolated cells in suspension [9]. In addition we also observed two affinity types of binding sites with respective K_{ass} of 1.6 and 18.2 nM⁻¹ and a lower receptor activity in the cauda than in the caput epididymis. The binding of labelled hSBP to the plasma membranes was similar to that of labelled rABP. In addition, a 100-fold excess of cold hSBP was able to inhibit the binding of labelled rABP to the membrane fractions. This showed that the receptor binding site binds both molecules. This is not surprising since the two molecules have a high percentage of homology for their aminoacid sequence [20]. The binding site of the membrane fraction is a protein since we observed that trypsin treatment of the membrane and streptozotocin treatment of the cells decreased the receptor activity by 42 and 38%, respectively. The receptor activity of membrane fractions from mature rats was about 1.7-fold lower than that obtained with fractions from immature rats. It has been shown that the concentration of rABP in testis is higher in mature rats (40 days) than in immature rats (15 days) [21]. In addition, Danzo *et al.* [2] observed that all hormonal treatments that increased testicular content of rABP also increased its transport into the epididymis. One may therefore assume that the decrease of specific activity of rABP epididymal receptor which was observed as a function of age corresponded to a higher *in situ* saturation of the receptor by rABP. The binding of rABP to the receptor could be associated with a down regulation [22]. The fact that only one single affinity type of receptor was found in 40-day-old rats was in favour of such an hypothesis, since a high level of rABP in the epididymis of 40-day-old rats could be responsible for a high level of recycling of the receptor. On the contrary, the low concentration of rABP in the epididymis of 15-day-old rats can explain that two affinity types of rABP receptor were observed at this age.

In conclusion, our data demonstrated the presence of a receptor for rABP and hSBP in

an enriched fraction of plasma membranes from rat epididymal cells. The receptor activity was higher in immature rats than in 40-day-old rats.

REFERENCES

1. Joseph D. R., Sullivan P. M., Fenstermacher D. A., Behrendsen M. E. and Zahnow C. A.: Alternate processed androgen-binding protein mRNAs; identification of a fusion transcript with a dopa decarboxylase-like RNA. *71st A. Meet. Endocr. Soc.*, Seattle, WA (1989) p. 71 (Abstr.).
2. Danzo B. J., Pavlou S. N. and Anthony H. L.: Hormonal regulation of androgen-binding protein in the rat. *Endocrinology* **127** (1990) 2829–2838.
3. Campo S., Cigorraga S., Belgorosky A., Chaler E. and Rivarola M. A.: Variations in soluble and particulate ABP of rat testis during sexual development. *Acta Physiol. Pharmac. Latinoam.* **37** (1987) 331–341.
4. Joseph D. R., Hall S. H., Conti M. and French F. S.: The gene structure of rat androgen-binding protein: identification of potential regulatory deoxyribonucleic acid elements of a follicle-stimulating hormone-regulated protein. *Molec. Endocr.* **2** (1988) 3–13.
5. Hammon G. L., Underhill D. A., Rykse H. M. and Smith C. L.: The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs. *Molec. Endocr.* **3** (1989) 1869–1876.
6. Gershagen S., Lundwall A. and Ferlund P.: Characterization of the human sex hormone-binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis. *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 9245–9258.
7. Guéant J. L., Frémont S., Khanfri J., Gérard A., Grignon G., Nicolas J. P. and Gérard H.: Biochemical evidence for a receptor mediated uptake of rat androgen binding protein by epididymis. *Steroids* **52** (1988) 347–349.
8. Hryb D. J., Khan M. S., Romas N. A. and Rosner W.: Solubilization and partial characterization of the sex hormone-binding globulin receptor from human prostate. *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 5378–5383.
9. Guéant J. L., Frémont S., Felden F., Nicolas J. P., Gérard A., Leheup B., Gérard H. and Grignon G.: Evidence that androgen-binding protein endocytosis *in vitro* is receptor mediated in principal cells of the rat epididymis. *J. Molec. Endocr.* **7** (1991) 113–122.
10. Gérard A., Khanfri J., Guéant J. L., Frémont S., Nicolas J. P., Grignon G. and Gérard H.: Electron microscope radioautographic evidence of *in vivo* androgen-binding protein internalization in the rat epididymis principal cells. *Endocrinology* **122** (1988) 1297–1307.
11. Gérard A., Egloff M., Gérard H., El Harate A., Domingo M., Guéant J. L., Dang C. D. and Degrelle H.: Internalization of human sex steroid-binding protein in the monkey epididymis. *J. Molec. Endocr.* **5** (1990) 239–251.
12. Frémont S., Guéant J. L., Felden F., Egloff M., Gérard A. and Nicolas J. P.: Dihydrotestosterone binding capacity of androgen binding protein (ABP) in tissue extract using high performance size exclusion chromatography. *J. Chromat.* **526** (1990) 186–193.
13. Guéant J. L., Khanfri J., Gérard H., Frémont S., Gérard A., Grignon G. and Nicolas J. P.: Purification of androgen binding protein from rat testis using high-performance liquid chromatography and physicochemical properties of the iodinated molecule. *FEBS Lett.* **207** (1986) 280–286.

Receptor of ABP in epididymal epithelial cells

14. Taylor C. A., Smith H. E. and Danzo B. J.: Photoaffinity labeling of rat androgen binding protein. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **77** (1980) 234-238.
15. Egloff M., Vranckx R., Tardivel-Lacombe J. and Degrelle H.: Immunochemical characterization and quantification of human sex steroid-binding plasma protein. *Steroids* **37** (1981) 455-462.
16. Markwell M. A. K.: A new solid-state reagent to iodinate proteins. Conditions for the efficient labelling of antiserum. *Analyt. Biochem.* **125** (1982) 427-430.
17. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J.: Protein measurements with the pholin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 265-275.
18. Scatchard G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51** (1949) 660-672.
19. Habib F. K., Maddy S. Q. and Gelly K. J.: Characterization of receptor for 1.25-dihydroxyvitamin D3 in the human testis. *J. Steroid Biochem.* **35** (1990) 195-199.
20. Joseph D. R., Hall S. H. and French F. S.: Rat androgen-binding protein: evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone-binding globulin. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **84** (1987) 339-343.
21. Danzo B. J. and Eller B. C.: The ontogeny of biologically active androgen binding protein in rat plasma, testis and epididymis. *Endocrinology* **117** (1985) 1380-1388.
22. Carpentier J. L.: Internalisation et recyclage du récepteur de l'insuline. *Méd. Sci.* **4** (1988) 83-89.
23. Rosenthal H. E.: A Graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Analyt. Biochem.* **20** (1967) 525-532.

IV. RECONNAISSANCE ET INTERNALISATION DE L'ABP DE RAT ET DE LA SBP HUMAINE PAR LES CELLULES GERMINALES DE RAT (Publications IV et V)

4.1. But de l'étude

La cellule germinale étant capable de reconnaître et/ou d'internaliser de façon spécifique un certain nombre de protéines testiculaires (transferrine, céruléoplasmine...) de façon spécifique, il était important de montrer que l'ABP testiculaire d'origine sertolienne pouvait également se lier spécifiquement sur la lignée spermatogénique.

Une étude allant dans ce sens avait montré, en 1984 (Steinberger et Coll.), que l'ABP pouvait reconnaître un site de liaison membranaire sur une population de pachytène spermatocytes de rat. La très forte homologie structurale, et génomique, entre l'ABP de rat et la SBP humaine nous a conduit à étudier l'interaction de ces deux protéines au contact de cellules isolées appartenant aux différents stades de la lignée germinale de rat et, de façon préliminaire, chez l'homme. Ces travaux ont fait appel à des méthodes biochimiques et histologiques pour étudier l'internalisation spécifique par récepteur des deux protéines.

4.2. Résultats

4.2.1. Mise en évidence de la liaison membranaire de l'ABP et de la SBP au niveau de la lignée germinale (Publication IV).

La cinétique d'association de l'ABP testiculaire de rat, préparée selon la méthode précédemment décrite (publication I), est maximale en quarante minutes, à 4°C (figure n°1), sur une préparation enrichie en membrane plasmique de cellules isolées de tous les stades de maturation de la lignée germinale de rat adulte (40 j). Cette liaison est saturable et réversible par l'ajout d'un excès d' ABP non radioactive. Cette fixation est maximale à un pH compris entre 6 et 8 (figure n°2) et la présence de calcium est indispensable.

L'analyse par représentation de Scatchard (1949) montre une seule classe de sites de liaison spécifique, aussi bien sur les cellules entières que sur les fractions membranaires (figures n°3 (a) et 3 (b)). Les paramètres de liaison indiquent une constante de dissociation (Kd) de 0,8 nM, soit 13000 sites / cellules, (figure n°3 (c)).

La spécificité du site récepteur est étudiée par préincubation de différentes protéines (lactotransferrine, serotransferrine, asialofétuine...) Il n'y a pas d'inhibition de la liaison de l'ABP aux fractions membranaires par ces différentes solutions protéiques (figure n°4). Seule la SBP humaine montre une affinité aussi importante pour le site que l'ABP de rat (figure n°4). Enfin, la solubilisation par du triton x-100 de l'extrait membranaire montre l'existence d'un site de liaison de haut poids moléculaire (élution au niveau du volume mort) après mini-gel filtration sur une colonne de supérose 6B (figure n°5). Cette méthode confirme la spécificité de la liaison (déplacement par un excès d'ABP froide), l'importance du calcium et de la neutralité du milieu (figure n°6), ainsi que la reconnaissance croisée du récepteur pour l'ABP et la SBP.

4.2.2. Discussion

Notre étude confirme la présence d'un site de liaison spécifique pour l'ABP testiculaire de rat au niveau de la lignée germinale, comme cela avait déjà été montré précédemment au niveau d'une population de pachytènes spermatocytes (Steinberger et Coll., 1984). Le récepteur membranaire est présent, aussi bien sur cellules entières que sur fractions membranaires, et son activité de liaison est un peu plus faible que dans l'épididyme. La comparaison des différentes caractéristiques biochimiques de liaison de l'ABP sur les deux modèles cellulaires est présentée dans le tableau n°9.

Le site de liaison membranaire est spécifique pour l'ABP de rat et la SBP humaine. Un résultat similaire avait déjà été retrouvé dans l'étude précédente sur l'épididyme. Il serait également intéressant de savoir si les différents stades de maturation de la lignée germinale, pris séparément, montrent une différence significative dans l'expression du récepteur de l'ABP. Cette étude est en cours et un début de réponse est présenté dans l'étude histologique suivante.

En conclusion, il existe un récepteur protéique membranaire, spécifique aux protéines de transport des androgènes, au niveau de la lignée germinale de rat adulte.

**TABLEAU N° 9 : Comparaison des principales caractéristiques biochimiques du récepteur de l'ABP/SBP sur les lignées épидидymaires et germinales de rats immature et adulte
(PFM = préparation de fractions membranaires)**

Caractéristiques du récepteur de l'ABP/SBP	Cellules épидидymaires entières (Publication II)	PFM d'épididymes (Publication III)	PFM de cellules germinales et cellules entières (GC) (Publication IV)
. Cinétique d'association-dissociation : - maximum de fixation (min)	40 (+ 4°C)	25 (+ 4°C) 80 (+ 34°C)	40 (+ 4°C)
- réversibilité de la liaison	oui	oui	oui
. pH optimum	6 à 8	6 à 8	6 à 8
. Spécificité de la liaison	ABP	ABP de rat SBP humaine	ABP de rat SBP humaine
. Inhibiteurs de la liaison	Trypsine, EDTA, cycloheximide	Trypsine, EDTA, streptozotocine	EDTA
. Activateurs de la liaison et/ou de l'internalisation	Calcium, chloroquine	Calcium, magnésium	Calcium, magnésium
. Evaluation de la masse moléculaire (Ka)	2000		
. Coefficient de sédimentation (S)	18.4 / 9.0 S		
. Variation en fonction de l'âge		Immature (15 j) > Mature (40 j)	
. Constantes d'associations (nM/L) - rABP - rABP + protéases - hSBP	67.9 / 2.8 (15 j)	18.2 / 1.6 (15 j) 3.7 (40 j) 2.6 (15 j)	1.28 (GC) 1.03 (PFM) 0.58 (PFM)
. Nombre de récepteurs - rABP * par cellules * par mg/protéines - hSBP * par cellules * par mg/protéines	1600/7700 (15 j)	2.2 / 5.4 10 ¹¹ (15 j) 4.5 10 ¹¹ (40 j) 3.8 10 ¹¹ (15 j)	13000 (40 j) 1.7 10 ¹⁰ (40 j)
. Activité tête/queue de l'épididyme	10 / 1	5 / 1	

Photoaffinity labelled rat androgen-binding protein and human sex hormone steroid-binding protein bind specifically to rat germ cells

F. Felden, J. L. Guéant, A. Ennya*, A. Gérard*, S. Frémont, J. P. Nicolas and H. Gérard*

Laboratoire de Biochimie Nutritionnelle, INSERM U 308, Faculté de Médecine, Université de Nancy I, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cédex, France

*Laboratoire d'Histologie-Embryologie II, Faculté de Médecine de Nancy, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cédex, France

(Requests for offprints should be addressed to J. L. Guéant)

RECEIVED 18 October 1991

ABSTRACT

A specific receptor with high affinity for rat androgen-binding protein (rABP) was identified in isolated adult rat germ cells and in the corresponding plasma membrane-enriched preparations. Binding was reversible and time-dependent, with maximum relative binding after 40 min at 4 °C; it was pH-dependent, with maximum binding at pH 6–8. Unlabelled rABP and human sex steroid-binding protein (hSBP), but not lactotransferrin, serotransferrin, asialofetuin, fetuin or bovine serum albumin, competed with labelled rABP for binding sites on isolated germ cells. Scatchard analysis revealed a single class of binding site with apparent dissociation constant (K_d) values of 0.78 ± 0.04 nM and 0.97 ± 0.05 nM in intact germ cells and plasma mem-

brane preparations respectively. A K_d of 1.72 ± 0.12 nM for hSBP showed that the receptor binding site was effective for both androgen-carrier molecules. Labelled rABP incubated with solubilized germ cell membrane fractions at pH 7 formed a complex excluded from Superose 6B mini-gels; this complex was not formed at pH 3. The receptor complex was also abolished in the presence of a 100-fold excess of either unlabelled rABP or unlabelled hSBP, or in the presence of 20 mM EDTA.

These results suggest that the plasma membrane of rat germ cells contains a receptor which selectively binds rABP and hSBP.

Journal of Molecular Endocrinology (1992) 9, 39–46

INTRODUCTION

Sertoli cells play a major role in the process of spermatogenesis (Means *et al.* 1980; Saez *et al.* 1985). They provide structural support and multiple cell interactions, especially with germ cells (Ziparo *et al.* 1980; Le Magueresse *et al.* 1986). Androgen-binding protein (ABP) is synthesized by Sertoli cells (Danzo *et al.* 1974), and a number of recent works have shown that germ cells can modulate the activity of Sertoli cells, including the secretion of ABP (Galdieri *et al.* 1984). Sertoli cell functions may be modulated by pachytene spermatocytes, both through direct contact between these two cell types and, possibly, by a factor(s) secreted by germ cells (Castellon *et al.* 1989). Rat ABP (rABP) has been

considered to be a carrier and metabolic protector of androgens in the testis.

Earlier, we showed that rat epididymal epithelial cells have a specific receptor which binds both rABP and human sex steroid-binding protein (hSBP) (Guéant *et al.* 1991; Felden *et al.* 1992). The receptor-mediated endocytosis of labelled rABP and hSBP by rat (Gérard *et al.* 1988; Guéant *et al.* 1991) and monkey (Gérard *et al.* 1990) epididymal cells has been shown by autoradiography. Despite the lack of experimental data, Steinberger *et al.* (1984) speculated on the presence of specific ABP-binding sites on pachytene spermatocytes.

In the present work, we have used photoaffinity labelled rABP as a model with which to investigate the mechanism by which rABP interacts with

spermatogenic cells. The data support the generality of the model of ABP binding to plasma membranes as previously described for transcortin (Strel'chyonok & Avvakumov, 1983) and hSBP (Hryb *et al.* 1985).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

[1,2-³H]17 β -Hydroxy-4,6-androstadien-3-one ([³H] Δ_6 -testosterone; 48 Ci/mmol) was purchased from NEN Research Products (Boston, MA, U.S.A.). Mannitol, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), pepstatin A, leupeptin, bacitracin and benzamidine were all obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, U.S.A.). Scintran was from BDH (Poole, Dorset, U.K.) and all other reagents were obtained as before (Guéant *et al.* 1986; Frémont *et al.* 1990; Guéant *et al.* 1991).

Isolation of germ cells

Testes from Wistar rats (40 days of age and weighing 200 g) were dissected free from surrounding fat and connective tissue and minced with scissors. Under a stereomicroscope, the seminiferous tubules were gently unravelled with forceps in RPMI 1640 medium (pH 7, Sigma) in order to eliminate all the interstitial tissue. Germ cells were isolated using a glass homogenizer (Potter no.10; Prolabo, Paris, France). They were washed with RPMI medium, filtered through cotton wool in order to trap testicular sperm and cellular debris and then recovered by centrifugation at 1000 g for 5 min. Pellets were resuspended in fresh culture medium and cell viability, assessed by trypan blue (Sigma) exclusion test, was greater than 95%. Cells were counted under phase-contrast microscopy, and the suspension was adjusted to 10⁷ cells/ml.

Smears were prepared with excess cell suspension and stained in order to quantify the germ cells, in particular with respect to their stages of maturation. Germ cell populations examined at light microscopic levels in smears contained (means \pm S.E.M., $n=4$) spermatogonia, 5.5 \pm 0.59%; primary and secondary spermatocytes, 34 \pm 2.66%; round spermatids, 25 \pm 0.54%; elongated spermatids, 21 \pm 0.34%; residual bodies, 10 \pm 2.7% and spermatozoa, 3 \pm 0.8%. We noted contamination by erythrocytes, Leydig cells and Sertoli cells (about 12% of the total germ cell populations). The different cell types were defined according to their known morphological characteristics.

Plasma membrane-enriched preparations of germ cells

The plasma membrane-enriched preparations were obtained from isolated germ cells. About 10⁶ cells/ml were disrupted in ice-cold buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4) containing 0.4 mM PMSF, 0.1% (w/v) benzamidine, 0.05% (w/v) bacitracin, 1 μ g leupeptin/ml, 1 μ g pepstatin A/ml and 0.15 M NaCl, with a mixer (Ultra-turrax; Ika-Labortechnik, Staufen, Germany), three times for 5 min at 4 °C. The homogenate was centrifuged for 10 min at 1000 g, the pellet was discarded and the supernatant was centrifuged for 30 min at 27 000 g in a Beckman L8-55 ultracentrifuge. The pellet was resuspended in the Tris-HCl buffer described above, in the presence of 300 mM mannitol, 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂, and centrifuged for a second period under the same conditions. The pellet was homogenized in the buffer described above and was stored at -80 °C in aliquots until use. Protein concentration was measured according to the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard. Compared with the initial homogenized tissue, the specific activity of 5' nucleotidase (a standard marker for plasma membranes) was increased five times in the plasma membrane fractions. The plasma membrane-enriched preparations were also examined by light microscopy.

Purification and labelling of rABP and hSBP

Photoaffinity labelled rABP was prepared as described by Guéant *et al.* (1986) and Frémont *et al.* (1990), according to the method of Taylor *et al.* (1980). Briefly, testicular extract (10 ml) was incubated with 1 nmol [³H] Δ_6 -testosterone overnight at 4 °C, and photolysed in a reactor using a u.v. light (345 nm) for four 15-min periods under controlled temperature. It was injected for preparative high-performance liquid chromatography onto a Lichroprep 200 Diol column (Merck, Darmstadt, Germany) to separate [³H] Δ_6 -testosterone covalently bound to ABP from free hormone. The peak of photoaffinity labelled rABP was eluted with a retention time of 7 min and was further filtered by fast protein liquid chromatography using a Superose 6B column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The peak of dimeric photoaffinity labelled rABP was eluted with a retention time of 32 min, corresponding to a molecular mass of 92 kDa; purification of rABP was 2970-fold, to a specific activity of 565 pmol/mg protein. Labelled rABP was stored in aliquots at -80 °C.

Human SBP was purified from human late-pregnancy serum using the method previously described by Egloff *et al.* (1981). The purity of hSBP

was checked by polyacrylamide gel electrophoresis and the radioactive component visualized by fluorography. Quantitative estimation of hSBP was performed by electroimmunodiffusion using a polyclonal rabbit anti-SBP serum. The concentration of labelled hSBP was estimated as 2 µg/ml (0.2 mCi/mg protein).

Binding assay

Labelled rABP (0.09–1.5 pmol) was incubated (1 h at 4 °C with shaking) with 10^6 germ cells per test tube (or plasma membrane-fraction aliquots corresponding to 10^6 cells) in triplicate and in the presence or absence of a 100-fold excess of unlabelled ABP. Bound and free ligand were separated by centrifugation at 25 000 *g* for 15 min, and the pellet was washed three times in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ and 0.1% (w/v) bovine serum albumin. The radioactivity of the supernatant and the pellet was measured after the addition of 3 ml Scintan. Specific binding (total binding minus binding in the presence of unlabelled rABP, approximately 12% of total) was analysed according to Scatchard (1949).

Gel filtration of Triton X-100-solubilized rABP receptor

Plasma membrane fractions of germ cells were extracted with Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.4) containing 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM MgCl₂ and 1 mM CaCl₂. Plasma membrane fractions (1 ml) were incubated for 1 h at 4 °C with labelled rABP (2 pmol) or labelled hSBP (2.5 pmol). Non-specific binding was studied by preincubating membrane extracts with a 100-fold excess of unlabelled rABP. Fractions were also incubated with 20 mM EDTA instead of CaCl₂, or after preincubation with a 100-fold excess of hSBP. The final mixture was loaded onto a 0.46 × 20 cm Superose 6B column, which was pre-equilibrated at 4 °C with the Tris-HCl buffer described above. Fractions were collected using a Frac-100 fraction collector (Pharmacia). Specific binding was estimated by measuring the radioactivity in 0.2 ml fractions in the presence of 3 ml scintillation liquid (Scintan).

RESULTS

The binding of labelled rABP to plasma membrane-enriched preparations of germ cells was studied as a function of time. Specific binding reached a maximum after 40 min at 4 °C (Fig. 1). The displacement

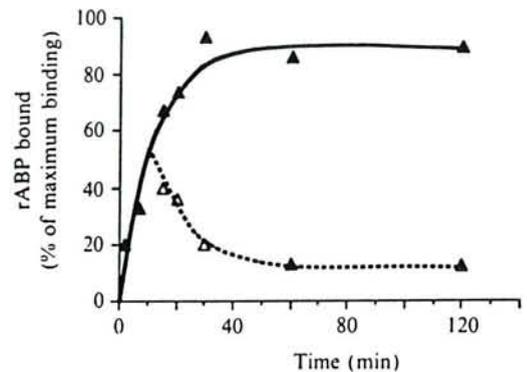


FIGURE 1. Time-course of labelled rat androgen-binding protein (rABP) binding to plasma membrane-enriched preparations (0.87 mg/ml). Association (▲) was performed at 4 °C; 1 pmol labelled rABP was incubated with aliquots of plasma membranes in a final volume of 10 ml. Aliquots (1 ml) of the mixture were collected at incubation times ranging from 2 to 120 min. A second experiment (△) was performed in the same way, except that a 100-fold excess of unlabelled rABP was added 15 min after incubating the plasma membranes with the tracer at 4 °C. Data are the means of triplicate experiments.

of bound labelled rABP by a 100-fold excess of radioinert rABP demonstrated that the binding was a reversible process (Fig. 1). The binding of labelled rABP was pH-dependent; it was maximal at pH 6–8 with a sharp decline at more acidic pH (Fig. 2). Specific binding of rABP and hSBP with plasma membrane fractions and intact germ cells of adult rats was analysed by Scatchard plots (Fig. 3). We found a single class of binding site with dissociation constant (K_d) values of 0.78 ± 0.04 nM and 0.93 ± 0.05 nM (means \pm S.D., $n = 3$) respectively for rABP in intact germ cells ($13\,000$ sites/cell) and plasma membrane-enriched preparations (1.7×10^{10} sites/mg protein). hSBP incubated with plasma membranes showed a single class of binding site with a lower affinity corresponding to a K_d of 1.72 ± 0.12 nM ($n = 3$). The binding of rABP was calcium-dependent, and pretreatment of the plasma membranes with EDTA (20 mM) resulted in an almost complete loss of binding (data not shown). Specificity of ABP binding to germ cells was studied by preincubating membrane-enriched preparations with unlabelled proteins. No inhibition of the binding of labelled rABP to germ cells by an excess of different proteins was observed (Fig. 4), except with unlabelled hSBP, which was as efficient as unlabelled rABP.

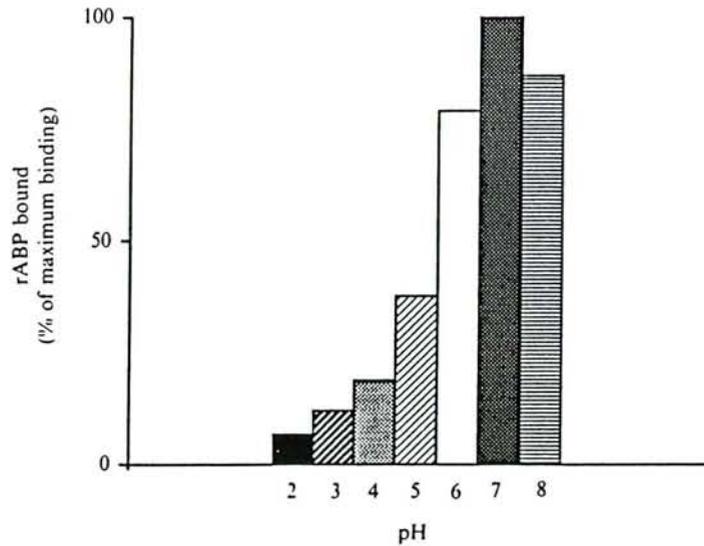


FIGURE 2. Effect of pH on the binding of 1 pmol labelled rat androgen-binding protein (rABP) to plasma membranes of germ cells. The membrane fractions were incubated with the tracer for 2 h in the presence of various buffer solutions with a pH range of 2–8 (0.02 M Tris-HCl buffer, pH 8; 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7; 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6; 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5; 0.05 M acetate buffer, pH 4; 0.02 M citrate-KCl buffer, pH 3; 0.02 M citrate-HCl buffer, pH 2). Data are the means of the percentages of maximum specific binding from two separate experiments.

Plasma membranes of germ cells solubilized by Triton X-100 showed a receptor peak with a retention time of 9 min in Superose 6B mini-gel filtration. Photoaffinity labelled unbound rABP was eluted with a retention time of 14 min and free [^3H] Δ_6 -testosterone with a retention time of 19 min (Fig. 5). This peak was abolished when the Triton X-100-solubilized membrane fractions were preincubated with a 100-fold excess of either unlabelled rABP (Fig. 5) or hSBP (data not shown). It was also abolished in the presence of 20 mM EDTA or when the incubation was performed at pH 3 instead of neutral pH (Fig. 6).

DISCUSSION

Previous studies found a specific binding site for transferrin in pachytene spermatocytes (Holmes *et al.* 1983; Steinberger *et al.* 1984; Sylvester & Griswold, 1984). Our results confirmed that rat germ cells have a specific binding site for another transport protein from seminal plasma.

In the present work we used photoaffinity labelled rABP, purified as described previously (Frémont *et al.* 1990). This meant that the receptor could bind to

the androgen-protein complex and could therefore potentially be implicated in a specific internalization of androgen, as has been observed previously for epididymal epithelial cells (Gérard *et al.* 1988). The rABP receptor was detected not only in intact cells but also in an enriched preparation of plasma membranes. The data can be compared with those observed with epididymal epithelial cells (Guéant *et al.* 1991; Felden *et al.* 1992). The affinity of rABP-binding sites of germ cells was lower than that of epididymal epithelial cells (K_d values were 0.97 and 0.27 nM respectively), but the number of binding sites per cell was similar (13 000 sites/cell). Labelled hSBP was bound almost as efficiently as labelled rABP ($K_d=1.72$ nM). A similar result has been obtained with epididymal epithelial cells (Felden *et al.* 1992), and can be explained by the structural homology of the two proteins (Joseph *et al.* 1987). The specificity of rABP-binding sites of germ cells was indicated by the lack of competitive inhibition by an excess of any of lactotransferrin, serotransferrin, asialofetuin, fetuin and bovine serum albumin. The binding was calcium- and pH-dependent. It could, therefore, feasibly mediate specific endocytosis of rABP by germ cells, as dissociation of rABP from its receptor could occur in the acidic

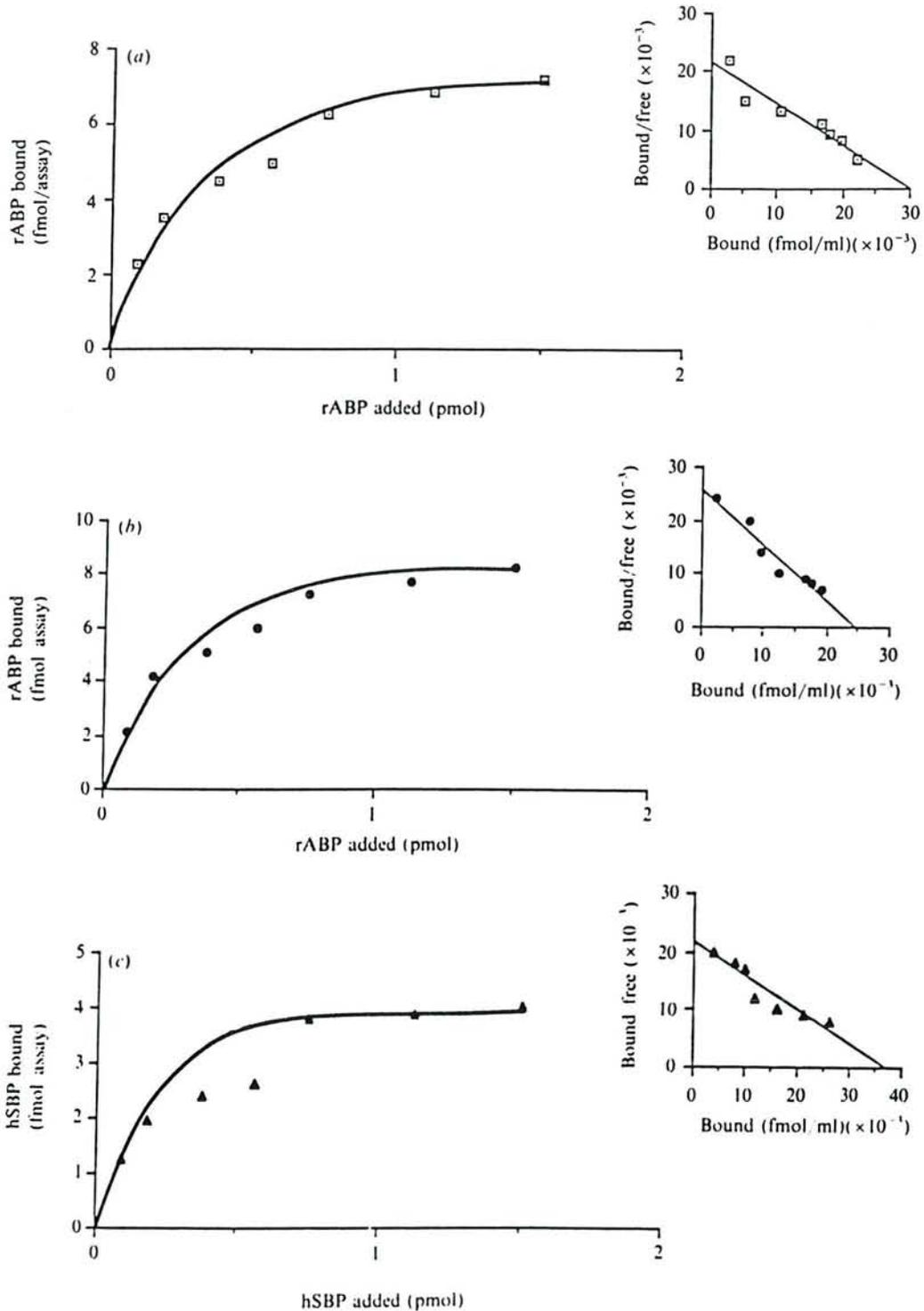


FIGURE 3. Saturation curves and Scatchard plots (inset) of the interactions of intact germ cells with photoaffinity labelled (a) rat androgen-binding protein (rABP) and of plasma membranes of germ cells with (b) labelled rABP and (c) labelled human sex steroid-binding protein (hSBP). Binding assays were performed at 4 °C as described in the text.

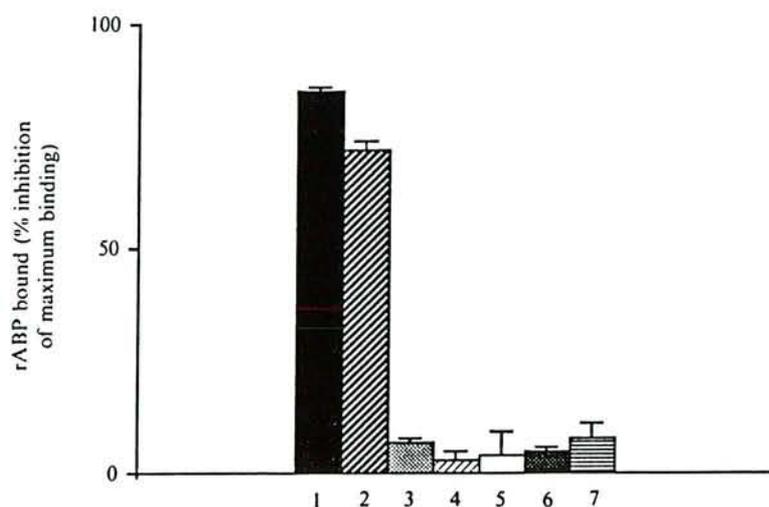


FIGURE 4. Specificity of photoaffinity labelled rat androgen-binding protein (rABP) binding to the receptor. rABP was incubated with plasma membranes of germ cells for 1 h. at 4 °C either in the presence of 1 pmol human sex steroid-binding protein (2) or 0.1 nmol of each of human lactotransferrin (3), serotransferrin (4), asialofetuin (5), fetuin (6) and bovine serum albumin (7), or in the absence of any proteins (1). All proteins were incubated with plasma membranes for 1 h before adding 1 pmol labelled rABP at 4 °C. Data are the means \pm S.E.M. of three experiments.

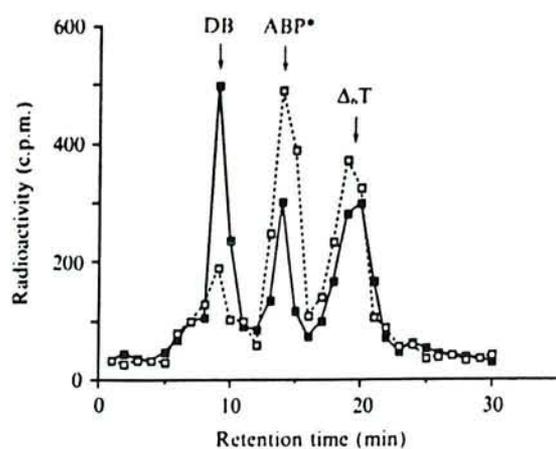


FIGURE 5. Superose 6B mini-gel filtration of labelled rat androgen-binding protein (rABP) incubated with Triton X-100-solubilized plasma membranes of germ cells, in the presence (\square) or absence (\blacksquare) of a 100-fold excess of unlabelled rABP. The receptor peak of rABP was eluted in the same position as dextran blue 2000 (DB; M_r 2×10^6). Two other peaks with retention times of 14 and 19 min corresponded respectively to unbound rABP (ABP*) and free [3 H] Δ_n -testosterone (Δ_n T). Radioactivity was measured in each fraction as described in the text.

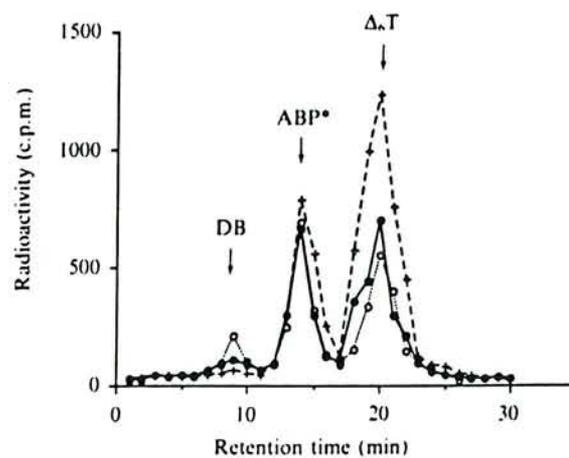


FIGURE 6. Chromatograms of Triton X-100-solubilized plasma membranes from germ cells. The peak of rat androgen-binding protein (rABP)-receptor complex in the position of dextran blue (DB; see Fig. 5) was abolished by preincubation of the mixture with 20 mM EDTA (\bullet) or at pH 3 instead of neutral pH (\circ). In the absence of receptor extract (+), the photoaffinity labelled rABP was eluted with a retention time of 14 min (ABP*) and free [3 H] Δ_n -testosterone (Δ_n T) with a retention time of 19 min.

compartment of the cell, as previously observed for epididymal epithelial cells. This hypothesis is likely, since coated pits and endosomes are observed in rat germ cells (Gérard *et al.* 1989). In addition, endocytosis of hSBP has been recently described in monkey spermatogenic cells (Gérard *et al.* 1992). The receptor of rat germ cells was different from the receptor described by Rosner (1990) in human prostate, which binds only unliganded hSBP, whereas the germ cell receptor bound occupied photoaffinity labelled rABP and hSBP. In addition, the receptor of human prostate has a lower affinity for hSBP than the receptor of rat germ cells.

Our germ cell suspension was enriched with early primary and secondary spermatocytes. It may therefore be suggested that the androgen-ABP complex plays a major role in the maturation of pachytene spermatocytes. Similar results were obtained by Holmes *et al.* (1983) with transferrin.

A further biochemical characterization of the receptor could be performed since the receptor could be solubilized in Triton X-100. The solubilized receptor behaved in a similar manner to the receptor site from plasma membranes, since the binding of labelled rABP was also calcium- and pH-dependent, and was inhibited by an excess of radioinert rABP or hSBP.

In conclusion, this paper describes an rABP receptor on plasma membranes from rat germ cells which also binds hSBP. It remains to be demonstrated whether the ABP receptor of rat germ cells is involved in a receptor-mediated endocytosis of steroids in germ cells.

REFERENCES

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Castellon, E., Jannecki, A. & Steinberger, A. (1989). Influence of germ cells on Sertoli cell secretory activity in direct and indirect co-culture with Sertoli cells from rats of different ages. *Molecular and Cellular Endocrinology* **64**, 169-178.
- Danzo, B. J., Eller, B. C. & Orgebin-Crist, M. C. (1974). Studies on the site of origin of the androgen-binding protein present in epididymal cytosol from mature intact rabbits. *Steroids* **24**, 107-122.
- Egloff, M., Vranckx, R., Tardivel-Lacombe, J. & Degrelle H. (1981). Immunochemical characterization and quantification of human sex steroid-binding plasma protein. *Steroids* **37**, 455-462.
- Felden, F., Leheup, B., Frémont, S., Bouguerne, R., Egloff, M., Nicolas, J. P., Grignon, G. & Guéant, J. L. (1992). The plasma membrane of epididymal epithelial cells has a specific receptor which binds to ABP and SBP. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **42**. (In Press.)
- Frémont, S., Guéant, J. L., Felden, F., Egloff, M., Gérard, A. & Nicolas, J. P. (1990). Dihydrosterone binding capacity of androgen-binding protein (ABP) in tissular extract using high-performance exclusion size chromatography. *Journal of Chromatography* **526**, 186-193.
- Galdieri, M., Monaco, L. & Stefanini, M. (1984). Secretion of androgen binding protein by Sertoli cells is influenced by contact with germ cells. *International Journal of Andrology* **5**, 409-416.
- Gérard, A., Egloff, M., Gérard, H., El Harate, A., Domingo, M., Guéant, J. L., Dang, C. D. & Degrelle, H. (1990). Internalization of human sex steroid-binding protein in the monkey epididymis. *Journal of Molecular Endocrinology* **5**, 239-251.
- Gérard, A., Ennya, A., Egloff, M., Domingo, M., Degrelle, H. & Gérard, H. (1992). Endocytosis of human sex steroid-binding protein in monkey germ cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **637**, 258-277.
- Gérard, A., Khanfri, J., Guéant, J. L., Frémont, S., Nicolas, J. P., Grignon, G. & Gérard, H. (1988). Electron microscope radioautographic evidence of *in vivo* androgen-binding protein internalization in the rat epididymis principal cells. *Endocrinology* **122**, 1297-1307.
- Gérard, H., Ennya, A., Guéant, J. L., Anwar, N., Frémont, S. & Gérard, A. (1989). Internalisation de l'androgen-binding protein (ABP) par les cellules germinales chez le rat: étude autohistoradiographique en microscopie électronique. *Regard sur la Biochimie* **3**, Abstract No. 9.
- Guéant, J. L., Frémont, S., Felden, F., Nicolas, J. P., Gérard, A., Leheup, B., Gérard, H. & Grignon, G. (1991). Evidence that androgen-binding protein endocytosis *in vitro* is receptor mediated in principal cells of the rat epididymis. *Journal of Molecular Endocrinology* **7**, 113-122.
- Guéant, J. L., Khanfri, J., Gérard, H., Frémont, S., Gérard, A., Grignon, G. & Nicolas, J. P. (1986). Purification of androgen-binding protein from rat testis using high-performance liquid chromatography and physicochemical properties of the iodinated molecule. *FEBS Letters* **207**, 280-286.
- Holmes, S. D., Bucci, L. R., Lipshultz, L. I. & Smith, R. G. (1983). Transferrin binds specifically to pachytene spermatocytes. *Endocrinology* **113**, 1916-1918.
- Hryb, D. S., Khan, M. & Rosner, W. (1985). Testosterone-estradiol-binding globulin binds to human prostatic cell membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **128**, 432-440.
- Joseph, D. R., Hall, S. H. & French, F. S. (1987). Rat androgen-binding protein: evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone-binding globulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **84**, 339-343.
- Le Magueresse, B., Le Gac, G., Loir, M. & Jegou, B. (1986). Stimulation of rat Sertoli cell secretory activity *in vitro* by germ cells and residual bodies. *Journal of Reproduction and Fertility* **77**, 489-498.
- Means, A. R., Dedman, J. R., Tash, J. S., Tindall, D. J., Van Sickle, M. & Welsch, M. J. (1980). Regulation of the testis Sertoli cell by follicle stimulation hormone. *Annual Reviews of Physiology* **42**, 58-70.
- Rosner, W. (1990). The function of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocrine Reviews* **11**, 80-91.
- Saez, J. M., Tabone, E., Perrard-Sapori, M. H. & Rivarola, M. A. (1985). Paracrine role of Sertoli cell. *Medical Biology* **63**, 225-236.
- Scatchard, G. (1949). The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **51**, 660-672.

- Steinberger, A., Dighe, R. R. & Diaz, J. (1984). Testicular peptides and their endocrine and paracrine functions. *Archivos Biologica Medicina Experimentales* **17**, 267-271.
- Strel'chyonok, D. A. & Avvakumov, G. V. (1983). Evidence for the presence of specific binding sites for transcortin in human liver plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **755**, 514-517.
- Sylvester, S. R. & Griswold, M. D. (1984). Localization of transferrin and transferrin receptors in rat testes. *Biology of Reproduction* **31**, 195-201.
- Taylor, C. A., Smith, H. E. & Danzo, B. J. (1980). Photoaffinity labelling of rat androgen binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **77**, 234-238.
- Ziparo, E., Geremia, R., Russo, M. & Stefanini, M. (1980). Surface interaction *in vitro* between Sertoli cells and germ cells at different stages of spermatogenesis. *American Journal of Anatomy* **159**, 385-388.

4.2.3. MISE EN EVIDENCE DE L'INTERNALISATION DE L'ABP ET DE LA SBP AU NIVEAU DE LA LIGNEE GERMINALE

PLANCHE I : Cellules germinales de rat

- Photo n°1 : Marquage membranaire de surface d'un spermatocyte primaire après 15 minutes d'incubation avec de l'ABP marquée par photoaffinité. Des grains d'argent sont observés sur un puits recouvert à l'aide de la révélation "grain fin" (M = Puits recouvert, E = endosome, R = reticulum, Mi = mitochondrie).
- Photo n°2 : Même type de marquage, avec un plus fort grossissement et une révélation de type microdol (M = puits recouvert), après 15 minutes d'incubation.
- Photo n°3 : On note la présence d'une source radioactive au niveau d'une vésicule, et à proximité de la région golgienne (G = appareil de Golgi), sur une spermatide ronde.
- Photo n°4 : Marquage cytoplasmique profond, après 30 minutes d'incubation, montrant la présence du marqueur radioactif au niveau de l'enveloppe nucléaire d'un spermatocyte primaire (N = noyau, E = enveloppe nucléaire, M = puits recouvert).

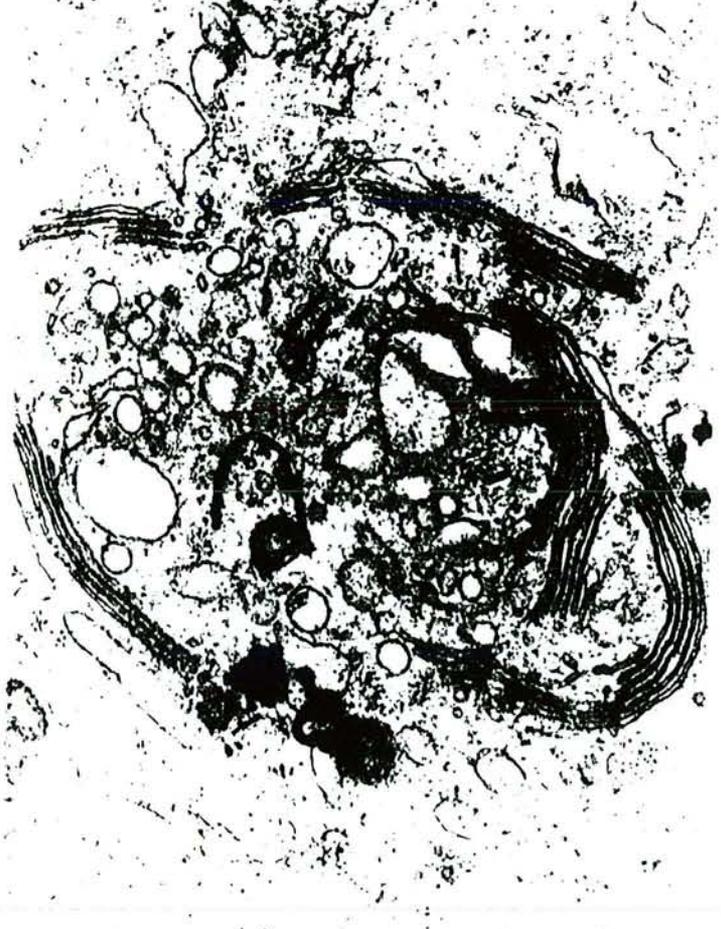
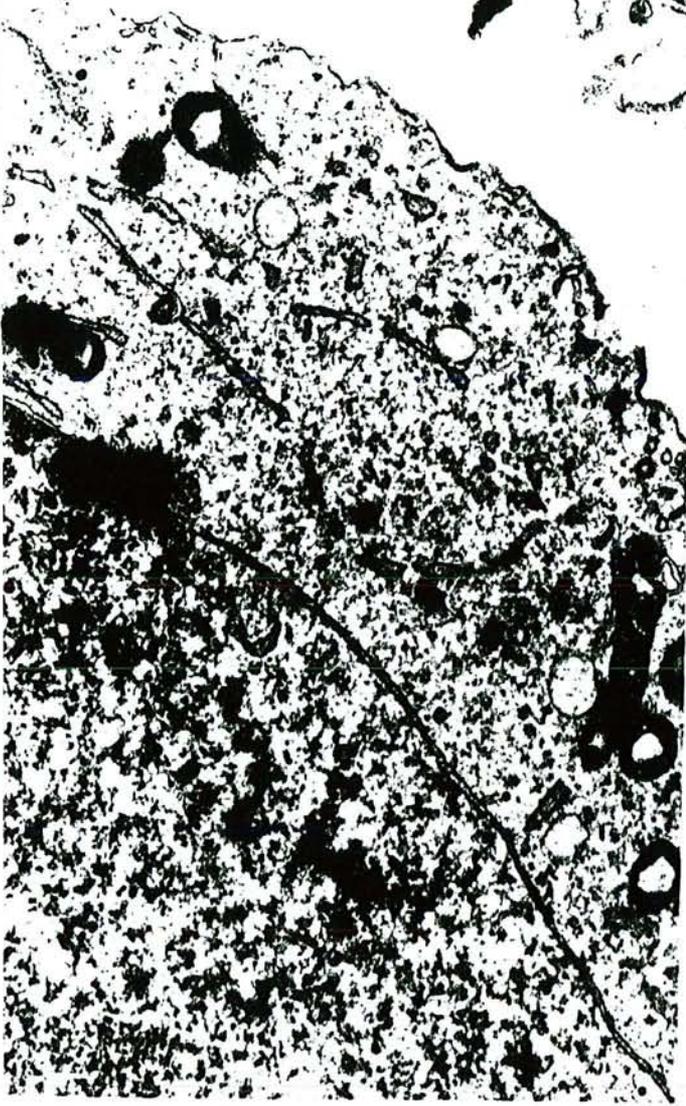
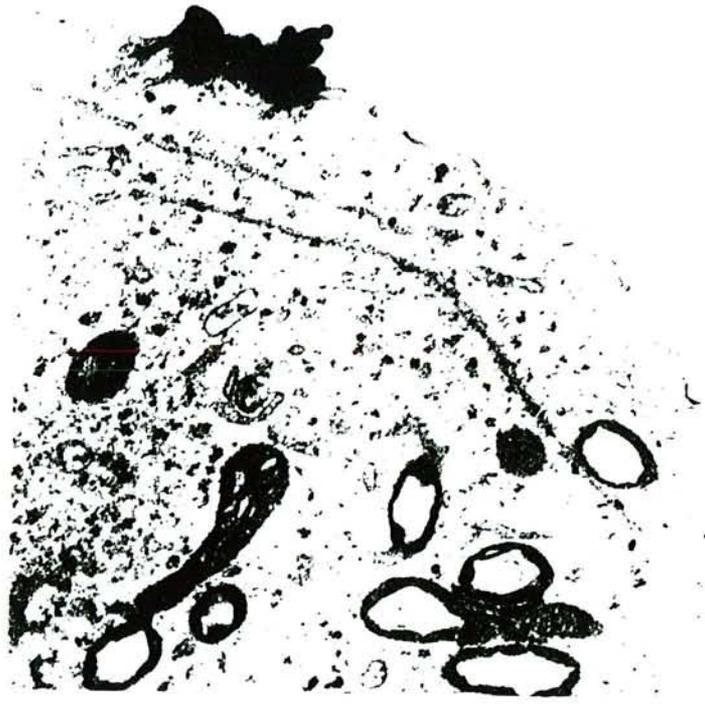
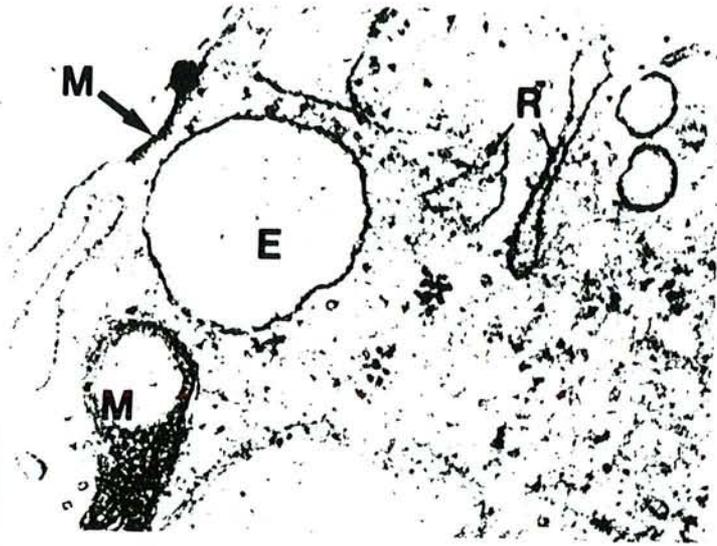


PLANCHE N°I.

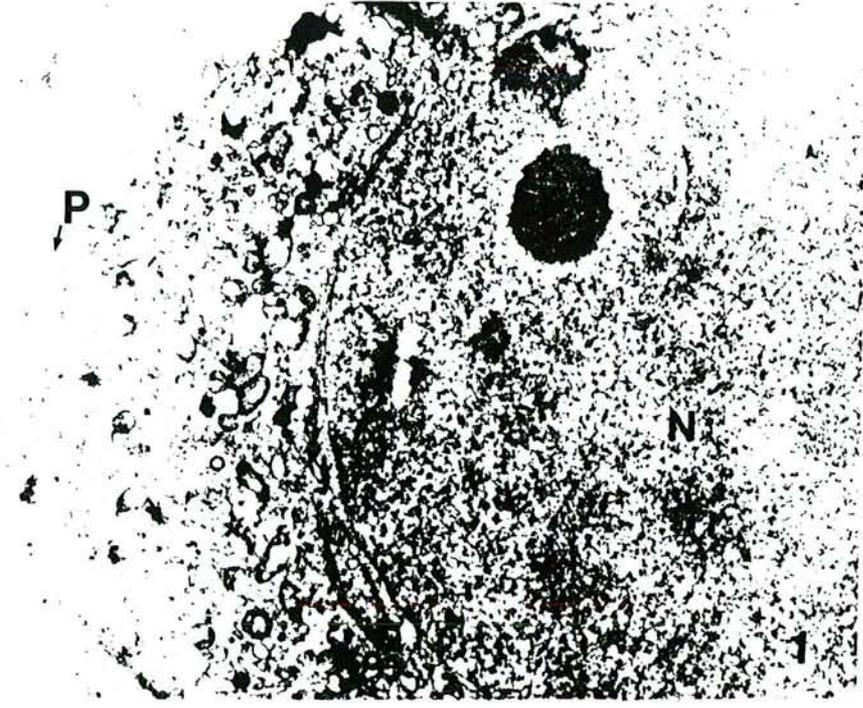
PLANCHE II : Cellules germinales humaines

- Photo n°1 : On note la présence des grains d'argent au niveau de la membrane plasmique (révélation microdol) après 15 minutes d'incubation sur un spermatocyte pachytène incubé avec de l'ABP marquée par photoaffinité. (N = noyau, P = membrane plasmique).
- Photo n°2 : La source radioactive est présente au niveau d'un endosome (E) après 20 minutes d'incubation avec de l'ABP marquée (0,5 µg) sur une spermatide ronde. Le marquage semble associé avec la membrane périphérique de cet endosome (G = Golgi, N = noyau, R = réticulum).
- Photo n°3 : Les grains d'argent sont localisés dans le cytoplasme profond, après 30 minutes d'incubation, au voisinage de l'enveloppe nucléaire sur un pachytène spermatocyte avec de la SBP humaine (30ng), (E = enveloppe nucléaire, N = noyau).

P

N

1

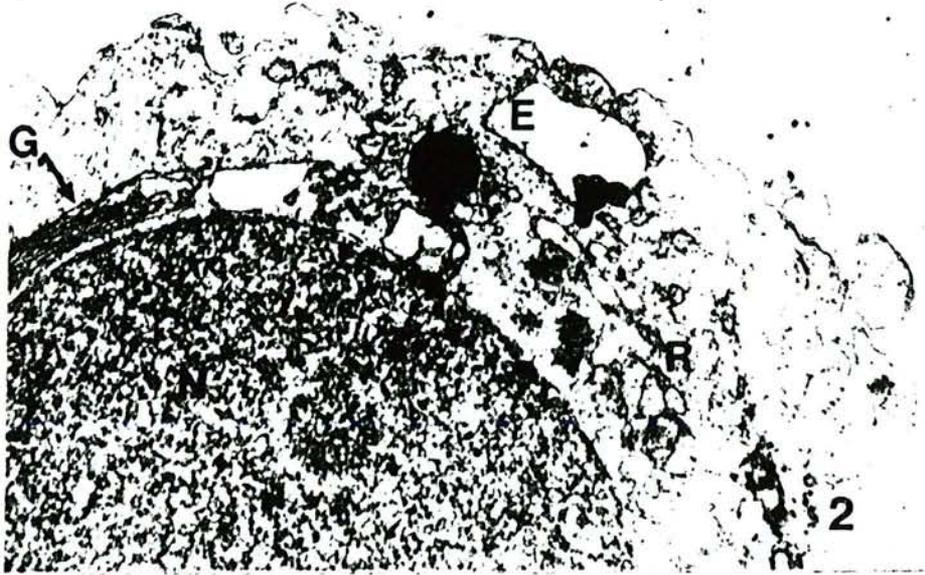


G

E

R

2



3

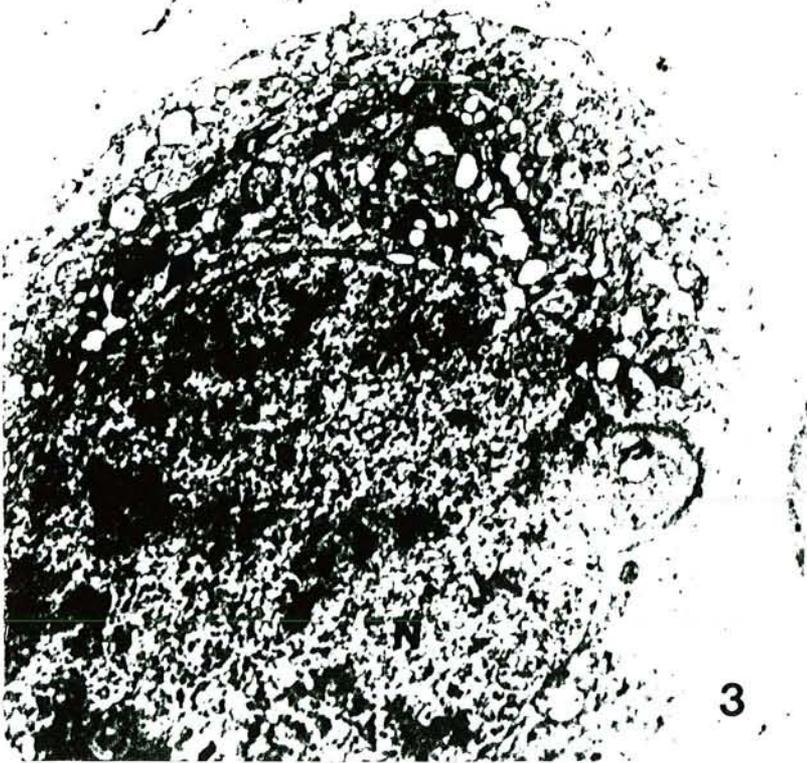


PLANCHE N°II.

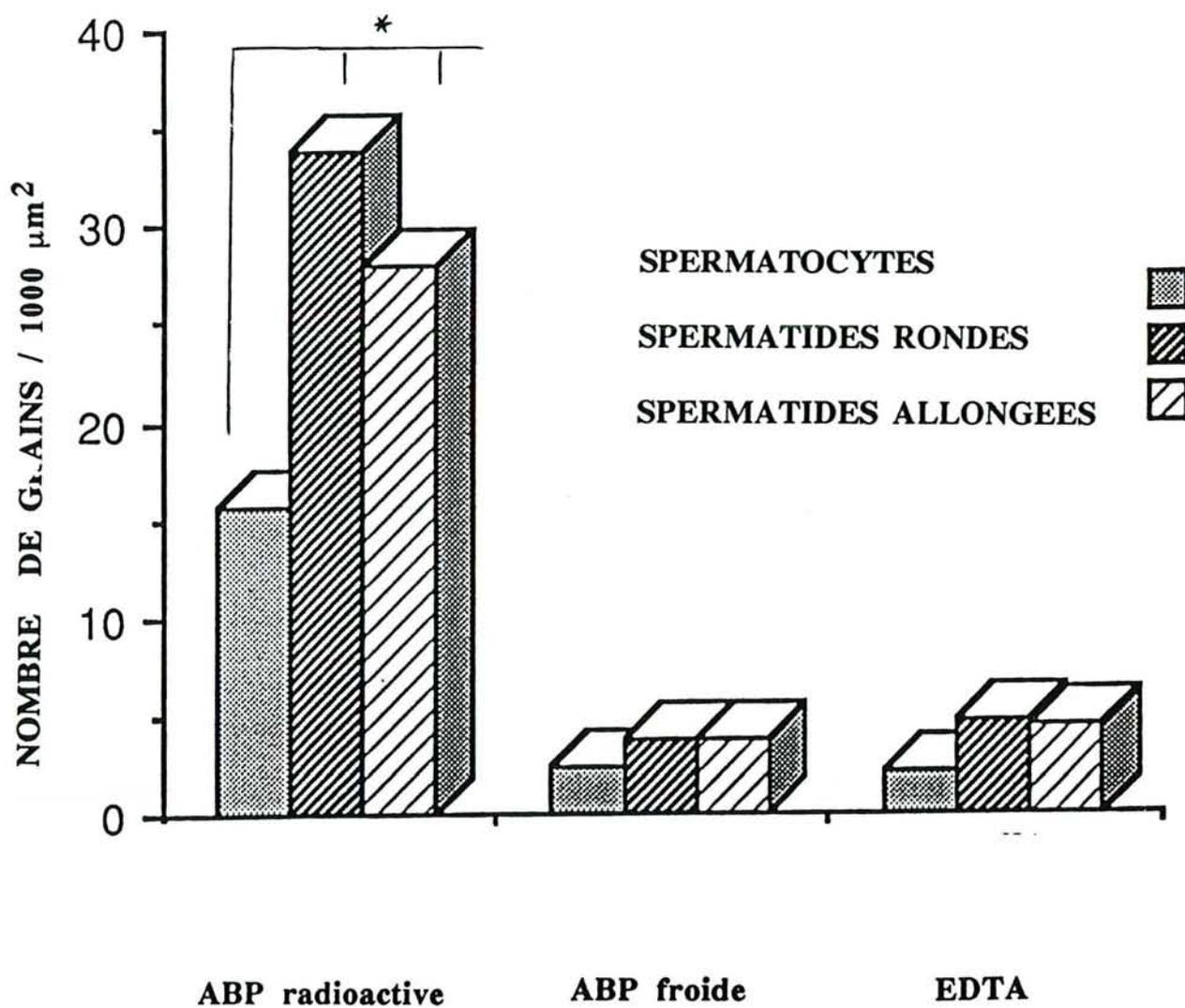


Figure n° 23 : Comparaison de la densité de marquage par unité de surface dans les différents stades de développement de la lignée germinale chez le rat. (* $p < 0,01$).

4.2.4. Discussion

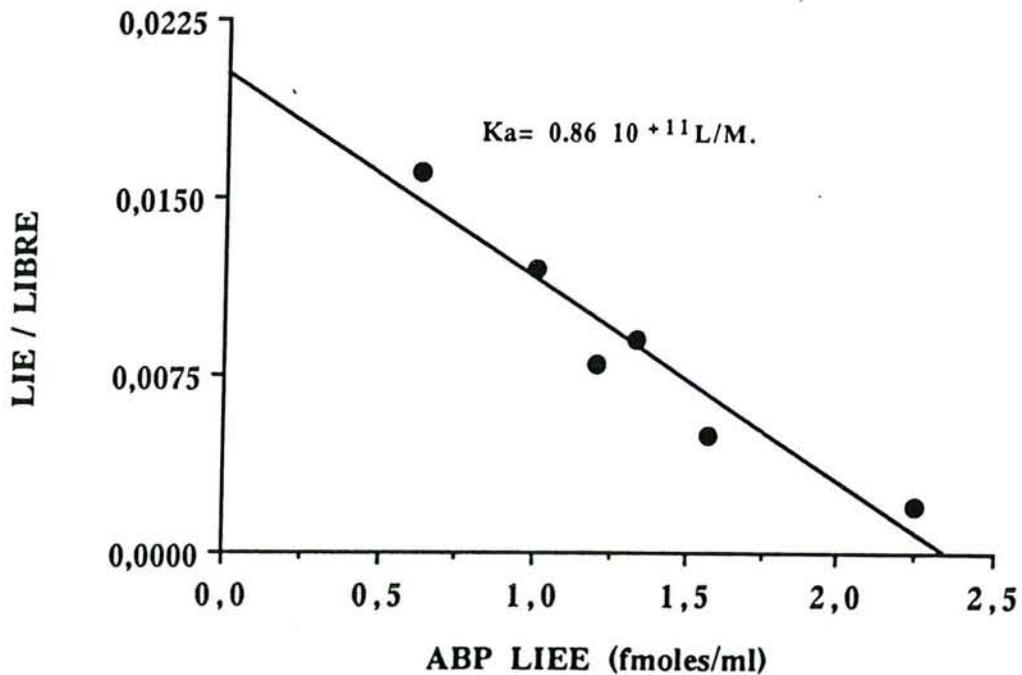
Les résultats obtenus confirment la liaison membranaire de l'ABP de rat, et de la SBP humaine, sur la lignée germinale de rat et chez l'homme. L'incubation de ces cellules avec un excès d'ABP froide, 30 minutes à + 4°C avant l'incorporation de la protéine marquée, montrent que l'endocytose de l'ABP est spécifique. L'ajout d'EDTA (4µM) inhibe fortement la liaison membranaire de l'ABP sur la cellule et confirme le caractère calcium-dépendant, comme cela avait été montré dans les études biochimiques précédentes (figure n°23). Après incubation des cellules germinales avec la protéine radioactive, des grains d'argent sont associés au niveau de puits recouverts (photo 1, planche 1) et des vésicules recouvertes (photo 2, planche 2) chez le rat et chez l'homme. On note, plus tardivement, un marquage au niveau de l'appareil de Golgi (photo 3, planche 1) et au niveau périnucléaire dans les deux lignées (photo 4, planche 1 ; photo 3, planche 2). On n'observe aucune localisation lysosomiale de l'ABP au cours de son transport intracellulaire. La radioactivité observée ne peut être due à un relargage de stéroïde marqué puisque le marquage de la protéine est de type covalent.

Toutes ces observations sont en faveur d'une internalisation spécifique au niveau de la lignée germinale de ces deux espèces, comme cela avait déjà été démontré dans la cellule principale épидидymaire pour l'ABP (Gérard et coll, 1988a) et dans la lignée germinale du singe pour la SBP (Gérard et coll, 1991). La figure n°23 nous montre la localisation prédominante du marqueur intracellulaire au cours de la spermiogénèse, statistiquement plus élevée dans les spermatides que dans les spermatocytes. Il n'existe pas de différence significative entre les deux types de spermatides. (Ce résultat est évalué en nombre de grains radioactifs/unité de surface cellulaire). L'action de l'EDTA ne permet plus de noter de différence significative. Cette étude est en cours de publication et les résultats obtenus chez l'homme sont très récents.

En conclusion, il existe une incorporation, par endocytose spécifique, de l'ABP et de la SBP dans la lignée germinale de différentes espèces de mammifères.

4.2.5. ETUDE PRELIMINAIRE DE LA LIAISON DE L'ABP SUR DES PREPARATIONS DE NOYAUX DE LA LIGNEE GERMINALE DE RAT

Au cours de cette étude préliminaire, nous avons incubé des quantités croissantes d'ABP marquée par photoaffinité (0,5 à 1,5 pmoles) en présence d'aliqouts de préparation de noyaux de cellules germinales décrits précédemment. Après une heure d'incubation, nous avons centrifugé la préparation (2500 g pendant 15 min) et le culot de noyaux à été lavé trois fois avec un tampon tris-HCl (20mM) pH 7,4 contenant 1 mM de CaCl₂. L'analyse par la représentation de Scatchard (1949), de la radioactivité des culots nucléaires obtenus est représentée ci-dessous.



Cette figure nous montre une liaison spécifique de l'ABP sur les fractions nucléaires de cellules germinales avec une constante d'association de $0,86 \cdot 10^{11} \text{ L/M}$. La méthode de préparation utilisée est incomplète et nécessiterait une étape supplémentaire de séparation entre les enveloppes et le matériel nucléaire pour étudier la localisation exacte du site de liaison. Cette étude est en cours.

V. ACTIONS DES ACIDES GRAS LIBRES SUR LA LIAISON DE LA DIHYDROTESTOSTERONE A L'ABP EPIDIDYMAIRE (Publication VI).

5.1. But du travail

Un certain nombre de travaux ont montré que les acides gras libres (AGL) pouvaient jouer un rôle important dans le transfert de l'information hormonale en modulant les propriétés de liaison des protéines de transport de stéroïdes telle que l'AFP murine (Valette et Coll., 1989), la CBG (Martin et Coll., 1988) et la SBP sérique (Martin et Coll., 1986). Ainsi, suivant les rapports de concentrations AGL/protéine, les lipides sont capables, *in vitro* et même *in vivo*, d'induire un changement conformationnel de ces protéines de liaison conduisant soit à une potentialisation, soit à une inhibition de la liaison à l'hormone. Nous avons donc, dans une première partie, évalué quantitativement et qualitativement les AGL d'un extrait épидидymaire de rat adulte car nous avons observé, au cours des étapes de préparation de l'extrait, une forte concentration en lipides. Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'effet des différentes classes d'AGL, à doses physiologiques, sur la liaison de la dihydrotestotérone tritiée à l'ABP épидидymaire de rat.

5.2. Résultats

Le dosage quantitatif des AGL d'un extrait épидидymaire montre un taux environ vingt fois supérieur ($89,75 \pm 20,5$ nmole/mg de protéine) à celui trouvé dans le sérum de rat ($5,29 \pm 1,18$ nmole/mg de protéine). La composition qualitative des différentes classes indique que 60% des AGL retrouvés au niveau épидидymaire sont insaturés (tableau 1). Nous avons réalisé des études de liaison de l'extrait épидидymaire vis-à-vis de différentes concentrations de DHT tritiée en présence, ou absence, d'AGL. La liaison du stéroïde est altérée en fonction de la dose, du degré d'insaturation et de la longueur de la chaîne carbonée de l'AGL étudié (figure n°1). La concentration d'AGL insaturé (acide arachidonique...) nécessaire pour provoquer 50% d'inhibition de la liaison de l'extrait épидидymaire est 10^5 fois plus importante que l'effet produit par de la DHT non radioactive. L'allure générale de ces droites d'inhibition en fonction des doses d'AGL ajoutées est en faveur d'une inhibition de type non-compétitive (Korenman, 1969).

Les paramètres de liaison de la DHT à l'extrait épидидymaire ont été étudiés par la représentation de Scatchard (1949) en absence, ou en présence, d'acide oléique (C 18:1) ou d'acide arachidonique (C 20:4) (figure n°2). En absence d'AGL, un seul type de liaison spécifique du stéroïde à l'extrait (après correction de Rosenthal (1967)) est retrouvé avec une constante d'affinité de $1,7 \pm 0,2 \text{ nM}^{-1}$ soit $1,39 \pm 0,11 \text{ pmole}$ de DHT/mg de protéine. En présence de $5 \mu\text{M}$ de C 18:1 ou de C 20:4, il n'y a pas de modification sensible du K_a , mais une réduction importante de la capacité de liaison ($0,88$ et $0,69 \text{ pmole}$ de DHT/mg pour l'acide oléique et l'acide arachidonique, respectivement).

L'étude de l'inhibition de la liaison du stéroïde par une représentation de Dixon, à deux concentrations différentes d'extrait épидидymaire, montre une constante d'inhibition (K_i) de $4 \mu\text{M}$ pour le C 20:4 et de $20 \mu\text{M}$ pour le C 18:1 (figures 2 A-B).

5.3. Discussion

Cette étude a montré une concentration totale en AGL vingt fois supérieure dans un extrait épидидymaire à celle trouvée dans le sérum de rat. Une action inhibitrice de type non compétitive, dose dépendante, est observée sur la liaison de la DHT à l'extrait épидидymaire. Les AGL polyinsaturés sont des inhibiteurs plus efficaces que les monoinsaturés et que les saturés.

Ce travail est important pour l'étude des interactions "protéine-stéroïde" du point de vue local régional. En effet, ces résultats ont été obtenus à doses physiologiques d'AGL épидидymaire. Au voisinage d'une cellule cible, en fonction de la concentration et du type d'AGL provenant d'activités lipasiques membranaires stimulées, la protéine de liaison va se trouver dans des états conformationnels différents, favorisant, ou non, la liaison du stéroïde à cette dernière. Il est alors possible que cet environnement lipidique puisse également moduler la reconnaissance de la protéine par son récepteur membranaire et/ou son internalisation. Nous avons observé (publication III) que la liaison du récepteur à l'ABP était beaucoup plus faible dans la partie caudale épидидymaire. Cette différence pourrait être due non pas à une diminution du nombre de sites de liaison mais aux changements qualitatifs et/ou quantitatifs de l'environnement lipidique le long du tractus épидидymaire. Des études de liaison membranaire de l'ABP en présence de différentes classes d'AGL sont actuellement en cours.

FREE FATTY ACID-INDUCED ALTERATIONS IN THE STEROID-BINDING
PROPERTIES OF RAT ANDROGEN-BINDING PROTEIN

Franck FELDEN ^{1,2}, Marie-Elise MARTIN ¹, Jean-Louis GUEANT ²,
Claudine BENASSAYAG ¹ and Emmanuel A. NUNEZ ^{*1}

1. INSERM U 224, Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine
Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris Cedex

2. INSERM U 308, Laboratoire de Biochimie Nutritionnelle,
Faculté de Médecine, Université de Nancy I, 54505 Vandoeuvre-
lès-Nancy Cedex, France

* To whom all correspondence should be addressed

SUMMARY

The free fatty acid (FFA) concentration in the epididymal cytosol of the adult rat was found to be 20-fold higher than in the serum. The binding of [³H] dihydrotestosterone to epididymal rat androgen binding protein (rABP) was modified by physiological concentrations of saturated and unsaturated fatty acids. Polyunsaturated fatty acids inhibited the binding more efficiently than monounsaturated or saturated fatty acids. Scatchard analysis and Dixon plots indicated that the number of binding sites decreased in presence of unsaturated fatty acids with an inhibition constant (K_i) of 4 μM for arachidonic acid (C20:4) and 20 μM for oleic acid (C18:1). These results indicate that unsaturated fatty acids induce alterations in rABP steroid-binding properties that could modulate the endocrine function of rABP.

INTRODUCTION

Androgen-binding protein (ABP) was first found in the rat Sertoli cells (1) but has now been found in the epididymis of several species, including humans (2-6). ABP specifically binds 5 α DHT with high affinity, and may play a role in the intraluminal transport of androgens in the male reproductive tract, and in sex differentiation (7-8). Thus, any factor that can alter this steroid-protein interaction may significantly influence the delivery of hormonal information to target cells. There is considerable evidence that exogenous or locally released free fatty acids (FFA) modify the functional properties of several steroid carrier proteins, including human SBP (9-11) which is structurally and genetically similar to rABP (12-14). The present study analyses the content FFA of epididymal cytosol to evaluate the influence of FFA on the DHT binding to epididymal rABP. The data indicate that FFA, mainly unsaturated FFA, inhibit the binding of steroid rABP. This could be of considerable significance, since rABP interacts specifically with receptors in the plasma membrane of

epididymal epithelial cells (15-16), where locally released FFA could modulate the delivery of steroid information to target cells.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals. [1.2.4.5.6.7. ^3H] dihydrotestosterone (100 Ci/mmoles) was purchased from Amersham International Ltd (Amersham, U.K.). Unlabelled dihydrotestosterone and fatty acids (stearic, oleic, linoleic, arachidonic and docosahexaenoic) were purchased from Sigma (St Louis, MO) and stored in hexane/benzene (95/5). Sephadex G25 superfine and LH20 were obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden).

Preparation of epididymal cytosol. Male Wistar rats (200-250 g) were killed by cervical dislocation and the testes removed. The epididymes were dissected from the surrounding fat, testis and connective tissue and minced with scissors at 4° C. They were homogenized in ice cold 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1 mM CaCl_2 and 1.5 mM EDTA with a tissue/buffer ratio (w/v) of 1/2 in an Ultra-Turrax mixer (Labortechnik, Germany). The homogenate was centrifuged at 15,000 g for 2 hours at 4° C and the supernatant filtered through glass wool. ABP was precipitated from the epididymal extract by adding 0.36 g/ml ammonium sulfate. The mixture was stored for 12 h and centrifuged at 15,000 x g for 2 h at 4° C. The pellet was dialysed against 20 volumes of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1 mM CaCl_2 and was concentrated 20-fold in an Amicon YM-10 membrane. Total protein concentration was 7 ± 2 mg/ml.

Protein determination. Protein concentration was measured by the method of Bradford (17) using rat serum albumin (1 mg/ml) as standard.

Serum free fatty acid (FFA) extraction and gas chromatography analysis. Heptadecanoic acid was added to the epididymal extracts and serum samples as an internal standard. Each sample (0.5 ml) was extracted three times with 5 ml organic solvent (ethyl acetate : cyclohexane, v/v) and the aqueous phase was removed by freezing (- 20° C). The organic extracts were pooled, evaporated to dryness, taken up in 0-5 ml chromatography solvent (benzene : ethanol, 95:5) and placed on Sephadex LH20 microcolumns (0.5 x 6 cm). FFA were eluted with 3 ml of solvent. Extracts were evaporated to dryness and methylated in boron trifluoride-methanol (Merck, Germany). The methylated fatty acids were chromatographed on a Packard Chrompack-Chromatograph, model 439 (Chrompack, France) using a capillary column (WCOT Fused Silica CP-sil-8 CB, 25 x 0.32 mm). The initial column temperature was 50° C (for the first 5 min) and increasing thereafter by 35° C/min for 3 min, 3° C/min for 17 min, and 10° C/min to 290° C. The peak area ratio of each FFA from plasma extracts and C17:0 were compared to the peak area of each FFA standard and C17:0.

DHT binding analysis. Batchwise gel equilibration with Sephadex G25 was used to separate bound (B) and unbound (U) ligand (18).

Each study used a series of tubes containing 0.2 g G25 and 100,000 cpm of [^3H]-DHT (1.37 pmoles) in 2 ml 0.06 M phosphate buffer pH 7.4. An epididymal protein concentration were chosen to give B/U values close to 1. Each tube was incubated for 1h at 20° C and an aliquot of the supernatant counted. For competition studies, increasing concentrations of the competitor (FFA) were added in organic solvent evaporated to dryness, mixed and shaken with buffer overnight at 4° C before other reagents and proteins were added. The solubility of the FFA was 95 % at the concentration used. The partition coefficient for DHT across the G25 phase was unchanged by the presence of FFA. All the epididymal preparations were treated with activated charcoal (5 %) for 1 h at 30° C just before the binding test in order to eliminate endogenous steroids and FFA. The absence of endogenous steroids and FFA was checked by RIA and Wako test (UNIPATH SA, Dardilly, France). The association constant (K_a) and the total number of binding sites were estimated by Scatchard analysis (19). Rosenthal correction (20) was applied to eliminate non specific binding. The inhibition constant of the competitor was calculated from a Dixon plot.

RESULTS.

FFA pattern of rat epididymal cytosol. The FFA concentration was 20-fold higher in the epididymal cytosol (89.75 ± 20.5 nmole/mg, $n=5$) than in the serum of adult rats (5.29 ± 1.18 nmole/mg, $n=5$). The quantitative analysis of each class of FFA is shown in table 1, 60 % of FFA were unsaturated.

Effect of FFA classes on the DHT binding to epididymal cytosol.

Fig.1 shows the dose-dependent displacement of [^3H] DHT binding steroid-free, fat-free epididymal cytosol by physiological concentrations (5 nmol/mg to 152 nmol/mg) of saturated and unsaturated FFAs. Polyunsaturated FFA were more efficient than diunsaturated FFA and monounsaturated FFA better than saturated FFA. The concentration of polyunsaturated FFA needed for 50 % inhibition of [^3H] (DHT) binding to epididymal cytosol was 10^4 higher than that of unlabelled DHT. The non-parallel binding curves suggest that the inhibition of DHT binding is non competitive (21).

FFA-induced changes in the DHT binding parameters

The parameters (association constant K_a , and number of binding sites) for DHT binding to epididymal cytosol was studied at equilibrium by Scatchard analysis, with and without 5 μM oleic (C18:1) or arachidonic (C20:4) acids (figure 2). Non-specific binding was measured with 10^3 fold-excess of unlabelled DHT. In the absence of FFA, there was a single class of binding sites ($K_a = 1.7 \pm 0.2 \text{ nM}^{-1}$, $n=5$) and a maximum binding capacity of 1.39 ± 0.11 pmol DHT/mg protein. Oleic acid (5 μM) and/or arachidonic acid (5 μM) induced non significant changes in K_a , but notable reductions in binding capacity (0.88 pmol DHT/mg protein for arachidonic acid and 0.69 pmol DHT/mg protein for oleic acid).

Dixon plots (1/B (nM) versus FFA concentrations (μM), figure 3A-B) gave an inhibition constant (K_i) for arachidonic acid at

4 μM , 5 fold-higher than the K_i for oleic acid (20 μM). Thus, polyunsaturated fatty acids were more potent inhibitors than monounsaturated fatty acid, and the inhibition is apparently non-competitive.

DISCUSSION

FFA have been shown to modulate the steroid-binding properties of plasma carrier proteins (9-11,22). They induce changes in the physicochemical properties of human SBP, the major plasma androgen-carrier protein of most species, except rats (11). This study, describes the effect of classes of FFA on the binding properties of rABP, which is produced and secreted by testicular Sertoli cells (1). The 20-fold higher concentrations of FFA in rat epididymal cytosol than in the serum indicates that this FFA environment could influence DHT binding to rABP. Physiological concentrations of FFA inhibited the DHT-rABP interaction as a function of dose, chain length, and unsaturation. Polyunsaturated FFA are the most efficient competitors. The inhibition constant for arachidonic acid is 5-fold higher than that of oleic acid and the unsaturated FFA bring about a significant decrease in the number of binding sites (37 % for C18:1 and 50 % for C20:4) but came no change in the affinity constant.

This suggests that the inhibition is non-competitive and that the unsaturated FFA-rich environment induces conformational change in rABP, thus conditioning its binding activity. These in vitro findings may reflect the alterations induced by the high lipid environment of ABP in the epididymal tract, and could explain several changes in its receptor system recognition.

We have recently found that both rABP and hSBP are bound specifically by receptors in epididymal epithelial cells (15-16) and in rat spermatogenic cells (23). Specific rABP binding is significantly lower in the cauda than in the caput of the epididymis (30 %). These results may be correlated with qualitative and quantitative changes in the composition of the FFA environment as the rABP travels through the various parts of the epididymis (24).

Danzo and al. (25) have shown that differences in glycosylation are responsible for different physiological roles of rABP, such as receptor system recognition. Our results suggest that FFA may be also interfere.

In conclusion, FFA inhibit DHT binding to rat epididymal ABP, perhaps by inducing conformational changes in the protein. Local changes in the FFA environment and heterogeneity of the protein differences in glycosylation could form part of a multifactorial system influencing the specific uptake of both androgen carrier proteins (ABP and SBP) and thus modulating the steroid hormone message in the target cell.

REFERENCES

1. Hagenäs, L., Ritzen, E.M., Ploën, L., Hansson, V., French, F.S., and Nayfeh, S.N. (1975) *Mol. Cell. Endocrinol.* 2, 339-350.

2. French, F.S., and Ritzen, E.M. (1973) *Endocrinology* 93, 88-95.
3. Feldman, M., Lea, O.A., Petrusz, P., Tres, L.L., Kierszenbaum, A.L., and French, F.S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5170-5175.
4. Jegou, B., Dacheux, J.L., Garnier, D.H., Terqui, M., Colas, G., and Courot, M. (1979) *J. Reprod. Fertil.* 57, 311-318.
5. Carreau, S., Drodowsky, M.A., and Courot, M. (1979) *J. Endocrinol.* 85, 443-448.
6. Hsu, A-F., and Troen, P. (1978) *J. Clin. Invest.* 61, 1611-1619.
7. Danzo, B.I., Orgebin-Crist, M.C., and Toft, D.O. (1973) *Endocrinology* 92, 310-317.
8. Bardin, C.W., Musto, W.A., Gunsalus, G.L., Kotite, N., Chen, S.L., Larrea F. and Becker R.A. (1981) *Rev. Physiol.* 43, 189-198.
9. Martin, M.E., Benassayag, C., and Nunez, E.A. (1988) *Endocrinology.* 123, 1178-1186.
10. Vallette, G., Vranckx, R., Martin, M.E., Benassayag, C., and Nunez, E.A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 997, 302-312.
11. Martin, M.E., Vranckx, R., Benassayag, C., and Nunez, E.A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 2954-2959
12. Joseph, D.R., Adamson, M.C., and Kozak, C.A. (1991) *Cytogenet. Cell Genet.* 56, 122-124.
13. Joseph, D.R., Hall, S.H., Conti, M., and French, F.S. (1988) *Mol. Endocrinol.* 2, 3-13.
14. Hammond, G.L., Underhill, D.A., Rykse, H.M., and Smith, C.L. (1989) *Mol. Endocrinol.* 3, 1869-1876.
15. Guéant, J.L., Frémont, S., Felden, F., Nicolas, J.P., Gérard, A., Leheup, B., Gérard, H., and Grignon, G. (1991) *J. Molec. Endocr.* 7, 113-122.
16. Felden, F., Leheup, B., Frémont, S., Bouguerne, R., Egloff, M., Nicolas, J.P., Grignon, G. and Guéant, J.L. (1992) *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 42, 279-285.
17. Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
18. Pearlman, W.H., and Crepy, O. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 182-189.
19. Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.
20. Rosenthal, H.E. (1967) *Anal. Biochem.* 20, 525-532.
21. Korenman, G.S. (1969) *Steroids* 13, 163-177.
22. Haourigui, M., Thobie, N., Martin, M.E., Benassayag, C. and Nunez, E.A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 125, 157-165.
23. Felden, F., Guéant, J.L., Ennya, A., Gérard, A., Frémont, S., Nicolas, J.P., and Gérard, H. (1992) *J. Molec. Endocr.* 9, 39-46.
24. Radigue, C., Christeff, N., Martin, M.E., Benassayag, C., Soufir, J.C. and Nunez, E.A. Unpublished data.
25. Danzo, B.J., Black, J.H. and Bell, B.W. (1991) *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40, 821-831.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Displacement of [^3H] DHT from rat epididymal cytosol by FFA, measured by equilibrium dialysis. The results are plotted as percent [^3H] DHT bound to rat epididymal cytosol versus FFA and DHT concentrations. Epididymal cytosol (7.40 $\mu\text{g/ml}$) was incubated with [^3H] DHT (10^5 cpm = 1 nM) plus unlabelled DHT (0.5 - 25 nM) and each FFA (4.4 - 130 μM). The values are the means of three determinations.

Figure 2. Scatchard analysis of [^3H] DHT binding to rat epididymal cytosol in the presence of 5 μM C 18:1 (\bullet), 5 μM C20:4 (Δ) or in the absence of FFA (\circ). Steroid binding was calculated by gel equilibration and Rosenthal correction was used to determine specific rABP binding. Each point is the mean of triplicate assays.

Figure 3. Dixon plots of the inhibition of [^3H] DHT binding to rat epididymal cytosol. Measurements were performed with 640 $\mu\text{g/ml}$ (EE_1) and 900 $\mu\text{g/ml}$ (EE_2) of epididymal cytosol, in the presence of 5 μM oleic acid (A) and 5 μM arachidonic acid (B). The inhibition constant (K_i) was 20 μM for C18:1 and 4 $\mu\text{mol/l}$ for C20:4.

Table 1. FFA concentrations in rat serum and epididymal cytosol. Values are the means of five determinations.

FFA (nmole/mg)	SERUM (n=5)	EPIDIDYMAL EXTRACT (n=5)
Total	5.29±1.48	89.75±20.5
Saturated	1.32±0.01	35.9±2.7
Monounsaturated	1.24±0.11	31.95±0.99
Di-triunsaturated	1.99±0.17	14.00±2.3
Polyunsaturated	0.74±0.17	6.55±1.07

TABLE I

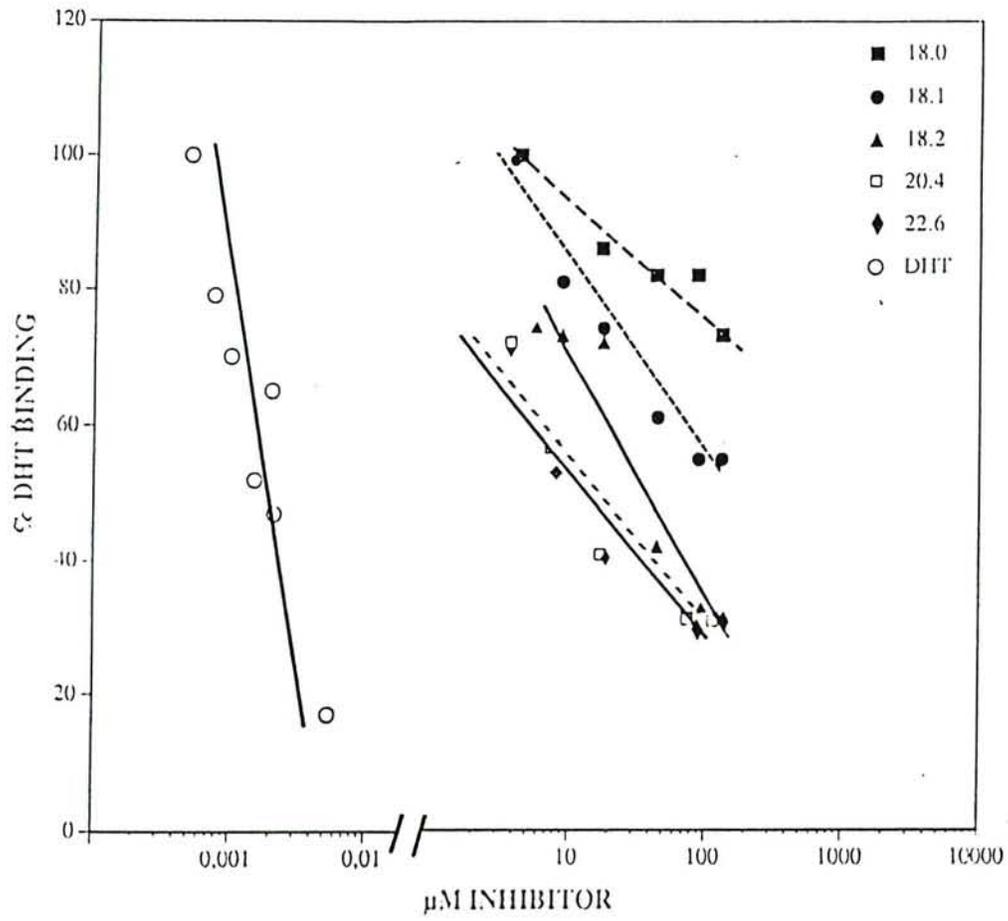
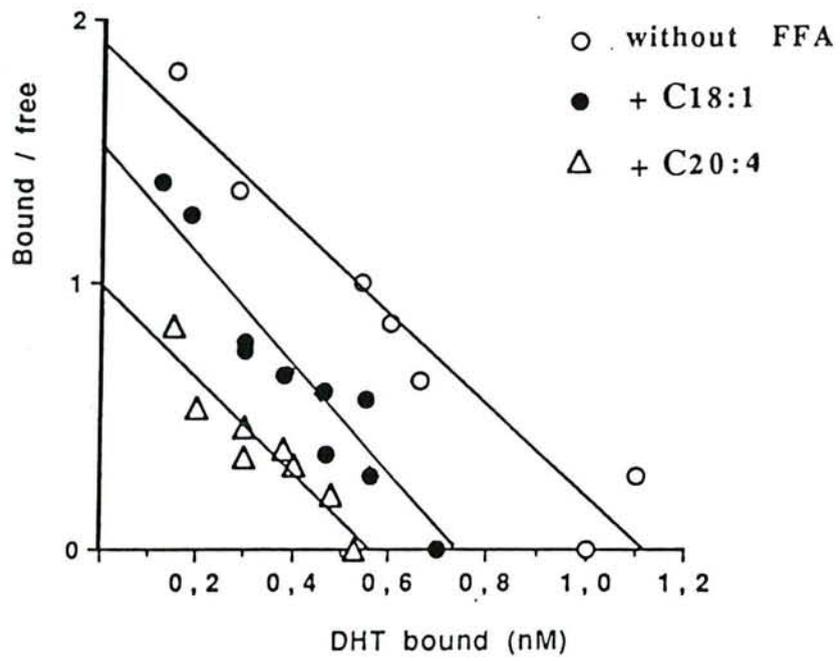


FIGURE N°1

**FIGURE N°2**

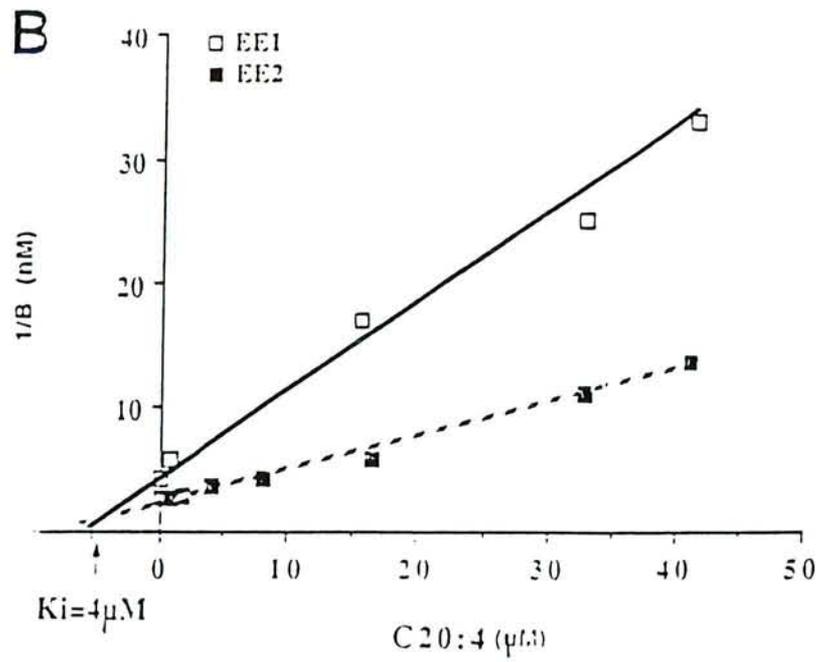
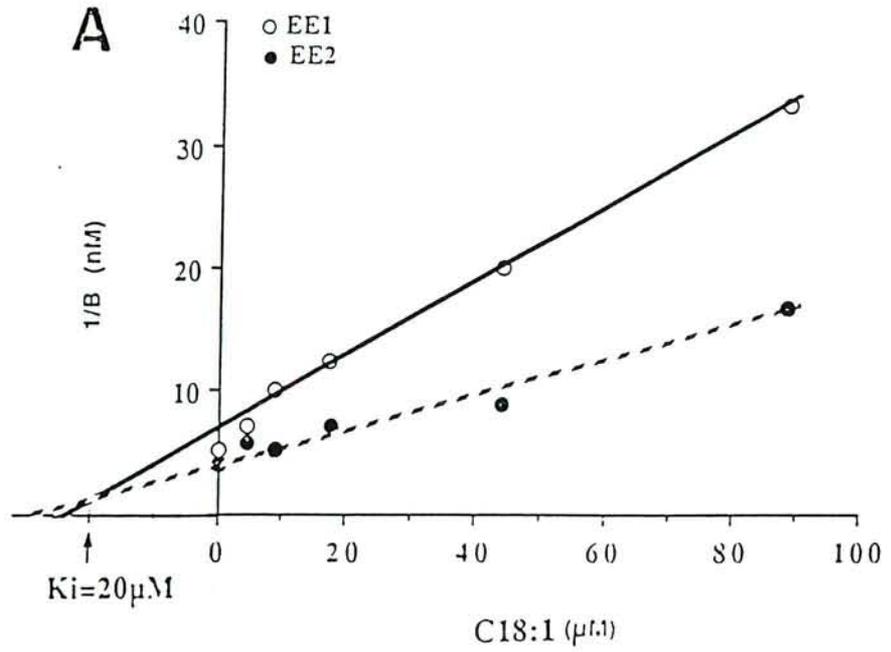


FIGURE N°3

DISCUSSION GENERALE

Les premières idées sur le transport sérique des hormones stéroïdiennes supposaient que seule la fraction libre (non liée aux protéines) de l'hormone pouvait diffuser au travers des capillaires et exercer une action biologique. La grande quantité de stéroïdes liés à des protéines non spécifiques (albumine) ou spécifiques (CBG, SBP...) était considérée comme biologiquement inerte et leur seul rôle consistait à réguler la fraction d'hormone libre. Les travaux de Partridge et Coll. (1981) ont montré que les stéroïdes liés à ces protéines pouvaient se dissocier et traverser les parois capillaires. Un certain nombre d'observations récentes, utilisant des méthodes biochimiques ou histologiques, démontrent clairement la présence de la CBG ou de la SBP dans différents tissus, au niveau intracellulaire et, qui plus est, ces protéines peuvent se lier de manière spécifique aux membranes plasmiques de certaines cellules cibles. L'étude de cette nouvelle fonction physiologique des protéines de transport des stéroïdes a suivi un cheminement logique depuis les premiers travaux de Bordin et Coll. (1980) sur l'immunolocalisation de la SBP dans différents tissus chez le singe.

Dans un premier temps, des études histologiques ont prouvé l'existence de ces protéines de liaison des stéroïdes dans le compartiment cellulaire, aussi bien pour la SBP et la CBG sériques (Egloff et coll., 1981; Hsu et coll., 1986) que pour l'ABP au niveau épидидymaire (Pelliniemi et coll., 1981). Dans un deuxième temps, il a été montré que les protéines plasmatiques se fixaient sur la membrane de cellules cibles sur des récepteurs spécifiques et / ou qu'elles étaient ensuite internalisées par endocytose spécifique (Hryb et coll., 1985; Hsu et coll., 1986; Porto et coll., 1991). Enfin, des travaux plus récents ont montré la génération de messagers secondaires (augmentation d'AMP_c intracellulaire) en réponse à la liaison de la protéine sur son site de liaison membranaire (Nakhla et coll., 1990) ce qui conférerait à ces molécules un rôle hormonal (Rosner et coll., 1988). La régulation de ces mécanismes est encore peu connue mais, d'après certains auteurs, la présence du stéroïde lié, ou non, à la protéine de liaison pourrait réguler la liaison membranaire du complexe (Hryb et Coll., 1990).

Afin d'étudier l'éventuelle généralisation de ce processus, nous avons examiné le cas de l'androgen-binding protein qui est, chez la plupart des espèces, la protéine de liaison tissulaire des stéroïdes au niveau du testicule et de l'épididyme. L'ABP est internalisée de façon spécifique au niveau des cellules principales de l'épididyme de rat (Gérard et Coll., 1988 a-b). Cette endocytose est certainement due à la présence d'un récepteur membranaire, comme le laisse supposer une étude préliminaire dans notre laboratoire (Guéant et Coll., 1988).

Au cours de ce travail, nous avons semi-purifié de l'ABP testiculaire de rat et de la SBP humaine, marquées de façon covalente par un stéroïde radioactif, sous l'effet d'une photoexcitation. Nous avons montré, pour cette protéine, qu'il existe des sites de liaison spécifiques au niveau membranaire dans la cellule principale épидидymaire. Ces récepteurs membranaires sont saturables, spécifiques et présentent une forte affinité pour la protéine. Une liaison maximale est observée à 4°C. L'analyse par la méthode de Scatchard (1949) montre qu'il existe deux types de sites de liaison épидидymaire, l'un de haute affinité dont la constante d'association est de 2,8 nM/l et l'autre de faible affinité avec un K_a de 67,9 nM/l. La SBP humaine, dotée d'une forte homologie structurale, est également capable de reconnaître le récepteur épидидymaire et de déplacer l'ABP liée à la membrane. Ce déplacement est spécifique puisque les autres protéines testées, comme la sérum albumine bovine ou la sérotransferrine, ne déplacent pas la liaison de l'ABP à la membrane.

Il existe une différence dans l'expression du site récepteur de l'ABP chez le rat immature (15 j.) et chez le rat adulte (60 j.). En effet, un seul type de site de liaison est retrouvé chez le rat mature et son affinité de liaison est plus faible que chez l'animal jeune ($K_a = 3,7$ nM/l). En utilisant différentes méthodes de dosage de l'ABP, il a été démontré que les taux d'ABP testiculaire et épидидymaire varient avec l'âge (Danzo et Coll., 1985). Au niveau épидидymaire, l'ABP n'est détectable que lorsque la communication anatomique entre le testicule et l'épididyme est établie, soit à 17 jours chez le rat. Enfin, il existe une augmentation de la concentration de la protéine jusqu'à 60 jours. Le dosage de l'ABP utilisé dans cette étude est réalisé par capacité de liaison avec un stéroïde radioactif. La double population de récepteurs retrouvée chez le rat de 15 jours pourrait s'expliquer par un rôle physiologique différent de celui de la liaison des androgènes à ce stade de développement. De plus, il a été montré récemment une homologie importante entre l'ABP de rat et deux protéines de structure des membranes basales: la laminine et la mérosine (Joseph et Coll., 1992).

La présence de la laminine est très précoce dans le développement foetal (Eklom, 1989) et elle joue un rôle très important dans le développement et la différenciation cellulaire (Martin et Coll., 1987). Il est alors tout à fait possible de penser que l'ABP puisse jouer un rôle similaire chez le rat impubère.

La caractérisation physicochimique de ce récepteur montre qu'il s'agit vraisemblablement d'une protéine, que la liaison est calcium-dépendante et maximale pour un pH proche de la neutralité. L'évaluation de sa masse moléculaire est incomplète et nous donne un agrégat protéique de 2000 Kda, beaucoup plus élevé que le récepteur de la SBP au niveau prostatique (Hryb et coll., 1989), ou pour la CBG au niveau rénal (Hsu et coll., 1986).

La deuxième partie de cette étude montre également la présence d'un site de liaison spécifique pour l'ABP de rat au niveau des cellules appartenant aux différents stades de la lignée germinale. Une étude préliminaire sur une population de pachytènes spermatocytes de rat avait montré l'existence de la liaison membranaire de l'ABP et de la transferrine (Steinberger et coll., 1984).

Notre étude confirme ce résultat en montrant que, premièrement, ce récepteur existe au niveau des différents stades de la lignée germinale et, deuxièmement, qu'il est spécifique. Il existe également une reconnaissance croisée du récepteur pour l'ABP de rat et la SBP humaine, comme au niveau épидидymaire. Les caractéristiques physicochimiques du site de liaison testiculaire sont très proches de celles retrouvées dans l'épididyme (tableau n°10). La constante d'association calculée par la représentation de Scatchard est la même que celle retrouvée par Steinberger. L'ABP marquée, par photoaffinité, à son stéroïde est capable de reconnaître son site de liaison membranaire épидидymaire ou testiculaire dans nos deux études. Ce résultat est en contradiction avec le modèle proposé par Hryb et Coll. (1990) où le stéroïde diminue l'affinité de la SBP sérique pour la reconnaissance du récepteur membranaire. En effet, dans cette étude il semble qu'au niveau de la prostate humaine seule la protéine insaturée soit capable de se lier au site de liaison membranaire et que le complexe ainsi formé présente une affinité élevée pour le stéroïde.

Nous avons ensuite étudié, par autoradiographie, la liaison et la cinétique de pénétration de l'ABP de rat et de la SBP humaine, marquées par photoaffinité, au niveau des cellules de lignée germinale. Cette étude confirme les résultats biochimiques. La présence du traceur est associée aux puits recouverts et vésicules recouvertes (photos 1 & 2) chez le rat. Cette liaison est spécifique car elle diminue significativement par préincubation des cellules avec de l'ABP froide. L'importance du calcium est également confirmée car l'EDTA diminue de façon très significative la liaison cellulaire du traceur. Après quinze à vingt minutes, les grains d'argent sont retrouvés au niveau golgien et au niveau juxtanucléaire. Ces observations sont en faveur d'une internalisation spécifique de la protéine car elle est marquée de façon covalente et le marquage observé ne peut pas être dû à la libération du stéroïde, comme c'était le cas avec la DHT tritiée, ou au relargage de l'iode 125 de la protéine. Les mêmes résultats ont été retrouvés de façon préliminaire chez l'homme et ils généralisent l'internalisation des protéines de liaison des androgènes dans la lignée germinale de différentes espèces (Gerard et coll., 1991). Si ces observations confirment la présence intracellulaire de l'ABP, son devenir et son rôle dans la cellule restent encore hypothétiques. En effet, dans notre étude l'ABP internalisée est saturée: ce résultat montre que la présence du stéroïde n'empêche pas la reconnaissance du récepteur, ni son endocytose, mais la modulation exercée par l'hormone n'a pas été étudiée en raison de sa liaison covalente artificielle dans notre protocole.

Au niveau intracellulaire, la présence de grains radioactifs de différents compartiments ne nous donne aucune indication sur le devenir du complexe "récepteur-protéine-hormone". En effet, il faudrait un double marquage de l'ABP et de l'hormone pour étudier leur devenir dans la cellule. Un séquençage du récepteur membranaire permettrait de localiser son devenir dans la cellule à l'aide d'anticorps spécifiques. Notre étude de cinétique de pénétration épидидymaire de l'ABP après micro-injections (publication II), à l'aide de poisons cellulaires permet d'émettre quelques hypothèses à ce sujet. La présence de grains d'argent en superposition de la membrane des endosomes et des corps multivésiculaires ainsi que la diminution significative de la liaison de l'ABP au récepteur à pH acide laissent supposer une dissociation du complexe "protéine- récepteur" dans le compartiment acide de la cellule. La chloroquine est capable de bloquer la pompe à proton et d'augmenter le pH des endosomes (de Duve et coll., 1974). L'augmentation significative du nombre de grains d'argent au niveau de la membrane des endosomes, après injection de chloroquine, pourrait correspondre au blocage de cette dissociation. Il est alors possible que le récepteur soit recyclé vers la membrane cellulaire, ou qu'il soit dégradé au niveau des lysosomes. Des expérimentations par fractionnements sub-cellulaires en présence de traceur internalisé sont nécessaire pour étudier si l'ABP est ou non dégradée dans le compartiment lysosomal des cellules principales épидидymaires. Il est de ce point de vue paradoxal que le marquage demeure en superposition des structures membranaires (photo 5, publication II) au niveau du compartiment acide de la cellule.

La cinétique de pénétration cellulaire montre une fixation à proximité de l'enveloppe nucléaire de la cellule. A partir de cette dernière observation, nous avons étudié la liaison de l'ABP sur une préparation de noyaux de cellules germinales et l'étude par représentation de Schatchard (1949) nous indique, de façon préliminaire, un site de liaison spécifique. La signification physiologique de ce phénomène reste à élucider car, dans notre étude, le stéroïde étant lié de façon covalente à l'ABP, il est difficile de savoir si le marquage à proximité du noyau est dû à la présence d'un récepteur pour la protéine ou pour l'hormone. Des études avec de l'ABP marquée à l'iode 125 seraient utiles pour confirmer l'existence d'une action potentielle de la protéine au niveau nucléaire.

L'ensemble de ces résultats sur l'ABP, protéine de liaison tissulaire des stéroïdes, généralise le processus décrit pour la SBP et la CBG au niveau plasmatique. Il existe toutefois un certain nombre de disparités dans les résultats publiés sur ces protéines sériques, ou tissulaires, car il n'y a pas de consensus général, ni de standardisation dans les protocoles utilisés. Le tableau n°10 nous donne un exemple des différentes conditions opératoires retrouvées dans les principaux travaux publiés sur la liaison spécifique "protéine de transport - récepteur membranaire".

TABEAU N° 10 : CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES RECEPTEURS AUX PROTEINES DE TRANSPORT DANS LES DIFFERENTS TISSUS CIBLES

PROTEINES DE TRANSPORT	MARQUAGE	TISSUS CIBLES	CARACTERISATION DU RECEPTEUR	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
CBG	Iode 125	Foie humain	Liaison 16h00 à + 4°, 2 types de sites, $K_D = 2 \cdot 10^{-8}$ et 10^{-10} mole/l, spécificité	Strel'chyonok et coll., 1983
	Iode 125	Prostate humaine	Liaison 6h00 à + 37°, 1 type de site, $K_D = 8,6 \cdot 10^{-7}$ mole/l, spécificité	Hryb et coll., 1986
	Iode 125	Rate de rat	Liaison 6h00 à + 37°, 1 type de site, $K_D = 8,6 \cdot 10^{-7}$ mole/l spécificité	Singer et coll., 1988
SBP	Iode 125	Endomètre humain	Liaison 16h00 à + 4°, 1 type de site, $K_D = 3,5 \cdot 10^{-12}$ mole/l, spécificité	Strel'chyonok et coll., 1984
	Iode 125	Prostate humaine	Liaison 6h00 à + 37°, 2 types de sites, $K_D = 1,5 \cdot 10^{-8}$ et $8,1 \cdot 10^{-6}$ mole/l	Hryb et coll., 1985
	Iode 125	Lignée MCF-7	Liaison 4h00 à + 37°, 1 type de site, $K_D = 3 \cdot 10^{-8}$ mole/l	Porto et coll., 1992
	Photo-affinité	Epididyme de rat	Liaison 1h00 à + 4°, 1 type de site, $K_D = 3,8 \cdot 10^{-10}$ mole/l	Felden et coll., 1992
ABP	Iodée	Pachytène Spermatoocytes de rat	Liaison 1h00 à + 34°, 1 type de site, $K_D = 0,8 \cdot 10^{-9}$ mole/l	Steinberger et coll., 1984
	Photo-affinité	Cellules germinales de rat	Liaison 1h00 à + 4°, 1 type de site, $K_D = 0,78 \cdot 10^{-9}$ mole/l	Felden et coll., 1992

En effet, la technique de purification de la protéine, les conditions d'obtention des cellules ou des préparations solubilisées de membranes, les études de liaison "protéine-récepteur" (T° , pH, temps d'incubation...), enfin les méthodes d'interprétation statistique des résultats sont très différentes d'une étude à l'autre. L'examen de ce tableau nous donne quelques indications intéressantes :

- la totalité des études réalisées jusqu'à présent utilisaient une protéine marquée à l'iode 125. Au cours de notre travail, nous avons utilisé une protéine marquée par photoaffinité.

- la labilité du marquage à l'iode et le traitement infligé aux protéines lors du radiomarquage peuvent interférer avec une bonne reconnaissance du récepteur membranaire. Seul le marquage par photoexcitation apporte la preuve que la protéine, saturée par son stéroïde, est capable de reconnaître les systèmes récepteurs. Les résultats obtenus avec l'ABP saturée sur l'épididyme et la lignée germinale montrent que la protéine est capable de reconnaître le récepteur membranaire,

- la différence de temps et de température pose un problème. Strel'chyonok et coll (1983-1984) travaillent toujours à $+4^\circ$ alors que le groupe de Rosner préfère 37° C. Cette dernière température ne permet pas d'observer uniquement une liaison car il peut, en même temps, se dérouler une internalisation modifiant alors les résultats obtenus. C'est pourquoi, dans l'ensemble de nos travaux, la température qui ne permet pas le processus d'internalisation ($+4^\circ$ C) a été choisie. Le temps d'incubation varie de 16 h (Strel'chyonok et coll., 1983) à 1 h. Ces différents temps ont été choisis logiquement grâce à une étude préalable de cinétique d'association - dissociation. La différence importante observée au cours de ces expérimentations peut venir de la méthode de purification de la protéine, ou du modèle cellulaire, mais il faut également étudier la présence de substances contaminantes dans le milieu réactionnel qui pourraient augmenter, ou diminuer, la liaison,

- les caractéristiques de la liaison étudiée par analyse de Scatchard (1949) montrent des coefficients de dissociation (Kd) variant de 10^{-8} à 10^{-12} mole/l. Ces valeurs sont donc le reflet d'une grande affinité de la protéine utilisée sur les membranes du tissu cible. Notre étude dans l'épididyme nous donne des valeurs de Kd proches de la nanomole (10^{-9} à 10^{-10}). Ces résultats indiquent que l'ABP possède des sites de haute affinité dans l'épididyme de rat et que la SBP humaine présente une affinité plus importante dans l'épididyme que dans le tissu prostatique (Hryb et coll., 1985). Au niveau de la lignée germinale de rat, les résultats obtenus sont identiques,

- la spécificité de la liaison est toujours retrouvée dans l'ensemble des études, avec des préincubations de différentes protéines montrant que le système récepteur est spécifique, notamment de celui observé par Sylvester et coll. (1984) ou Holmes et coll. (1983) dans les testicules de rat, pour la transferrine.

Le(s) rôle(s) physiologique(s) exact(s) de ce mécanisme d'endocytose par récepteur de protéines de liaison des stéroïdes est encore inconnu. Selon l'hypothèse de Rosner (1990), la SBP sérique, par l'intermédiaire de son stéroïde, active un second messenger intracellulaire par la liaison membranaire du complexe. Ce second messenger, également activé par la CBG (Nakhla et coll., 1990) au niveau de certaines cellules, est une augmentation intracellulaire d'AMPc. Le processus, activé par les protéines de liaison, pourrait les rapprocher d'un mécanisme hormonal (groupe 2A) alors que le stéroïde seul diffuse dans la cellule pour se lier à un récepteur cytosolique ou nucléaire (groupe 1). Il semble donc que, dans une même cellule, la pénétration du stéroïde puisse se faire selon deux voies différentes mais il n'est pas sûr que le message hormonal transmis lors de ces deux processus aboutisse à la même réponse physiologique pour la cellule.

Aucune étude similaire du second messenger n'a, jusqu'à présent, été réalisée au niveau tissulaire avec l'ABP dans l'épididyme ou le testicule.

La modulation de la reconnaissance du récepteur à la protéine de liaison des stéroïdes est également hypothétique. Si Hryb et coll. (1990) supposent l'action directe du stéroïde (cf. précédemment), il existerait un certain nombre d'autres facteurs de régulation.

L'environnement lipidique modifie les propriétés des protéines de liaison plasmatiques des stéroïdes aussi bien pour la CBG que pour la SBP (Martin et coll., 1986-1988). Cette modulation a été retrouvée dans le sens d'une potentialisation, ou d'une inhibition, de la liaison selon le type de protéine et selon la classe d'AGL.

Il n'y avait aucune étude de ce genre au niveau tissulaire, dans l'épididyme et le testicule, pour l'ABP vis-à-vis de son stéroïde. L'analyse qualitative et quantitative des AGL épидидymaires a montré un taux vingt fois supérieur à celui trouvé dans le sérum de rat. Les AGL polyinsaturés sont en quantité neuf fois supérieure au taux sérique. Une inhibition de type non compétitive est provoquée par les AGL, surtout polyinsaturés, dans la liaison de la dihydrotestostérone à l'ABP épидидymaire. Il est alors possible de concevoir que les AGL puissent favoriser, ou défavoriser, la reconnaissance par le récepteur membranaire et/ou l'internalisation de l'ABP. En effet, la libération d'AGL par différentes lipases membranaires pourrait, par exemple, induire un changement conformationnel spécifique de l'ABP qui permettrait une activation, ou une inhibition, de la reconnaissance par la protéine du site de liaison membranaire. Une étude de l'influence des AGL sur la reconnaissance du récepteur épидидymaire de l'ABP est actuellement en cours.

Récemment, Danzo et Coll. (1991) ont proposé une autre possibilité de régulation. En effet, la copule glucidique de l'ABP est différente dans l'épididyme, le testicule ou au niveau sérique, pour une même espèce. Le rôle fonctionnel de ces différences structurales post-transductionnelles n'est pas encore connu. Il semble désormais acquis que les résidus glucidiques n'influencent pas la liaison du stéroïde à l'ABP. Une confirmation de cette hypothèse est en cours de réalisation à l'aide d'une protéine recombinante entièrement déglycosylée (Petra et Coll., résultats non publiés).

Il semble, toutefois, que ces différences qualitative et quantitative en carbohydrates pourraient avoir une action spécifique sur la reconnaissance du récepteur membranaire. Cette hypothèse n'a pas encore été démontrée pour les protéines de liaison des stéroïdes mais elle semble bien établie dans d'autres modèles hormonaux (Ryan et Coll., 1987).

En définitive, il ne paraît pas exister une voie unique de régulation mais un certain nombre de facteurs liés, par exemple, à la présence, ou non, du stéroïde, à l'environnement lipidique spécifique ou à la différence de composition de la copule glucidique, qui pourraient appartenir à un modèle complexe multifactoriel de régulation de la reconnaissance du récepteur membranaire par la protéine de liaison des stéroïdes.

En conclusion, l'ABP tissulaire possède un récepteur membranaire spécifique au niveau de l'épididyme et du testicule chez le rat. La liaison "protéine-récepteur" est suivie d'un processus spécifique d'internalisation. Au niveau intracellulaire, la protéine est localisée dans différents compartiments et pourrait même reconnaître un site de liaison périnucléaire. Le récepteur membranaire pourrait subir un recyclage mais les devenir intracellulaires de l'ABP et de son stéroïde sont encore totalement incompris. L'environnement lipidique, au niveau locorégional de la protéine, pourrait influencer sur ce processus. La figure n°24 résume les principales hypothèses de l'interaction de l'ABP avec sa cellule cible. Ce modèle protéique tissulaire généralise les résultats trouvés avec les protéines de liaison plasmatique des stéroïdes.

Le mécanisme d'action de ces molécules présente une dimension physiologique entièrement nouvelle dans le cheminement et le transfert, extrêmement complexes, du message hormonal à sa cellule cible.

CONCLUSION GENERALE
PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons semi-purifié de l'ABP testiculaire de rat et de la SBP sérique humaine par photoaffinité et chromatographie liquide haute performance.

Nous avons démontré la liaison spécifique de l'ABP sur la cellule principale épидидymaire et sur les cellules de la lignée germinale testiculaire. Cette liaison ne peut être déplacée que par la SBP humaine préparée dans les mêmes conditions.

Il s'agit donc d'un site de liaison membranaire spécifique aux protéines de liaison des androgènes.

L'internalisation au niveau testiculaire de l'ABP dans les cellules appartenant aux différents stades de maturation de la lignée germinale de rat et, de façon préliminaire, chez l'homme, nous montre l'existence d'un mécanisme d'endocytose spécifique par récepteur de même nature que celui précédemment décrit au niveau de la cellule principale épидидymaire.

La modulation de la liaison membranaire de l'ABP chez le rat dépend de l'âge de l'animal et, vraisemblablement, de la composition locorégionale qualitative et quantitative en acides gras libres.

L'ensemble de ces résultats laisse supposer, au niveau tissulaire, un rôle actif de l'ABP dans ses tissus cibles et apporte un double intérêt futur :

- au niveau fondamental: pour comprendre le message métabolique transmis par l'hormone liée à sa protéine de liaison par rapport à l'hormone stéroïde seule et/ou l'action potentielle de la protéine seule.

- au niveau clinique: la présence de récepteurs aux protéines de liaison des stéroïdes a été retrouvée dans des tissus sains, mais également dans des lignées ou des tissus tumoraux (Porto et coll., 1991-1992, Fortunati et coll., 1991, Nakhla et coll., 1990, Reventos et coll., 1990). Une nouvelle approche thérapeutique pourrait ainsi être envisagée (anticorps anti-récepteurs) s'il s'avérait que la SBP, par exemple, augmentait la croissance et/ou la différenciation de la tumeur (sein, prostate). L'homologie de l'ABP et de la SBP avec la laminine (Joseph et coll., 1992) pourrait laisser supposer que ces protéines aient un rôle à jouer dans la prolifération métastatique comme cela a été montré pour la laminine dans certains cancers tels que les tumeurs du colon (Felden et coll., 1991).

Ces hypothèses sont autant de sujets d'études pour nos futurs projets de recherche.

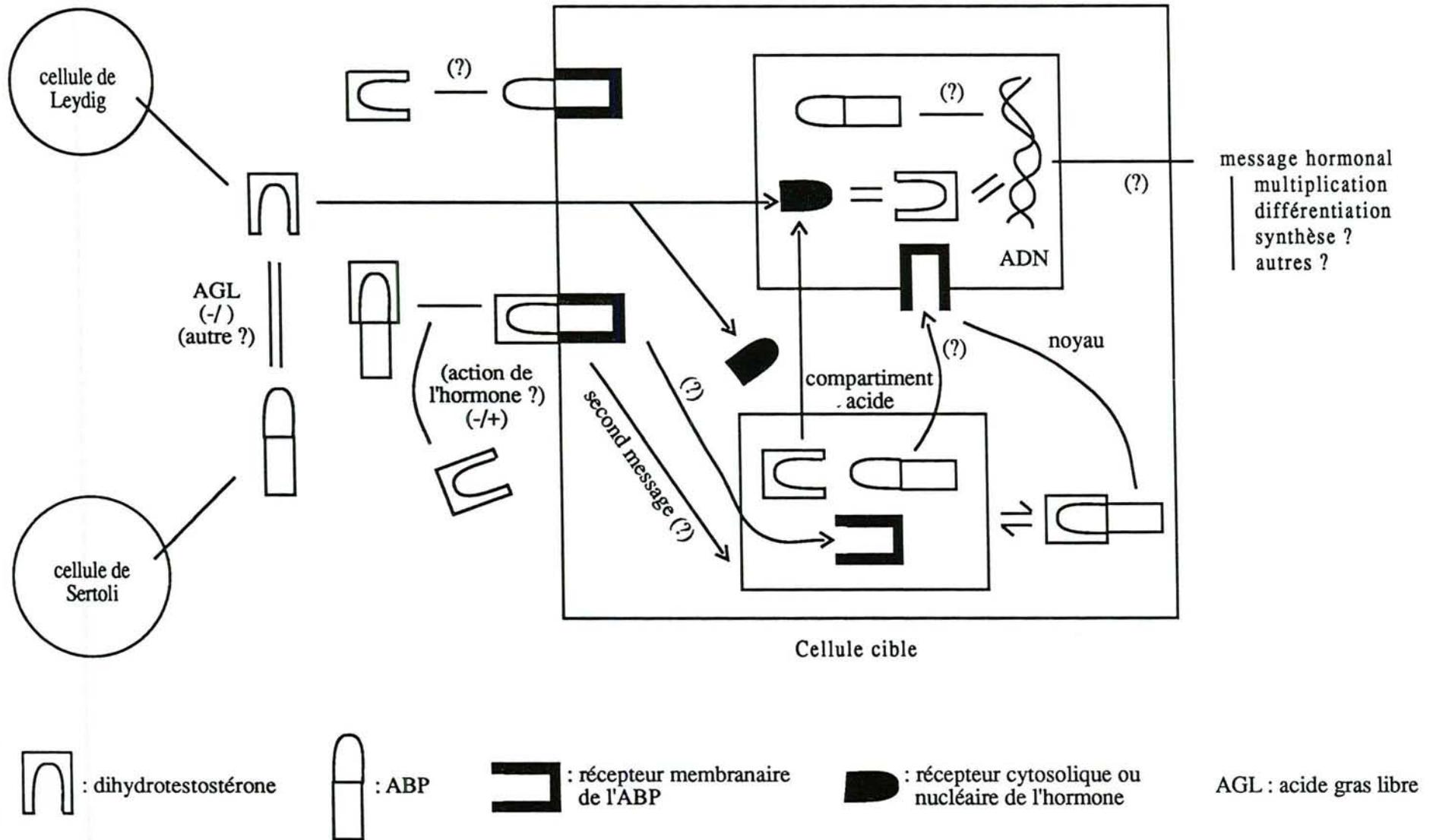


Figure n° 24 : Hypothèses du cheminement de l'ABP, depuis son lieu de synthèse jusqu'à sa cellule cible (cellule principale épидидymaire ou cellule de la lignée germinale).

BIBLIOGRAPHIE

ABDEL MALAK G., CARREAU S., THIBIER M., DRODOWSKY M.A. (1982)

Androgen binding protein in the seminal plasma of post pupertal bull.

In : Cell biology of the testes, C.W. Bardin et R.J. Iherins (eds), 383, pp 479-480.

ABRAHAMSON D.R., RODEWALD R. (1981)

Evidence for the sorting of endocytic vesicle contents during the receptor - mediated transport of IgG across the newborn rat intestine.

J.Cell. Biol 91, 270-280.

ADASHI E.Y., RESNICK C.E., SVOBODA M.E., VAN WYK J.J. (1986)

Somatomedin - C as an amplifier of Follicle - stimulating hormone action : Enhanced accumulation of adenosine 3', 5' - mono - phosphate.

Endocrinology 118, 149-155.

AISEN P., LISTOWSKY I. (1980)

Iron transport and storage proteins.

Annu. Rev. Biochem. 49, 357-393.

ALEXANDER L., FAMULARE A.J., WORTHY T.E. (1985)

Evaluation of an immunoradiometric Assay for measurement of Sex Hormone - Binding Globulin.

Clin. Chem. 31, 964-971.

ANDERSON D.C.(1974)

Sex-hormone binding globulin.

Clin.Endocrinol. 3, 69-96.

ANDERSON P., YIP Y.K., VILCEK J. (1982)

Specific binding of ^{125}I -human interferon-gamma to high affinity receptors on human fibroblasts.

J.Biol. Chem. 257, 11301-11304.

ANDERSON R.G., GOLDSTEIN J.L., BROWN, M.S. (1976)

Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73 : 2434-2438.

- ANTHONY C.T., DANZO B.J., ORGEBIN-CRIST M.C. (1984)
Investigations on the relationship between sperm fertilizing ability and androgen-binding protein in the restricted rat.
Endocrinology 114, 1413-1418.
- ASHWELL G., HARFORD J. (1982)
Carbohydrate specific receptors of the liver.
Annu. Rev. Biochem. 51, 531-554.
- ATTRAMATAL A., BARDIN C.W., GUNSALUS G.L., MUSTO N.A., HANSSON V. (1981).
Immunocytochemical localization of androgen binding protein in rat Sertoli and epididymal cells.
Biol. Reprod. 25, 983-988.
- AU C.L., WONG P.Y.D. (1980)
Luminal acidification by the perfused rat cauda epididymis.
J.Physiol. 309 : 419-427.
- AVVAKUMOV G.L., ZHUK.N.I., STREL'CHYONOK O.A. (1986)
Subcellular distribution and selectivity of the protein-binding component of the recognition system for sex-hormone binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium.
Biochim.Biophys.Acta 882, 143-151.
- AYER LE LIEVRE C., OLSON L., EBENDAL T., HALLBÖÖK F., PERSSON H. (1988)
Nerve growth factor in mRNA and protein in the testis and epididymis of mouse and rat.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85, 2628-2632.
- BAKER M.E., FRENCH F.S., JOSEPH D.R. (1987)
Vitamin K-dependent protein S is similar to rat androgen - binding protein.
Biochem. J. 243, 293-296.
- BARBEY P., HERROU M., NOUVELOT A., DRODOWSKY M.A. (1990)
Partial purification of androgen binding protein from bull epididymis
J.Steroid Biochem. 35, 307-311.

BARDIN C.W., GUNSALUS G.L., MUSTO N.A., CHENG C.Y., REVENTOS J., SMITH C., UNDERHILL D.A., HAMMOND G. (1988)

Corticosteroid binding globulin, testosterone - estradiol binding globulin, and androgen - binding protein belong to protein families distinct from steroid receptors.

J.Steroid Biochem. 30, 131-139.

BARDIN.C.W., LIPSETT.M.B.(1967)

Testosterone and androstenedione blood production rates in normal women with idiopathic hirsutism and polycystic ovaries.

J.Clin.Invest. 46, 891-902.

BARDIN C.W., MUSTO N.A., GUNSALUS G.L., KOTITE N., CHENG S.L., LARREA F., BECKER R. (1981)

Extracellular androgen binding proteins.

Annu. Rev. Physiol. 43 : 189-198.

BECKER R.R., GUNSALUS G.L., MUSTO N.A., BARDIN C.W. (1984)

The epididymis contributes minimally to serum androgen-binding protein in the rat : a whole body kinetic study.

Endocrinology 114 : 2354-2360.

BEDFORD J.M. (1975)

Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis. In : Hamilton D.W., Greep R.O., eds. Handbook of physiology : V. male reproductive system. Washington, DC : American Physiology Society 5 : pp. 303-318.

BEGUINOT L., HANOVER J.A., ITO S., RICHERT N.D., WILLINGHAM M.C., PASTAN I. (1985)

Phorbol esters induce transient internalization without degradation of unoccupied epidermal growth factor receptors.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82, 2774-2778.

BERUDE D., SERALINI.G.E., GAGNE. R., HAMMOND.G.L.(1990)

Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13).

Cytogenet.Cell genet. 54, 65-67.

BLAQUIER J.A., CAMEO M.S., CHARREAU E. (1970)

Comparative uptake of androstenediol, testosterone and dihydrotestosterone by tissues of the male rat.

J.Steroid. Biochem. 1 : 327-334.

BÖHLEN P., ESCH F., BAIRD A., GOSPODAROWICZ D. (1985)

Acidic fibroblast growth factor (FGF) from bovine brain : Amino terminal sequence and comparison with basic FGF.

EMBO J. 4, 1951-1956.

BOMBEL M., PRYDZ K., PARTON R.G., GRUENBERG J., SIMMONS K. (1989)

Endocytosis in filter - grown Madin - Darby canine kidney cells.

J.Cell. Biol. 109, 3243 - 3258.

BORDIN S., PETRA PH. (1980)

Immunocytochemical localization of the sex steroid-binding protein (SBP) of plasma in tissues of the adult monkey, *Macaca nemestrina*.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 5678-5682.

BORDIN S., TORRES R., PETRA P.H. (1982)

An enzyme - Immuno Assay (ELISA) for the Sex Steroid - binding Protein (SBP) of human Serum.

J.Steroid Biochem. 17, 453-457.

BRADFORD. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Analyt.Biochem. 72, 248-254.

BRANCA A.A., SLUSS P.M., SMITH R.A., REICHERT L.E. (1985)

The subunit structure of the follitropin receptor : chemical cross - linking of the solubilized follitropin receptor complex.

J.Biol. Chem. 260, 9988-9993.

BREITFIELD P.P., CASSANOVA J.E., SIMISTER N.E., ROSS S.A., Mc KINNON W.C., MOSTOV K.E. (1989)

Transepithelial transport of immunoglobulins : A model of protein sorting and transcytosis.
Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. 1, 257-262.

BRETSCHER M.S. (1989)

Endocytosis and recycling of the fibronectin receptor in CHO cells.
EMBO J. 8, 1341-1348.

BRETSCHER M.S., THOMSON J.N., PEARSE B.M.F. (1980)

Coated pits act as molecular filters.
Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 77, 4153-4156.

BROWN M.S., GOLSTEIN J.L. (1986)

A receptor - mediated pathway for cholesterol homeostasis.
Science 232, 34-47.

BRIEN T.G. (1981)

Human corticosteroid binding globulin.
Clin. Endocrinol. 14, 193-207.

BROWN V.I., GREENE M.I. (1991)

Molecular and cellular mechanisms of receptor - mediated endocytosis.
DNA and cell Biology 10, 399-409.

BURKE C.W., ANDERSON D.C. (1972)

Sex - hormone binding globulin is an estrogen amplifier.
Nature 240, 38-42.

CARPENTER G., COHEN S. (1979)

Epidermal growth factor.
Annu. Rev. Biochem. 48, 193-216

CARREAU S., DRODOWSKY M.A., COUROT M. (1979)

Age related effects on Androgen binding Protein (ABP) in sheep testis and epididymis.
Int. J. Androl. 2, 49-61.

CARREAU S., DRODOWSK M.A., PISSELET C., COUROT M. (1980)

Hormonal regulation of androgen binding protein in lamb testis.

J.Endocrinol 85, 443-448.

CASALI E., PETRA P.H., RUSS J.B. A. (1990)

Fluorescence investigation of the sex steroid binding protein of rabbit serum : steroid binding and subunit dissociation.

Biochemistry 29, 9334 - 9343.

CARSON D.D., LENWARZ W.J. (1983)

Vitamin A deprivation Selectively lowers uridine nucléotide pools in cultured Sertoli cells.

J.Biol. Chem. 258, 1632-1636.

CHANNING C.P., GORDON W.L., LIU V.K., WARD D.N. (1985)

Mini review : Physiology and biochemistry of ovarian inhihin.

J.Biol. Med. 178, 339-361.

CHEN W.J., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. (1990)

NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit - mediated internalization of the low density lipoprotein receptor.

J.Biol. Chem. 265, 3116 - 3123.

CHENG C.Y., BARDIN C.W., MUSTO N.A., GUNSALUS G.L., CHENG S.L., GANGULY - M. (1983)

Radioimmunoassay for human testosterone - estradiol - binding - globulin in humans. A reassessment of normal values.

J.Clin. Endocrinol. Metab. 56, 68-75.

CHENG C.Y., GUNSALUS G.L., MORRIS I.D., TURNER T.T., BARDIN C.W. (1986)

The heterogeneity of rat androgen binding protein (rABP) in the vascular compartments differs from that in the testicular tubular lumen : further evidence for bidirectional secretion of rABP.

J.Androl. 7, 175-179.

CHENG C.Y., MUSTO N.A., GUNSALUS G.L., BARDIN C.W. (1985)

The role of the carbohydrate moiety on the size heterogeneity and immunologic determinants of human testosterone - estradiol - binding globulin.

J.Steroid Biochem. 22, 127-134.

CHENG S.L., MUSTO N.A. (1982)

Purification and characterization of ABP from rabbit epididymis.

Biochemistry 21, 2400-2405.

CHENG C.Y., GRIMA J., STAHLER M.S., GUGLIELMOTTI A., SILVESTRINI B.,
BARDIN C.W. (1990)

Sertoli cell synthesizes and Secretes a protease inhibitor, α 2 - macroglobulin.

Biochemistry 29, 1063-1067.

CIECHANOVER A., SCHWARTZ A.L., LODISH H.F. (1983)

The asialoglycoprotein receptor internalizes and recycles independently of the transferrin and insulin receptors.

Cell 32, 267-275.

CONTI M., MONACO L., GEREMIA R., STEFANINI M. (1986)

Effect of phosphodiesterase inhibitors on Sertoli cell refractoriness : Reversal of the impaired androgen aromatization.

Endocrinology 118, 901-908.

CORVOL P., BARDIN C.W. (1973)

Spécies distribution of testosterone - binding globulin.

Biol. Reprod. 8, 277-282.

CORVOL P.L., CHRAMBACH A., RODBARD D., BARDIN C.W. (1971)

Physical properties and binding capacity of testosterone estradiol binding globulin in human plasma determined by polyacrylamide gel electrophoresis.

J.Biol. Chem. 246, 3435-3443.

DAHLBÄCK B., HILDEBRAND B. (1983)

Degradation of human complement component C4b in the presence of the C4b-binding protein - protein S complex.

Biochem. J 209, 857-863

DANZO B.J., BELL B.W. (1988)

The microheterogeneity of androgen binding protein in rat serum and epididymis is due to differences in glycosylation of their subunits.

J.Biol. Chem. 263, 2402-2408.

DANZO B.J., BELL B.W., BLACK J.H. (1989)

Human testosterone - binding globulin is a dimer composed of two identical promoters that are differentially glycosylated.

Endocrinology 124, 2809 - 2817.

DANZO B.J., BLACK J.H. (1990)

Analysis of the oligosaccharides on rat androgen - binding protein using social lectin chromatography.

Biol. Reprod. 43, 219-228.

DANZO B.J., BLACK J.H., BELL B.W. (1991)

Analysis of the oligosaccharides on androgen - binding proteins : implications concerning their rôle in structure /function relationship.

J.Steroid. Biochem. Molec. Biol. 40, 821-831.

DANZO B.J., ELLER B.C. (1985)

The ontogeny of biological active ABP in rat plasma, testis and epididymis.

Endocrinology 117, 1380-1388.

DANZO B.J., ELLER B.C., ORGEBIN - CRIST M.C. (1974)

Studies on the site of origin of the androgen - binding protein present in epididymal cytorol from mature intact rabbits.

Steroids 24, 107-122.

DANZO B.J., TAYLOR J.C.A., ELLER B.C. (1982)

Some physicochemical characteristics of photoaffinity-labeled rabbit testosterone-binding globulin.

Endocrinology 111, 1278-1285.

DATTATREYAMURTY B., RATHNAM P., SAXENA B.B. (1983)

Isolation of the luteinizing hormone - chorionic gonadotropin receptor in high yield from bovine corpora lutea.

J.Biol. Chem. 258, 3140-3158.

DAUGHADAY W.H., BREMER R., HARNETT-COLLINS C., (1956)

Binding of corticosteroids by plasma proteins. Dialysis equilibrium and renal clearance studies.

J.Clin. Invest 35, 1428-1433.

DAYHOFF M.O., BARKER W.C., HUNT L.T. (1983)

Establishing homologies in protein sequences.

Methods Enzym. 91, 524-545.

DE DUVE C., DEBARSKY T., POOLE B.(1974)

Lysosomotropic agents.

Biochem. Pharmacol. 23, 2495-2498.

DE JONG F.H., ROBERTSON D.M. (1985)

Inhibin : Update on action and purification

Mol. Cell. Endocrinol. 42, 95-103.

DORRINGTON J.H., FRITZ I.B. (1975)

Cellular localization of 5-alpha reductase and 3-alpha hydroxy steroid deshydrogenase in the seminiferous tubule of the rat testis.

Endocrinology 96, 879-889.

DORRINGTON J.H., ROLLER N.F., FRITZ I.B (1975)

Effects of follicle - stimulating hormone on cultures of Sertoli cell preparations.

Mol. Cell. Endocrinol. 3, 57-70.

DUN.J.F., MERRIAM.G.R., EIL.C., KONO.S., LORIAUX.D.L., NISULA.B.C.(1980)

Testosterone-estradiol binding globulin binds to 2-methoxyestradiol with greater affinity than to testosterone.

J.Clin.Endocrinol.Metab.51, 404-406.

DYM M., FAWCETT D.W. (1970)

The blood - testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium

Biol. Reprod. 3, 308-326.

EGLOFF M.

Contribution à l'étude biochimique et immunologique de la protéine liant les hormones sexuelles.

Thèse d'état de sciences pharmaceutiques de Paris VI, 1982.

EGLOFF M., VRANCKX R., TARDIVEL - LACOMBE J., DEGRELLE H. (1981)
 Immunochemical characterization and quantification of human sex steroid - binding plasma protein.
 Steroids 37, 455-462.

EIKVAR L., LEVY F.O., ATTRAMADAL H., JUTTE N.H.P., FROYSA A., TVERMYR S.M., HANSSON V. (1985)
 Glucagon - stimulated cyclic AMP production and formation of oestradiol in Sertoli cell cultures from immature rats.
 Mol. Cell. Endocrinol. 39, 107-114.

EKLOM.P.(1989)
 Developmentally regulated conversion of mesenchyme to epithelium.
 FASEB J.3, 2141-2150.

ESTOUR.B., PUGEAT.M., LANG.F.,DECHAUD.H.,PELLET.J., ROUSSET. .(1986)
 Sex hormone binding in women with anorexia nevrosa.
 Clin.Endocrinol. 24, 571-576.

FAWCETT D.W. (1975)
 Ultrastructure and function of the Sertoli cell.In : Hamilton DW, Creep RO (eds). Handbook of physiology, vol. 5, Sec 7, pp. 21-25.

FINE R.E., OCKLEFORD C.D. (1984)
 Supramolecular cytology of coated vesicles.
 Int. Rev. Cytol. 91, 1-43.

FEIG L.A., BELLVE A.R., ERICKSON N.H., KLAGSBRUN M. (1980)
 Sertoli cells contain a mitogenic polypeptide.
 Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 4774-4778.

FELDEN F.
 Préparation d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'Androgen-binding protein testiculaire de rat obtenue par une méthode semi-préparative en chromatographie liquide haute performance.
 Mémoire de D.E.A de l'Université de Nancy I, 1988.

FELDEN F., RENKES P., FREMONT S., CHAMBRE J.F., CHAMPIGNEULLE B., GAUCHER P., GUEANT J.L. (1991)

Serum laminin P1 in metastatic colon carcinoma.

Clin. Chem. 37, 1795-1796.

FELDMANN M., LEA O.A., PETRUSZ P., TRES L.L., KIERSZENBAUM A.L., FRENCH F.S. (1981)

Androgen - binding protein : Purification from rat epididymis, characterization and immunochemical localization.

J.Biol. Chem. 256, 5170-5175.

FERLUND P., GERSHAGEN S., (1990)

2-Iodoestradiol binds with high affinity to human sex-hormone binding globulin (SHBG).

J.Steroid Biochem. 36, 75-81.

FERNLUND P., GERSHAGEN S., KJELLBERG M., RANNEVICK G. (1984)

Electro - immunoassay of Sex hormone binding globulin. Enhanced Sensitivity by autoradiography using A - ring 125-I-17 Beta - oestradiol

Scand J. clin. Lab. Invest. 44, 25-31.

FERNLUND P., LAURELL C.B. (1981)

A simple two-step procedure for the simultaneous isolation of corticosteroid binding globulin and sex hormone binding globulin from human serum by chromatography on cortisol - sepharose and phenyl - sepharose.

J.Steroid Biochem. 14, 545-552.

FORTUNATI N., FISSORE F., FAZZARI A., BERTA L., GIUDICI M., FRAIRIA (1991).

Sex steroid-binding protein interacts with a specific receptor on human premenopausal endometrium membrane: Modulating effect of estradiol.

Steroids, 56, 341-346.

FORTUNATI N., FRAIRIA R., FISSORE F., BERTA L., FAZZARI A., GAIDANO G. (1992)

The receptor for human sex steroid binding protein (SBP) is expressed on membranes of neoplastic endometrium.

J.Steroid Biochem. Molec. Biol. 42, 185-191.

FREE M.J., JAFFEE R.A. (1979)

Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation.
Biol. Reprod. 20, 269-274.

FREMONT S.

Internalisation epididymaire recepteur-dependante de l'Androgen-binding protein testiculaire chez le rat.

Thèse de doctorat de l'Université de Nancy I, 1988.

FRENCH F.S., RITZEN E.M. (1973)

A high affinity androgen binding protein (ABP) in rat testis : evidence for secretion into efferent duct fluid and adsorption by epididymis.
Endocrinology 93, 88-95.

FRIEND D.F., FARQUHAR M.G. (1967)

Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens.
J.Cell. Biol. 35, 357-376.

FRITZ I.B., ROMMERTS F.G., LOUIS B.G., DORRINGTON J.H. (1976)

Regulation by follicle stimulating hormone and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen - binding protein in Sertoli cell-enriched cultures.
J.Reprod. Fertil. 46, 17-24.

GALDIERI M., MONACO L., STEFANINI M. (1984)

Secretion of androgen binding protein by Sertoli cells is influenced by contact with germ cells.
Int. J. Androl. 5, 409-416.

GEIGER D., CARPENTIER J.L., GORDON P., ORCI L. (1989)

Down - regulation of insulin receptors is related to insulin internalization.
Exp.Cell Res. 185, 33-40.

GERARD A., EGLOFF M., GERARD H., EL HARATE A., DOMINGO M., GUEANT J.L.,
DANG D.C., DEGRELLE. (1990)

Internalization of human sex steroid - binding protein in the monkey epididymis.
J.Molec. Endocrinol. 5, 239-251.

GERARD A., ENNYA. A., EGLOFF M., DOMINGO M., DEGRELLE H., GERARD H. (1991)

Endocytosis of human sex steroid - binding protein in monkey germ cells.

Ann. N.Y. Acad. Sci (USA) 637, 258-271.

GERARD A., KHANFRI J., GUEANT J.L., FREMONT S., NICOLAS J.P., GRIGNON G., GERARD H. (1988a)

Electron microscope radioautographic evidence of in vivo androgen-binding protein internalization in the rat epididymis principal cells.

Endocrinology 122, 1297-1307.

GERARD H., GUEANT J.L., GERARD A., EL HARATE A., FREMONT S., NICOLAS J.P., GRIGNON G. (1988b)

L'endocytose de l'androgen-binding protein (ABP) par les cellules principales de l'épididyme chez le rat.

Reprod.Nutr. Dev 28, 1257-1266.

GERSHAGEN S., FERNLUND P., LUNDWALL A. (1987)

A cDNA coding for human sex hormone binding globulin. Homology to vitamin K-dependent protein S.

FEBS lett. 220, 129-135.

GERSHAGEN S., HENNINGSSON K., FERNLUND P. (1987)

Subunits of human sex hormone binding globulin. Inter-individual variation in size.

J.Biol. Chem. 262, 8430-8437.

GERSHAGEN S., LUNDWALL A., FERNLUND P. (1989)

Characterization of the human sex hormone - binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis.

Nucleic Acid. Res. 17, 9245-9258.

GEUZE H.J., SLOT J.W., STROUS G.J.A.M. (1983)

Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: Double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis.

Cell 32, 277-287.

GOLDSTEIN J.L., ANDERSON R.G.W., BROWN M.S. (1979)

Coated pits, coated vesicles, and receptor - mediated endocytosis.

Nature 279, 679-685.

GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S., ANDERSON R.G.W., RUSSEL D.W., SCHNEIDER W.J. (1985)

Receptor-mediated endocytosis : concepts emerging from the LDL receptor system.

Annu. Rev. Cell Biol. 1, 1-39.

GRENFELL S., SMITHERS N., MILLER K., SOLARI R. (1989)

Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of human Interleukine 1 Alpha.

Biochem. J. 264, 813-822.

GRENOT C., DE MONTARD A., BLACHERE T., MAPPUS E., CUIILLERON C.T. (1988)

Identification d'un site de photomarquage de la protéine plasmatique de liaison de la testostérone et de l'oestradiol (SPB) par l'hydroxy-17 β oxo-3 androstadiène-4,6 tricié.

C.R.Acad. Sci. (Paris) 307, 391-396.

GRIFFIN P.R., KUMAR S., SHABANOWITZ J., CHARBONNEAU H., NAMKUNG P.C., WALSH K.A., HUNT D.F., PETRA P.H. (1989)

The amino acid sequence of the sex steroid - binding protein of rabbit serum.

J.Biol. Chem 264, 19066-19075.

GRISWOLD M.P., MERRY WEATHER J. (1982).

Insulin stimulates the incorporation of inorganic phosphorus - 32 into RNA in cultured Sertoli cells.

Endocrinology 111, 661-667.

GUEANT J.L., FREMONT S., KHANFRI J., GERARD A., NICOLAS J.P., GERARD H. (1988)

Biochemical evidences for a receptor-mediated uptake of rat androgen-binding protein by epididymis.

Steroids 52, 347-349.

GUEANT J.L., KHANFRI J., GERARD H., FREMONT S., GERARD A., GRIGNON G., NICOLAS J.P. (1986)

Purification of androgen-binding protein from rat testis using high-performance liquid chromatography and physicochemical properties of the iodinated molecule.

FEBS lett. 207, 280-286.

GUESDON J.L., TERNYNCK.T., AVRAMEAS. S. (1979)

The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques.

J.Histochem.Cytochem.27, 1137-1139.

GUSTAFSON A.W., DAMASSA D.A., PRATT R.D., KWIELINSKI G.G. (1989).

Post-natal patterns of plasma androgen - binding activity in Djungarian (Phodopus sungorus) and golden (Meso cricetus auratus) hamsters.

J.Reprod. Fertil. 86, 91-104.

GUNSALUS G.L, DE BESI L., MUSTO N.A., BARDIN C.W. (1986)

Measurement of rat ABP by steroid binding, radioimmunoassay (RIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

In: proteines de liaison des hormones steroïdes, Ed . Forest M.G., Pugeat M., Edition INSERM, J. Libbey Eurotext Ltd, Paris, 149, 227-235.

GUNSALUS G.L., LARREA F., MUSTO N.A., BECKER R.R., MATHER J.P., BARDIN C.W. (1981)

Androgen binding protein as a marker for Sertoli cell function.

J.Steroid Biochem. 15, 99-106.

GUNSALUS G.L., MUSTO N.A., BARDIN C.W. (1978)

Immunoassay of androgen binding protein in blood : A new approach for the study of the seminiferous tubule.

Science, 200, 65-66.

GUNSALUS G.L., MUSTO N.A., BARDIN C.W. (1980)

Bidirectional release of a Sertoli Cell product, androgen binding protein, into the blood and seminiferous tubule.

In : Testicular development, structure and function, A. Steinberger and E. Steinberger (Eds) pp : 291-297, Raven press, New York.

HAGEN F.S., ARGUELLES C., SUI L.M., ZHANG W., SEIDEL P.R., CONROY S.C.,
PETRA P.H. (1992)

Mammalian expression of the human sex steroid-binding protein of plasma (SBP or SHBG)
and testis (ABP).

FEBS Lett, 299, 23-27.

HALL P.F., MITA M. (1984)

Influence of FSH on glucose transport by cultured Sertoli cells.

Biol. Reprod. 31, 863-869.

HALL K., RITZEN E.M., JOHNSONBAUGH R.E., PARVINEN M. (1983)

Secretion of somatomedin - like compound from Sertoli cells in vitro.

In : Insulin - Like Growth Factors / Somatomedins, Spencer E.M. (ed)

Walter de Gruyter, New York, pp : 611-614.

HAMMOND G.L. (1990)

Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins.

Endocr. Rev. 11, 65-79.

HAMMOND.G.L., LANGLEY.M.S., ROBINSON.P.A. (1985)

A liquid-phase immunoradiometric assay (IRMA) for human sex-hormone binding
globulin.(SHBG)

J.Steroid.Biochem. 23, 451-560.

HAMMOND G.L., SMITH C.L., GOPING J.S., UNDERHILL D.A., HARLEY M.J.,
REVENTOS J., MUSTO N.A., GUNSALUS G.L., BARDIN C.W. (1987)

Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and
pulmonary cDNA, exhibits homology with serine protease inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 84, 5153-5157.

HAMMOND G.L., UNDERHILL D.A., RYKSE H.M., SMITH C.L. (1989)

The human sex hormone - binding globulin gene contains exons for androgen - binding protein
and two other testicular messenger RNAs.

Mol. Endocrinol. 3, 1869-1876.

HAMMOND G.L., UNDERHILL D.A., SMITH C.L., GOPING I.S., HARLEY M.J ; MUSTO N.A. CHENG C.Y., BARDIN C.W. (1987)

The cDNA deduced primary structure of human sex hormone - binding globulin and location of its steroid - binding domain.

FEBS Lett. 215, 100-104.

HANOVER J.A., WILLINGHAM M.C., PASTAN I. (1984)

Kinetics of transit of transferrin and epidermal growth factor through clathrin - coated membranes.

Cell 39, 283-293.

HANSSON V. (1981)

Heterogeneity in end-terminal sugars of rabbit and rat androgen binding protein (ABP).

Int. J. Androl. 4, 220-226.

HANSSON V., LARSEN J., REUSCH E. (1972)

Physicochemical properties of the 5 - dihydrotestosterone binding protein in human male serum.

Steroids 20, 555-574.

HANSSON V., TRYGSTAD O., FRENCH F.S., Mc LEAN W.S., SMITH A.A., TINDALL D.J., WEDDINGTON S.C., PETRUSZ P., NAYFEH S.N., RITZEN E.M. (1974)

Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis.

Nature 250, 387-391.

HANSSON V., TVETER K.J. (1971)

Uptake and binding in vivo of ³H - labelled androgen in the rat epididymal and ductus deferens.

Acta Endocrinol. 66, 745-755.

HANSSON.V., WEDDINGTON.S.C., Mc LEAN.W.S., SMITH.A.A.,NAY-FEH.S.N.,FRENCH.F.S., RITZEN.E.M.(1975)

Regulation of seminiferous tubular function by FSH and androgen.

J.Reprod.fertil.44, 363-372.

HAOURIGHI., THOBIE.N., MARTIN M.E., BENASSAYAG.C., NUNEZ.E.A.(1992).

In vitro transient rise in plasma free fatty acids alters the functional properties of α -foetoprotein.

Biochim. Biophys. Acta. 1125, 157-165.

HELDIN C.H., WASTESON A., WESTERMARK B. (1982)

Interaction of platelet - derived growth factor with its fibroblast receptor.

J. Biol. Chem. 257, 4216-4221.

HENNING S.J. (1978)

Plasma concentrations of total and free during development in the rat.

Am. J. Physiol 235, 451-455.

HILSHLER B., PASSIA D., HILSHLER W. (1979)

Kinetics of the enzymatic pattern in the testis. I. Stage dependence of enzymatic activity and its relation to cellular interactions in the testis of the wistar rat.

Andrologia 11, 169-181.

HOLMES.S.D., BUCCI.L.R., LIPSHULTZ.L.I., SMITH.R.G.(1983)

Transferrin binds specifically to pachytene spermatocytes.

Endocrinology 113, 1916-1918.

HOPKINS C.R., TROWBRIDGE I.S. (1983)

Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells.

J. Cell Biol. 97, 508-521.

HRYB D.J., KHAN M.S., ROSNER W. (1985)

Testosterone estradiol binding globulin binds to human prostatic cell membranes

Biochem. Biophys. Res. Commun. 128, 432-440.

HRYB D.J., KHAN M.S., ROMAS N.A., ROSNER W. (1986)

Specific binding of human corticosteroid-binding globulin to cell membranes.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83, 3253-3256.

HRYB D.J., KHAN M.S., ROMAS N.A., ROSNER W. (1989)

Solubilization and partial characterization of the sex hormone-binding globulin receptor from human prostate.

J.Biol. Chem. 264, 5378-5383.

HRYB.D.J., KHAN.M.S., ROMAS.N.A., ROSNER.W.(1990)

The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones.

J.Biol.Chem. 265, 6048-6054.

HSU A.F., TROEN P. (1978)

An androgen - binding protein in testicular cytosol of human testis comparison with human testosterone - estrogen binding globulin.

J.Reprod. Fertil. 61, 403-408.

HUNTER T., COOPER J.A. (1985)

Protein-tyrosine kinases.

Annu. Rev. Biochem. 54, 897-930.

HSU B. R-S., SIITERI P.K., KUHN R.W. (1986)

Interactions between corticosteroid-binding globulin (CBG) and target tissues.

in: Binding proteins of steroid hormones, Eds M.G. First and M. Pugeut, editions INSERM, 149, pp. 577-591.

IMAMURA K., SPRIGGS D., KUFÉ D. (1987)

Expression of tumor necrosis factor receptors on human monocytes and internalization of receptor bound ligand.

J.Immunol. 139, 2989-2992.

JEGOU B., DACHEUX J.L., GARNIER D.H, TERQUI M., COLAS G., COUROT M. (1979).

Biochemical and physiological studies of androgen - binding protein in the reproductive tract of the ram.

J.Reprod. Fertil. 57, 311-318.

JOSEPH D.R., ADAMSON M.C., KOZAK C.A. (1991)

Genetic mapping of the gene for androgen - binding protein / Sex hormone - binding globulin to mouse chromosome 11.

Cytogenet. Cell Genet. 56, 122-124.

JOSEPH D.R., BAKER M.E. (1992)

Sex hormone - binding globulin, androgen - binding protein, and vitamine K - dependent protein S are homologous to laminin A, merosin, and Drosophila crumbs protein.

FASEB J 6, 2477-2481.

JOSEPH D.R., HALL S.H., FRENCH F.S. (1987)

Rat androgen - binding protein : evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone - binding globulin.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84, 339-343.

JOSEPH D.R., SULLIVAN P.M., WANG Y.M., MILLHORN D.E., BAYLISS D.M. (1991)

Complex structure and regulation of the ABP/SHBG Gene.

J.Steroid Biochem. Molec. Biol. 40, 771-775.

KARIN M, MINTZ, (1981)

Receptor - mediated endocytosis of transferrin in developmentally totipotent mouse terato carcinoma cells.

J.Biol. Chem. 258, 9108-9115.

KARL A.F., GRISWOLD M.D. (1980)

Actions of Insulin and vitamin A on Sertoli cells.

Biochem. J. 1186, 1001-1004.

KATO T., HORTON R. (1968)

Studies of testosterone binding globulin

J.Clin Endocrinol. Metab. 28, 1160-1168.

KEATING M.T., WILLIAMS L.T. (1987)

Processing of the platelet - derived growth factor receptor.

J.Biol. Chem 262, 7932-7937.

KEEN J.H., WILLINGHAM M.C., PASTAN I.H. (1979)

Clathrin - coated vesicles : isolation, dissociation and factor - dependent reassociation of clathrin baskets.

Cell 16, 303-312.

KHAN M.S., EWEN.E., ROSNER.W.(1982)

Radioimmunoassay for human testosterone-estradiol binding globulin.

J.Clin.Endocrinol.Metab.54, 705-710.

KHAN M.S., ROSNER (1990)

Histidine 235 of human sex hormone - binding globulin is the covalent site of attachment of the nucléophilic steroid derivative, 17B bromoacety - dihydrotestosterone.

J.Biol. Chem. 265, 8431-8435.

KHAN S.A., SÖDER O., SYED V., GUSTAFSSON K., LINOH M., RITZEN E.M. (1987).

The rat produces large amounts of an interleukin - 1 - like factor.

Int. J. Androl. 10, 495-505.

KING G.L., JOHNSON S.M. (1984)

Receptor mediated transport of insulin across endothelial cells.

Science 227, 1583-1586.

KIRCHHOFF J., SOFFIE M., ROUSSEAU G.G. (1979)

Differences in the steroid - binding site specificities of rat prostate androgen receptor and epididymal androgen-binding protein (ABP).

J.Steroid Biochem. 10, 487-497.

KOVACS W.J., BELL B.W., TURNEY M.K., DANZO B.J. (1988)

Monoclonal antibodies to rat androgen-binding protein recognize both of its subunits and cross-react with rabbit and human testosterone-binding globulin.

Endocrinology 122, 2639-2647.

KRUPENKO.N.I., AVVAKUMOV.G.V., STREL'CHONOK.O.A. (1990)

Binding of human sex hormone-binding globulin complexes to the syncytiotrophoblast membrane.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 171, 1279-1283.

- KUEHL F., PATANELLI D.J., HUMES J.L., TARNOFF J. (1970)
Testicular adenylate cyclase : stimulation by the pituitary gonadotrophins.
Biol. Reprod. 2, 153-163.
- KUHN L.C., KRAEHENBUHL J.P. (1979)
Interaction of rabbit secretory component with rabbit IgA dimer.
J.Biol. Chem. 254, 11066-11071.
- KUHN L.C., KRAEHENBUHL J.P. (1982)
The sacrificial receptor-translocation of polymeric IgA across epithelia.
Trends Biol. Sci. 7, 299-302.
- LAMB D.J., TSAI Y-H., STEINBERGER A., SANBORN B.M. (1981).
Sertoli cell nuclear transcriptional activity. Stimulation by follicle stimulating hormone and testosterone in vivo.
Endocrinology 108, 1020-1026.
- LAMB D.J., WAGLE J.R., TSAI Y.H., LEE A.L., STEINBERGER A., SANBORN B.M. (1982)
Specificity and nature of the rapid steroid stimulated increase in Sertoli cell nuclear RNA polymerase activity.
J.Steroid Biochem. 16, 653-660.
- LARREA F., MUSTO N.A., GUNSALUS G.L., BARDIN C.W. (1981a)
The microheterogeneity of rat androgen binding protein from the testis, rete testis fluid, and epididymis as demonstrated by immunoelectrophoresis and photoaffinity labeling.
Endocrinology 109, 1212-1220.
- LARREA F., MUSTO N.A., GUNSALUS G.L., MATHER J.P., BARDIN C.W. (1981b)
Origin of the heavy and light protomers of ABP from the rat testis.
J.Biol. Chem. 256, 12566-12573.
- LARRIVA-SAHAD J., OROZCO H., HERNANDEZ-PANDO R., OLIART R.M., MUSTO N.A., LARREA F. (1991)
Immunohistochemical demonstration of androgen-binding protein in the rat prostatic gland.
Biol. Reprod. 45, 417-423.

LAZAROVITS J., ROTH M. (1988)

A single amino acid change in the cytoplasmic domain allows the influenza virus hemagglutinin to be endocytosed through coated pits

Cell 53, 743-752.

LOBEL P., FUJIMOTO K., YE R.D., GRIFFITHS G., KORNFELD S. (1989)

Mutations in the cytoplasmic domain of the 275 Kd mannose 6-phosphate receptor differentially alter lysosomal enzyme sorting and endocytosis.

Cell 57, 787-796.

LOUIS B.G., FRITZ I.B. (1979)

Follicle stimulating hormone and testosterone independently increase the production of androgen binding protein by Sertoli cells in culture.

Endocrinology 104, 454-461.

MARCKWELL M.A.K. (1982)

A new- solid state reagent to iodinate proteins.I. Conditions for the efficient labeling of antiserum.

Analyt. Biochem. 125, 427-432.

MARSHALL S. (1985)

Kinetics of insulin receptor internalization and recycling in adipocytes.

J.Biol. Chem. 260, 4136-4144.

MARTIN.G.R., TIMPL.R. (1987)

Laminin and other basement membrane components.

Annu. Rev. Cell Biol.3, 57-85.

MARTIN M.E.

Rôle des acides gras libres dans le transfert de l'information hormonale stéroïdienne

Thèse de Doctorat de l'Université de PARIS VI, 1989.

MARTIN M.E., BENASSAYAG C, NUNEZ E.A. (1988)

Selective changes in binding and immunological properties of human corticosteroid binding globulin by free fatty acids.

Endocrinology 123, 1178-1186.

MARTIN M.E., VRANCKX R., BENASSAYAG C., NUNEZ E.A. (1986)

Modifications of the properties of human sex steroid - binding protein by nonesterified Fatty acids.

J.Biol. Chem. 261, 2954-2959.

MASON A.J., HAYFLICK J.S., LING N., ESCH F., VENO N., YING S.Y., GUILLEMIN R., NIALL H., SEEBURG P.H. (1985).

Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor - β .

Nature 318, 659-663.

MATHER J.P., GUNSALUS G.L., MUSTO N.A., CHENG C.Y., PARVINEN M., WRIGHT W., PEREZ-INFANTE V., MARGIORIS A., LIOTTA A., BECKER R., KRIEGER D.T., BARDIN C.W. (1983).

The hormonal and cellular control of Sertoli cell Secretion.

J.Steroid Biochem. 19, 41-51.

Mc CULLAGH D.D. (1932)

Dual endocrine activity of the testis.

Science 76, 19-20.

MEANS A.R., FAKUNDING J.L., HUCKINS C., TINDALL D.J., VITALE R. (1976)

Follicle - stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis.

Rec. Prog. Horm. Res. 32, 477-527.

MERCIER - BODARD C., ALFSEN A., BEAULIEU E.E. (1965).

A testosterone binding globulin.

In : Proceeding of 2nd symposium on steroid hormones, Ghent, Belgium.

Exerpta Med. Int. Congr. Ser. 101 pp 212-220.

MERCIER - BODARD C., ALFSEN A., BEAULIEU E.E. (1970)

Sex steroid binding plasma protein (sbp)

Acta Endocrinol. (Copenh) 147, 204-224.

MERCIER - BODARD C., BAVILLE F., BIDEUX G., BINART N., CHAMBRAUD B., BEAULIEU E.E. (1989)

Regulation of SBP synthesis in human cancer cell lines by steroid and thyroid hormones.

J.Steroid Biochem. 24, 443-448.

MICKELSON K.E., PETRA P.H. (1975)

Purification of the sex steroid-binding protein (SBP) from human serum.
Biochemistry 14, 957-963.

MICKELSON K.E., PETRA P.H. (1978)

Purification and physico-chemical characterization of the sex steroid - binding protein of rabbit serum. Comparaison with the human protein.
J.Biol. Chem. 253, 5293-5298.

MIKHAILOV V.I. (1989)

Molecular mechanisms of receptor - mediated endocytosis and their application for site - directed transport of bioreactive compounds.
J.Mol. Biol. 23, 639-651.

MITA M., PRICE J.M., HALL P.F. (1982)

Stimulation by FSH of synthesis of lactate by Sertoli cells from rat testis.
Endocrinology 110, 1535-1541.

MITA M., BORLAND K., PRICE J.M., HALL P.F. (1985)

The influence of insulin and insulin - like growth factor - I on hexane transport by Sertoli cells.
Endocrinology 116, 987-992.

MIYACHI Y., NIESCHLAG E., LIPSETT M.B. (1973)

The secretion of gonadotropins and testosterone by the neonatal male rat.
Endocrinology 92, 156-162.

MORRIS I.D., BARDIN C.W., MUSTO N.A., THAU R.B., GUNSALUS G.L. (1987)

Evidence suggesting that germ cells influence the bidirectionnal secretion of androgen binding protein by the seminiferous epithelium demonstrated by selective impairment of spermatogenesis with bisulphan.
Int. J. Androl. 10, 691-700.

MOSTOV K.E., DEITCHER D.L. (1986)

MDCK cells Transcytose IgA
Cell 46, 613-621.

MOSTOV K.E., SIMISTER N.E. (1985)

Transcytosis

Cell 43, 389-390.

MUFLY K.E., TURNER T.T., BROWN M., HALL P.F. (1985)

Contents of K^+ and Na^+ in seminiferous tubule and rete testis fluids from sertoli cell-enriched testes.

Biol. Reprod. 33, 1245-1251.

MUNSON.P.J., RODBARD.D.(1980)

Ligand: A versatile computerized approach to characterisation of ligand-binding systems.

Analyt.Biochem. 107, 220-239.

MURAI.T.J., MENDEL.C.M., SIITERI.P.K.(1991)

Free fatty acids do not influence the concentrations of free steroid hormones in serum under physiological conditions.

J.Clin.Endocrinol.Metab. 72, 137-139.

MURPHY H.D. (1965)

Sertoli cell stimulation following intra testicular injection of FSH in the hypophysectomized rat
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118, 1202-1205.

MUSTO N.A., GUNSALUS G.L., BARDIN L.W. (1980)

Purification and characterization of ABP from the rat epididymis.

Biochemistry 19, 2853-2862.

MUSTO N.A., GUNSALUS G.L., MILJKOVIC M., BARDIN C.W. (1977)

A novel affinity column for isolation of ABP from rat epididymis.

Endocr. Res. Commun. 4, 147-157.

NAKHLA A.M., KHAN M.S., ROSNER W. (1990)

Biologically active steroids activate receptor-bound human sex hormone-binding globulin to cause LNCaP cells to accumulate adenosine 3',5'-monophosphate.

J.Clin. Endocrinol. Metab. 71, 398-404.

NAKHLA A.M., MATHER J.P., JÄNNE O.A., BARDIN C.W. (1984)

Estrogen and androgen receptors in different stages of the seminiferous epithelial cycle and the interstitial tissue of rat testis.

Endocrinology 116, 132-136.

NAKHLA A.M., MATHER J.P., JÄNNE O.A., BARDIN C.W. (1986)

The action of calcitonin on cultivated testicular cells. Changes in androgen binding protein secretion and sex steroid receptor concentrations in Sertoli cells.

J.Androl. 32, 123-131.

NAMKUNG P.C., KUMAR S., WALSH K.A., PETRA P.H. (1990)

Identification of Lysine-134 in the steroid binding site of the sex steroid binding protein of human plasma.

J.Biol. Chem. 265, 18345-18350.

NISULA B.C., LORIAUX D.L., WILSON Y.A. (1978)

Solid phase method for measurement of the binding capacity of testosterone-estradiol binding globulin in human serum.

Steroids 31, 681-690.

NUNEZ E.A. (1987)

Nonesterified fatty acids : role in the molecular events linking endocrinology and oncology via nutrition.

Tumor Biol. 8, 831-834.

ORLANDO.C., CALDINI., BARNI.T.,WOOD.W.G.,STRASBURGER.C.J.(1985)

Ceruleoplasmin and transferrin in human seminal plasma: Are they an index of seminiferous tubular function ?

Fertil.Steril. 43, 280-284.

ORSTAN.A., LULKA.M.F., EIDE.B., PETRA. P.H., ROSS. J.B.A.(1986)

Steroid-binding site of human and rabbit sex steroid-binding protein of plasma: fluorescence characterization with equilenin.

Biochemistry 25, 2686-2692.

ORTH J.M. (1984)

The role of FSH in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats.
Endocrinology 115, 1248-1255.

PARVINEN M. (1982)

Regulation of the seminiferous epithelium.
Endocr. Rev. 3, 404-417.

PAULOIN A. (1991)

Vesicules recouvertes, polypeptides d'assemblage et phosphorylation.
Médecine / sciences 7, 561-568.

PAULOIN A., BERNIER I., JOLLES P. (1982)

Presence of cyclic nucleotide Ca^{2+} independent protein Kinase in bovine brain coated vesicle.
Nature 298, 574-576.

PEARLMAN W.H., CREPY O. (1966)

Steroid - protein interaction with particular reference to testosterone-binding by human serum.
In: 2nd International Congress on hormonal Steroids, Milan, Italie.
Excerpta med. Int. Congr. Ser. 111 pp 48-56.

PEARLMAN W.H., CREPY O. (1967)

Steroid - protein interaction particular reference to testosterone binding by human serum
J.Biol. Chem. 242, 182-189.

PEARLMAN W.H., FONG I.F.F. (1968)

A testosterone and 17 β - estradiol binding factor in human pregnancy serum.
Fedn.. Proc. 27, 624-631.

PEARSE B.M.F. (1988)

Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits.
EMBO J. 7, 3331-3336.

PEARSE B.M.F., BRETSCHER M.S. (1981)

Membrane recycling by coated vesicles.
Annu. Rev. Biochem. 50, 85-91.

PELLINIEMI L.J., DYM M., GUNSALUS G.L., MUSTO N.A., BARDIN C.W., FAWCETT D.W. (1981)

Immunocytochemical localization of androgen binding protein in the male rat reproductive tract. *Endocrinology* 108, 925-931.

PEREZ-INFANTE.V., BARDIN.C.W., GUNSALUS.G.L., MUSTO.N.A., RICH.K.A., MATHER.J.P. (1986)

Differential regulation of testicular transferrin and androgen-binding protein in primary cultures of rat Sertoli cells.

Endocrinology 118, 383-392.

PETRA P.H., LEWIS J. (1980)

Modification in the purification of the sex steroid - binding protein of human serum by affinity chromatography.

Analyt. Biochem. 105, 165-169.

PETRA P.H., QUE B.G., NAMKUNG P.C., ROSS J.B.A., CHARBONNEAU H., WALSH K.A., GRIFFIN P.R., SHABONOWITZ S., HUNT D.F. (1988).

Affinity labeling, molecular cloning and comparative amino acid sequence analysis of sex steroid - binding protein of plasma. A multidisciplinary approach for understanding steroid - protein interaction and its physiological role.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA) 538, 10-24.

PETRA P.H. (1979)

The serum sex steroid - binding protein. Purification, characterization and immunological properties of the human and rabbit proteins.

J.Steroid Biochem. 11, 245-252.

PETRA P.H. (1991)

The plasma sex steroid-binding protein (SBP or SHBG). A critical review of recent developments on the structure, molecular biology and function.

J.Steroid Biochem. Molec. Biol. 40, 735-753.

PLYMATE S.R., MATEI L.A., JONES R.E., FRIEDL K.E. (1988)

Inhibition of sex hormone - binding globulin production in the human hepatoma (Hep G2) cell line by insulin and prolactin.

J.Clin. Endocrinol. Metab. 67, 460-464.

PORTO C.S., GUNSALUS G.L., BARDIN C.W., PHILLIPS D.M., MUSTO N.A. (1991)
Receptor-mediated endocytosis of an extracellular steroid-binding (TeBG) in MCF-7 human breast cancer cells.

Endocrinology 129, 436-445.

PORTO C.S., MUSTO N.A., BARDIN C.W., GUNSALUS G.L. (1992)

Binding of an extracellular steroid-binding globulin to membranes and soluble receptors from human breast cancer cells (MCF-7 cells).

Endocrinology 130, 2931-2936.

PUGEAT.M., CRAVE.J.L., ELMIDANI. M., LEJEUNE. H., CHARRIE A.,
FLEURY.M.C., DECHAUD H.,TOURNIAIRE.J.(1991)

Relation inverse de l'index de masse corporelle et de l'insulinémie à jeun avec la protéine de liaison de la testostérone au cours de l'hirsutisme.

Ann. Endocrinol. (Paris) 52, 93-96.

PUGEAT M., GARREL D., ESTOUR B., LEJEUNE H., KURZER M.S., TOURNIAIRE J., FOREST M.G. (1988)

Sex steroid - binding protein in non endocrine disease.

Ann. NY. Acad. Sci (USA) 258, 235-247.

QUE B.G., PETRA P.H. (1987)

Characterization of a cDNA coding for the sex steroid - binding protein of human plasma.

FEBS lett. 219, 405-409.

RAMASHARMA K., SAIRAM M.R., SEIDAH N.G., CHIRTIEN M., MANJUNATH P.,
SCHILLER P.W., YAMASHIRO D., LI C.H. (1984)

Isolation, structure and synthesis of a human seminal plasma peptide with inhibine - like activity.

Science 223, 1199-1202.

RENOIR M., MERCIER-BODARD C., BAULIEU E.E. (1980)

Hormonal and immunological aspects of the phylogeny of sex-steroid binding plasma protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 4578-4582.

REVENTOS J., HAMMOND G.L., CROZAT A., BROOKS D.E., GUNSALUS G.L., BARDIN C.W., MUSTO N.A. (1988)

Hormonal regulation of rat androgen-binding protein (ABP) messenger ribonucleic acid and homology of human testosterone-estradiol-binding globulin and ABP complementary desoxyribonucleic acids.

J.Molec. Endocrinol. 2, 125-132.

REVENTOS J., HAMMOND G.L., MUSTO N.A., BARDIN C.W. (1990)

Studies on steroid binding proteins in normal tissues and tumor cell lines.

Rev. Esp. Fisiol. 46, 9-16.

RICH K.A., BARDIN C.W., GUNSALUS G.L., MATHER J.P. (1983)

Age dependant pattern of androgen binding protein (ABP) secretion from rat Sertoli cells in primary culture.

Endocrinology, 113, 2284-2293.

RITZEN E.M., FRENCH F.S., WEDDINGTON S.C., NAYFEH S., HANSSON V. (1974)

Steroid binding in polyacrylamide gels. Quantitation at steady state conditions.

J.Biol. Chem. 249, 6597-6603.

RITZEN E.M., NAYFEH S.N., FRENCH F.S., DOBBINS M.L. (1971)

Demonstration of androgen binding components of rat epididymis cytosol and comparison with binding components in prostate and other tissues.

Endocrinology, 89, 143 - 151.

ROBERTSON D.M., FOULDS L.M., LE VERSHA L., MORAN F.J., HEARN M.T.W., BURGER H.G., WETTENHALL R.E.H., DE KRETZER D.M.V. (1985)

Isolation of Inhibin from bovine follicular fluid.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 220-226.

ROBINSON M.S. (1987)

Kd coated vesicle proteins : molecular heterogeneity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies.

J.Cell. Biol. 104, 887-895.

ROMMERTS F.F.G., GROOTEGOED J.A., VAN DER MOLEN H.J. (1976)

Physiological role for androgen binding protein-steroid complex in testis ?

Steroids 28, 43-49.

ROSENBAUM W., CHRISTY N.P., KELLY W.G. (1966)

Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen - binding β - globulin in human plasma.

J.Clin. Endocrinol. Metab. 26, 1399 - 1403.

ROSENTHAL H.E. (1967)

A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system.

Analyt.Biochem. 20., 525-532.

ROSNER W. (1972)

A simplified Method for the quantitative determination of testosterone - estradiol globulin activity in human plasma.

J.Clin. Endocrinol. Metab. 34, 983-988.

ROSNER.W. (1990)

The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances.

Endocr.Rev. 11., 80-91.

ROSNER W., ADEN D.P., KHAN M.S. (1984)

Hormonal influences of the secretion of steroid - binding proteins by a human hepatoma - deviated cell line.

J.Clin. Endocrinol. Metab. 59, 806-808.

ROSNER W.,CHRISTY N.P., KELLY G.K. (1969)

Partial purification and preliminary characterization of estrogen - binding globulin from human plasma.

Biochemistry 8, 3100 - 3108.

ROSS J.B.A., TORRES R., PETRA. P.H.(1982)

Equilenin, a specific fluorescent probe for steroid-protein interactions in sex steroid binding protein (SBP).

FEBS lett. 149, 240-244.

RYAN R.J., KEUTMANN H.J., CHARLESWORTH M.G., Mc CORMICK D.J., MILIUIS R.P., CALVO F.O., VUTYAVANICH T. (1987)

Structure - function relationships of gonadotrophins

Rec. Prog. Horm. Res. 43, 383-429.

SANBORN B.M., STEINBERGER A., TCHOLAKIAN R.K., STEINBERGER E. (1977)

Direct measurement of androgen receptors in cultured Sertoli cells.

Steroids 29, 493-502.

SAVU L., VRANCKX R., MAYA M., NUNEZ E.A. (1989)

Binding activities of thyroxine binding globulin versus thyroxine binding prealbumin in rat sera : Differential modulation by thyroid hormone ligands, oleic acid and pharmacological drugs.

Biochem. Biophys. Res. commun. 159, 919-926.

SCATCHARD (1949)

The attraction of proteins for small molecules and ions.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA) 51, 660-672.

SCHLESSINGER J., SHECHTER Y., WILLINGHAM M.C., PASTAN I. (1978)

Direct visualization of binding, aggregation, and internalization of insulin and epidermal growth factor on living fibroblastic cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 2659-2663.

SCHMIDT W.N., TAYLOR J.C.A., DANZO B.J. (1981)

The use of a photoaffinity ligand to compare androgen binding protein (ABP) present in rat Sertoli cell culture media with ABP present in epididymal cytosol.

Endocrinology 108, 786-794.

SCHNEIDER C., OWEN M.J., BANVILLE D., WILLIAGS J.G. (1984)

Primary structure of human Transferrin receptor deduced from the mRNA sequence.

Nature 30, 675-678.

SCHNEIDER W.J., BEISIEGEL U., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. (1982)
Purification of the LDL receptor, an acidic glycoprotein of 16400 molecular weight.
J.Biol. Chem. 257, 2664-2673.

SCHOULTZ B.V., CARLSTROM K. (1989)
On the regulation of sex hormone binding globulin. A challenge of an old dogma and outlines
of an alternative mechanism.
J.Steroid Biochem. 32, 327-334.

SEE Y.P., ROSE J.L., WRIGHT L.A. (1988)
Correlation between testosterone not bound to Sex-hormone binding globulin (SHBG) and the
testosterone / SHBG ratio.
Clin. Chem. 34, 2163-2168.

SEIDAH N.G., RAMASHARMA K., SAIRAM M.R., CHRETIEN M. (1984).
Partial amino acid sequence of a human seminal plasma pepticle with inhibin - like activity.
FEBS Lett. 167, 98-102.

SERTOLI E. (1865)
On the existence of special branched cells in the seminiferous tubules of the human testis
Morgagni Z, 31-47.

SETCHELL B.P., DUGGAN M.C., EVANS R.W. (1973)
The effect of gonadotropins on fluid secretion and sperm production by the rat and hamster
testis.
Endocrinol. 56, 27-36.

SETCHELL B.P. (1978)
The Mammalian testis
Cornell University Press, Ithacq, New-York

SHARPE R.M., FRASER H.M., COOPER I., ROMMERTS F.F.G. (1981)
Sertoli - Leydig cell communication via a luteinizing hormone releasing hormone like factor.
Nature 209, 785-787.

SIITERI P.K., MURAI J.T., HAMMOND G.L., NISKER J.A., RAYMOURE W.J., KUHN R.W. (1982).

The serum transport of steroid hormones.

Rec.Prog. Horm. Res. 38, 457-503.

SINGER C.J., KHAN M.S., ROSNER W. (1988)

Characteristics of the binding of corticosteroid-binding globulin to rat cell membranes.

Endocrinology 122, 86-89.

SINNECKER G., HIORT O., KWAN P.W., De LELLIS R.A. (1990)

Immunohistochemical localization of sex hormone-binding globulin in normal and neoplastic breast tissue.

Horm. Metab. Res. 22, 47-50.

SKINNER M.K. (1991)

Cell - cell interactions in the testis.

Endocr. Rev. 12, 45-76.

SKINNER M.K., GRISWOLD M.D. (1980)

Sertoli cells synthesize and secrete transferrin - like protein.

J.Biol. Chem. 255, 9523-9525.

SKINNER M.K., GRISWOLD M.D. (1983)

Sertoli cells synthesize and secrete a ceruloplasmin - like protein.

Biol. Reprod. 28, 1225-1230.

SKINNER M.K., MOSES H.L. (1989a)

Transforming growth factor - Beta gene expression and action in the seminiferous tubule : peritubular cell - Sertoli cell interactions.

Mol. Endocrinol. 3, 625-631.

SKINNER M.K., TAKACS K., COFFEY R.J. (1989b)

Cellular localization of transforming growth factor - alpha gene expression and action in the seminiferous tubule : peritubular Cell-Sertoli cell interactions.

Endocrinology 124, 845-853.

SKINNER M.K., TUNG P.S., FRITZ I.B. (1985)

Cooperativity between Sertoli Cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components.

J.Cell. Biol. 100, 1941-1949.

SLY W.S., FISCHER H.D. (1982)

The phosphomannosyl recognition system for intracellular and intercellular transport of lysosomal enzymes.

J.Cell. Biochem. 18, 67-85.

SMITH K.A., CANTRELL D.A. (1985)

Interleukine 2 regulates its own receptor

Proc. Natl.Acad. Sci. (USA) 82, 864-868.

STEINBERGER A., HEINDEL J.J., LINDSEY J.N., ELKINGTON J.S.H., SANBORN B.M., STEINBERGER E. (1975)

Isolation and culture of FSH responsive Sertoli cells.

Endocr. Res. Commun. 2, 261-272.

STEINBERGER E., CHOWDHURY M. (1974)

Control of pituitary FSH in male rats.

Acta Endocrinol. (Copenh) 76, 235-241.

STEINBERGER E., STEINBERGER A., FICHER M. (1970)

Study of spermatogenesis and steroid metabolism in cultures of mammalian testes.

Rec. Prog. Horm. Res. 26, 547-588.

STEINBERGER A., DIGHE R.R., DIAZ J. (1984)

Testicular peptides and their endocrine and paracrine functions.

Arch. Biol. Med. Exp. 17, 267 - 271.

STREL'CHYONOK O.A., AVVAKUMOV G.V. (1983)

Evidence for the presence of specific binding sites for transcortin in human liver plasma membranes.

Biochim. Biophys. Acta 755, 514-517.

STREL'CHYONOK O.A., AVVAKUMOV G.V., SURVILO L.I. (1984)

A recognition system for sex-hormone binding protein estradiol complex in human decidual endometrium plasma membranes.

Biochim. Biophys. Acta 802, 459-466.

STREL'CHYONOK O.A., AVVAKUMOV G.V. (1990)

Specific steroid - binding glycoproteins of human blood plasma : novel data on their structure and function.

J.Steroid Biochem 35, 519-534.

SWEET.F., MORDOCK. G.L.(1987)

Affinity labelling of hormone-specific proteins.

Endocr.Rev.8, 154-184.

SYLVESTER.S.R., GRISWOLD. (1984)

Localization of transferrin and transferrin receptors in rat testes.

Biol. Reprod. 31., 195-203.

TABEI T., MICKELSON K.E., NEUHAUS S., PETRA P.H. (1978)

Sex steroid - binding protein (SBP) in dogs.

J.Steroid Biochem. 9, 983-988.

TARDIVEL-LACOMBE.J., DEGRELLE .H.(1991)

Hormone-associated variation of the glycan microheterogeneity pattern of human sex steroid-binding protein (hSBP).

J.Steroid Biochem. Molec.Biol. 39, 449-453.

TARDIVEL-LACOMBE J., EGLOFF M., MAZABRAUD A., DEGRELLE H. (1984)

Immunohistochemical detection of the sex steroid-binding plasma protein in human mammary carcinoma cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 488-494

TAYLOR J.C.A., SMITH H.E., DANZO B.J. (1980)

Characterization of androgen - binding protein in rat epididymal cytosol using a photoaffinity ligand.

J.Biol. Chem. 255, 7769-7773.

TCHOLAKIAN R.K., STEINBERGER A. (1979)

In vitro metabolism of testosterone by cultured Sertoli cells and the effect of FSH.

Steroids 33, 495-526.

TOOZE J., TOOZE S.A. (1986)

Clathrin - coated vesicular transport of secretory proteins during the formation of ACTH - containing secretory granules in ALT20 cells.

J.Cell. Biol. 103, 839-850.

TSUTSUI K., ISHII S. (1980)

Hormonal regulation of follicle stimulating hormone receptors in the testes of Japanese quail.

Endocrinology 85, 511-518.

TURNER T.T., GLEAVY J., HARRIS J.M. (1990)

Fluid movement in the lumen of the rat epididymis. Effect of vasectomy and subsequent vasovasectomy.

J.Androl. 11, 422-428.

TURNER E., ROSS J.B.A, NAMKUNG P.C., PETRA P.H. (1984)

Purification and characterization of the sex steroid - binding protein from macaque serum.

Comparaison with the human protein.

Biochemistry 23, 492-497.

VALLETTE G., VRANCKX R. MARTIN M.E., BENASSAYAG C., NUNEZ E.A. (1989)

Conformational changes in rodent and human - foetoprotein : influence of fatty acids.

Biochim. Biophys. Acta 997, 302-312.

VANNELLI B.G., BARNI T., ORLANDO C., NATALI A., SERIO M., BALBONI G.C. (1988)

Insulin - like growth factor - I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis : an immunohistochemical study.

Fertil. Steril. 49, 666-678.

VAN BAELEN H., HEYNS W., SCHONNE E., DE MOOR P. (1968)

An estradiol binding globulin in human serum : partial purification.

Ann. Endocrinol. (Copenh.) 29, 153-158.

VAN DEURS B., HANSEN S.H., PETERSEN O.W., MELBY E.L., SANDVIG K. (1990)
Endocytosis, intracellular transport and transcytosis of the toxic protein rincin by a polarized epithelium.

Eur. J. Cell Biol. 51, 96-109.

VERMEULEN A., VERDONCK L. (1968)

Studies on the binding of testosterone to human plasma.

Steroids 11, 609-635.

VERMEULEN A.L., VERDONCK L., VAN DER STRAETEN M., ORIE M. (1969)

Capacity of the testosterone binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate.

J.Clin. Endocrinol. Metab. 29 , 1470-1480.

VERNON R.G., KOPEC B., FRITZ I.B. (1974)

Observations on the binding of androgens by rat testis seminiferous tubules and testis extracts.

Mol. Cell. Endocrinol. 1, 167-187.

WALSH K.A., TITANI K., KUMAR S., HAYES R., PETRA P.H. (1986).

Amino acid sequence of the sex steroid-binding protein (SBP) of human blood plasma.

Biochemistry 25, 7584-7590.

WANG Y.M., BAYLISS D.A., MILLHORN D.E., PETRUSZ P., JOSEPH D.R. (1990)

The androgen-binding protein gene is expressed in male and female rat brain.

Endocrinology 127, 3124-3130.

WELSH M.J., WIEBE J.P. (1978).

Sertoli cell capacity to metabolize C-19 steroids : variation with age and the effect of follicle - stimulating hormone.

Endocrinology 103, 838-844.

WESTPHAL U. (1983)

Steroid-protein interactions ; from past to present.

J.Steroid Biochem. 19, 1-15.

WILLINGHAM M.C., HANOVER J.A., DICKSON R.B., PASTAN I. (1984)

Morphologic characterisation of the pathway of transferrin endocytosis and recycling in human KB cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81, 175-179.

WRIGHT W.W., PARVINEN M., MUSTO N.A., GUNSALUS G.L., PHILLIPS D.M., MATHER J.P., BARDIN C.W. (1983)

Identification of stage - specific proteins synthesized by rat seminiferous tubules.

Biol. Reprod. 29, 257-270.

YAMASHIRO D.J., TYCKO B., FLUSS S.R., MAXFIELD F.R. (1984)

Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6,5) para-golgi compartment in the recycling pathway.

Cell 37, 789-800.

TABLE DES ABREVIATIONS

ABP - Δ_6	ABP photomarkée par la 17-béta-hydroxy-4,6-androstadien-6-one ou Δ_6 testostérone
ABP	Androgen Binding Protein
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Sérum albumine bovine
cDNA	"Complementary desoxyribonucleic acid" (Acide désoxyribonucléique complémentaire)
CBG	Corticosteroid binding globulin
CHAPS	[(3-cholomido-propyl) dimethylammonio]-1-propane-sulfonic acid
CLHP	"High performance liquid chromatography" (Chromatographie liquide haute performance)
CPM	Coups par minute
DHT	Dihydrotestostérone
EDTA	"Ethylene diamine tetraacetic acid" (Acide éthylène diamine tétraacétique)
ELISA	"Enzyme linked immunosorb assay" (Test immunoenzymatique)
FSH	"Follicule stimulating hormone" (Hormone folliculo stimulante)
Ka	Constante d'association
Kb	kilobase
Kd	Constante de dissociation
Kda	kilodalton
M	Molaire
nmole	nanomole (10^{-9} M)
PAGE	"Polyacrylamide gel electrophoresis" (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide)
pb	paire de bases
pI	point isoélectrique
SBP	Sex-steroid binding protein
SHBG	Sex hormone-binding globulin
TeBG	Testosterone oestradiol binding globulin
Δ_6 T	Δ_6 -testostérone
3 H-DHT	DHT marquée au tritium
5α - DHT	5α - Dihydrotestostérone

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE N°1 :	Structure générale de l'appareil reproducteur mâle.....	9
FIGURE N°2 :	Structure et organisation d'un testicule humain	9
FIGURE N°3 :	Composition et évolution chronologique des cellules de la lignée germinale	11
FIGURE N°4 :	Schéma général d'un épидидyme de rat	15
FIGURE N°5 :	Schéma de l'ultrastructure des cellules épithéliales épидидymaire	15
FIGURE N°6 :	Schéma de l'ultrastructure de la cellule de Sertoli.....	22
FIGURE N°7 :	Organisation générale du tube séminifère.....	23
FIGURE N°8 :	Principales hormones stéroïdes dérivant du cholestérol ..	33
FIGURE N°9 :	Séquences polypeptidiques de la SBP humaine et de lapin.....	40
FIGURE N°10 :	Homologie entre ABP/SBP et laminine/mérosine.....	42
FIGURE N°11 :	Site de liaison le plus probable de la SBP pour son stéroïde.....	46
FIGURE N°12 :	Structure hypothétique de la SBP représentant le stéroïde encasté dans la structure dimérique de la protéine.....	46
FIGURE N°13 :	Comparaison de l'organisation structurale des gènes de l'ABP de rat et de la SBP humaine.....	62
FIGURE N°14 :	Les deux types d'endocytose en phase liquide et avec récepteur.....	70
FIGURE N°15 :	Le triskèle celtique.....	72
FIGURE N°16 :	Structure des vésicules recouvertes.....	72
FIGURE N°17 :	Représentation des différentes voies utilisées par les 4 classes d'endocytose	74
FIGURE N°18 :	Rôles joués par les vésicules recouvertes.....	76
FIGURE N°19 :	Modèle hypothétique de l'interaction SBP-récepteur- stéroïde.....	86
FIGURE N°20 :	Protocole d'enrichissement en membranes plasmiques....	96
FIGURE N°21 :	Profil chromatographique et électrophorétique obtenu de la semi-purification de l'ABP.....	112
FIGURE N°22 :	Représentation de Scatchard de la liaison de l'ABP au niveau proximal et caudal de l'épididyme.....	138
FIGURE N°23 :	Hypothèses du cheminement de l'ABP depuis son lieu de synthèse jusqu'à sa cellule cible.....	162
FIGURE N°24 :	Hypothèses du cheminement de l'ABP, depuis son lieu de synthèse jusqu'à sa cellule cible.....	188

TABLEAU N°1 : Liste des principales sécrétions des cellules de Sertoli...	20
TABLEAU N°2 : Liste des principales protéines de transport des stéroïdes.....	36
TABLEAU N°3 : Comparaison de la SBP chez trois espèces différentes....	38
TABLEAU N°4 : Liste des principales situations physiopathologiques impliquant une variation du taux circulant de la SBP	49
TABLEAU N°5 : Principales propriétés physicochimiques de l'ABP chez le rat.....	56
TABLEAU N°6 : Liste des principaux exemples d'endocytose par récepteur dans les différentes classes.....	80
TABLEAU N°7 : Liste des principales publications sur l'interaction spécifique "protéine de transport" et tissu cible.....	83
TABLEAU N°8 : Caractérisation physicochimique du récepteur épидидymaire de l'ABP chez le rat de 15 jours	123
TABLEAU N°9 : Comparaison des principales caractéristiques biochimiques du récepteur de l'ABP/SBP sur les lignées épидидymaires et germinales de rats immatures et adultes.....	149
TABLEAU N°10 : Caractéristiques physicochimiques des récepteurs aux protéines de transport dans les différents tissus cibles.....	185

ANNEXE
Formule des stéroïdes utilisés

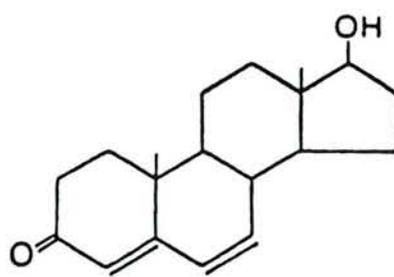
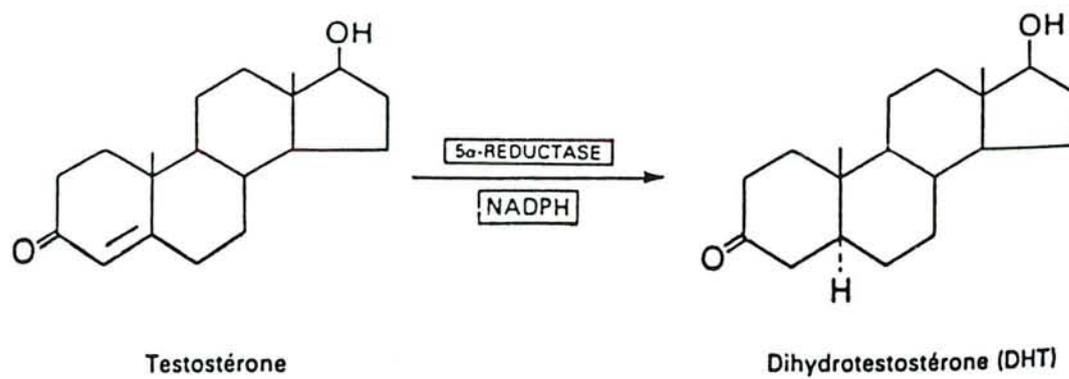
 $\Delta 6$ - Testostérone

TABLE DES MATIERES

LISTE DES PUBLICATIONS	1
<u>INTRODUCTION.....</u>	3
<u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	6
I. STRUCTURE ET FONCTIONS DU TESTICULE ET DE L'EPIDIDYME.....	7
1.1. Généralités.....	8
1.2. Le testicule.....	8
1.3. La lignée germinale.....	10
1.4. L'épididyme	14
1.5. Régulation de la spermatogénèse.....	17
II. LA CELLULE DE SERTOLI.....	18
2.1. Introduction.....	19
2.2. Les fonctions sertoliennes.....	21
2.3. Régulation de la cellule.....	27
III. LES PROTEINES DE LIAISON DES STEROIDES.....	31
. Généralités.....	32
A. La sex-steroid binding globulin.....	34
. introduction.....	35
. méthodes de purification	37
. caractérisation physicochimique.....	38
. séquence primaire et homologie avec l'ABP.....	39
. microhétérogénéité.....	43
. étude du site de liaison du stéroïde.....	44
. biologie moléculaire et génomique	47
. facteurs de régulation	48
. méthodes de dosage.....	50
. rôles physiologiques.....	52

B. L'Androgen-binding protein.....	53
. Introduction	54
. méthodes de purification.....	55
. caractérisation physicochimique et microhétérogénéité	58
. biologie moléculaire.....	60
. ontogénie-régulation hormonale.....	63
. méthodes de dosage.....	64
. rôles physiologiques.....	66
IV. MECANISMES SPECIFIQUES DE L'ENDOCYTOSE PAR RECEPTEUR.....	68
4.1. Généralités.....	69
4.2. Classification des mécanismes d'endocytose par récepteur	71
4.3. Mécanismes intercellulaires d'endocytose spécifique.....	75
4.4. Fonctions de l'endocytose par récepteur.....	79
V. RECEPTEURS MEMBRANAIRES AUX PROTEINES DE LIAISON DES STEROIDES (CBG, SBP, ABP).....	81
5.1. Généralités	82
5.2. Récepteurs à la CBG.....	84
5.3. Récepteurs à la SBP.....	85
5.4. Récepteurs à l'ABP.....	88
<u>BUT DU TRAVAIL.....</u>	89
<u>EXPOSE DES TRAVAUX</u>	91
<u>MATERIEL ET METHODES.....</u>	92
I.MATERIEL BIOLOGIQUE.....	93
1.1 animaux.....	93
1.2 sérums de femmes gestantes.....	93

1.3	testicules humains.....	93
1.4	préparation de l'extrait testiculaire.....	94
1.5	préparation de l'extrait épидидymaire.....	94
1.6	cellules épидидymaires isolées.....	95
1.7	cellules germinales isolées.....	94
1.8	préparation de fractions enrichies en membranes plasmiques.....	96
1.9	extraits membranaires solubilises.....	97
1.9.1.	à partir de l'épididyme.....	97
1.9.2	. à partir de fractions membranaires.....	97
1.10	préparation de fractions enrichies en noyaux.....	98
II. TECHNIQUES		99
A. <u>Methodes biochimiques</u>.....		99
2.1	semi-purification des protéines.....	99
2.2	pré-purification du récepteur membranaire de l'ABP.....	100
2.3	marquage par photoaffinité de l'ABP de rat et de la SBP humaine.....	100
2.4	marquage de l'ABP à l'iode 125	101
B. <u>Etudes de "binding"</u>		101
2.5	étude de la liaison du steroïde sur la proteïne.....	101
2.5.1	étude de la liaison de dihydrotestostérone à l'ABP épидидymaire de rat.....	101
2.5.2	étude de la capacité de liaison de la dihydrotestostérone à l'ABP testiculaire par CLHP.....	103
2.6	étude de la liaison membranaire des protéines de liaison des stéroïdes.....	103
2.6.1	cinétique d'association-dissociation.....	104
2.6.2	étude physicochimique de la liaison protéique	104
2.6.3	estimation des paramètres de liaison	105
2.6.4	spécificité de liaison.....	105

2.6.5	étude de la liaison de l'extrait membranaire solubilisé par CLHP	106
C.	<u>Techniques histologiques</u>	106
2.7	étude de la liaison et de la cinétique de pénétration cellulaire de l'ABP et la SBP marquées par photoaffinité.....	106
2.8	étude de la pénétration épидидymaire par microinjections intraluminales d'ABP.....	107
D.	<u>Dosages des acides gras libres épидидymaires</u>	108
RESULTATS ET DISCUSSION		109
I. SEMI-PURIFICATION DE L'ABP TESTICULAIRE ET MARQUAGE PAR PHOTOAFFINITE		
1.1.	But de l'étude	110
1.2.	Résultats.....	110
1.3.	Discussion	111
1.4.	Publication I.....	113
II. CARACTERISATION D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE L'ABP DE RAT AU NIVEAU EPIDIDYMAIRE		
2.1.	But de l'étude.....	121
2.2.	Résultats.....	121
2.3.	Discussion	125
2.4.	Publication II	126

III. RECONNAISSANCE CROISEE DU RECEPTEUR AUX PROTEINES DE LIAISON DES ANDROGENES (ABP,SBP) A DEUX STADES DE DEVELOPPEMENT DU RAT	136
3.1. But de l'étude.....	136
3.2. Résultats.....	136
3.3. Discussion	139
3.4. Publication III.....	140
IV. RECONNAISSANCE ET INTERNALISATION DE L'ABP DE RAT ET DE LA SBP HUMAINE PAR LES CELLULES GERMINALES DE RAT	147
4.1. But de l'étude.....	147
4.2. Résultats.....	147
4.2.1. Mise en évidence de la liaison membranaire de l'ABP et de la SBP au niveau de la lignée germinale.....	147
4.2.2. Discussion.....	148
4.2.3. Mise en évidence de l'internalisation de l'ABP et de la SBP au niveau de la lignée germinale.....	158
4.2.4. Discussion.....	163
4.2.5. Etude préliminaire de la liaison de l'ABP sur des préparations de noyaux de la lignée germinale de rat.....	164
4.3. Discussion	149
4.4. Publication IV	150
V. ACTIONS DES ACIDES GRAS LIBRES SUR LA LIAISON DE LA DIHYDROTESTOSTERONE A L'ABP EPIDIDYMAIRE.....	165
5.1. But de l'étude.....	165
5.2. Résultats	165
5.3. Discussion	165
5.4. Publication VI.....	167

DISCUSSION GENERALE.....	177
CONCLUSION GENERALE.....	186
BIBLIOGRAPHIE	189
TABLE DES ABREVIATIONS.....	230
TABLE DES ILLUSTRATIONS	233
TABLE DES TABLEAUX.....	234
ANNEXE : Formules des stéroïdes utilisés.....	235
TABLE DES MATIERES	237



UNIVERSITE DE NANCY I

NOM DE L'ETUDIANT : Monsieur FELDEN Franck

NATURE DE LA THESE : DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I
en BIOCHIMIE DE LA REPRODUCTION

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 26 OCT. 1992 n° 491

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY



RESUME

L'Androgen-binding protein (ABP) est une protéine synthétisée par les cellules de Sertoli. Elle assure le transport des androgènes depuis leur lieu de synthèse jusqu'à l'épididyme.

Au cours de ce travail, nous avons préparé de l'ABP testiculaire de rat par marquage covalent et spécifique (photoaffinité) suivit de deux étapes en chromatographie liquide haute performance.

A l'aide de cette protéine, nous avons montré l'existence d'un site de liaison membranaire spécifique dans un premier temps, au niveau de la cellule principale épидидymaire et, dans un second temps, sur une préparation cellulaire des différents stades de la lignée germinale testiculaire de rat. Cette liaison est spécifique, saturable et réversible. Le site récepteur est de nature protéique, calcium dépendant et actif à un pH compris entre 6 et 8. Il existe une reconnaissance croisée du récepteur de l'ABP de rat avec la SBP humaine, protéine sérique de forte homologie structurale avec l'ABP.

L'activité réceptrice chez le rat immature est supérieure à celle retrouvée chez l'animal adulte. Au niveau de la lignée germinale, il existe un mécanisme spécifique d'internalisation de l'ABP dans les différents stades de développement de la lignée chez le rat et, de façon préliminaire, chez l'homme.

Au niveau épидидymaire, les acides gras libres (AGL) inhibent fortement la liaison de l'ABP à son stéroïde (dihydrotestostérone). Cette inhibition est dose-dépendante, non compétitive, et croît en fonction du degré d'insaturation de l'acide gras. Ainsi, les AGL, en modifiant la conformation de l'ABP, pourraient vraisemblablement jouer un rôle important dans la reconnaissance de la protéine vis à vis de son site de liaison membranaire.

En conclusion, cette étude nous a permis de mettre en évidence une interaction cellulaire spécifique de l'ABP avec les cellules principales de l'épididyme et les cellules de la lignée spermatogénique de rat. Ces résultats généralisent le rôle fonctionnel potentiel des protéines de transport des stéroïdes au niveau cellulaire, qu'elles soient sériques ou tissulaires.

Mots clés : Androgen-binding protein - Epididyme - Cellules germinales - Récepteur - Sex-steroid binding protein - Endocytose - Acides gras libres -Photoaffinité