



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

92396

DOUBLE 9501

Université Henri Poincaré, Nancy I

Faculté de Médecine

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DE NANCY I



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

par

El Bachir BOUKHZER

CARACTERISATION D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE  
DE LA TRANSCOBALAMINE II AU NIVEAU DES  
CELLULES DE LA LIGNE GERMINALE MALE DU LAPIN

Travaux effectués sous la direction du professeur J.L. GUEANT  
dans le laboratoire de Biochimie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition  
de la faculté de Médecine de Nancy et dans l'unité INSERM U308

Soutenue publiquement le 11 janvier 1995 devant la commission d'examen composée de:

|             |                            |                                                                              |
|-------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Président   | H. GERARD                  | Professeur à l'Université de Nancy I                                         |
| Rapporteurs | P. FENICHEL<br>J.C. SOUFIR | Professeur à l'Université de Nice<br>Professeur à l'Université de Paris VI   |
| Examineurs  | J. L. GUEANT<br>P. NABET   | Professeur à l'Université de Nancy I<br>Professeur à l'Université de Nancy I |

✓



D 007 109060 4

1995 / 447



**A mes parents**

**En témoignage d'affection et de  
reconnaissance,**

**A Karima**

**Pour le bonheur et l'énergie qu'elle me  
procure,**

**A mes trois filles**

**Mérim, Yasmine et Balsam,**

**A mes frères et soeurs**

**A ma famille et belle-famille**

**A tous mes amis**

A Monsieur le professeur H. GERARD  
Président du jury

Il m'a fait le grand honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Je tiens à le remercier pour l'excellent accueil que j'ai toujours trouvé dans son laboratoire d'Histologie-Embryologie II. J'ai pu admirer son dynamisme et son ouverture d'esprit durant les moments que j'ai passé dans son laboratoire. Qu'il soit assuré de ma respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le professeur J. L. GUEANT  
Directeur de thèse

je lui adresse mes plus sincères remerciements pour avoir activement dirigé cette recherche. Il m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire. J'ai pu apprécier sa compétence, son dynamisme et ses nombreuses qualités humaines et pédagogiques. Qu'il trouve ici l'expression sincère de ma profonde admiration et de mon respect.

A Monsieur le professeur P. FENICHEL

Il m'a fait la faveur de s'intéresser à ce travail. Qu'il me soit permis en cette occasion, de lui témoigner mon profond respect et de le remercier de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'en être rapporteur.

A Monsieur le professeur J. C. SOUFIR

Il m'a fait un très grand honneur en acceptant d'examiner ce travail et d'être rapporteur de cette thèse malgré ses nombreuses occupations. Qu'il en soit sincèrement remercié et qu'il trouve ici l'expression de mon grand respect et de ma vive reconnaissance.

A Monsieur le professeur P. NABET

Il m'a fait la grande faveur en acceptant de juger ce travail. Qu'il en soit sincèrement remercié et qu'il trouve ici l'expression de mon grand respect.

Mes remerciements s'adressent aussi :

- A tous mes collègues du laboratoire de Biochimie Nutritionnelle et plus particulièrement à Philippe, Ali, Amal, et Franck pour leur gentillesse et leurs encouragements qui m'ont été précieux durant la réalisation de cette thèse.
  
- Aux membres du laboratoire d'Histologie-Embryologie II qui ont participé au travail d'autohistologie présenté dans cette thèse, en particulier Madame A. GERARD et EN-NYA Amina.
  
- A tous ceux qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce travail.

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Biochimie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition (Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, Nancy I) et dans l'unité INSERM U308, sous la direction du Professeur J. L. GUEANT. Elle fait référence aux deux publications qui figurent en annexe de cette thèse:



I. 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.* **1175**, 128-131

II. EN-NYA A, GUEANT J. L, NEXØ E, GERARD A., BOUKHZER E., NICOLAS J.P., GERARD H. (1993)

Endocytosis of transcobalamin in male rabbit germ cells : electron microscope radioautography study.

*International Journal of Developmental Biology.* **37**, 353-357

## Liste des abréviations

|                        |   |                                                                                              |
|------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ApoTC II</b>        | : | <b>Transcobalamine sous forme libre</b>                                                      |
| <b>B<sub>12</sub></b>  | : | <b>Vitamine B12 ou cyanocobalamine</b>                                                       |
| <b>B.D.</b>            | : | <b>Bleu dextran</b>                                                                          |
| <b>B.S.A.</b>          | : | <b>Albumine sérique bovine</b>                                                               |
| <b>Cbi</b>             | : | <b>Cobinamide</b>                                                                            |
| <b>Cbl</b>             | : | <b>Cobalamine</b>                                                                            |
| <b>CN-Cbl</b>          | : | <b>Cyanocobalamine</b>                                                                       |
| <b><sup>57</sup>Co</b> | : | <b>Cobalt radioactif (isotope 57 ; rayonnement <math>\gamma</math>)</b>                      |
| <b>cpm</b>             | : | <b>Coup par minute</b>                                                                       |
| <b>Da</b>              | : | <b>Dalton</b>                                                                                |
| <b>Abs</b>             | : | <b>Absorbance</b>                                                                            |
| <b>EDTA</b>            | : | <b>Acide éthylène-diamine-tétra-acétique</b>                                                 |
| <b>F.I.</b>            | : | <b>Facteur intrinsèque</b>                                                                   |
| <b>Hc</b>              | : | <b>Haptocorrine</b>                                                                          |
| <b>Holo-TCII</b>       | : | <b>Transcobalamine liée à la cobalamine</b>                                                  |
| <b><sup>125</sup>I</b> | : | <b>Iode radioactif (isotope 125 ; rayonnement <math>\gamma</math> et <math>\beta</math>)</b> |
| <b>KDa</b>             | : | <b>Kilodalton</b>                                                                            |
| <b>Met-Cbl</b>         | : | <b>Méthylcobalamine</b>                                                                      |
| <b>OH-Cbl</b>          | : | <b>Hydroxocobalamine</b>                                                                     |
| <b>P.A.G.E.</b>        | : | <b>Electrophorèse sur gel de polyacrylamide</b>                                              |
| <b>P.M.S.F.</b>        | : | <b>Phenylmethylsulfonyl fluoride</b>                                                         |
| <b>R</b>               | : | <b>Récepteur</b>                                                                             |
| <b>S.D.S.</b>          | : | <b>Dodécylsulfate de sodium</b>                                                              |
| <b>TC II</b>           | : | <b>Transcobalamine II</b>                                                                    |

# **INTRODUCTION**

Dans les années 60 Sharp et Witts, Watson et Morales, ainsi que Griswold démontrent que la vitamine B<sub>12</sub> influence la spermatogénèse. Les stérilités observées, chez les patients des deux sexes atteints d'anémie pernicieuse, peuvent être surmontées par une thérapie à la vitamine B<sub>12</sub>. L'aspect biochimique de cette stérilité, les cellules cibles concernées et le rôle joué par la vitamine B<sub>12</sub>, demeurèrent inconnues.

Le but de cette étude a été de rechercher et de caractériser le récepteur du complexe transcobalamine-vitamine B<sub>12</sub> au niveau des cellules germinales mâles.

La présence de récepteurs de transcobalamine-vitamine B<sub>12</sub> au niveau des cellules germinales mâles souligne l'importance de la vitamine B<sub>12</sub> comme nutriment indispensable au métabolisme des cellules germinales et à leur maturation.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. GÉNÉRALITÉS SUR LE TESTICULE

L'appareil génital mâle comporte quatre groupes de structures: les testicules, lieu de production des gamètes mâles et des hormones, les voies spermatiques vectrices des spermatozoïdes, les glandes annexes sécrétrices de la phase liquide du sperme et un organe copulateur.



### 1.1. STRUCTURE DU TESTICULE

Le testicule est un organe très complexe. Son architecture générale fait apparaître des structures glandulaires de type exocrine (tubes séminaux et les premiers segments des voies excrétrices génitales mâles) et des structures glandulaires de type endocrines, les cellules interstitielles qui produisent les hormones sexuelles mâles (androgènes).

Les testicules sont contenus dans les bourses, paroi cutanée mince très pigmentée. Chaque testicule est entouré par une enveloppe qui lui est propre : l'albuginée.

L'albuginée est une membrane conjonctive, épaisse de 1 mm, non élastique, et présente un épaississement triangulaire au niveau du pôle postérosupérieur du testicule, le corps de Highmore. Ce dernier envoie en profondeur du testicule des prolongements, ou septa testis, formant ainsi des cloisons interlobulaires divisant le parenchyme testiculaire en un certain nombre de pyramides, ou lobules. Dans chaque lobule, sont logés deux ou trois tubes enroulés sur eux-mêmes, les tubes séminifères, où s'élaborent les gamètes mâles. Le parenchyme est formé par ces tubes séminifères entourés de tissus conjonctifs renfermant des cellules interstitielles, des vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que des nerfs (Fig. 1).

### 1.2. LES CELLULES DE SERTOLI

En 1865, Enrico Sertoli a démontré l'existence de cellules ramifiées dans les tubes séminifères du testicule humain et a suggéré que leur fonction était liée à la formation des spermatozoïdes. Des études ultérieures ont conduit Peter, en 1899, à considérer ces cellules ramifiées comme étant des cellules nourricières indispensables pour les cellules germinales et au bon déroulement de la spermatogenèse.

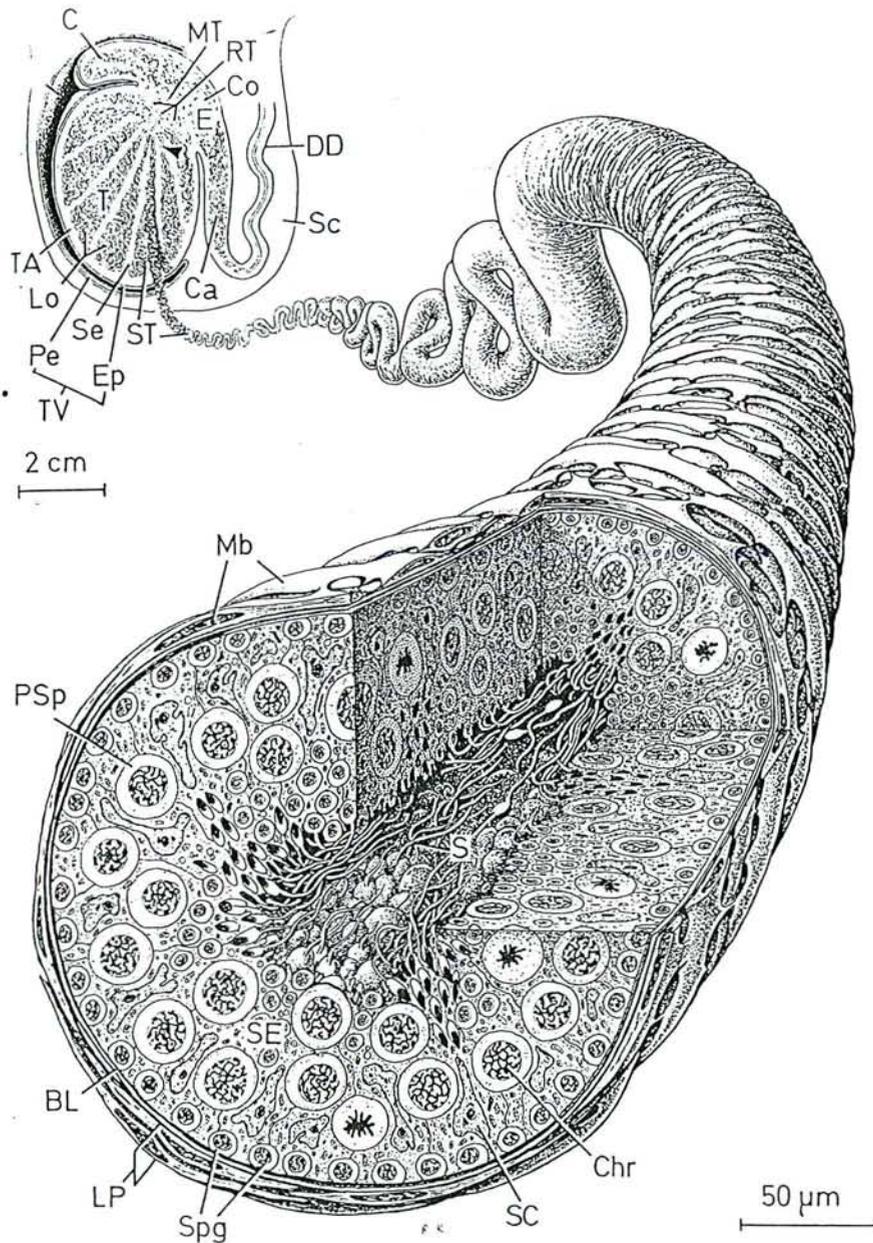


Figure 1. Vue d'ensemble du testicule et vue détaillée d'un tube séminifère. Le testicule et une partie de l'épididyme sont comprises dans la tunique vaginale (TV), mais chaque testicule est compris dans une membrane qui lui est propre, la tunique albuginée (TA). Celle-ci envoie des prolongements, septa testis (Se), qui divisent le parenchyme testiculaire en un certain nombre de lobules (Lo). Chaque lobule renferme un à deux tubes séminifères (ST). A la surface postérosupérieure du testicule se trouve l'épididyme (E) qui comporte trois parties: la tête = caput (C), le corps = corpus (Co) et la queue = cauda (Ca). Le tube séminifère (ST) est entouré d'une lame basale (BL) suivie d'une mince lame (LP) composée de myofibroblastes péritubulaires (Mb). En microscopie électronique, on distingue les spermatogonies (Spg), des petites cellules situées contre l'épithélium basale, les spermatocytes primaires (PSp), des cellules plus grandes, les spermatozoïdes (S) et les cellules de Sertoli (SC). (R. V. Krstić, 1990)

Les cellules de Sertoli sont en forme de colonne à base assez large et parcourent toute l'épaisseur de la paroi du tube séminifère (Elftman 1963). Leur noyau est en général ovalaire, leur cytoplasme renferme des gouttelettes lipidiques, du réticulum endoplasmique lisse, des ribosomes libres et des lysosomes primaires et secondaires. Leur base repose sur la lame basale du tube séminifère.

Le contour des cellules de Sertoli est irrégulier et très complexe. Aux endroits où deux cellules sont en contact, elles forment des jonctions de type desmosomes ou de type gap-jonctions. Leurs faces latérales présentent une série de prolongements assez larges, qui délimitent des creux et forment des logettes où nichent les différentes cellules germinales (Fig. 2).

### **1.3.LES CELLULES GERMINALES ET LA SPERMATOGENESE**

La spermatogenèse s'installe à la puberté. Elle est le processus de différenciation cellulaire partant des cellules souches (Spermatogonie) pour aboutir à la production de cellules hautement spécialisées (spermatozoïdes).

Trois types de cellules germinales sont impliquées dans la spermatogenèse: les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides (De Kretzer, 1988).

#### **1.3.1.Les Spermatogonies**

On distingue chez les rongeurs trois types de spermatogonies sur la base de leurs caractéristiques nucléaires:

- les spermatogonies A (dites poussiéreuses).
- les spermatogonies I (intermédiaires).
- les spermatogonies B (croûteuses).

Les spermatogonies sont connectées par des points intercellulaires de sorte qu'elles restent liées les unes aux autres. La cellule souche est une spermatogonie A (Fig. 3). Selon le modèle de Clermont et Hermo (1975), il existe deux catégories de cellules souches:

- les cellules souches de réserve (A0) qui résistent aux différentes agressions physiques et chimiques, et permettent la restauration de l'épithélium séminifère chaque fois qu'il est endommagé (Dym et Clermont, 1970; Radigue, 1992)

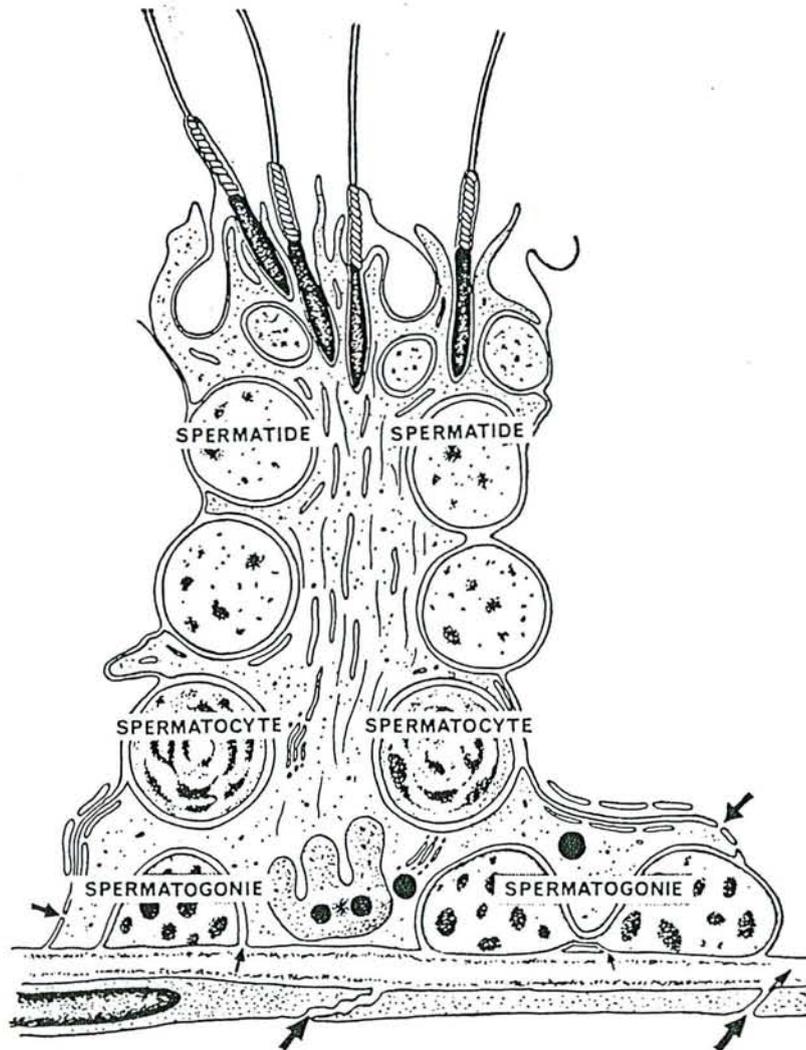


Figure 2. Schéma de l'ultrastructure de la cellule de Sertoli

Ses contours irréguliers présentent une série de prolongements qui délimitent des creux et forment des logettes où nichent les différentes cellules germinales.

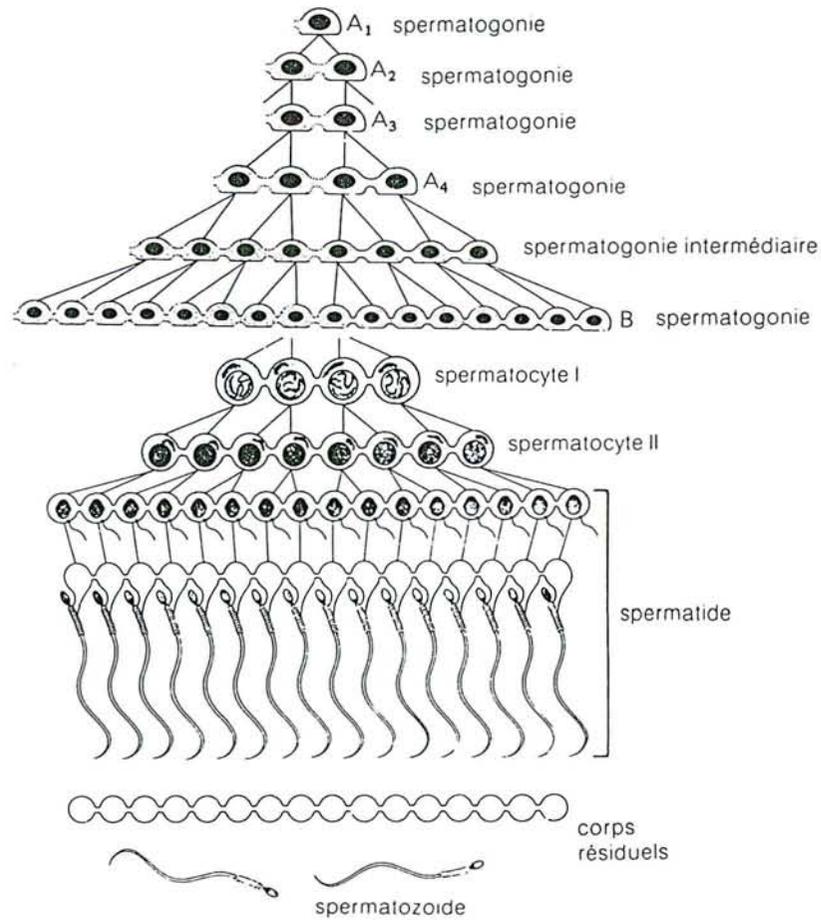


Figure 3. Schéma montrant le clone des cellules germinales.

Les cellules souches de renouvellement ( $A_1$  à  $A_4$ ) se différencient en spermatogonies B. Ces dernières se divisent pour donner des spermatocytes puis des spermatides et des spermatozoïdes. (D'après Bloom W, Fawcett DW, 1975)

- les cellules souches de renouvellement (A1 à A4) qui se différencient en spermatogonie I ou redonnent des spermatogonies A1.

Les spermatogonies I se divisent pour donner des spermatogonies B qui se divisent à leur tour pour donner deux spermatoctes de premier ordre (I).

### 1.3.2. Les spermatoctes

Issus de la dernière division des spermatogonies B, les spermatoctes sont des cellules ovalaires qui vont subir la méiose. Les spermatoctes ont un noyau arrondi qui contient plusieurs nucléoles .

C'est pendant la période qui précède la prophase (stade préleptotène) que les spermatoctes I synthétisent de l'ADN. La prophase comprend cinq stades successifs:

- le stade leptotène: marque la fin de la synthèse de l'ADN.
- le stade zygotène: caractérisé par l'appariement des chromosomes homologues.
- le stade pachytène: au cours duquel il se produit un échange de matériel chromosomique entre les chromosomes homologues (crossing-over).
- le stade diplotène: pendant lequel les chromosomes homologues se séparent légèrement tout en restant attachés à plusieurs endroits, entrecroisements, appelés "chiasmas".
- le stade diacinèse: séparation totale des chromosomes homologues.

Cette première division produit deux spermatoctes de second ordre (II). Après une courte interphase, les spermatoctes II se divisent à leur tour pour donner chacune deux spermatides haploïdes.

### 1.3.3. Les spermatides

Les spermatides sont de petite taille, de forme ronde et se retrouvent en bordure de la lumière des tubes séminifères. Leur noyau volumineux occupe plus que la moitié de chaque spermatide. Les spermatides subissent des transformations complexes aboutissant aux spermatozoïdes et consistent en : le développement et la mise en place de l'acrosome à partir de l'appareil de Golgi, la réorganisation du cytoplasme et la formation de la queue (Fig. 4). La spermiogenèse comporte des étapes bien identifiées (homme: 8, rat: 19)

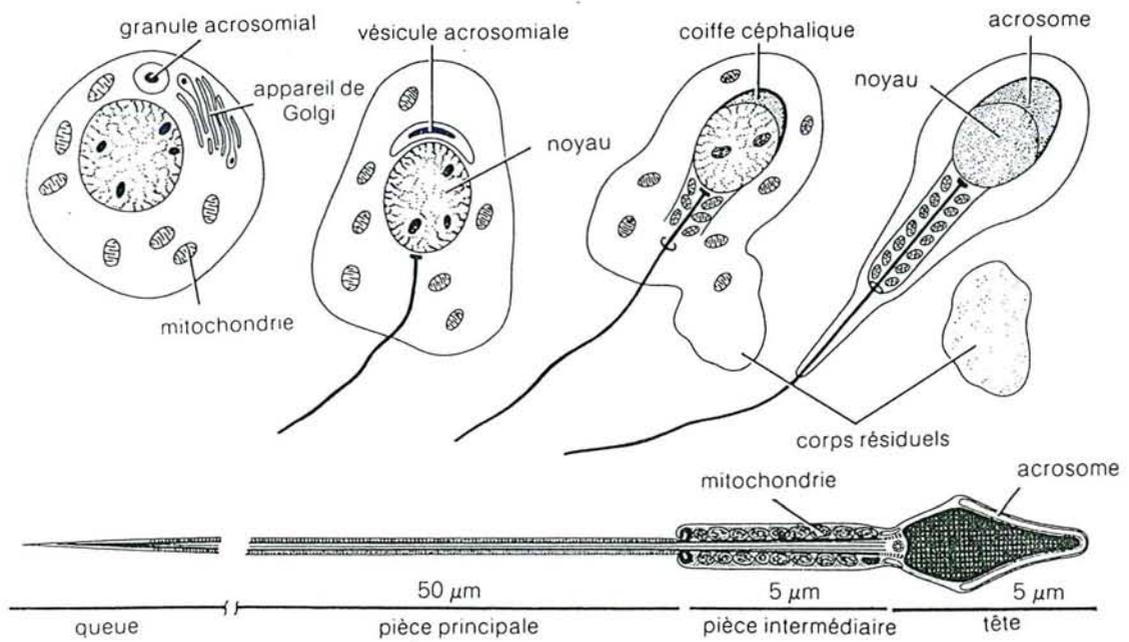


Figure 4. **En haut:** Principales modifications survenant dans une spermatide pendant la spermiogénèse. **En bas:** structure d'un spermatozoïde.

#### **1.3.4. Les spermatozoïdes**

Le spermatozoïde est le résultat final de la spermatogenèse. Doté d'une motilité flagellaire et d'une forme filiforme, il comporte trois parties: la tête, la pièce connective et le flagelle (fig. 4). L'acrosome contient plusieurs enzymes hydrolytiques telles que la neuraminidase, la hyaluronidase et des protéases, dont l'acrosine, qui interviennent dans la fécondation.

#### **1.3.5. Cycle spermatogénétique**

A la différence du cycle de l'épithélium séminal (Tab. 1) concernant les cellules souches de renouvellement (A1), qui entrent périodiquement en spermatogenèse à des intervalles réguliers (10,5 j chez le lapin), le cycle spermatogénétique est défini comme étant la succession dans le temps des différents stades de maturation d'une génération de cellules germinales, depuis la première division goniale jusqu'à la libération des spermatozoïdes. La durée de la spermatogenèse est constante pour une espèce donnée (lapin : 51,8 j, homme : 74 j). Lorsque l'on observe les tubes séminifères à travers une lumière, on repère un modèle de transillumination caractéristique qui apparaît dans les différentes parties du tube séminifère et qui permet d'étudier les étapes du stade spermatogénétique (Fig. 5).

| Espèces                              | Durée (jours)                 |                |     |
|--------------------------------------|-------------------------------|----------------|-----|
|                                      | Cycle de l'épithélium séminal | Spermatogenèse |     |
| Verrat                               | 8,6                           | 34,1           | (1) |
| Hamster ( <i>Cricetus auratus</i> )  | 8,7                           | 35             | (1) |
| Souris                               | 8,8                           | 35             | (1) |
| Singe ( <i>Macaca fascicularis</i> ) | 10,5                          | 42             | (2) |
| Bélier                               | 10,4                          | 49             | (1) |
| Lapin                                | 10,5                          | 51,8           | (1) |
| Rat (Wistar)                         | 13,3                          | 53,2           | (1) |
| Taureau                              | 13,5                          | 54             | (1) |
| Chien                                | 13,6                          | 54,4           | (3) |
| Homme                                | 16                            | 74             | (1) |

(1) : Références in Clermont, *Physiol. Rev.*, 1972, 52, 198-236.

(2) : Fouquet et al., *Biol. Reprod.*, 1986, 35 : 199-207.

(3) : Foote et al., *Anat. Rec.*, 1973, 175 : 241-352.

Dans les travaux cités, la durée du cycle de l'épithélium et de la spermatogenèse a été calculée par une analyse autoradiographique quantitative, après marquage des cellules germinales par la thymidine tritiée.

Tableau 1. Durée du cycle de l'épithélium séminal et de la spermatogenèse chez différents mammifères

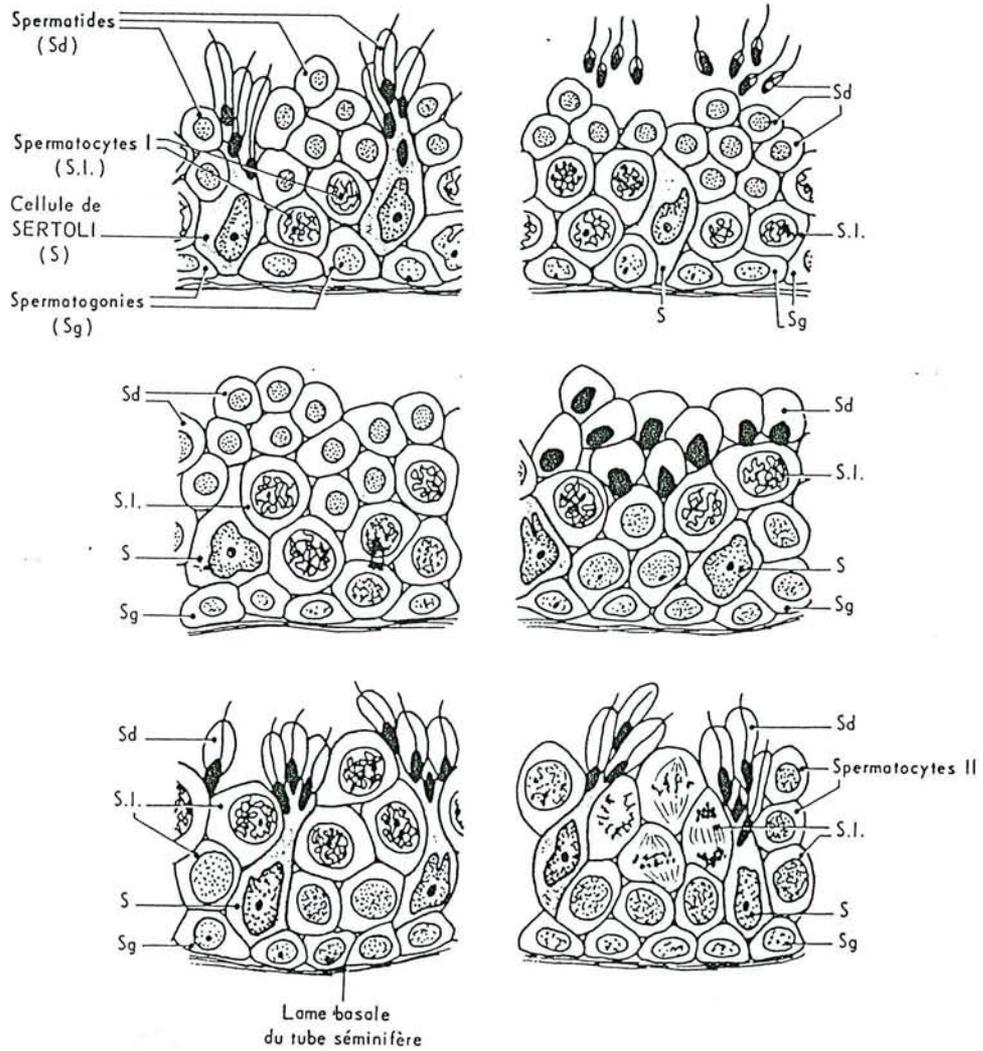


Figure 5. Schéma des 6 stades d'association cellulaire correspondant aux stades du cycle de l'épithélium séminifère humain. (D'après Clermont Y,1986)

## **II. LES INTERACTIONS CELLULES DE SERTOLI- CELLULES GERMINALES**

**ET LE TRANSPORT DES MICRONUTRIMENTS ET DES HORMONES**

Les cellules de Sertoli sont les seuls constituants somatiques de l'épithélium séminal. Elles sont la cible de la FSH " gonadotrophine Follicule-Stimulating Hormone " et des androgènes qui régulent la spermatogenèse.

Les cellules germinales, qui ne sont la cible d'aucune de ces deux hormones, sont crucialement dépendantes du fonctionnement normal des cellules de Sertoli (Fritz I.B., 1976 ; Ritzen et coll., 1989).

La régulation de la croissance est nécessaire pour le développement et le maintien de la spermatogenèse dans le testicule (Clermont et Perey, 1957).

Les observations au microscope électronique suggèrent l'existence de structures spécifiques qui sont le support des interactions entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales pendant la spermatogenèse (Russell L.D., 1980). Ces structures comportent des jonctions desmosomes typiquement associées aux gap junctions entre les cellules de Sertoli et les spermatogonies, les spermocytes et les spermatides (Fig. 6).

Les structures ectoplasmiques des cellules de Sertoli semblent tenir les spermatides allongés dans des niches profondes. Ces structures apparaissent au milieu et à la fin du stade pachytène des spermocytes et disparaissent avant la spermiogenèse (Russell et coll., 1980).

Trois approches techniques permettent d'étudier les interactions cellules de Sertoli-cellules germinales:

Les co-cultures cellules de Sertoli-cellules germinales qui permettent d'étudier l'influence d'un type de cellule sur l'autre.

La culture de fragments de tube séminifère à des stades précis, isolé sous transillumination, pour étudier les interactions cellulaires à différents stades du cycle de l'épithélium séminal (Parvinen M., 1982).

La culture de cellules de Sertoli en chambres à deux compartiments. Les cellules restant polarisées en culture (Steinberger et coll., 1987), les sécrétions apicales et basales seront séparées et leurs effets sur les cellules germinales en culture pourront être étudiés.

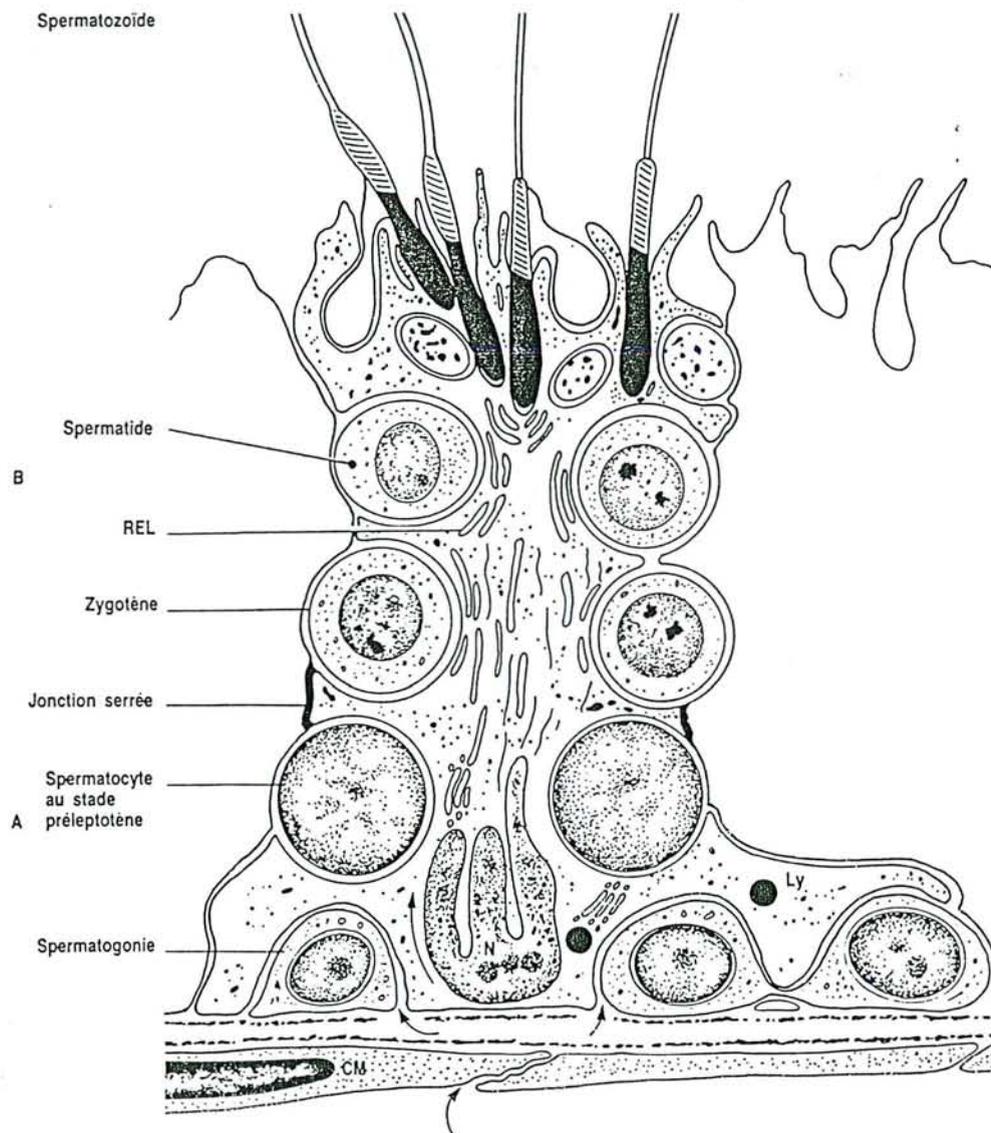


Figure 6. Schéma de l'ultrastructure de la cellule de Sertoli et des deux compartiments intratubulaires engendrés par les jonctions serrées.

Les interactions cellule-cellule du testicule paraissent très tôt pendant le développement foetal. Elles facilitent le transfert des nutriments entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli immatures à travers des jonctions (Nagano T. et Suzuki F., 1987). Dans le testicule adulte, ces jonctions deviennent très complexes et sont appelées desmosome-gap-jonction (Russel et coll., 1977 ; Pelletier et coll., 1983).

Les interactions que nous allons décrire sont de trois types: environnementales, nutritionnelles et régulatrices (Skinner, 1987).

## **2.1. LES INTERACTIONS ENVIRONNEMENTALES**

La structure complexe et en colonne des cellules de Sertoli, qui s'étend de la surface basale à la surface apicale du tube séminifère, offre un support physique pour les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides afin de subir respectivement la mitose, la méiose et le processus de la spermiogénèse, pour devenir des spermatozoïdes (Clermont, 1972).

L'une des premières et importantes interactions environnementales entre les cellules de Sertoli situées près de la base de l'épithélium, est identifiée comme étant des gap-jonctions serrées qui forment une barrière excluant le passage des macromolécules de l'espace interstitiel vers le lumen des tubes séminifères (Brokelmann, 1963 ; Dym et Fawcett, 1970). Cette barrière est appelée "barrière hémotesticulaire" et peut être mise en évidence par un simple examen de la composition en ions, en acides aminés et en protéines du liquide des tubes séminifères de la lymphe et du plasma (Setchell, 1960 ; Tuck et coll., 1970). La barrière hémotesticulaire est indispensable au maintien d'un microenvironnement à l'intérieur du tube séminifère nécessaire au développement des cellules germinales (Setchell, 1980).

Une autre interaction environnementale dont l'importance fonctionnelle demeure encore imprécise (Clermont Y. et coll., 1980) a été identifiée entre les cellules de Sertoli et les spermatides en phase de maturation. C'est une étroite projection tubulaire de la membrane plasmique des spermatides qui invaginent la membrane plasmique adjacente des cellules de Sertoli (Russell, 1978). Ces structures sont appelées "complexe tubulobulbaire" (Russell et Clermont, 1976 ; Malone, 1979).

Les études de Russell et coll. ont montré qu'une cellule de Sertoli pourrait être en contact avec 47 cellules germinales adjacentes à différents stades du développement (Wong et Russell, 1983). Ces contacts sont assurés par des structures ectoplasmiques des cellules de Sertoli. Celles-ci sont sous forme de citernes aplatis de réticulum endoplasmique de cellules de Sertoli qui se forment en face des spermatocytes et des acrosomes des spermatides (Brokelmann, 1963; Ross, 1976 et Grove et vogl, 1986).

Le développement continu et normal des cellules germinales, leur passage de la base du tube au lumen et la présence du cycle de l'épithélium séminifère, signifie que les interactions environnementales entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales sont dynamiques et exigent un remodellement rapide du tissu qui est nécessaire pour la translocation des spermatocytes du compartiment basal au compartiment apical à travers les jonctions serrées (Russell, 1977 et Ailenberg et coll., 1990).

Les contacts jonctionnels entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales sont maintenus *in vitro* (Eddy et Kahri, 1976), et la viabilité des cellules germinales est prolongée par la co-culture avec les cellules de Sertoli (Stallad et Griswold, 1990). Lorsqu'elles sont mises en culture ensemble, les spermatocytes pachytènes forment des structures jonctionnelles avec les cellules de Sertoli, alors que les spermatides rondes adhèrent moins (Russell et coll., 1983). La liaison entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales est thermodépendante (DePhilip et Danahey, 1987) ; la concanavaline A s'avère être un facteur stimulateur (Grootegoed et coll., 1982) ; l'adhésion est inhibée par une digestion protéolytique douce. La production de l'activateur de plasminogène et de protéases par les cellules de Sertoli (Lacroix et coll., 1977; Wright et coll., 1989 ; Erickson-Lawrence et coll., 1990) est nécessaire au remodellement du tissu associé à la translocation des spermatocytes, la dégradation des complexes jonctionnels et la libération des spermatozoïdes mûrs dans le lumen du tube séminifère.

## 2.2. LES INTERACTIONS NUTRITIONNELLES

Le transport de composants nutritionnels essentiels depuis les cellules de Sertoli jusqu'aux cellules germinales est indispensable à la survie et au métabolisme des cellules germinales séquestrées à l'intérieur du tube séminifère, et ce à cause de la présence de la barrière hémotesticulaire (Waites et Gladwell, 1982 ; Christensen et coll., 1985). Celle-ci est perméable aux masses moléculaires inférieures à 700 Da (Pelltier et Friend, 1983).

Les cellules germinales sont dépendantes des substrats métaboliques produits par les cellules de Sertoli. Les cellules germinales ont besoin de lactate et de pyruvate, mais ne peuvent pas métaboliser le glucose (Jutte et coll., 1981 et 1982).

Malgré la petite taille de la plupart des nutriments, le transport d'un grand nombre d'entre eux exige le concours des protéines de transports (Tindall et coll., 1985 et Bardin et coll., 1988).

Les cellules de Sertoli puisent les nutriments à partir du liquide interstitiel. Les protéines de transport du sérum entrent dans les cellules de Sertoli et transfèrent les nutriments vers les protéines de transport nouvellement synthétisées.

La première protéine de transport, produite par les cellules de Sertoli, qui a été identifiée est l'A.B.P (Androgen Binding Protein). Elle a pour rôle le transport des androgènes à travers le tractus génital mâle. (Hagenäs et coll., 1975 ; Fritz et coll., 1976)

Un autre type de molécules est sécrété par les cellules de Sertoli. Il s'agit des protéines transportrices de métaux : la transferrine et la céruléoplasmine (Skinner et Griswold, 1980 et 1983).

Le fer quant à lui est indispensable à toutes les cellules. Une forte concentration de récepteurs de transferrine est localisée sur les spermatocytes pachytène (Holmes et coll., 1983 ; Sylvester et Griswold, 1984). La transferrine est une protéine de transfert du fer.

Le transfert du fer aux cellules est médié par un récepteur membranaire. Le complexe récepteur-transferrine est internalisé, il libère le fer et la transferrine sera recyclée et gagne la surface cellulaire.

La céruléoplasmine est une protéine de transport du cuivre vers les cellules qui en ont besoin en tant que coenzyme, pour la synthèse de certaines protéines, ainsi que celle de la ferroxidase (Frieden et Hsieh, 1976 ; Mareschal et coll., 1980). La céruléoplasmine est internalisée sur un mode différent de la transferrine car son récepteur est dégradé après internalisation.

Les lipides peuvent faire l'objet d'une interaction nutritionnelle. La croissance rapide des cellules germinales aurait besoin du transport de précurseurs de lipides et d'acides gras (Beckman et Coniglio, 1980). Il est possible qu'un transport d'acides gras se fasse des cellules de Sertoli vers les cellules germinales (Beckman et Coniglio, 1980 ; Marzouki et Coniglio, 1982)

. La SGP-1 (Sulfated Glycoprotéine-1), protéine de transport produite par les cellules de Sertoli, est impliquée dans le transport de sphingolipide vers les cellules germinales (Sylvester et coll., 1984 ; O'Brien et coll., 1988).

Les cellules de Sertoli produisent les protéines de transport des vitamines telles que la folate-binding protein, la biotin-binding protein et la retinol-binding protein (Fetterolf P.M. et Skinner M.K., 1987 ; Ong D.E. et Chytil F., 1988 ; Schingleton J.L. et coll., 1989). Le plasma sérial humain contient un transporteur de la vitamine B12 , la transcobalamine II, (Carmel et Bernstein, 1984) à une concentration très élevée.

La vitamine A s'avère être indispensable pour la fonction des testicules et de la spermatogenèse. La carence en vitamine A provoque un arrêt de la spermatogenèse au stade préleptotène (Huang et Membree, 1979 ; Huang et coll., 1983). Une administration de la vitamine A à des animaux déficients restaure la spermatogenèse d'une façon synchronisée (Morales et Griswold, 1987).

La vitamine B12 est indispensable au maintien de la fertilité chez les deux sexes. En 1971, Ronald H. et coll. ont montré que l'administration mensuelle de 1000  $\mu\text{g}$  d'hydroxocobalamine a permis à deux sœurs jumelles stériles, et atteintes d'anémie pernicieuse, d'être enceintes après quatre injections au maximum. Aucune des deux sœurs n'était enceinte suite à une thérapie de fer, et la lecture de leur hématoците était normale. Les travaux de Watson (1962) suggèrent que la vitamine B<sub>12</sub> pourrait influencer

la maturation des spermatozoïdes humains. Pendant la même année, Sharp A.A. et Witts L.J. soutiennent la thèse de Watson par l'étude d'un cas dont 60% de ses spermatozoïdes présentaient une morphologie anormale et dont le sperme faisait apparaître un grand nombre de spermatides et de spermatogonies. Le diagnostic avait confirmé l'existence d'une anémie pernicieuse. Le patient fut alors traité par des injections de vitamine B12 à la suite desquelles la situation était redevenue normale. Six mois plus tard, le sperme contenait de nombreux spermatozoïdes dont 75% étaient très motiles et leur morphologie était normale. Dix-huit mois plus tard, le patient avait repris le traitement et sa femme avait donné naissance à un garçon en bonne santé.

En conclusion, les deux chercheurs recommandent que le taux de la vitamine B12 dans le sérum soit toujours examiné lorsqu'une diminution inexplicquée de la spermatogenèse est remarquée.

### **2.3. LES INTERACTIONS REGULATRICES**

Les interactions régulatrices entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales coordonnent le processus de la spermatogenèse (Griswold et coll., 1989) et sont médiées par des produits de sécrétion des cellules de Sertoli. Elles disparaissent par destruction des associations cellulaires et de la morphologie cellulaire par l'irradiation (Gravis, 1979 ; Wong et Russell, 1983), la chaleur (Russell, 1978), ou par des agents toxiques (Weber et coll., 1983). La destruction *in vivo* des cellules germinales influence le fonctionnement des cellules de Sertoli (Morris et coll., 1987 ; Cheng et coll., 1989). La co-culture des cellules germinales et des cellules de Sertoli stimule la synthèse de l'ARN et de l'ADN des cellules germinales (Rivarola et coll., 1985).

L'IGFI (insulin-like-growth factor-I) dont la structure est similaire à l'insuline (Froesch et coll., 1985) est produit par les cellules de Sertoli (Chatelain et coll., 1987 ; Smith et coll., 1989 ; Closset et coll., 1989) et régularise la synthèse de l'ADN. La production de l'IGFI par les cellules de Sertoli permet le contrôle paracrine de la prolifération des cellules germinales . Les cellules de Sertoli et les cellules germinales contiennent toutes les deux les récepteurs de l'IGF-I (Handelsman et coll., 1985 ; Oonk et coll., 1988 ; Vannelli et coll., 1988 ; Hansson et coll., 1989).

Deux autres facteurs de croissance provenant des cellules de Sertoli, SGF (seminiferous growth factor) et SCSGF (Sertoli cell-secreted growth factor), ont des propriétés mitogéniques. Le SGF est le premier facteur mitogène identifié dans le tube séminifère (Feig et coll., 1980). Basé sur son affinité à l'héparine, ce mitogène a été purifié à partir des cultures de cellules de Sertoli (Feig et coll. 1983; Bellve et Zheng, 1989). Le SCSGF est partiellement purifié et semble avoir un effet mitogénique pour un nombre de lignées cellulaires (Buch et coll., 1988)

D'autres agents régulateurs tels que les interleukines sont produits par les cellules de Sertoli et agissent sur les cellules germinales.

Les interleukines appartiennent à la famille des cytokines produits par les macrophages et les lymphocytes activés. L'interleukine-1 (IL-1) stimule la prolifération des cellules germinales (Khan et coll., 1987). L'injection de l'IL-1 à des rats hypophysectomisés stimule l'incorporation de la thymidine tritiée dans les spermatogonies (Pollanen et coll., 1989)

De même, les cellules germinales influencent les cellules de Sertoli. La présence de cellules germinales dans des cultures de cellules de Sertoli influence la glycosylation des protéines (Galdieri et coll., 1983), augmente la production de l'ABP (Galdieri et coll., 1984 ; La Magueresse et coll., 1986) et inhibe la production de l'œstradiol par les cellules de Sertoli (La Magueresse et Jegou, 1988).

Les effets des cellules germinales sur les cellules de Sertoli dépendent de l'âge de ces premières. Certes, les spermatoctes pachytènes ont des effets plus spectaculaires que les spermatides en dernier stade (La Magueresse et Jegou, 1988 ; Castelon et coll., 1989). Le milieu de culture des cellules germinales stimule la phosphorylation des protéines dans les cellules de Sertoli (Ireland et Welsh, 1987). Il stimule également l'activité g-glutamyl transpeptidase (Schteingart et coll., 1989) et augmente la production de la transferrine et de l'ABP (La Magueresse et coll., 1988 ; Djakiew et Dym, 1988). Par ailleurs, il diminue la synthèse de l'ARN (Rivarola et coll., 1986) et de l'œstradiol (La Magueresse et Jegou, 1986 et 1988). Des composants actifs du milieu de culture des cellules germinales ont été mis en évidence. Leur activité est sensible à la température et à la trypsine (La Magueresse et Jegou, 1986 et 1988).

Une semi-purification montre que l'activité est présente dans une fraction contenant trois polypeptides ayant entre 10000 et 30000 daltons (Stallard et Griswold, 1990).

En plus de l'analyse des facteurs paracrines dérivés des cellules germinales, un autre agent mitogène, connu pour son importance, d'une part dans le développement et le maintien des neurones sympathiques dans le système nerveux périphérique, et d'autre part dans celui des neurones cholinergiques au sein du système nerveux central. Cet agent mitogène, le "Nerve growth factor" (NGF), s'avère être aussi un facteur paracrine dans le tube séminifère (Persson et coll., 1990). L'expression du gène  $\beta$ -NGF et l'immunoréaction du NGF dans les spermatocytes et les spermatides du premier stade (Ayer-LeLievre et coll., 1988 ; Olson et coll., 1986), ainsi que l'expression de gène du récepteur NGF dans les cellules de Sertoli (Persson et coll., 1990), conduit à admettre que le NGF pourrait médier les interactions régulatrices ayant un rapport avec la croissance (Yanker Shooter, 1982) et qui s'effectuent entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli.

Un autre facteur qui n'est pas produit dans le testicule (Skinner et coll., 1989) mais qui est impliqué dans le maintien de la spermatogenèse (Tsutsumi et coll., 1986; Stastny et Cohn, 1972) : c'est l'EGF (l'epidermal growth factor). Celui-ci stimule la croissance cellulaire (Carpenter, 1987). La souris sialoadenectomisée montre une réduction de 50% du sperme mature, alors que l'administration de l'EGF permet un retour au niveau normal de la spermatogenèse.

Les cellules de Sertoli sécrètent un facteur qui empêche l'EGF de se lier à son récepteur (Holmes et coll., 1986) : le TGF- $\alpha$ , "Transforming growth factor- $\alpha$ " (Skinner et coll., 1989). Le TGF- $\beta$  est une molécule multifonctionnelle de régulation, produite par les cellules de Sertoli qui stimule et inhibe les aspects de la croissance et de la différenciation cellulaire (Roberts et Sporn, 1988).

### **III. LA VITAMINE B<sub>12</sub>**

### 3.1. GENERALITES SUR LA VITAMINE B<sub>12</sub>

La découverte de la vitamine B<sub>12</sub> est étroitement liée aux différentes tentatives de traitement d'une maladie nommée "Anémie de Biermer" encore appelée "anémie pernicieuse", individualisée au siècle dernier et dont les causes sont demeurées inconnues pendant plusieurs décennies. C'est en 1822 que J.B. Combe décrit pour la première fois l'anémie de Biermer et ce n'est qu'un siècle après, en 1926, que Minot et Murphy arrivent à traiter avec succès cette anémie par administration de quantités importantes de foie cru. Quelques années plus tard, en 1929, Castle découvre un composé actif antipernicieux en couplant du foie cru (produisant un facteur extrinsèque) avec un suc gastrique (produisant un facteur intrinsèque).

En 1948, deux équipes de chercheurs, Rickes et coll. (USA), ainsi que Smith et coll. (GB), identifient et isolent le facteur extrinsèque à partir d'un extrait de foie auquel fut donné le nom de la vitamine B<sub>12</sub>. Le facteur intrinsèque, quant à lui, ne fut isolé que beaucoup plus tard, en 1966, par Gräsbeck et coll.

En 1954, Pitney et coll. découvrent dans le sérum les premiers accepteurs (transporteurs) de la vitamines B<sub>12</sub> de la famille des protéines R. Deux autres accepteurs de la vitamine B<sub>12</sub> furent découverts en 1965 par Hall et Finkler qui sont la TC I, appartenant aux protéines R et la TC II.

Simons et Garäsbeck (1963) montrent que les protéines R possédaient toutes les mêmes propriétés immunologiques. Bloomfield et Scott (1972) identifient deux formes de protéines R, la TC I et la TC III.

Les protéines R se combinent à toutes les formes de corrinoïdes. C'est pourquoi Nexø et Olesen leur ont donné le nom d'haptocorine.

Les accepteurs de la vitamines B<sub>12</sub> sont de trois natures: le FI, l'Haptocorine et la TC II.

### 3.2. STRUCTURE DE LA VITAMINE B<sub>12</sub>

La cobalamine (Cbl) appartient à la famille des corrinoïdes. Son étude structurale fut réalisée aux rayons x par Dorothy Crowfoot-Hodgkin en 1961. La Cbl est une molécule hydrosoluble formée de trois parties (fig.: 7) :

- un noyau tétrapyrrolique, de nature corrinique, (4 noyaux pyrole A, B, C et D) renfermant en son centre un atome de cobalt uni aux azotes des noyaux pyroles par des liaisons de coordinance. Le noyau tétrapyrrolique constitue la partie centrale plane de la molécule.
- un nucléotide benzimidazolique (5,6-diméthylbenzimidazole-ribose-3-phosphate), en position perpendiculaire à la corrine et lié à l'atome de cobalt.
- en position  $\beta$  et lié à l'atome de cobalt par la sixième liaison de coordinance se trouve le ligand (-R) anionique qui est variable et labile et qui peut être:
  - un groupement hydroxyle dans l'hydroxocobalamine (OH-Cbl), forme physiologique et pharmacologique utilisée pour le traitement des carences en Cbl.
  - un groupement méthyle dans la méthylcobalamine (Me-Cbl), forme coenzymatique.
  - un radical 5' désoxyadénosyl dans l'adénosylcobalamine (Ado-Cbl), deuxième forme coenzymatique connue de la Cbl.
  - un groupement cyanure dans la cyanocobalamine (CN-Cbl), principale forme de production industrielle par fermentation bactérienne de la vitamine B<sub>12</sub>. C'est la forme la plus stable, mais elle est en faible concentration dans l'organisme; elle n'est pas biologiquement active et son utilisation intracellulaire nécessite une conversion préalable en une forme de coenzyme (Marcoullis et Nicolas, 1983).
  - un groupement nitrite dans la nitrocobalamine.
  - un groupement aqueux dans l'aquocobalamine.
  - un groupement thiocyanate dans la thiocyanocobalamine.

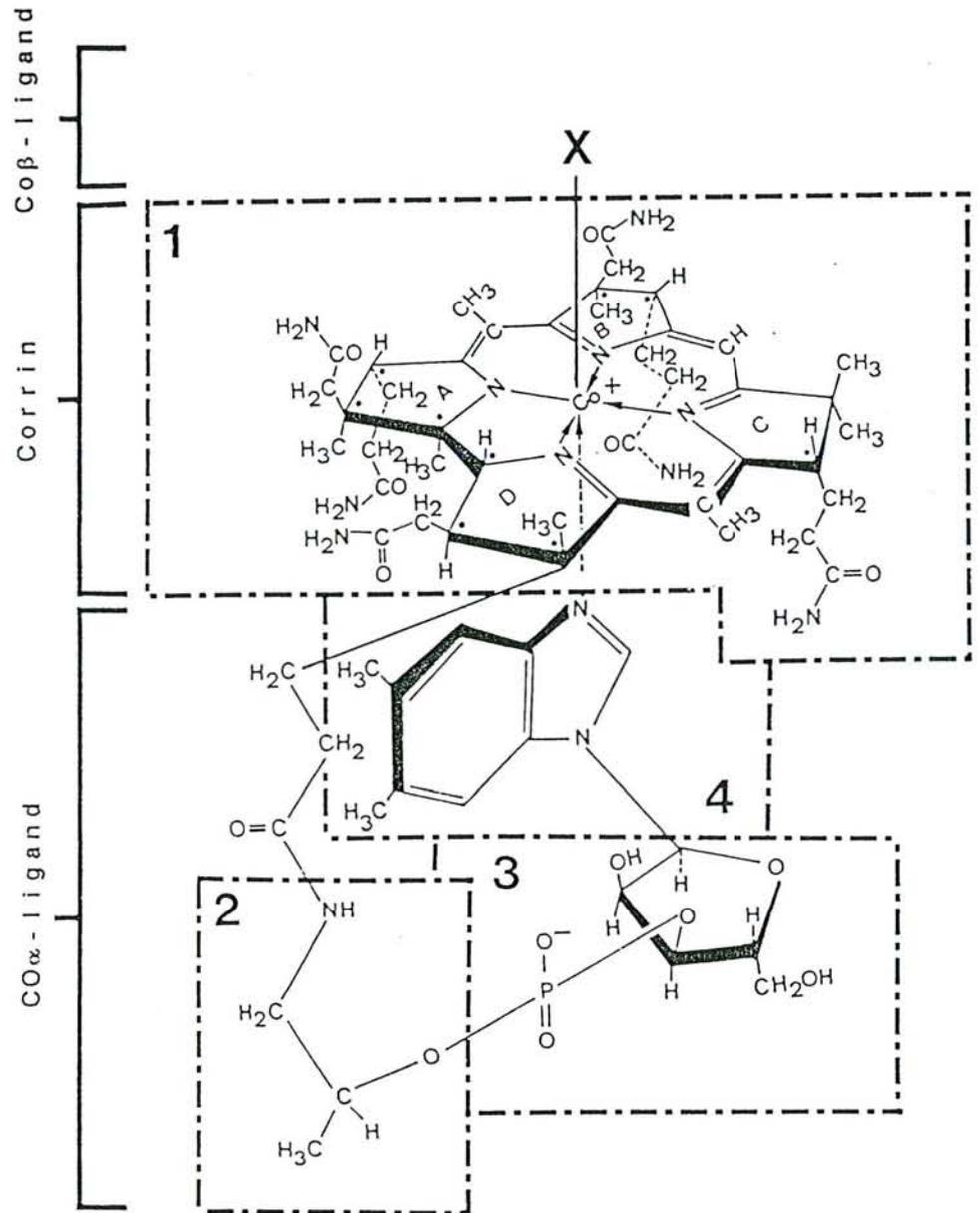


Figure 7. Structure de la cobalamine. 1: le noyau tétrapyrrolique de nature corrinique; 2: amino-1-propanol-2; 3: ribose-3'-phosphate; 4: 5,6-diméthyl-benzimidazole; le groupe X peut être: un hydroxyl, un méthyl, un radicale 5' désoxyadénosyl, un groupement cyanure ...

Il existe des analogues de la vitamines B<sub>12</sub> qui comportent des modifications de la structure chimique de la Cbl dont les principales formes sont caractérisées par:

- l'absence de Nucléotide: Cobinamide.
- la modification au niveau du Nucléotide: Cobamide.
- d'autres analogues qui diffère de la Cbl par la nature du ligand (-R) et peuvent contenir un atome central autre que le cobalt, le cuivre, le zinc, le fer,... (Kopenhagen et coll., 1979 ; Elsenhans et Rosenberg, 1984).

On distingue trois formes de vitamines B<sub>12</sub> selon le degré de valence de l'atome de cobalt:

B<sub>12a</sub> : cobalt trivalent Co<sup>+++</sup>

B<sub>12r</sub> : cobalt divalent Co<sup>++</sup>

B<sub>12s</sub> : cobalt monovalent Co<sup>+</sup>

### 3.3. BIOSYNTHESE DE LA VITAMINE B<sub>12</sub>

La synthèse de la vitamine B<sub>12</sub>, tout au moins dans les premières étapes, est identique à celle de l'hème de la chlorophylle qui est une porphyrine (fig.: 8)

L'acide cobyrique, l'un des précurseur de cette biosynthèse, a été identifié dans des cultures de micro-organismes capables de synthétiser la vitamine B<sub>12</sub> (*Propionibacterium Shermanii*). D'autres précurseurs sont également identifiés dans ces cultures, tels que le succinyl coenzyme A et la glycine qui se combinent pour donner l'acide δ Amino-lévulinique. L'isomère Uroporphyrinogène III est un intermédiaire entre le porphobilinogène et l'acide cobyrique (Scott et coll., 1974). C'est après la formation de l'Uroporphyrinogène III que les voies de biosynthèse des porphyrines et des corrines se séparent.

### 3.4. BESOIN ET SOURCE DE LA VITAMINE B<sub>12</sub>

Les Cbl sont synthétisées exclusivement par les micro-organismes, certaines bactéries, levures ou algues (Smith EL, 1965). Certains d'entre eux font partie de la flore digestive des herbivores, ce qui explique pourquoi ces animaux ne développent pas une déficience en Cbl malgré l'absence d'une prise alimentaire riche en Cbl. Chez l'homme, la plus grande partie de la vitamine B<sub>12</sub> provient

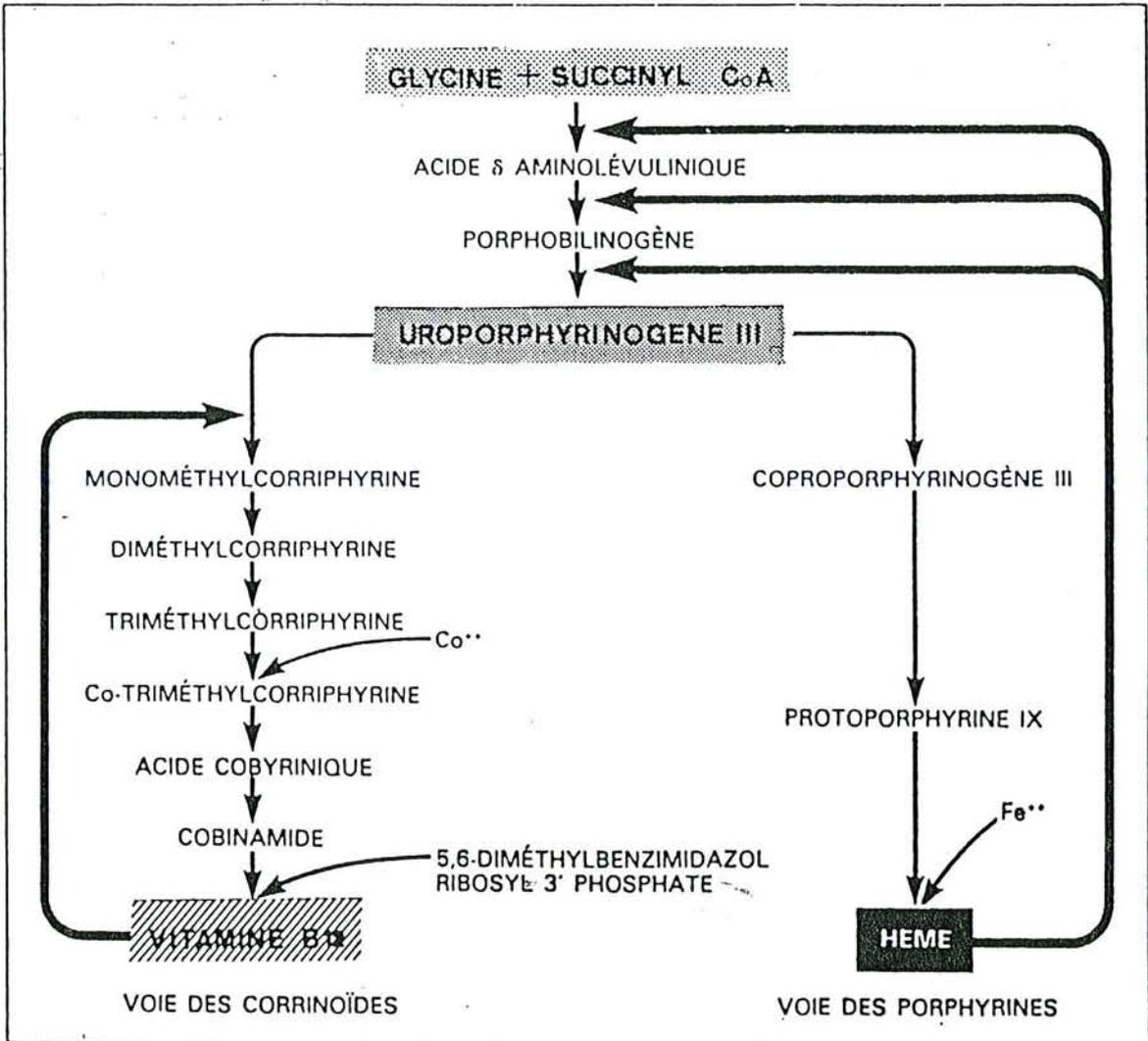


Figure 8. Biosynthèse de la vitamine B<sub>12</sub>. La vitamine B<sub>12</sub> aussi bien que l'hème de la chlorophylle, sont synthétisés à partir de la glycine et du succinyl-CoA. Ces deux molécules ont un tronc commun de biosynthèse conduisant à l'Uroporphyrinogène III. Cette partie commune de biosynthèse est régulée par l'hème.

de l'alimentation. Les aliments qui contiennent la vitamine B<sub>12</sub> sont essentiellement ceux d'origine animale : le foie, les reins, la viande, les œufs, les produits laitiers, le poisson (Smith EL, 1965). Ainsi, la vitamine B<sub>12</sub> provient essentiellement d'une alimentation carnée.

Les végétaux ne contiennent pas de la vitamine B<sub>12</sub>, mais certains micro-organismes qui synthétisent la vitamine B<sub>12</sub> se développent dans le sol, et sont retrouvés dans les rhizomes des légumineuses.

La Cbl, comme toutes les autres vitamines, est indispensable à l'homme en petite quantité et doit être apportée par l'alimentation. Les besoins quotidiens varient avec l'âge. Ils sont estimés à 0,3 µg chez le nourrisson (Herbert Y, 1987), 0,06 µg/Kg du poids corporel chez l'enfant (Giugliani et coll., 1985) et à 2 µg/jour à l'âge adulte (Herbert Y, 1987). Les besoins journaliers augmentent en période de grossesse et d'allaitement maternel à 2,5 µg.

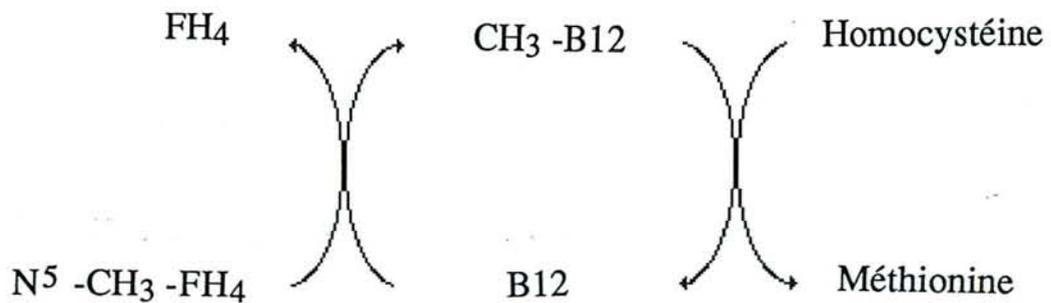
### 3.5. LE ROLE BIOCHIMIQUE DE LA VITAMINE B<sub>12</sub>

La vitamine B<sub>12</sub> joue un rôle essentiel dans le métabolisme intermédiaire, dans le métabolisme des tissus à renouvellement rapide chez l'homme (lignées cellulaires de l'hématopoïèse, cellules épithéliales des revêtements muqueux) et dans le métabolisme intracellulaire des mammifères.

La vitamine B<sub>12</sub>, sous sa forme coenzymatique (MeCbl et AdoCbl), est un co-facteur nécessaire à une dizaine de réactions enzymatiques, identifiées et étudiées dans les micro-organismes (Hogenkamp, 1968 ; Barker, 1972). Certaines d'entre elles sont bien connues chez l'homme.

-La MeCbl est l'enzyme des réactions de méthylation par transfert du radical -CH<sub>3</sub>. C'est le cas d'une réaction très importante catalysée par la N-méthyltétra-hydrofolate-homocystéine-méthyltransférase (Larrabee et coll., 1963 ; Chanarin I., 1969). Cette enzyme permet, en présence de FADH<sub>2</sub>, le transfert du groupement méthyle du N<sup>5</sup>-méthyl FH<sub>4</sub> sur la MeCbl puis sur l'homocystéine, ce qui aboutit à la formation de méthionine à partir d'homocystéine. En participant à cette synthèse, la vitamine B<sub>12</sub> est impliquée directement dans la synthèse des protéines. En plus, cette réaction permet la régénération de l'acide tétra-hydrofolique (FH<sub>4</sub>), forme active des folates, à partir de l'acide N<sup>5</sup>-méthyl FH<sub>4</sub> (Herbert V., 1973).

Cette réaction peut se schématiser de la manière suivante:

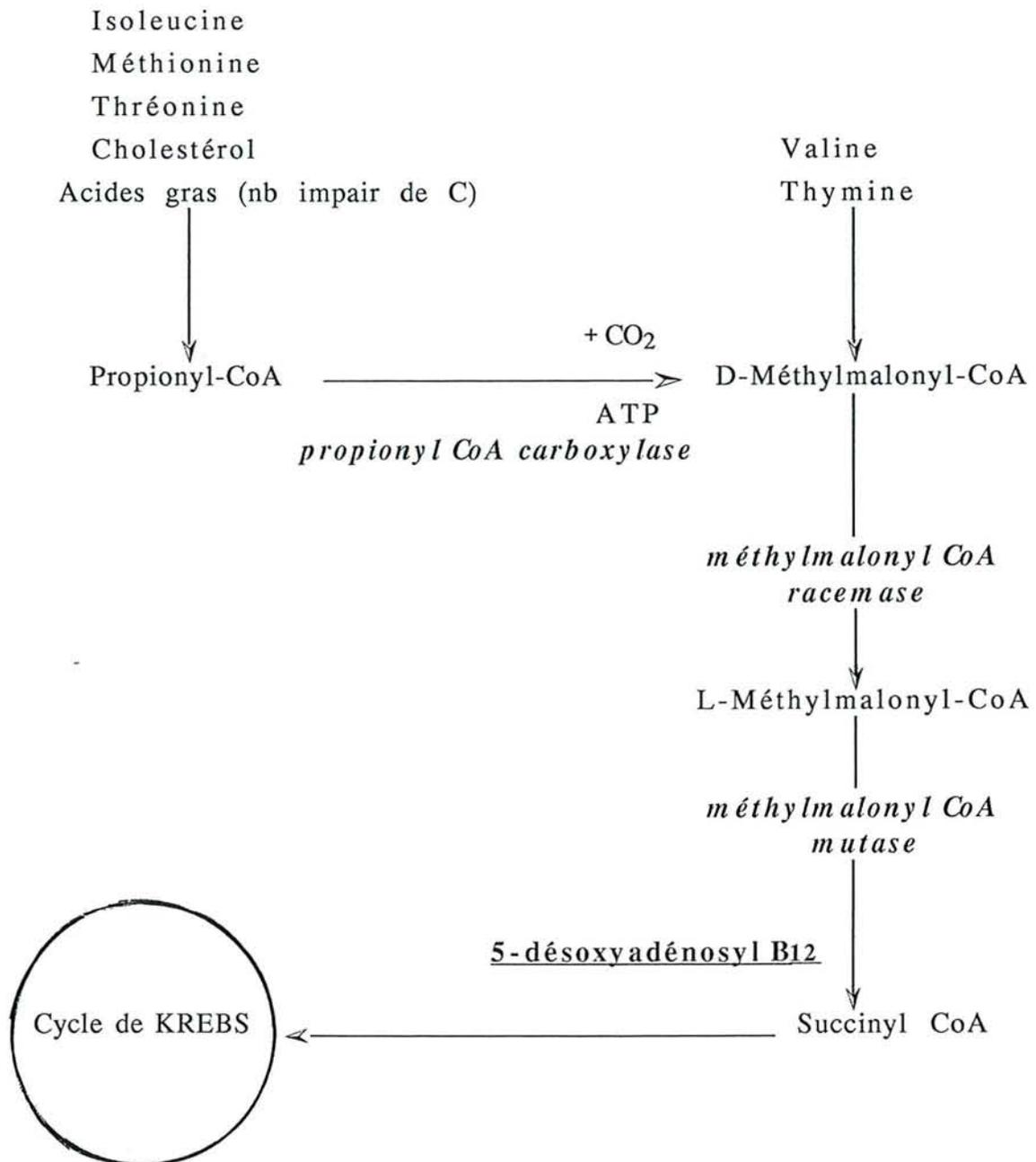


En cas de carence en MeCbl, cette réaction est bloquée. Il y a augmentation du  $N^5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$ .

Le blocage de cette réaction a deux conséquences: le blocage de la régénération de la méthionine perturbe le métabolisme des acides aminés soufrés et explique l'excrétion urinaire augmentée d'homocystéine. L'absence de régénération du tétrahydrofolate bloque la régénération du  $N^5$ -méthyl-tétrahydrofolate, qui est une coenzyme de la thymidylate synthétase. Il y a donc blocage de la synthèse de l'ADN (Chanarin I.,1978), ce qui pourrait expliquer en partie la mégaloblastose médullaire observée suite à la carence en Cbl.

▫ L'AdoCbl catalyse des réactions de déshydrogénation et d'isomérisation ainsi que des réactions de réduction des sucres. Ces réactions sont toutes régies par un mécanisme de transfert d'hydrogène, le coenzyme se comporte comme un donneur ou un accepteur d'hydrogène.

Une des réactions les mieux connues est celle qui permet l'interconversion entre le méthyl-malonyl-CoA et le succinyl-CoA et qui est catalysée par la méthyl-malonyl-CoA mutase (Beck et Ochoa, 1958 ; Hogenkamp, 1968).



Il s'agit d'une isomérisation par transfert intra-chaine d'hydrogène suivie par un transfert de carbone par laquelle le méthyl-malonyl-CoA est converti en succinyl-CoA qui est transformé ensuite en acide succinique. Celui-ci sera métabolisé dans le cycle de Krebs. En cas de carence en AdoCbl, il y'a augmentation du méthylmalonyl-CoA circulant qui est éliminé dans les urines sous forme d'acide méthylmalonique.

Cette réaction permet l'utilisation de l'acide propionique, composé qui résulte de l'oxydation des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone (et de certains acides aminés: isoleucine, valine, thréonine).

Chez les micro-organismes, l'AdoCbl est un facteur nécessaire à la synthèse de l'ADN à partir de l'ARN par la transformation des ribonucléotides en désoxyribonucléotides. Cette réduction est catalysée par la ribonucléoside-triphosphate réductase chez *Lactobacillus leichmanii*. Chez l'homme, les cellules de la lignée érythroblastique présente un défaut de maturation en cas de carence de Cbl entraînant ainsi le blocage de la mitose et l'élévation du rapport ARN/ADN dans les mégalo blasts. Ces perturbations pourraient être expliquées, en partie, par l'existence éventuelle d'une enzyme Cbl-dépendante permettant la synthèse des précurseurs d'ADN.

Ces réactions peuvent être schématisées de la manière suivante :

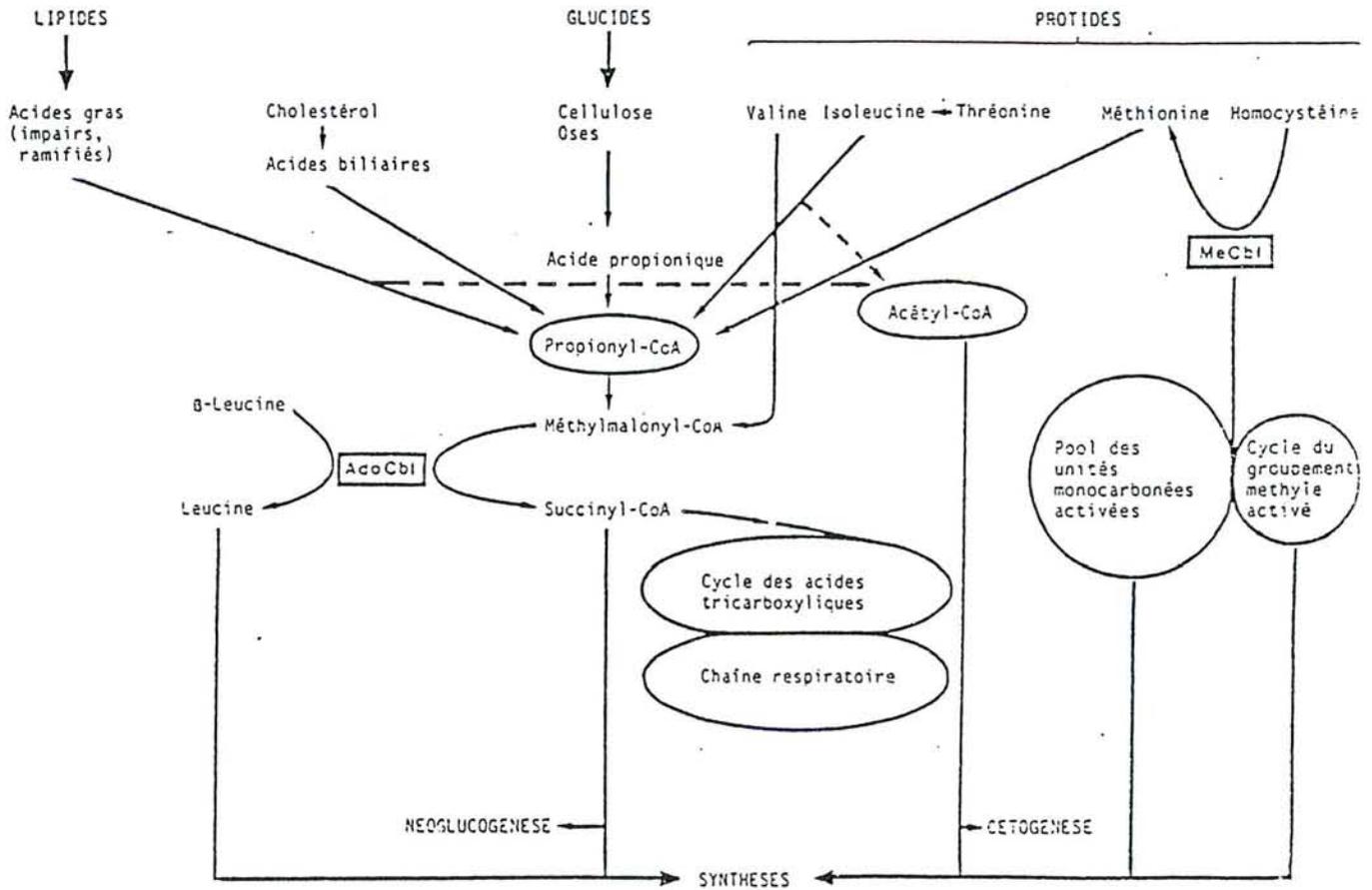


Figure 9. Fonctions clés de la cobalamine (Y. Parmentier, 1986)

## **IV. LA TRANSCOBALAMINE II**

#### 4.1. DEFINITION ET NOMENCLATURE DE LA TC II

Dans le sang, la vitamine B<sub>12</sub> est liée à deux types de protéines sériques (Pitney et coll., 1954). Les protéines qui migrent électrophorétiquement avec les β-globulines et sont considérées comme étant les principales protéines de transport de la vitamine B<sub>12</sub> et désignées par la TC II (Hall et Finkler, 1963). Les protéines qui migrent avec les α-globulines désignées par TC I et TC III et présentes en petites quantités dans le plasma (0,5 à 1,5 μg/l), notamment en forme libre. L'appellation transcobalamine est liée à la fonction de la molécule, c'est-à-dire au transport de la cobalamine et à son transfert aux récepteurs membranaires des cellules.

#### 4.2. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA TCII

La liaison entre la B<sub>12</sub> et la TC II se fait selon un rapport équimolaire. Contrairement au FI, la TC II lie aussi la pseudo-vitamine B<sub>12</sub> et le diméthyl-benzimidazole. Les changements dans le cycle B du noyau corrin décroît la liaison mais pas aussi remarquablement que dans le cas du FI (Retief et coll., 1966 ; Hippe et coll., 1971). Comme dans le cas du FI, les sites de combinaisons les plus probables sont le cycle B corrin et le cycle benzimidazole, mais le mécanisme de fixation de la B<sub>12</sub> à la TC II est différent (E. Nexø 1977).

La constante d'équilibre (K<sub>ass</sub>) de la réaction:



à pH 7,4 à 26° C et avec la cyanocobalamine est de 281.10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> (Hippe et coll., 1971).

#### 4.3. PURIFICATION DE LA TC II

Putula et Gräsbeck (1972) ont obtenu à partir de la fraction III de plasma humain, dite "de Cohn", une purification d'un million de fois de la TC II en utilisant une chromatographie échangeuse d'ions et une filtration sur gel. Le produit final contient uniquement 37% de TC II-B<sub>12</sub> et la nature du reste du produit reste incertaine.

Allen et Majerus (1972) ont purifié la TC II à partir de la fraction III de Cohn. Ils ont utilisé la chromatographie d'affinité avec Sépharose- B<sub>12</sub> éluée avec 7,5 M de guanidine suivie d'une série de techniques classiques de purification de protéines (chromatographie sur gel DEAE-cellulose-A suivie d'une chromatographie sur gel Sépharose-A couplé avec 3,3'Diamino-dipropylamine et enfin une chromatographie sur gel Séphadex G-150). Le rendement final était uniquement de 13% mais une purification de 2 millions de fois était atteinte et le produit final était homogène sur gel polyacrylamide, ultracentrifugation et chromatographie sur séphadex G 150. La TC II contenait un seul site de liaison de B<sub>12</sub> par molécule, avec une activité spécifique de liaison de 28,6 µg de B<sub>12</sub> par mg de protéine. La masse moléculaire était de 53900 Da par sédimentation, 60000 Da par gel filtration et 59500 Da par analyse du contenu en acide aminé. Cependant, l'électrophorèse en SDS indique la présence de deux composants de masse moléculaire de 38000 Da et de 25000 Da. Allen en 1975 et Schneider et coll. en 1976 suggèrent que la masse moléculaire correcte est de 38000 Da, le peptide de 25000 Da pouvant correspondre à une dénaturation de la protéine.

Savage et coll. (1976) ont simplifié la procédure d'Allen et Majerus en incorporant une étape de précipitation au point isoélectrique. Leur préparation finale liait 26,7 µg de B<sub>12</sub> par mg de protéine. Cette procédure, bien que simplifiée, implique encore l'utilisation de guanidine.

Nexø (1977) évite la guanidine en utilisant la chromatographie d'affinité thermolabile suivie d'une filtration sur gel G200 pour purifier la TC II du sérum du lapin. Le rendement est de 80% et une homogénéité apparente est confirmée en électrophorèse en SDS sur gel de polyacrylamide.

#### 4.4. SITE DE SYNTHÈSE DE LA TC II

Les études de Tan et Hansen (1968) ont montré que la synthèse de la TC II dans l'organisme n'est pas affectée par l'enlèvement de la rate, des reins et de l'estomac.

En 1973, England et coll. et en 1974, Cooksley et coll. ont étudié le foie par perfusion isolé. Ils ont constaté que la concentration de TC II augmentait dans les perfusats et que la <sup>14</sup>C-leucine était incorporée dans une

fraction de protéine éluée du séphadex G100 dans la même position que la TC II.

Savage et Green (1976) ont étudié des cellules parenchymateuses du foie de rat en culture cellulaire ; le milieu de culture contient des acides aminés marqué au carbone 14. Ils ont obtenu de la transcobalamine marquée au carbone 14 dans le milieu de culture. Cette synthèse de TC II a été bloquée par la cycloheximide, la puromycine et la fluorophénylalamine.

Ces résultats montrent que le foie est un site de synthèse de la TCII.

Sonneborn et coll. (1972) ont montré que les chiens hépatectomisés synthétisent la TC II aussi rapidement que les chiens normaux, ce qui rend évident la synthèse de la TC II par d'autres tissus que le foie.

Hall et Rappazzo (1975) ont étudié par perfusion le cœur, la rate, le foie et le rein de chien isolés. Ils ont obtenu une accumulation de la TC II dans le perfusât de chaque organe, mais leur expérience n'a pas différencié une nouvelle synthèse de la TC II par ces organes de la simple mobilisation de TC II stockée dans ces organes.

Green et coll. (1976) et Rachmilewitz et coll. (1977) ont montré la synthèse de la TC II par des cultures de fibroblaste et des cultures de macrophage de souris. La synthèse de la TC II par les deux lignées a été bloquée par la cycloheximide et la puromycine.

Rothenberg et coll. (1978) ont étudié la synthèse de la TC II par immunofluorescence indirecte appliquée à une suspension d'enterocyte iléale de cobaye après les avoir incubé avec du sérum anti-TC II de poulet. Ils ont pu conclure à l'existence de la TC II dans les enterocytes iléaux . Cependant, les photos publiées montrent une fluorescence considérable dans les coupes de contrôle utilisant le sérum de poulet normal.

Les mêmes auteurs ont travaillé sur la muqueuse iléale de cobaye en culture après les avoir incubé in vivo avec le facteur intrinsèque saturé (IF-B<sub>12</sub>). Ils ont observé une accumulation de la TC II qui n'était pas inhibée par la puromycine ou la cycloheximide .

Notre groupe a montré la synthèse de la TC II par les cellules HT29 (Schohn, Guéant et coll., 1991). Cette synthèse a été bloquée par la cycloheximide.

Seetharman et Alpers (1985) ainsi que Dix et coll. (1986 et 1990) ont montré que les cellules CaCo-2 synthétisent et sécrètent de la TC II. Cette synthèse était inhibée par la cycloheximide, la colchicine et la cytochalasin B.

#### 4.5. ROLE BIOCHIMIQUE DE LA TC II

En 1965, Hall et Finkler ont montré que la B<sub>12</sub> marquée ingérée ou injectée se lie à la TC II. Ils ont suggéré que la TC II était un transporteur de la vitamine B<sub>12</sub> de tissu à tissu (Rappazzo et Hall, 1972). La liaison de la B<sub>12</sub> avec la TC II a été confirmée par plusieurs chercheurs: Hom et Olesen, 1969 ; England et coll., 1973 ; Hall et coll., 1975 ; Chanarin et coll., 1978 ...

Il a été démontré aussi que la TC II favorise la capture de la B<sub>12</sub> par une variété de tissus, y compris les cellules amniotiques et les cellules de rein (Finkler et Hall, 1967), les reticulocytes (Retief et coll., 1966), les fibroblastes (Rosenberg et coll., 1973), le foie intact (Finkler et Hall, 1967), la membrane du placenta (Freidman et coll., 1977), les cellules leucémiques de la souris (DiGirolamo et Heunnenkens, 1975), le foie du chien (Rappazzo et Hall, 1972), la rate et le cœur du chien (Hall et Rappazzo, 1972)...

La demi-vie dans le plasma de la B<sub>12</sub> liée à la TCII chez l'homme a été estimée d'une façon variable à 5 mn (Allen, 1976), 1,5 heure (Hom, 1967) et 28 heures (England et coll., 1973). Cependant, Hom a montré que lorsque la TC II-B<sub>12</sub> est injectée dans le corps humain, seulement 32% sont présents dans le plasma à 10 mn, suggérant sa distribution dans un ou plusieurs compartiments d'échange rapide. Cette dispersion rapide dans un compartiment extra-vasculaire est probablement responsable des valences largement différentes citées et fait que le concept de la demi-vie de la TCII plasmatique est sujet à caution.

Schneider et coll. (1976) ont marqué la TC II avec de l'Iode 125 et ils ont étudié son devenir lorsqu'elle est associée à la <sup>57</sup>Co-B<sub>12</sub> injectée au lapin en la comparant à de la BSA marquée à l'Iode 134 qu'ils ont également injecté au lapin. En 30 minutes, la TC II marquée à l'Iode 125 et la B<sub>12</sub> marquée au Cobalt 57 étaient présentes en excès par rapport à la BSA marquée à l'Iode 134 dans le rein, le foie, la rate, le cœur, le poumon et l'intestin grêle. Schneider et coll. ont suggéré une captation sélective du complexe TC II-B<sub>12</sub> par les tissus. Pendant la première heure le taux de <sup>125</sup>I

et  $^{57}\text{Co}$  dans le plasma restait constant mais plus tard le taux baissait tandis qu'un fragment de faible poids moléculaire (inférieur à 1000) marqué à  $^{125}\text{I}$  apparaissait dans l'urine, suggérant que le complexe TC II- $\text{B}_{12}$  pourrait être capté par les cellules par pinocytose et la TC II dégradée par les enzymes lysosomiales, libérant ainsi la  $\text{B}_{12}$  pour qu'elle puisse être utilisée dans le métabolisme intracellulaire et/ou revenir plus tard dans le plasma liée à une autre TC II. Lorsque la TC II sans vitamine  $\text{B}_{12}$  a été injectée aux lapins, la baisse de la concentration de la TC II était de 30% plus rapide que celle du complexe TC II- $\text{B}_{12}$ . Cependant la TC II utilisée dans ces expériences a été exposée à 7M de guanidine pendant sa préparation, ce qui pourrait dénaturer la protéine.

Chez l'Homme, Donaldson et coll. (1977) quant à eux montraient que l'injection intraveineuse de la  $\text{B}_{12}$  réduisait la TC II total du plasma à 53% en 30 minutes, une similaire a été remarquée par Begley et coll. (1977) après une injection intramusculaire de la vitamine  $\text{B}_{12}$ . Dans les deux cas la baisse rapide de la TC II totale a été suivie par un retour graduel au niveau initial après plusieurs heures. Cette baisse précoce pourrait être expliquée par une capture plus rapide par les tissus de la TC II- $\text{B}_{12}$ . Ceci pourrait correspondre aux observations de Friedman et coll. (1977), Seligman et Allen (1978) ainsi que E. Nexø et Hollenberg (1980), montrant que les sites de liaison de la membrane de placenta humain ont une affinité plus élevée à la TC II- $\text{B}_{12}$  qu'à la TC II seule.

Des résultats contradictoires de Schneider et coll. (1976) montrent que la TC II disparaît plus vite du plasma que le complexe TCII- $\text{B}_{12}$ .

## **V. ENDOCYTOSE**

Pendant les vingt dernières années l'endocytose récepteur-médiée a été reconnu comme un mécanisme par lequel les cellules animales internalisaient plusieurs macromolécules (Goldstein et coll., 1979 ; Bretscher et Pearse, 1984). Le concept de l'endocytose récepteur-médiée a été formulé en 1974, par Goldstein et Brown, pour expliquer la régulation du cholestérol cellulaire qui dépend de la liaison séquentielle de la surface cellulaire, de l'internalisation et de la dégradation de la LDL.

Le mécanisme de la captation a été suggéré sur la base d'études biochimiques ; il a été très vite vérifié morphologiquement (Anderson et al. 1976). Le processus est initié lorsque les récepteurs de la surface cellulaire lient les macromolécules et se glissent latéralement vers les puits recouverts de clathrine. Les puits recouverts s'invaginent et se referment pour former des vésicules endocytiques recouvertes. Après s'être débarrassées de leurs couvertures de clathrine, les vésicules fusionnent ensemble pour former des endosomes dont le contenu est acidifié par des pompes à protons (Tycko et Maxfield, 1982 ; Pastan et willingham, 1983). A l'intérieur de l'endosome le ligand et le récepteur restent liés. Le ligand est transporté vers les lysosomes pour être dégradé, alors que le récepteur revient à la surface cellulaire pour lier de nouveaux ligands (Brown et coll., 1984).

Un grand nombre de récepteurs spécifiques participent à l'endocytose récepteur-médiée. Ces récepteurs font partie des récepteurs qui reconnaissent des protéines de transport qui délivrent les nutriment aux cellules telles que, la lipoprotéine transportrice du cholestérol (LDL), la transferrine, la transcobalamine. L'endocytose récepteur-médiée s'applique à plusieurs protéines non transportrice, y compris les asialoglycoprotéines, l' $\alpha_2$ macroglobuline, les enzymes lysosomales (dont les récepteurs reconnaissent les résidus manose-6-phosphate des protéines), certains virus et toxines (qui pénètrent dans la cellule, apparemment, en se liant à des récepteurs qui fonctionnent normalement dans la captation d'autres substances), les facteurs de croissance (tels que EGF, PDGF,...), les hormones polypeptidiques (insuline, LH,...) et d'autres.

## 5.1. LES CHEMINS DE L'ENDOCYTOSE RÉCEPTEUR-MÉDIÉE

Les différents parcours de l'endocytose récepteur-médiée partagent un critère commun : les récepteurs se déplacent vers les puits recouverts et les vésicules recouvertes. 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 contiennent toutes de la clathrine.

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

Classe I : le récepteur et son ligand sont dissociés l'un de l'autre, le récepteur est recyclé vers la membrane plasmique alors que son ligand est dégradé dans le compartiment lysosomal.

Classe II : le récepteur et son ligand sont recyclés à la surface cellulaire.

Classe III : le récepteur et son ligand sont dégradés dans le compartiment lysosomal.

Classe IV : la transcytose, le récepteur et son ligand sont libérés à la face opposée d'une cellule polarisée.

L'ensemble de ces mécanismes est illustré schématiquement dans la figure : 10.

## 5.2. MODELE D'INTERNALISATION DE LA TC II

La TC II fait partie de la classe I où le récepteur et son ligand sont dissociés l'un de l'autre, dans l'endosome, suite à la baisse du pH. La TC II est ensuite transportée vers les lysosomes, où elle sera dégradée. Le récepteur quitte l'endosome, apparemment par incorporation dans une vésicule qui bourgeonne de la surface de l'endosome. Ces vésicules recyclantes commencent en tant qu'extensions de l'endosome, qui recueillent les récepteurs et sortent du corps de l'endosome (Geuze et coll., 1984).

Les récepteurs de la TC II transportent la TC II dans les cellules à un taux élevé. Un récepteur de TC II peut médier la captation d'une centaine de ligands pendant sa durée de vie. Le recyclage exige que le récepteur ait une structure stable qui lui permet de passer sans cesse à travers le milieu acide de l'endosome sans qu'il soit dénaturé. Dans les endosomes acides, le récepteur subit un changement conformationnel suffisant afin de pouvoir libérer la TC II, mais il n'est pas irréversiblement dénaturé (DiPaolo et Maxfield, 1984).

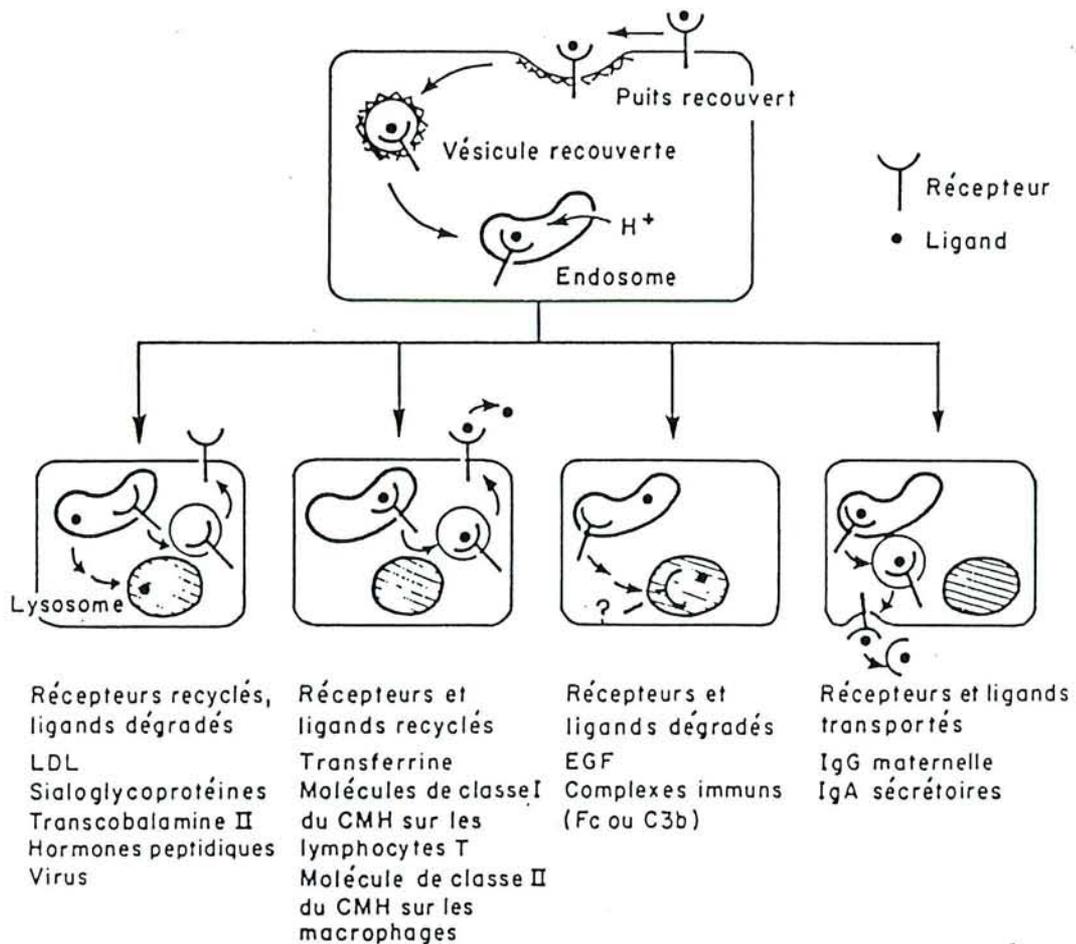


Figure 10. Il existe 4 mécanismes de l'endocytose récepteur médié. Dans le modèle des LDL, le récepteur est recyclé vers la surface de la cellule et le ligand est dirigé vers les lysosomes. Dans le modèle de la transferrine, le récepteur et le ligand sont recyclés sur la surface cellulaire. Dans le modèle de l'EGF, récepteur et ligand sont détruits au niveau des lysosomes. Dans la transcytose, le complexe récepteur-ligand traverse la cellule d'un pôle à l'autre. (d'après Goldstein et coll., 1985)

# **EXPOSE DES TRAVAUX**

## **I. BUT DU TRAVAIL**

Au cours de ce travail nous avons semi-purifié la TC II par chromatographie d'affinité en utilisant l'héparine-sépharose. Nous avons marqué la TC II sérique d'une façon spécifique par la  $^{57}\text{Co}$ -Cbl. Le complexe  $^{57}\text{Co}$ -Cbl-TC II est obtenu par filtration sur gel sephacryl S200. Pour l'autohistoradiographie nous avons utilisé une TC II qui a été purifiée par Ebba Nexø et que nous avons marqué à l'Iode 125.

Nous étudierons ensuite la liaison de la TC II avec le récepteur membranaire des cellules germinales en utilisant d'abord des cellules entières ensuite des fractions riches en membrane plasmique. Ces études porteront sur l'étude cinétique de la liaison, sa spécificité, et les paramètres de la liaison.

Nous allons essayer de voir le mode d'internalisation de la TC II en utilisant des drogues telles que la cycloheximide et la chloroquine. La première bloque la transcription des ARNm en agissant sur l'ARN de transfert ce qui va bloquer la synthèse du récepteur. La deuxième inhibe la pompe à proton entraînant ainsi l'augmentation du pH dans le compartiment endosomal et empêchant ainsi la dissociation de la TC II de son récepteur. Ce dernier étant fixé à la TCII ne peut pas rejoindre la membrane plasmique et en conséquence ne peut être recyclé.

Nous utiliserons également des méthodes autoradiographiques pour étudier la pénétration de la TC II dans les différents compartiments cellulaires de la lignée germinale du lapin mâle.

L'ensemble de ces expériences permettra une caractérisation de ce récepteur.

## **II. MATERIEL ET METHODES**

## **2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE**

### **2.1.1. Les animaux**

Ce sont des lapins adultes, de race Fauve de Bourgogne, d'âge moyen de 22 semaines. leur poids moyen est de 2,5 Kg.

### **2.1.2. Préparation du sérum du lapin**

Les lapins sont sacrifiés, leur sang est récupéré dans des tubes secs. Après rétraction du caillot, le sang est centrifugé à 1500g et les sérums sont mélangés et stockés à -20°C.

### **2.1.3. Isolement des cellules germinales**

Les lapins (rats) sont anesthésiés et les testicules sont prélevés dans un milieu de culture RPMI 1640 (pH 7) contenant des antiprotéases (leupeptine, pepstatine, Benzamidine,...) et des antibiotiques (bacitracine). L'ensemble des étapes se déroule sur de la glace pilée.

Les testicules sont coupés en petits morceaux et broyés dans un potter pour permettre la libération des cellules germinales. Après décantation d'une minute on élimine les fragments de tubes séminifères et cellulaires, restés en suspension, le produit de décantation est filtré à travers du coton hydrophile stérile pour éliminer les débris tissulaires. Les globules rouges sont éliminés en les exposant à un choc osmotique. Le culot issu de la décantation est incubé pendant cinq secondes avec un volume de 5 ml d'eau distillée juste après le même volume d'une solution à 18‰ de NaCl est ajouté. Le mélange est ensuite lavé en centrifugeant trois fois à 150 g pendant 15 mn dans le tampon Tris-HCl (20 mM) pH 7,4 contenant 0,125 M NaCl pour servir aux expériences ultérieures. Les cellules sont observées et comptées sous microscope optique. La viabilité cellulaire est déterminée par le test d'exclusion au bleu de trypan.:

Ainsi, nous préparons quatre volumes d'une solution de bleu de trypan à 0,2 % que l'on mélange avec un volume de solution de NaCl à 4,25%. Nous mixons alors un volume du mélange obtenu avec trois volumes de préparation cellulaire.

Le bleu de trypan diffuse à travers la membrane plasmique des cellules mortes, qui deviennent colorées. Après comptage en hématimètre le pourcentage de viabilité de notre préparation est évalué supérieur à 95%.

Cette méthode d'isolement mécanique, qui n'utilise pas les enzymes et les produits chimiques, ne dénature pas la surface des cellules germinales, ce qui évite la dénaturation des récepteurs membranaires.

La composition cellulaire obtenue est la suivante:

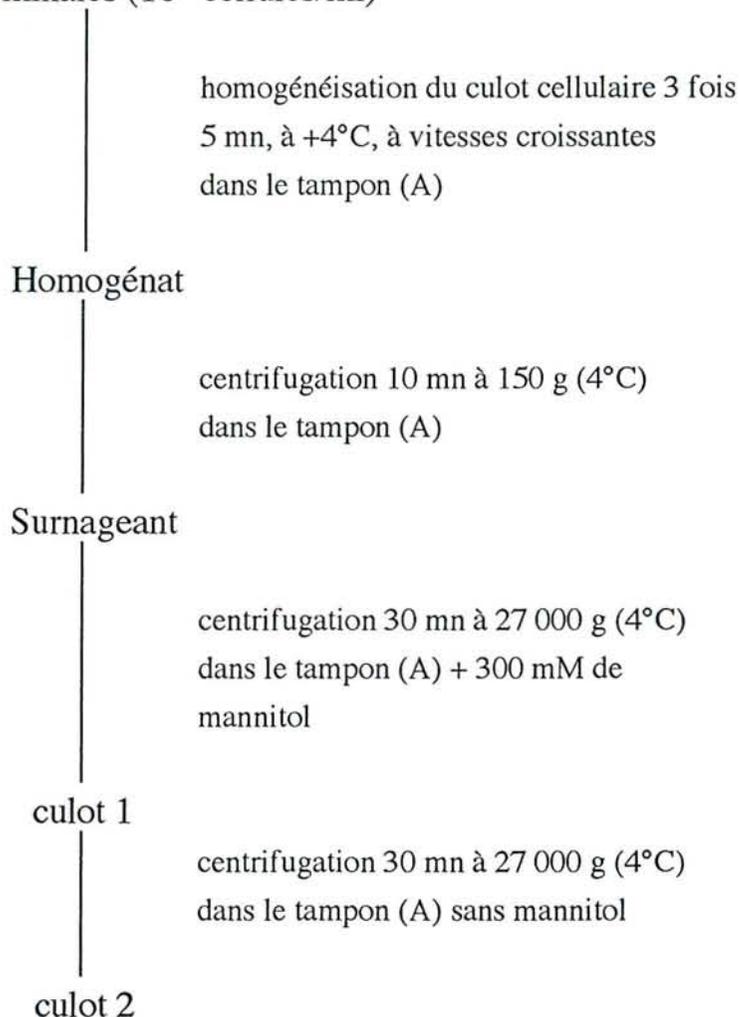
|                                       |               |
|---------------------------------------|---------------|
| Spermatogonies                        | : 4,0 ± 0,6 % |
| Spermatocyte primaires et secondaires | : 36 ± 0,2 %  |
| Spermatides allongées                 | : 20 ± 0,2 %  |
| Spermatozoïdes                        | : 1,0 ± 0,3 % |
| Cellules endommagées                  | : 2,0 ± 1,1 % |
| Autres cellules                       | : 5,0 ± 1,8 % |

#### **2.1.4. Préparation de fraction riche en membrane plasmique des cellules germinales**

Les cellules germinales obtenues précédemment sont en suspension dans le tampon (A) : Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contenant : 0,4 mM PMSF ; 0,1% Benzamidine ; 0,05% Bacitracine ; 1µg/ml Leupeptine ; 1µg/ml pepstatine A et 0,125 M NaCl. Les cellules sont broyées à vitesse croissante, à l'aide d'un Ultra-turax, plusieurs fois pendant cinq minutes (toutes les étapes se déroulent à 4°C), l'homogénat obtenu est centrifugé 10 mn à 150 g, le culot contenant les organites cellulaires (noyaux, mitochondries...) est écarté et le surnageant est recentrifugé à 27000 g pendant 1 heure. Le culot obtenu, riche en membrane plasmique, est resuspendu dans du Tris-Hcl à raison de 1 mg de protéines/ml. Les fractions ainsi préparées sont stockées à - 80°C.

Le tableau ci-dessous résume ces différentes étapes :

Cellules germinales ( $10^6$  cellules/ml)



## 2.2. METHODES BIOCHIMIQUES

### 2.2.1. Semi-purification de la TC II

La semi-purification de la Transcobalamine II (TC II) se base sur l'affinité de celle-ci à l'héparine (J. van Kapel et coll., 1988). Sur une colonne (50 cm x 2,5 cm) d'héparine couplée au sépharose (pharmacia) nous avons passé jusqu'à 150 ml de sérum, on peut décrire trois étapes dans cette purification:

- L'adsorption: Le sérum est mélangé (V/V) avec le tampon de couplage (Tris 20 mM pH 5,6 , sans NaCl) est passé sur la colonne avec un débit de 1 ml / mn.

- Le lavage: pour éliminer les contaminants, liés d'une façon non spécifique à l'héparine, la colonne est lavée abondamment par le tampon de couplage (20 fois le volume de la colonne).

- La désorption est effectuée par passage de tampon Tris-HCl 20 mM pH 9 contenant 1M NaCl. Des fractions de 3 ml sont collectées avec un débit d'élution de 2 ml/mn.

### 2.2.2. Test de charbon-hémoglobine

Ce test nous permet de déterminer la capacité totale que possède un échantillon pour fixer la B<sub>12</sub> (UB<sub>12</sub>BC: Unsaturated B<sub>12</sub> Binding Capacity). En ce qui nous concerne, nous avons utilisé ce test pour déterminer la quantité de TC II insaturée dans nos échantillons.

Les échantillons sont incubés, pendant 30 minutes, avec une solution de <sup>57</sup>Co-cyanocobalamine et de B<sub>12</sub> froide totalisant 2500pg/ml ; la cyanocobalamine libre est éliminée à l'aide d'une suspension de charbon traité à l'hémoglobine, puis on détermine la radioactivité résiduelle à l'aide d'un compteur  $\gamma$  (voir Tableau ci-dessous).

| Réactif                                                                               | Volume ( $\mu$ l) |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Echantillon                                                                           | 20                |
| <sup>57</sup> Co-cyanocobalamine/cyanocobalamine<br>à 2500 pg/ml* (15000 cpm environ) | 200 -             |
| Tampon Tris 20 mM                                                                     | 780               |
| Incubation 30 minutes sous agitation à température ambiante                           |                   |
| Charbon-hémoglobine**                                                                 | 1000              |
| Centrifugation 30 minutes à 1700 g                                                    |                   |
| Mesure de la radioactivité des surnageants                                            |                   |

\* composition de la solution de B<sub>12</sub> radioactive à 2500 pg.ml<sup>-1</sup> :

- 25  $\mu$ l de <sup>57</sup>Co-cyanocobalamine (activité spécifique de  $4,973 \cdot 10^{-13}$  Bq .mg<sup>-1</sup> ;  $2,703 \cdot 10^{-17}$  Bq .ml<sup>-1</sup>).
- 50  $\mu$ l de B<sub>12</sub> non radioactive à 500 ng.ml<sup>-1</sup>
- q.s.p. 10 ml d'eau bidistillée

\*\* composition de la suspension de charbon-hémoglobine:

- 2,5 g de charbon végétal (NORIT A, neutre)
- 0,5 g d'hémoglobine
- 500 ml d'eau bidistillée

### 2.2.3. Marquage de la TC II

#### 2.2.3.1. Marquage de la TCII au cobalt 57

La TC II utilisée provient du sérum de lapin qui est riche en TC II insaturée (Apo TC II). 2 ml de sérum sont incubés avec 20  $\mu$ l de Cobinamide (Cbi) à 10  $\mu$ g / ml pour saturer l'Haptocorine (Hc) puis avec 490  $\mu$ l de [<sup>57</sup>Co]-Cyanocobalamine ([<sup>57</sup>Co]-Cbl) pour saturer la TC II, le mélange est injecté sur une colonne (100 cm x 1 cm) de Sephacryl S 200 avec un débit de 0,5 ml/mn et élué avec un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contenant 1M NaCl. Le complexe [<sup>57</sup>Co]-Cbl-TC II est repéré par comptage de la radioactivité des fractions, le pic correspondant est récupéré et conservé à - 20° C.

#### 2.2.3.2. Marquage de la TC II à l'iode 125

La TC II utilisée a été purifiée par Ebba Nexø. Pour la marquer nous avons repris la méthode utilisée pour le marquage du FI (J.L. Guéant et coll., 1985). Deux bille d'iodes (iodobeads) sont lavées dans du tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contenant 0,5 M NaCl et incubées pendant quelque minutes (3 à 5 mn) avec  $2,703 \cdot 10^{-15}$  Bq d'iode 125 dans 200  $\mu$ l de tampon précédent. Nous avons ajouté 40  $\mu$ g de TC II purifiée, après quinze minutes d'incubation, sous agitation, nous avons ajouté 100  $\mu$ l de bleu dextrant, le mélange est élué sur une colonne (PD 10) de sépharose G 25, la fraction éluée avec le bleu dextrant correspond à la TC II marquée. Une deuxième filtration sur gel de séphacryl S200 est nécessaire pour éliminer toute contamination par de l'iode libre.

## **2.2.4. Etude de la liaison de la TC II avec le récepteur membranaire des cellules germinales**

### **2.2.4.1. Etude cinétique**

L'étude cinétique de l'association de la TC II avec son récepteur membranaire des cellules germinales de lapin a été réalisée à 4° C en incubant dix millions de cellules germinales (ou 1 mg de protéine de la fraction membranaire) avec 1,4 pmoles de [<sup>57</sup>Co] Cbl-TC II dans un volume final de 10 ml de tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contenant 0,125 M NaCl, sous agitation. Des aliquotes de 1 ml du mélange sont prélevés à des intervalles de temps allant de 2 à 60 minutes, ces aliquotes sont immédiatement centrifugés à 150 g et le culot obtenu est lavé deux fois avec le tampon d'incubation pour éliminer le complexe [<sup>57</sup>Co] Cbl-TC II non lié aux récepteurs. La radioactivité des culots est comptée par un compteur  $\gamma$ . L'étude cinétique de la dissociation de la TC II de son récepteur membranaire (la réversibilité de la liaison) a été réalisée dans les mêmes conditions précédentes, à ceci près qu'après quinze minutes d'incubation, une quantité excédentaire de TC II froide (200 fois supérieure à la TC II marquée) est ajoutée au milieu d'incubation.

### **2.2.4.2. Effet du pH et des chélateurs sur l'activité membranaire de liaison de la TC II**

Nous avons étudié l'effet du pH sur la liaison entre la TC II et son récepteur membranaire des cellules germinales de lapin en incubant pendant 1 heure à 4° C des quantités de fractions membranaires correspondant à 0,1 mg de protéine en présence de 100 fmoles de [<sup>57</sup>Co]Cbl-TC II à différents pH (Tableau 2).

Pour ne pas trop changer le milieu d'incubation et s'éloigner excessivement des pouvoirs tampons des tampons utilisés, nous avons utilisé deux tampons :

- Le tampon Acétate (0,05 M acétate de sodium) pour les pH allant de 2 à 5.
- Le tampon Tris (0,02 M Tris-HCl) pour les pH allant de 6 à 8.

Nous avons évalué l'importance du calcium en absence ou en présence de 20 mM d'EDTA dans la solution tampon utilisée.

Tab. 2 : Protocole de l'étude de l'effet du pH et des chélateurs sur la liaison du récepteur membranaire avec la TC II

| Tubes                                                       | pH | (57 Co)-B12-TCII |       |            | Acétate 50 mM contenant: |            | Tris 20 mM contenant: |            | EDTA<br>(20 mM) | CaCl <sub>2</sub><br>(10 mM) | membrane<br>(1mg/ml) |
|-------------------------------------------------------------|----|------------------|-------|------------|--------------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------|------------------------------|----------------------|
|                                                             |    |                  |       |            | 1M NaCl                  | 0M NaCl    | 1M NaCl               | 0M NaCl    |                 |                              |                      |
|                                                             |    | fMole            | cpm   | ( $\mu$ l) | ( $\mu$ l)               | ( $\mu$ l) | ( $\mu$ l)            | ( $\mu$ l) | ( $\mu$ l)      | ( $\mu$ l)                   |                      |
| 1                                                           | 2  | 107              | 46000 | 90         | 35                       | 765        | 0                     | 0          | 0               | 10                           | 100                  |
| 2                                                           | 3  | 107              | 46000 | 90         | 35                       | 765        | 0                     | 0          | 0               | 10                           | 100                  |
| 3                                                           | 4  | 107              | 46000 | 90         | 35                       | 765        | 0                     | 0          | 0               | 10                           | 100                  |
| 4                                                           | 5  | 107              | 46000 | 90         | 35                       | 765        | 0                     | 0          | 0               | 10                           | 100                  |
|                                                             |    |                  |       |            |                          |            |                       |            |                 |                              |                      |
| 5                                                           | 6  | 107              | 46000 | 90         | 0                        | 0          | 35                    | 765        | 0               | 10                           | 100                  |
| 6                                                           | 7  | 107              | 46000 | 90         | 0                        | 0          | 35                    | 765        | 0               | 10                           | 100                  |
| 7                                                           | 8  | 107              | 46000 | 90         | 0                        | 0          | 35                    | 765        | 0               | 10                           | 100                  |
|                                                             |    |                  |       |            |                          |            |                       |            |                 |                              |                      |
| 8                                                           | 7  | 107              | 46000 | 90         | 0                        | 0          | 35                    | 765        | 10              | 0                            | 100                  |
| 9                                                           | 7  | 107              | 46000 | 90         | 0                        | 0          | 35                    | 765        | 10              | 0                            | 100                  |
| <b>Incubation 1 H à 4°C</b>                                 |    |                  |       |            |                          |            |                       |            |                 |                              |                      |
| <b>Lavage 3fois avec Tampon d'incubation ; 0,125 M NaCl</b> |    |                  |       |            |                          |            |                       |            |                 |                              |                      |
| <b>Comptage des cpm</b>                                     |    |                  |       |            |                          |            |                       |            |                 |                              |                      |

### 2.2.4.3. Etude de la spécificité de la liaison

L'étude de la spécificité de la liaison TC II-récepteur membranaire a été réalisée à 4° C en préincubant pendant une heure un million de cellules germinales (ou 0,1 mg de Protéine de la fraction membranaire) avec 1 nmole de différentes protéines (fétuine, lactotransferrine humaine, transferrine et Albumine bovine sérique) Après la préincubation, les cellules sont centrifugées à 150 g et les culots sont lavés deux fois, avec le tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contenant 0,125M NaCl. Les cellules ainsi lavées sont incubées, toujours à 4°C, pendant une heure avec 100 fmoles de [<sup>57</sup>Co] Cbl-TC II. Après une nouvelle phase de centrifugation à 150 g, la radioactivité des culots est mesurée. Cette mesure quantifie la spécificité de la liaison TCII-B<sub>12</sub> à son récepteur membranaire (Tab. 3).

### 2.2.4.4. Evaluation des paramètres de la liaison

Une étude de saturation des récepteurs membranaires par la TC II marquée a été réalisée (Tab. 4) en incubant pendant 1 heure à 4° C un million de cellules germinales (ou 0,1 mg de Protéine de la fraction membranaire) en présence de quantités croissantes de [<sup>57</sup>Co] Cbl-TC II allant de 10 à 150 fmoles, le volume final d'incubation est de 1 ml (tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contenant 0,125 M NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> et 0,2% (w/v) de BSA). La radioactivité des culots est mesurée. La représentation de Scatchard (1949) est utilisée pour déterminer les paramètres de liaison (constante d'association K<sub>a</sub>, le nombre de sites récepteurs par cellule et par mg de protéines) : l'interaction du radioligand (TC II\*) avec une population de récepteur (R) peut être exprimée par la relation (1) correspondant à la loi

d'action de masse:  $TC II + B_{12} \rightleftharpoons TC II-B_{12}$ . Après équilibre, il s'agit de

séparer le radioligand libre du complexe radioligand lié au récepteur (TC II\*-R). Ceci nous l'avons réalisé par centrifugation. Lorsque l'équation (1) est à l'équilibre on peut écrire :  $[TC II^*] [R] / [TC II^*-R] = K_D = 1 / K_{ass}$  (2)

La concentration totale de récepteur spécifique (B<sub>max</sub>) est égale à la somme des récepteurs libres [R] et des récepteurs saturés par le radioligand :  $B_{max} = [TC II^*-R] + [R]$  soit  $[R] = B_{max} - [TC II^*-R]$

d'où:  $[TC II^*-R] = (B_{max} [TC II^*]) / ([TC II^*] + K_D)$  (3)

La représentation de Scatchard est utilisée pour faciliter la détermination de K<sub>a</sub> et de B<sub>max</sub>. Nous partons de l'équation (3). Selon les conventions courantes [TC II\*-R] est appelé B "Bound" et [TC II\*] est appelé F "Free". Nous obtenons :  $B = F(B_{max}) / (K_D + F)$  ou  $B/F = -(1/K_D) B + B_{max} / K_D$

La représentation de Scatchard exprime B/F en ordonnée et B en abscisse. B<sub>max</sub> est alors lue en abscisse et K<sub>D</sub> déterminée à partir de la pente de la courbe. L'évaluation de la liaison non spécifique est réalisée dans les mêmes conditions en préincubant les cellules (fraction membranaire) avec un excès de TC II froide.

Tab. 3 : Protocole de l'étude de la spécificité de liaison de la TC II vis-à-vis de son récepteur membranaire

| Tube | 1 nM de Protéine  |            | Tris 20mM<br>0,125 M NaCl | CaCl <sub>2</sub><br>(10 mM) | Cellules<br>10 <sup>7</sup> /ml |
|------|-------------------|------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------|
|      |                   | ( $\mu$ l) | ( $\mu$ l)                | ( $\mu$ l)                   | ( $\mu$ l)                      |
| 1    | Fétuine           | 98         | 882                       | 10                           | 10                              |
| 2    | Lactotransferrine | 61         | 919                       | 10                           | 10                              |
| 3    | Transferrine      | 76         | 903                       | 10                           | 10                              |
| 4    | BSA               | 84         | 896                       | 10                           | 10                              |
| T1   | 0                 | 0          | 980                       | 10                           | 10                              |
| T2   | 0                 | 0          | 980                       | 10                           | 10                              |

Incubation 1 H à 4°C  
Lavage avec Tris 20mM ; 0,125 M NaCl

| (57 Co)-B12-TCII |       |            | Tris 20mM contenant: |            | CaCl <sub>2</sub><br>(10 mM) |
|------------------|-------|------------|----------------------|------------|------------------------------|
| fMole            | cpm   | ( $\mu$ l) | 1M NaCl              | 0M NaCl    | ( $\mu$ l)                   |
| 107              | 46000 | 90         | ( $\mu$ l)           | ( $\mu$ l) | 10                           |
| 107              | 46000 | 90         | ( $\mu$ l)           | ( $\mu$ l) | 10                           |
| 107              | 46000 | 90         | ( $\mu$ l)           | ( $\mu$ l) | 10                           |
| 107              | 46000 | 90         | ( $\mu$ l)           | ( $\mu$ l) | 10                           |
| 107              | 46000 | 90         | ( $\mu$ l)           | ( $\mu$ l) | 10                           |
| 107              | 46000 | 90         | ( $\mu$ l)           | ( $\mu$ l) | 10                           |

Incubation 1 H à 4°C  
Lavage avec Tris 20mM ; 0,125 M NaCl  
Comptage des culots cpm des culots

Tab. : 4 Protocole de l'étude de la saturation des récepteurs membranaires de la TC II

| TUBES                                      | (57 Co)-B12-TCII |       |      | Tris 20mM contenant: |                 | CaCl <sub>2</sub><br>(10 mM)<br>(μl) | Cellules<br>10 <sup>8</sup> /ml<br>(μl) |
|--------------------------------------------|------------------|-------|------|----------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|
|                                            | fMole            | cpm   | (μl) | 1M NaCl<br>(μl)      | 0M NaCl<br>(μl) |                                      |                                         |
| 2                                          | 35,6616          | 15240 | 30   | 95                   | 855             | 10                                   | 10                                      |
| 3                                          | 53,4924          | 22860 | 45   | 80                   | 855             | 10                                   | 10                                      |
| 4                                          | 71,3232          | 30480 | 60   | 65                   | 855             | 10                                   | 10                                      |
| 5                                          | 89,154           | 38100 | 75   | 50                   | 855             | 10                                   | 10                                      |
| 6                                          | 106,9848         | 45720 | 90   | 35                   | 855             | 10                                   | 10                                      |
| 7                                          | 124,8156         | 53340 | 105  | 20                   | 855             | 10                                   | 10                                      |
| 8                                          | 142,6464         | 60960 | 120  | 5                    | 855             | 10                                   | 10                                      |
| <b>Incubation à 4°C pendant 1heure</b>     |                  |       |      |                      |                 |                                      |                                         |
| <b>lavage avec Tris 20mM ; NaCl 0,125M</b> |                  |       |      |                      |                 |                                      |                                         |
| <b>comptage des cpm des culots</b>         |                  |       |      |                      |                 |                                      |                                         |

#### **2.2.4.5. Effet des drogues**

L'effet de la chloroquine et de la cycloheximide, sur le métabolisme du complexe TC II-B12 et sur la synthèse du récepteur, a été étudié sur une suspension de cellules germinales à raison de 10<sup>6</sup> cellules par essai (voir protocole Tab. 5) L'expérience se déroule en deux étapes: dans un premier temps les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de la drogue pendant 1h à 34°C, elles sont ensuite lavées et réincubées de nouveau pendant 1h avec de la TC II marquée.

### **2.3. METHODE HISTOLOGIQUE :Autohistoradiographie à haute résolution**

Ces techniques ont été réalisées au laboratoire d'Histologie-Embryologie II du professeur H. Gérard.

#### **2.3.1. Principe de l'Autohistoradiographie A haute résolution**

La méthode d'autohistoradiographie permet la localisation et le suivi d'isotopes radioactifs qui par l'intermédiaire d'une émulsion photographique, donne des grains d'argent visibles en microscopie électronique.

Les isotopes radioactifs les plus souvent utilisés sont le tritium, l'iode 125, le carbone 14, le soufre 35 et le phosphore 32.

La réaction autohistoradiographique est connue depuis 1965 avec Granboulan et a été modifiée en 1970 par Larra et Droz. La coupe histologique contenant la source radioactive, est recouverte d'une monocouche cristalline de bromure d'argent. Entre les deux s'intercale un fin dépôt de carbone séparant cette monocouche de la coupe. La source radioactive émet un rayonnement  $\beta$  de faible énergie, quand ce dernier heurte un cristal de bromure d'argent, une ionisation se produit entraînant ainsi une "image latente" au niveau des cristaux de bromure d'argent. Grâce à un révélateur photographique, le filament d'argent se développe, pendant des mois, dans les cristaux de bromure d'argent, contenant une image latente. Les cristaux de bromure d'argent vierge, n'ayant pas réagi avec la source radioactive, sont dissous après fixation au thiosulfite tandis que "les grains développés" persistent et seront observés au microscope électronique.

Tab. 5 : Protocole de l'étude de l'effet des drogues sur la liaison de la TC II à son récepteur membranaire

| Tube | Drogue        |         |         | Tris 20mM<br>0,125 M NaCl | CaCl2<br>(10 mM) | Cellules<br>10 <sup>7</sup> /ml | (57 Co)-B12-TCII |       |            | Tris 20mM contenant:  |                       | CaCl2<br>(10 mM) |
|------|---------------|---------|---------|---------------------------|------------------|---------------------------------|------------------|-------|------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
|      |               | $\mu$ M | $\mu$ l | ( $\mu$ l)                | ( $\mu$ l)       | ( $\mu$ l)                      | fMole            | cpm   | ( $\mu$ l) | 1M NaCl<br>( $\mu$ l) | 0M NaCl<br>( $\mu$ l) | ( $\mu$ l)       |
| 1    | Cycloheximide | 3,5     | 10      | 880                       | 10               | 100                             | 89,15            | 38100 | 75         | 50                    | 855                   | 10               |
| 2    | Cycloheximide | 18      | 50      | 840                       | 10               | 100                             | 89,15            | 38100 | 75         | 50                    | 855                   | 10               |
| 3    | Cycloheximide | 35      | 100     | 790                       | 10               | 100                             | 89,15            | 38100 | 75         | 50                    | 855                   | 10               |
| 4    | Chloroquine   | 1,5     | 10      | 880                       | 10               | 100                             | 89,15            | 38100 | 75         | 50                    | 855                   | 10               |
| 5    | Chloroquine   | 7,5     | 50      | 840                       | 10               | 100                             | 89,15            | 38100 | 75         | 50                    | 855                   | 10               |
| 6    | Chloroquine   | 15      | 100     | 790                       | 10               | 100                             | 89,15            | 38100 | 75         | 50                    | 855                   | 10               |
| 7    | Blanc         | 0       | 0       | 890                       | 10               | 100                             | 89,15            | 38100 | 75         | 50                    | 855                   | 10               |
| 8    | Blanc         | 0       | 0       | 890                       | 10               | 100                             | 89,15            | 38100 | 75         | 50                    | 855                   | 10               |

Incubation 1 H à 34°C

Lavage avec Tris 20mM ; 0,125 M NaCl

Incubation 1 H à 4°C

Lavage avec Tris 20mM ; 0,125 M NaCl

Comptage des culots cpm des culots

Grâce à des contrôles, on peut déterminer le bruit de fond de l'autohistoradiogramme ainsi que la totalité de la source radioactive.

### **2.3.2. Les étapes de l'Autohistoradiographie à haute résolution**

Les lames sont gravées de croix afin de repérer les coupes qui y seront déposées, elles sont dégraissées et essuyées. Les lames sont trempées dans une solution d'acétate d'isoamyle contenant 2% de collodion puis séchées. Toutes ces étapes se déroulent à l'abri de la poussière.

Les coupes ultra-fines sont réalisées par un ultramicrotome (Reicher OMU 3) de 80 nm d'épaisseur et récupérées avec un anneau en plastique, et déposées au niveau des croix. Les lames sont colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, puis elles sont recouvertes d'une couche de 10  $\mu\text{m}$  de carbone.

Le traitement photographique se fait à l'abri de la lumière, dans une chambre noire avec un éclairage à filtre rouge. Les lames sont plongées dans une émulsion de bromure d'argent (Ilford L4) pendant une heure puis séchées et stockées à 4° C à l'abri de la lumière pendant trois mois dans des boîtes contenant du  $\text{P}_2\text{O}_5$  qui permet aux lames de rester sèches. Après trois mois la révélation se fait avec du Microdol-X (Kodak) qui révèle les grains d'argent sous forme de tortillon.

### **2.3.3. La localisation des grains d'argent dans les compartiments cellulaires**

Afin de déterminer l'emplacement des grains d'argent dans les différents compartiments cellulaires (membrane plasmique, cytoplasme, système golgien, membrane nucléaire, noyaux, ...), on doit mesurer la " half-distance" (HD) qui est définie comme la distance perpendiculaire à la ligne source et qui renferme au moins 50% des grains d'argent produits par les désintégration à son niveau (Salpeter et coll. 1978). Cette distance est de 100 à 140 nm pour l'isotope 125 de l'iode traité par l'émulsion IL ford L4 déposée en couche monocristalline sur des coupes de résine époxy d'épaisseur inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$ .

### **III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

### 3.1. SEMI-PURIFICATION DE LA TC II

La semi-purification de la TC II se base sur l'affinité de celle-ci à l'héparine (J. van Kapel et coll., 1988). 30 ml de sérum de lapins sont passés sur une colonne (50 x 2,5 cm) d'héparine couplé au sépharose. La colonne est ensuite lavée avec le tampon Tris-Hcl 20 mM pH 5,6 (sans NaCl) afin d'éliminer les contaminants liés d'une façon non spécifique à l'héparine. La désorption de la TC II est effectuée avec le tampon Tris-HCl 20 mM pH 9 contenant 1M NaCl. Des fractions de 3 ml sont collectées. Les pics de protéines sont repérés grâce à l'absorbance à 280 nm, alors que le test du charbon hémoglobine va servir à détecter le pic de la TC II et en même temps à évaluer la quantité de TC II semi-purifiée (Fig. 11).

Exemple d'un test de charbon hémoglobine: (Tab.6)

| N° Fraction | cpm   | % Fixation | ng de B <sub>12</sub> fixée par<br>essai de 3 ml | pmoles de TC II fixée<br>par essai de 3 ml |
|-------------|-------|------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 14          | 5945  | 39         | 29,43                                            | 21,71                                      |
| 15          | 6164  | 40         | 30,51                                            | 22,51                                      |
| 16          | 6290  | 41         | 31,14                                            | 22,97                                      |
| 17          | 6436  | 42         | 31,86                                            | 23,50                                      |
| 18          | 5872  | 39         | 29,07                                            | 21,45                                      |
| 19          | 5586  | 36         | 27,64                                            | 20,39                                      |
| Totaux      | 15218 | 100        |                                                  |                                            |
| Blanc       | 48    | 0,3        |                                                  |                                            |

La quantité de B<sub>12</sub> fixée par la TC II est de 179,65 ng indiquant que la quantité de TC II semi-purifiée est de 132,5 pmoles

le tableau de la semi-purification de la TC II ci-dessous permet de calculer l'activité spécifique de cette TC II semi-purifiée :

|           | Capacité totale<br>de fixation de<br>B <sub>12</sub> (pmol) | Protéines tot.<br>(mg) | Activité spécifique<br>(pmol/mg) | Facteur de<br>purification | Rendement<br>(%) |
|-----------|-------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------|
| sérum     | 198                                                         | 1740                   | 0,11                             | -                          | -                |
| Hép-Séph. | 134                                                         | 77,25                  | 1,73                             | 15                         | 67               |

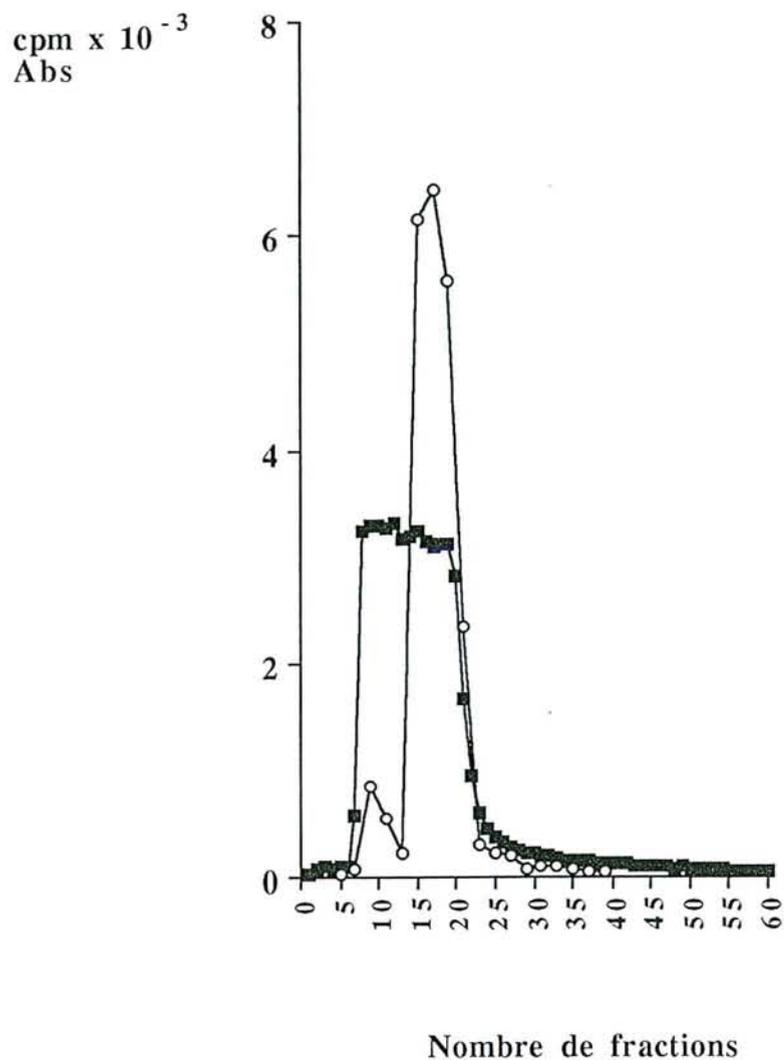


Fig. 11. Le chromatogramme d'affinité héparine sépharose de 30 ml de sérum. La désorption de la TC II est effectuée avec le tampon Tris-HCl 20 mM pH 9 contenant 1M NaCl. Les cpm (cercle vide) étaient évalué par le test de charbon hémoglobine; absorbance (carré plein) a été mesurée à 280 nm.

### 3.2. MARQUAGE SPECIFIQUE DE LA TC II

2 ml de sérum de lapin sont incubés avec 20  $\mu\text{l}$  de Cobinamide (Cbi) à 10  $\mu\text{g}$  / ml afin de saturer l'Haptocorine (Hc), puis avec 490  $\mu\text{l}$  de [ $^{57}\text{Co}$ ] Cbl (18 pmoles) pour marquer spécifiquement la TC II. Le mélange est injecté sur une colonne d'un mètre de Séphacryl S 200. On élue avec le tampon Tris-HCl 20 mM contenant 1M de NaCl avec un débit de 0,5 ml/mn. Après avoir éliminé le volume mort de la colonne, on collecte 150 fractions successives de 1 ml. On mesure la radioactivité de chaque tube.

\*L'activité spécifique sera évaluée d'après le chromatogramme (Fig.12) qui ne présente nécessairement que trois pics : le pic de l'Hc-B<sub>12</sub> représentant la petite quantité d'Hc ayant échappé à la saturation par la Cbi, le pic de la TC II-B<sub>12</sub> qui est celui recherché et enfin le pic de la B<sub>12</sub> libre.

- La mesure de la radioactivité totale nous permet de calculer le pourcentage de radioactivité de chaque pic.

L'activité spécifique de la TC II-[ $^{57}\text{Co}$ ] Cbl peut être évaluée à partir des "cpm du pic TC II" et de la quantité de [ $^{57}\text{Co}$ ] Cbl fixée par la TCII.

$$\begin{array}{rcl} \text{- cpm totaux} & = & 10\,591\,581 \\ \text{- cpm TC II} & = & 7\,943\,686 \end{array}$$

Le pic de la TC II représente 73,5% de la radioactivité totale.  
Donc le pic de TC II fixe 73,5% des 18 pmoles de B<sub>12</sub> utilisés.

Le nombre de pmole de B<sub>12</sub> fixée par la TCII dans le pic cité est de :

$$(73,5 \times 18) / 100 = \mathbf{13,23 \text{ pmoles}}$$

ce qui implique que : 7 943 686 cpm correspond à 13,23 pmoles  
ou :  $10^3$  cpm correspond à 2,23 fmoles.

Il est déduit qu'à partir d'un ml de sérum, on obtient 6,6 pmoles de TCII.

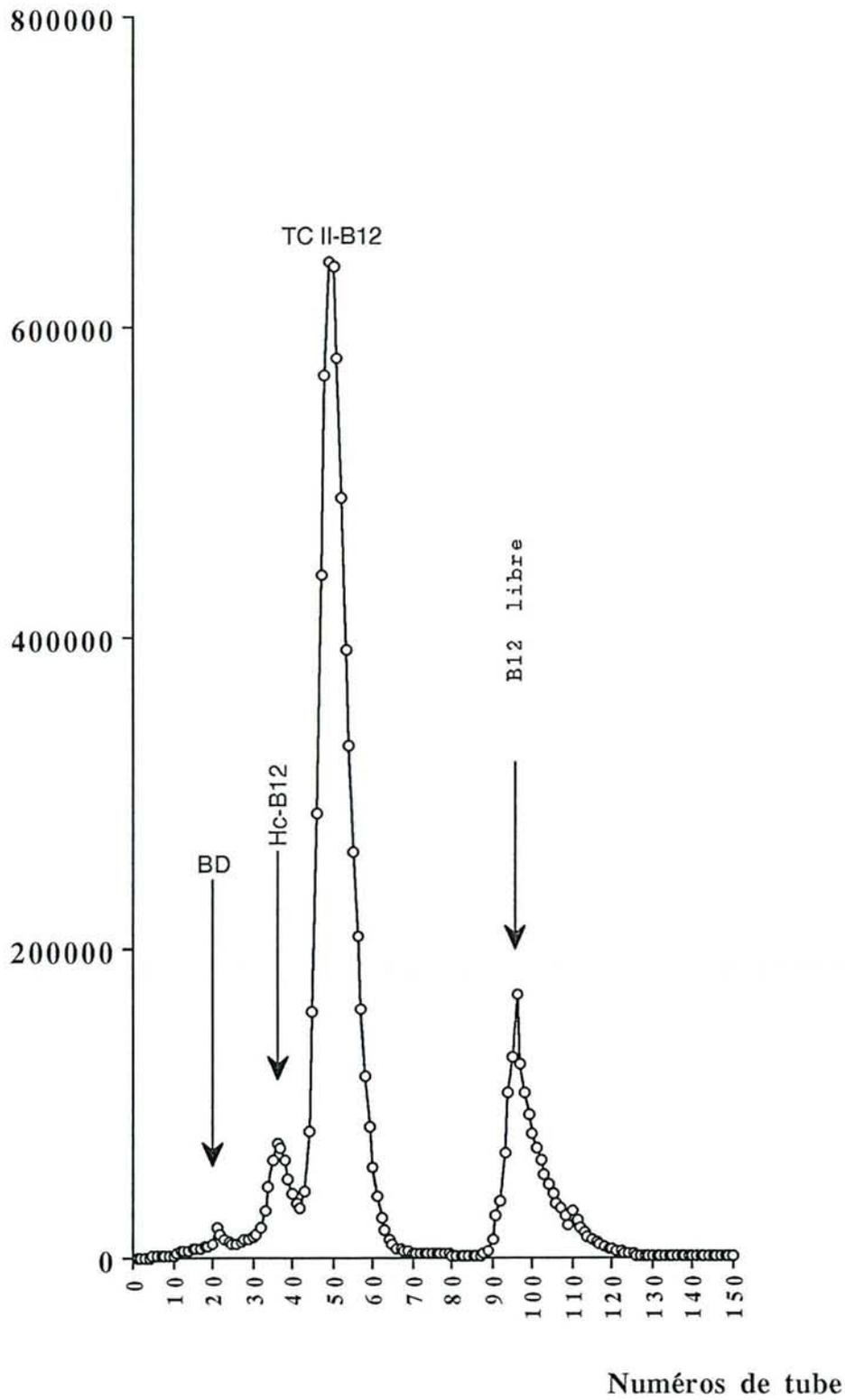


Figure 12. Chromatogramme du marquage spécifique de la TC II. Sur une colonne séphacryl S200, de 1m, 2 ml de sérum sont passé en présence de 490 $\mu$ l de  $^{57}\text{Co-B12}$ ; l'haptocorine était préalablement saturée par la cobinamide.

### Contrôle électrophorétique

électrophorèse sur gradient (8-25) de SDS-PAGE

les molécules de référence a,b,c,d,e respectivement, phosphorylase b (94 KD),  
sérum albumine humaine (67 KD), ovalbumine (43 KD), anhydrase carbonique  
(30 KD), lactalbumine (14 KD),

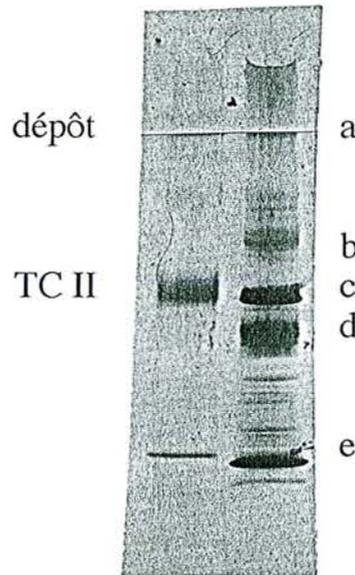


Fig. 11-a : TC II de lapin semi-purifiée par affinité sur gel héparine-sépharose

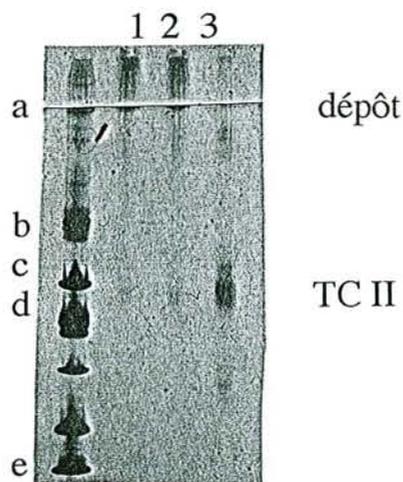


Fig. 12-a: TC II de lapin issue de la filtration sur gel séphacryl S200  
1 et 2 fraction de l'extérieur du pic de la TC II. 3 fraction du sommet du pic

### 3.3. CARACTERISATION D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA TCII AU NIVEAU DES CELLULES GERMINALES ENTIERES

#### 3.3.1. ETUDE BIOCHIMIQUE (PUBLICATION I)

##### 3.3.1.1. But de l'étude

La liaison de la TC II-Cbl avec les récepteurs membranaires des cellules germinales entières en suspension fera l'objet de cette étude.

##### 3.3.1.2. Résultats et discussions

###### a. Etude cinétique

La cinétique d'association de la  $^{57}\text{Co}$ -Cbl-TC II avec les récepteurs des cellules germinales de lapin a été étudiée, pendant une heure, à partir d'une suspension de cellules.

La liaison entre la TC II et les cellules germinales augmentait en fonction du temps (Fig. 13).

La liaison maximale fut obtenue en moins de 15 mn à 4°C. La liaison était réversible car un excès de 200 fois de TC II non marquée était capable de déplacer la TC II marquée des cellules germinales en 20 mn environ.

A partir de cette réaction cinétique nous allons déterminer les constantes cinétiques d'association et de dissociation  $k_1$  et  $k_{-1}$ .

Si on dérive la relation (1) dans le sens de l'association on obtient la vitesse de l'association d'une cinétique de second ordre:



$$\text{vitesse d'association} = d[\text{TCII}^*-\text{R}]/dt = k_1 [\text{TCII}^*] [\text{R}] - k_{-1}[\text{TCII}^*-\text{R}] \quad (2)$$

Alors que la réaction de dissociation suit une cinétique de premier ordre (en supposant que la vitesse d'association est faible par rapport à la vitesse de dissociation):



$$\text{vitesse de dissociation} = d[\text{TCII}^*-\text{R}] / dt = k_{-1}[\text{TCII}^*-\text{R}] \quad (3)$$

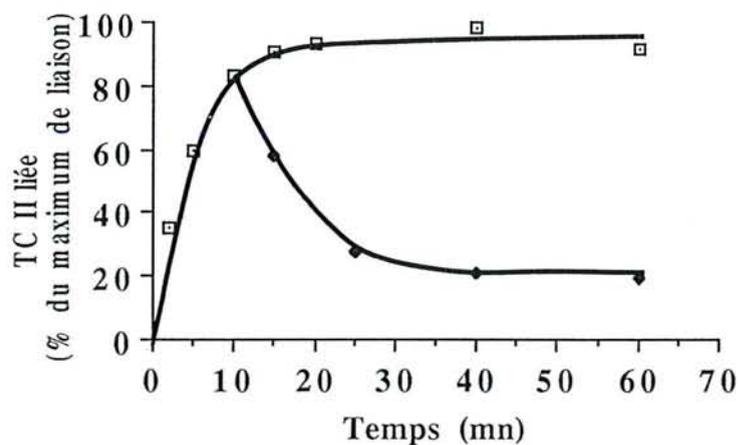


Figure 13. Cinétique de liaison de [  $^{57}\text{Co}$ ]-Cbl-TC II avec les cellules germinales à 4°C. L'association ( carrés vides) obtenue en utilisant 1,4 pmole de TC II marquée incubée avec  $10^7$  cellules dans un volume final de 10 ml. 1ml d'aliquot du mélange prélevé à des intervalles d'incubation allant de 2 à 60 mn. La dissociation (losanges pleins) obtenue de la même façon sauf qu'un excès de 200 fois de la TC II froide a été ajouté avec le traceur 15 mn après l'incubation des cellules germinales . Les données représentent la moyenne pour des valeurs en double.

La constante cinétique de dissociation  $k_{-1}$  doit être déterminée en premier lieu car sa valeur doit être connue pour la détermination de  $K_1$

### a1. Détermination de la constante cinétique $k_{-1}$

En intégrant l'équation (3), on obtient :

$$\ln ([TCII^*-R]_t / [TCII^*-R]_{eq}) = k_{-1}t \quad (4)$$

En reportant en ordonnée le premier membre de l'équation (4) et  $t$  en abscisse, on obtient une droite de pente  $-k_{-1}$  (figure 13-a).

Au  $t_{1/2}$ , temps auquel  $[TCII^*-R]_t$  est égale à la moitié de  $[TCII^*-R]_{eq}$ ,  $k_{-1}$  devient :

$$k_{-1} = 0,693 / t_{1/2} \quad (\text{Ln } 0,5 = 0,693)$$

dans notre cas :  $t_{1/2} = 15$  minutes

d'où :  $k_{-1} = 0,693 / 15 = 0,05 \text{ min}^{-1}$

valeur identique à celle obtenue par la courbe.

### a2. Détermination de la constante cinétique $k_1$

A partir de la constante cinétique de dissociation  $k_{-1}$  et de la constante d'association  $K_a$ , nous allons déterminer la constante cinétique d'association  $k_1$ .

$$K_a = k_1 / k_{-1}$$

d'où  $k_1 = K_a \cdot k_{-1}$

$$k_1 = 0,65 \cdot 10^{-9} \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$$

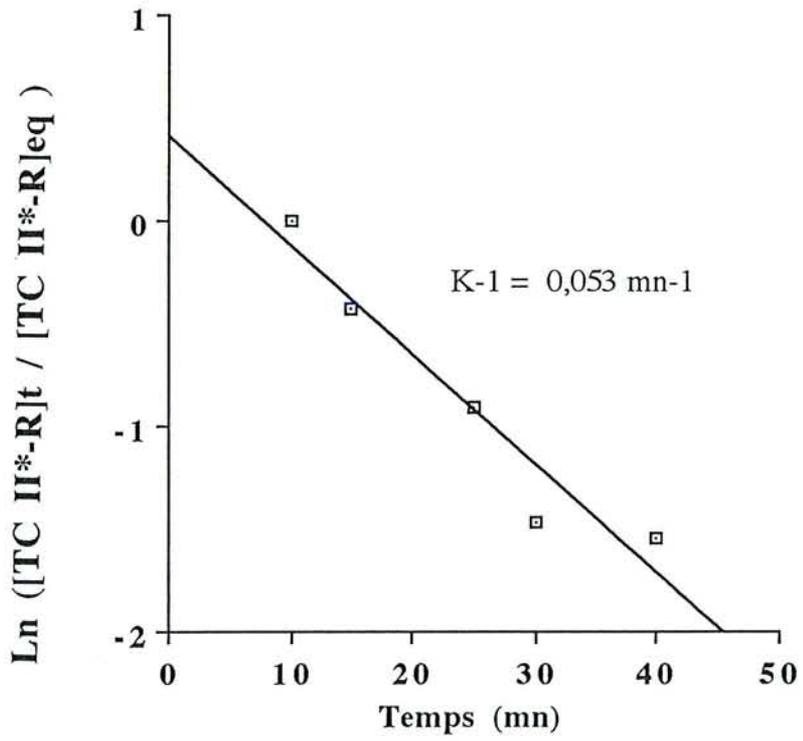


Fig. 13a : Détermination de la constante cinétique k-1

## b. Évaluation des paramètres de liaison

La courbe de saturation a été obtenue par l'incubation des cellules germinales avec des concentrations croissantes de  $^{57}\text{Co-Cbl-TCII}$ .

La liaison non spécifique a été évaluée par préincubation avec un excès de 200 fois de TC II froide. La liaison spécifique est obtenue en retranchant la liaison non spécifique (représente 8% de la liaison totale) de la liaison totale. L'analyse de Scatchard de la liaison a révélé l'existence d'une seule classe de sites de liaison ayant une constante d'association ( $K_{ass}$ ) respectivement de  $13 \text{ nM}^{-1}$  et 700 sites par cellules avec le cobalt  $^{57}$  (Fig. 14) et 1000 sites par cellules, et une constante d'association ( $K_{ass}$ ) de l'ordre de  $14,6 \text{ nM}^{-1}$  avec l'iode  $^{125}$  (Fig. 15).

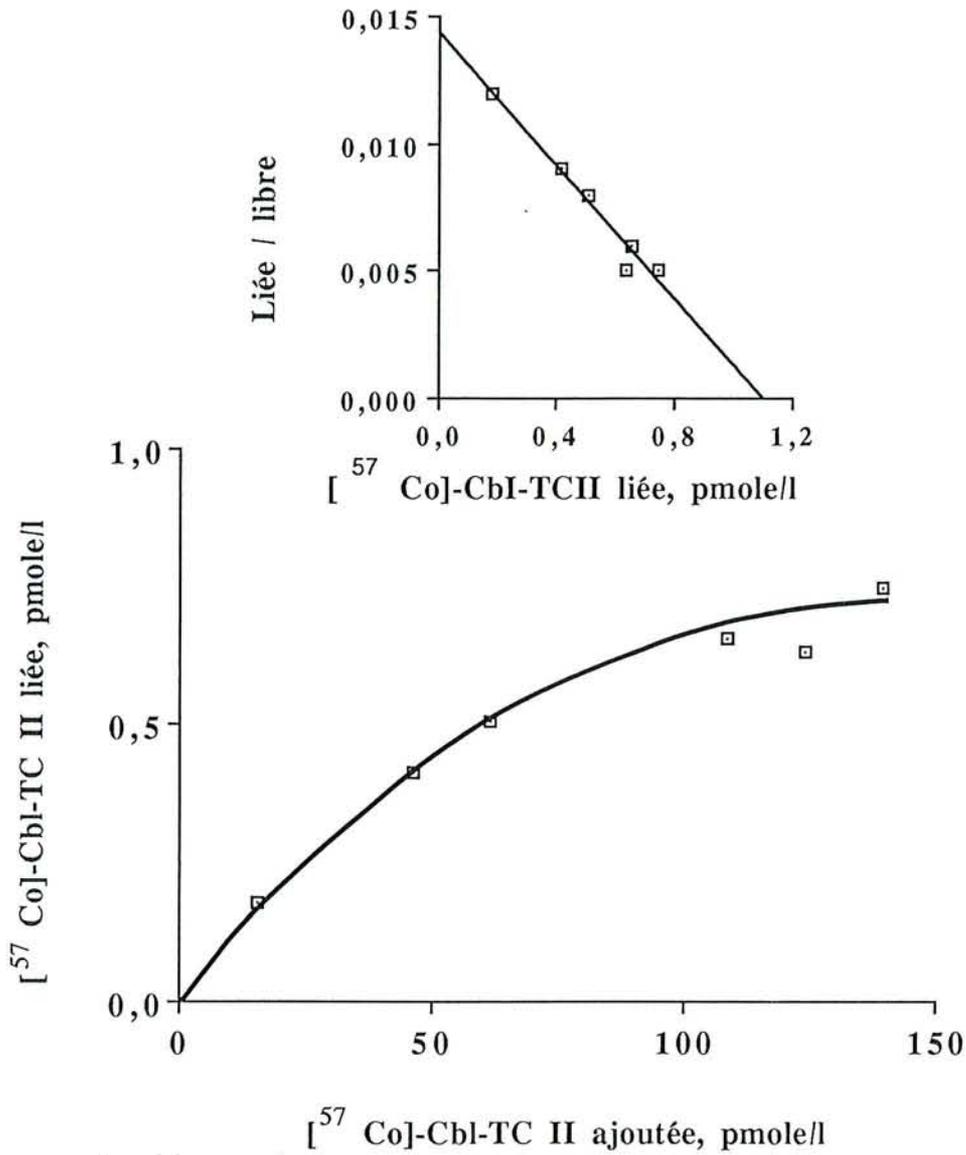


Figure 14. Courbe de saturation et graphique de l'analyse de Scatchard de l'interaction entre les cellules germinales et la TC II marquée à 4°C pendant 1h. Le total de la  $[^{57}\text{Co}]\text{-Cbl-TC II}$  liée aux cellules est estimé en déduisant la liaison non spécifique de la liaison totale.

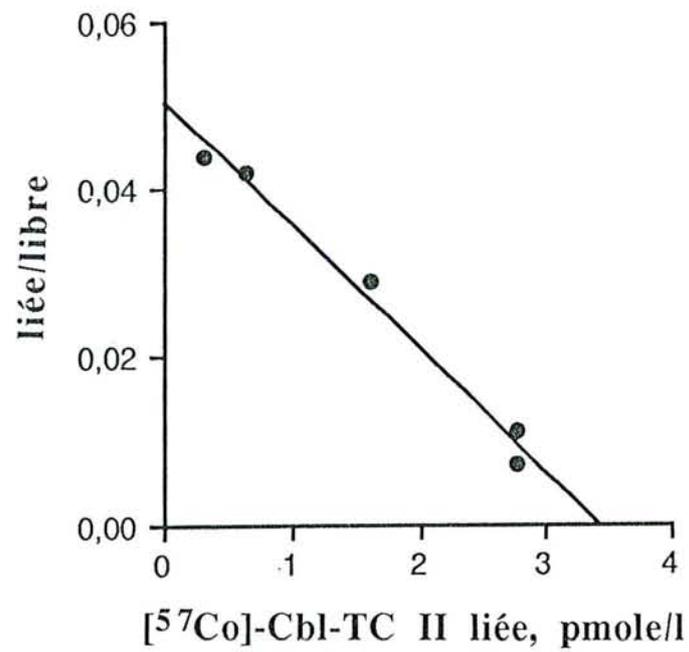


Figure 15. Le graphique de l'analyse de Scatchard de l'interaction entre les cellules germinales et la  $^{125}\text{I}$ -TC II à  $4^\circ\text{C}$  pendant 1h. Les données  $\Delta$  représentent la moyenne pour des valeurs en double

### c. Etude de la spécificité de liaison

La spécificité de liaison a été étudiée en préincubant à 4° C pendant une heure un million de cellules germinales avec 1 nmole de différentes protéines: la fétuine, la lactotransferrine humaine, la transferrine et l'albumine bovine. La liaison entre la (<sup>57</sup>Co)Cbl-TCII et les cellules germinales était spécifique. Une inhibition maximale de la liaison fut observée en présence de la TCII non marquée et non en présence d'autres protéines (Fig. 16) dont l'inhibition ne dépassait pas 5% de la liaison spécifique.

En conclusion, le récepteur reconnaît spécifiquement la TC II, et même la vitamine B<sub>12</sub> et ses transporteurs (Hc, FI) ne concurrencent pas la TC II vis à vis de son récepteur.

### d. Effet du calcium

La liaison de la (<sup>57</sup>Co)Cbl-TC II marquée est calcium dépendante puisqu'une incubation de cellules germinales avec 20 mM d'EDTA entraîne une baisse de 40% de la liaison spécifique (Fig. 16).

Avec <sup>125</sup>I-TC II la liaison est diminuée de 47% chez les spermatoctytes et de 32% chez les spermatides, alors que le calcium demeure sans effet apparent chez les spermatides allongées (Fig. 17). On remarque qu'avec l'EDTA l'inhibition n'est pas totale et ceci pourrait être expliqué de deux façon :

- soit qu'il n'y a pas suffisamment d'EDTA, en raison d'une concentration élevée en cations divalents dans les cellules germinales. Pourtant la concentration en EDTA utilisée était de 20 mM.
- soit le récepteur ayant déjà fixé le calcium, l'EDTA n'a pas suffisamment le temps de chélater le calcium déjà fixé sur le récepteur. Dans cette optique, il faudrait préincuber l'EDTA avec les cellules avant d'ajouter la TC II.

Des études antérieures sur les cellules de leucémie et les fibroblastes ont montré que la liaison TCII-Cbl était calcium dépendante (Rosenberg et coll, 1969).

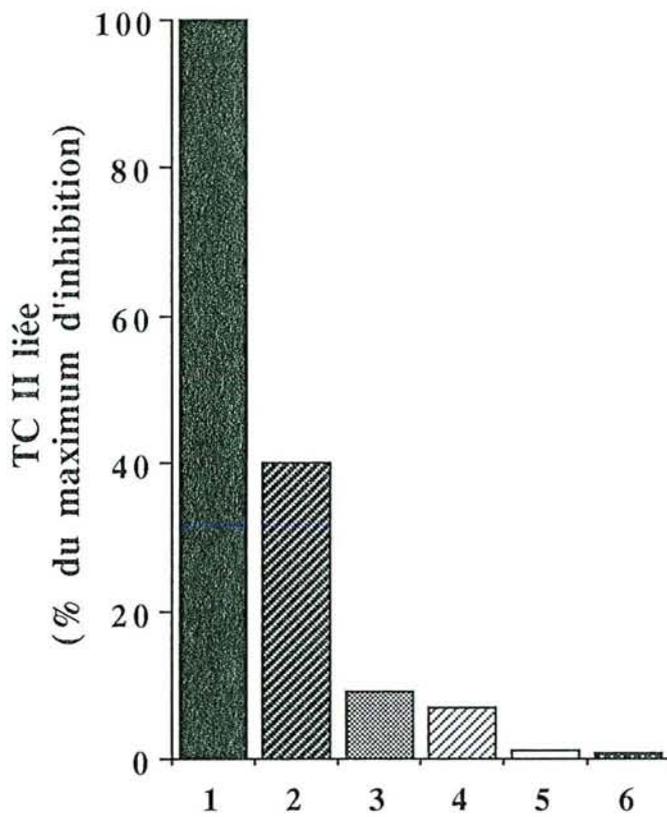


Figure 16. La spécificité de la liaison de la TC II avec les cellules germinales étudiée par incubation de  $10^6$  cellules avec 0,2 pmole de  $[^{57}\text{Co}]\text{-Cbl-TC II}$  à  $4^\circ\text{C}$  en présence de 40 pmole de TC II non marquée (1), 20 mM d'EDTA (2), 1 nM de fétuine (3), 1 nM de lactotransferrine (4), 1 nM de transferrine (5), 1 nM de sérum albumine bovine (6).

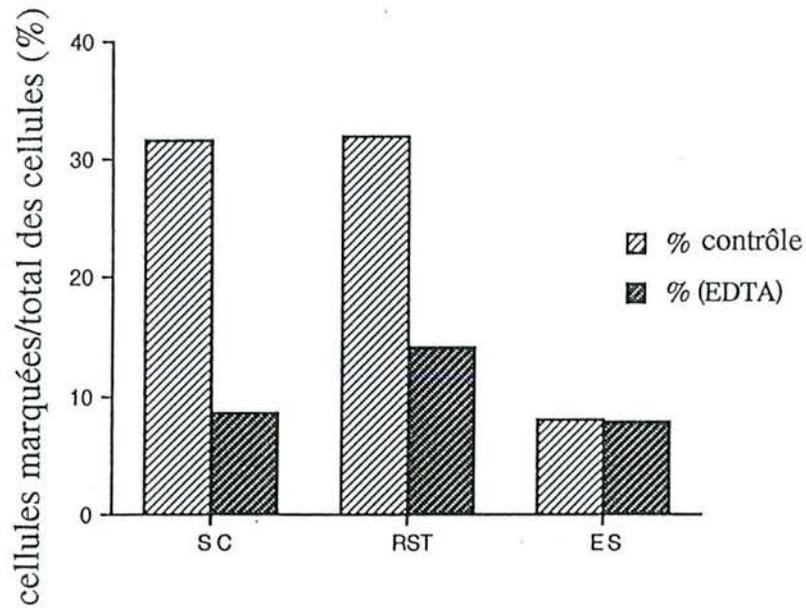


Figure 17. Marquage relatif des cellules germinales isolées du lapin suivant l'incubation en présence de 9 pmole de  $^{125}\text{I}$ -TC II avec ou sans le prétraitement à l'EDTA (10 mM pendant 15mn). SC: spermatocytes, RST: spermatides, EST: spermatides allongées.

### e . Effet des drogues

L'effet de la chloroquine et de la cycloheximide sur la liaison de la TC II avec les cellules germinales entières a été étudié par préincubation des cellules pendant 1h à 34°C avec des concentrations croissantes de la drogue. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées de nouveau pendant 1h avec de la TC II marquée.

La chloroquine est connue pour son action de blocage réversible des pompes à protons provoquant l'augmentation du pH dans le compartiment endosomal. La diminution apparente de la liaison TC II-récepteur trouve son origine au niveau du recyclage du récepteur. En effet, l'augmentation du pH inhibe la dissociation du récepteur de la TC II-Cbl ce qui freine le recyclage du récepteur.

L'effet de la chloroquine est dose dépendant. Le maximum d'inhibition est obtenu avec 15  $\mu\text{M}$  de chloroquine. La moitié de cette dose entraîne une inhibition de 50% (Fig. 18)

La cycloheximide bloque la synthèse des protéines en agissant sur les ARN de transfert. L'inhibition de la synthèse protéique signifie notamment le blocage de la synthèse du récepteur.

La cycloheximide inhibe la liaison de la TC II avec les cellules germinales. Le maximum d'inhibition est obtenu avec une concentration de 35  $\mu\text{M}$ , la moitié de cette dose provoque une inhibition de la liaison spécifique de 70% (Fig. 19)

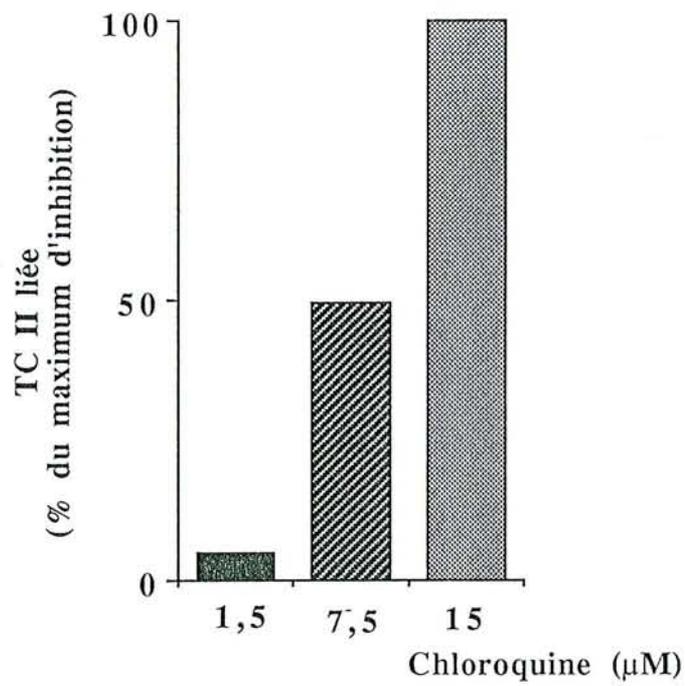


Figure 18. L'effet de la chloroquine sur la liaison de la TC II avec les cellules germinales entières étudié par préincubation, à 34°C, de  $10^6$  cellules avec des concentrations croissantes de chloroquine allant de 1,5 à 15  $\mu\text{M}$ . Après lavage, les cellules sont incubées avec 0,2 pmole de [ $^{57}\text{Co}$ ]-Cbl-TC II.

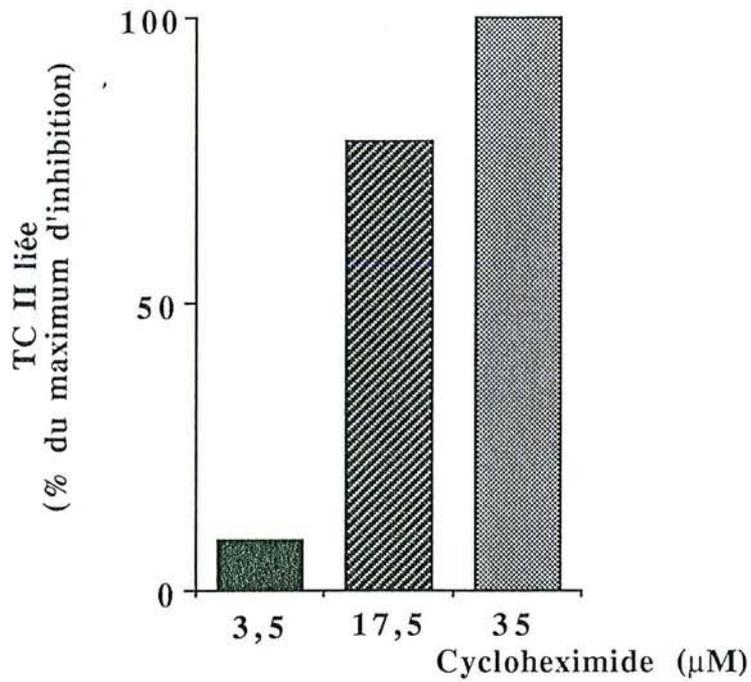


Figure 19. L'effet de la cycloheximide sur la liaison de la TC II avec les cellules germinales entières étudié par préincubation, à 34°C, de  $10^6$  cellules avec des concentrations croissantes de chloroquine allant de 3,5 à 35  $\mu\text{M}$ . Après lavage, les cellules sont incubées avec 0,2 pmole de la [ $^{57}\text{Co}$ ]-Cbl-TC II.

### 3.4. ÉTUDE MORPHOLOGIQUE (PUBLICATION II)

#### 3.4.1. But de l'étude

Il s'agit d'une étude histomorphométrique de la distribution des structures recouvertes et non recouvertes liées à l'endocytose. L'endocytose de la  $^{125}\text{I}$ -TC II par la suspension des cellules germinales sera étudiée par radioautographie au microscope électronique.

#### 3.4.2. Résultats et discussions

Une autoradiographie générale en microscopie électronique de la TC II iodée incubée avec les cellules germinales du lapin a montré une accumulation du traceur sur la membrane plasmique dans différents types de cellules germinales allant de la spermatogonie jusqu'aux dernières spermatides (Fig. 20).

Les puits et les vésicules recouverts ont souvent été observés dans le cytoplasme apical (Fig. 20). Ce marquage de cellule a été inhibé par un excès de TC II non marquée. Ces résultats montrent clairement la présence de sites spécifiques de la liaison de la TC II du lapin sur les cellules germinales de celui-ci. Par ailleurs, les structures recouvertes impliquées d'habitude dans l'endocytose récepteur-médiée sont présentes à la surface de la cellule germinale et pourraient entrer dans la première étape de l'endocytose récepteur-médiée de la TCII.

La distribution de structures liées à l'endocytose fut déterminée par les études histomorphométriques ultrastructurales. Les structures recouvertes et non recouvertes étaient présentes quelle que soit l'étape de maturation. Le nombre de vésicules recouvertes était à son plus haut degré pendant les premières étapes de maturation, alors que le nombre de vésicules non recouvertes était plus élevé pendant les dernières étapes de maturation. Le traceur radioactif fut détecté notamment sur la membrane plasmique, sur les vésicules recouvertes et sur les corps multivésiculaires des cellules germinales. Les grains furent observés essentiellement sur les spermatocytes et autour des spermatides 31,6% et 32% de ces cellules ont été respectivement marquées. En revanche, le traceur fut détecté chez uniquement 8,11% de spermatides allongées.

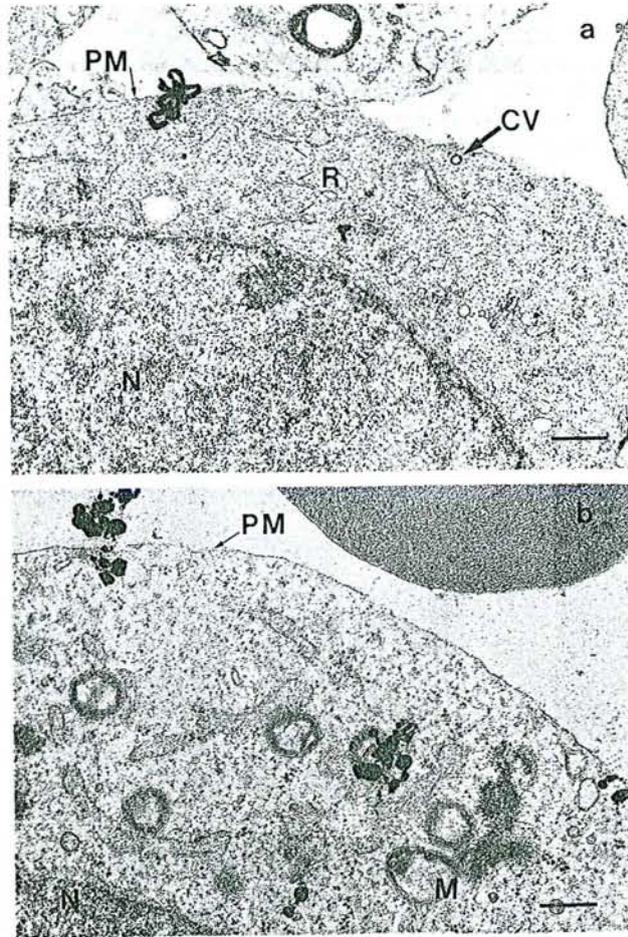


Figure 20. Radioautographie en microscopie électronique des cellules germinales du lapin après incubation avec  $^{125}\text{I}$ -TC II (9 pmol./ $10^6$  cellules dans un milieu de culture de 100  $\mu\text{l}$ ) pendant 15 mn à  $4^\circ\text{C}$ . a) Des grains d'argents sont associés avec la membrane plasmique (PM) d'une spermatogonie isolée. Dans le cytoplasme périphérique une vésicule recouverte est visible (CV); R: réticulum. Barre:  $0,5\mu\text{m}$ . b) Des grains d'argents sont situés dans le cytoplasme périphérique d'un spermatocyte primaire; PM: membrane plasmique; M: mitochondrie; N: noyau. Barre:  $0,75\mu\text{m}$

### 3.4.2.1. Preuve morphologique de l'existence d'un dispositif endocytique dans les cellules germinales du Lapin..

La plupart des cellules germinales du lapin montraient des structures recouvertes et non recouvertes dans le cytoplasme périphérique (Fig.21.a,b). Des puits recouverts étaient fréquemment disposés en structures paires (Fig. 21.a).

Des vésicules recouvertes de  $113 \pm 67$  nm de diamètre furent observées juste au-dessous de la membrane plasmique (Fig. 21.b). Des vésicules endocytiques non recouvertes étaient aussi présentes au-dessous de la membrane plasmique dans toutes les cellules germinales (Fig. 21.a). Leur forme était plutôt irrégulière et elles mesuraient  $283 \pm 84$  nm de diamètre.

Comme on peut le voir sur la Figure 22, le nombre moyen de vésicules recouvertes, par  $100 \mu\text{m}$  de membrane plasmique linéaire, était plus élevé au cours des premières étapes de maturation de la cellule germinale, alors que le nombre moyen de vésicules non recouvertes était plus élevé au cours des étapes finales de maturation des cellules germinales.

La participation des structures recouvertes dans l'endocytose récepteur-médiée a été établie par des études ultrastructurelles dans plusieurs cellules (Goldstein et coll, 1985).

Notre étude est le premier rapport sur l'existence de structures recouvertes dans les cellules germinales du lapin. Ces dernières sont un bon candidat pour l'endocytose récepteur-médiée. Deux autres structures apparentées à l'endocytose étaient dispersées dans tout le cytoplasme:

Des structures vésiculaires petites et vides avec une membrane lisse de 150-300 nm de diamètre : les premiers endosomes (Fig. 21.c). Des corps multivésiculaires de 1500-3000 nm de diamètre localisés dans le cytoplasme périnucléaire (Fig. 21.e) : les derniers endosomes. Ils sont considérés comme des éléments prélysosomiaux (Gérard et coll., 1991).

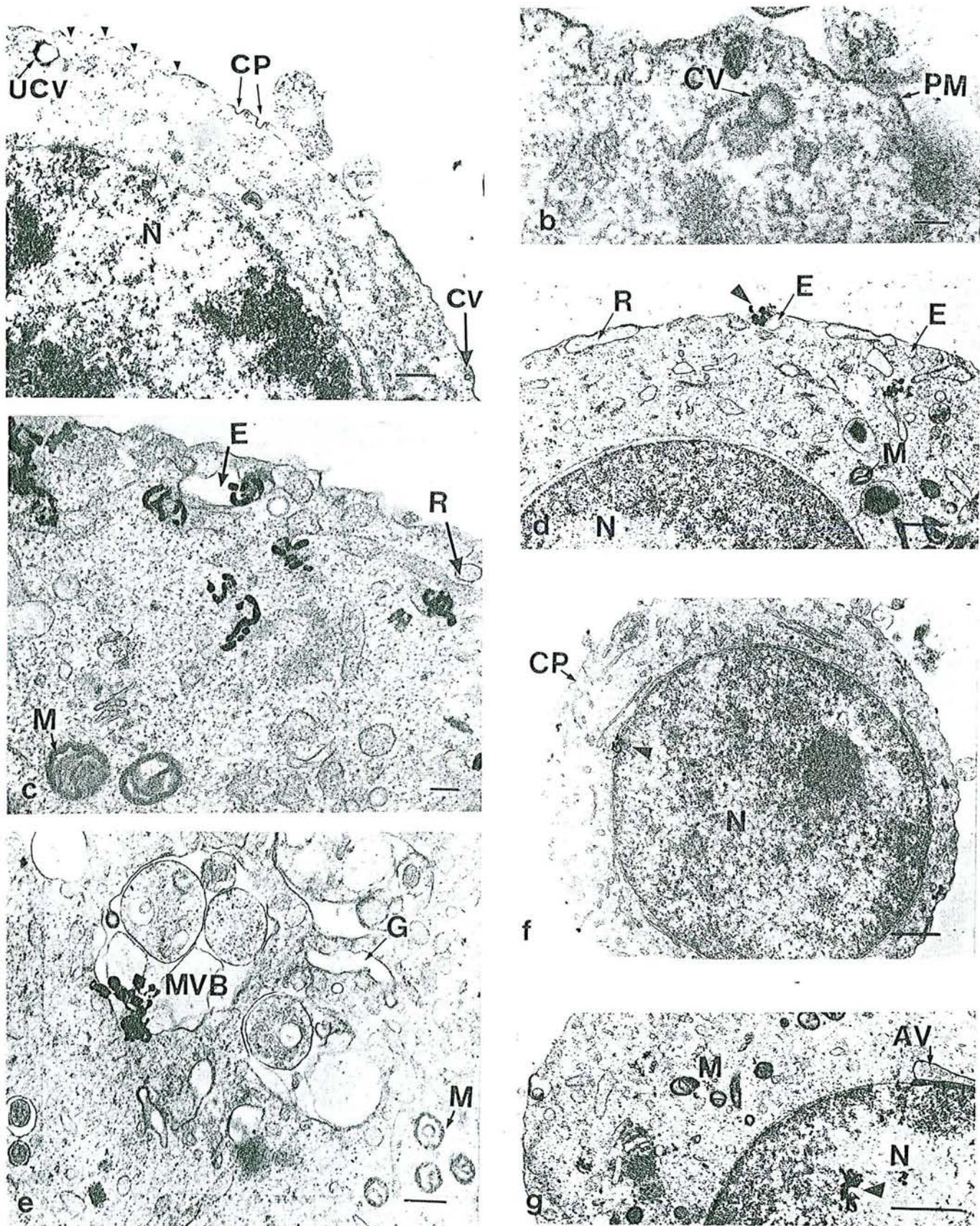


Figure 21. L'observation en microscopie électronique de la transmission des cellules germinales isolée de lapin. (a-b) les structures endocytiques; préparation standard. (c-d-e-f-g) le résultat de l'internalisation de la TC II; préparation autohistoradiographique après incubation avec  $^{125}\text{I}$ -TC II pendant 60 mn. a) Spermatocyte primaire. Tête de flèche: denture de la membrane plasmique, CP: Puits recouverts, CV: Vésicule recouverte, UCV: Vésicule non recouverte, N: Noyau. Barre: 1 $\mu\text{m}$ . b) Spermatocyte primaire. CV: Vésicule recouverte, PM: membrane plasmique. Barre: 0,1 $\mu\text{m}$ . c) Spermatocyte ronde. Les grains d'argent sont situés dans le cytoplasme périphérique associés aux endosomes, R: Réticulum endoplasmique lisse, M: Mitochondrie. Barre: 0,3 $\mu\text{m}$ . d) Spermatocyte ronde. Un grain d'argent est situé (tête de flèche) sur la membrane plasmique en relation étroite avec un endosome (E). R: Réticulum endoplasmique lisse, M: Mitochondrie. Barre: 1 $\mu\text{m}$ . e) Spermatide allongé. Des grains d'argent sont associés à un corps multivésiculaire (MVB) près de la région Golgienne M: Mitochondrie. Barre:0,3 $\mu\text{m}$ . f) Spermatogonie type B.Des grains d'argent (tête de flèche) sont associés à l'enveloppe nucléaire. N: Noyau, CP: Puits recouverts. Barre: 1 $\mu\text{m}$ . g) Spermatide en phase de formation de l'acrosome. Des grains d'argent (tête de flèche) sont situés dans le noyau (N). AV: Vésicule acrosomique. Barre:0,5 $\mu\text{m}$

### 3.4.2.2. Localisation cellulaire de la TC II

Le marquage cellulaire était différent du bruit de fond puisque le nombre de grains d'argent était respectivement de 5,46; 14,84 et 2,48 par 1000  $\mu\text{m}^2$  de spermatocytes, spermatides rondes et spermatides allongées, contre 0,83 par 1000  $\mu\text{m}^2$  de compartiment extracellulaire. La proportion de spermatocytes marquées, spermatides rondes et spermatides allongées était respectivement de 31,6%; 32%; et 8,11% (Fig. 22).

L'analyse HD (Half Distance) a démontré que seulement 15,8%; 3,3% et 14,3% des grains d'argent étaient situés respectivement dans un HD de la membrane plasmique des spermatocytes, des spermatides rondes et des spermatides allongées (Fig. 23).

A plus grand agrandissement, on pouvait voir les grains d'argent en association avec les membranes plasmiques (Fig. 21.d), et avec de petits puits et vésicules recouverts (Fig. 21.c).

Au niveau intracellulaire, on a observé des amas de grains d'argent sur les endosomes et les corps multivésiculaires (Fig. 21.e). Le traceur fut détecté sur la membrane plutôt que dans le cytoplasme. Enfin, certains grains ont aussi été situés sur la membrane nucléaire (Fig. 21.e) et sur le noyau (Fig. 21.g).

Notre étude *in vitro* a clairement montré que la  $^{125}\text{I}$ -TC II du lapin n'était pas seulement liée à la membrane plasmique de la cellule germinale de celui-ci mais qu'elle était aussi internalisée par les cellules. Étant donné que la distribution du marquage selon l'étape de maturation corrélait positivement avec la distribution des vésicules recouvertes (Fig. 22), Il apparaît que l'internalisation de la TC II exige des structures recouvertes. Enfin, la densité du marquage était très élevée dans les spermatocytes et les spermatides rondes.

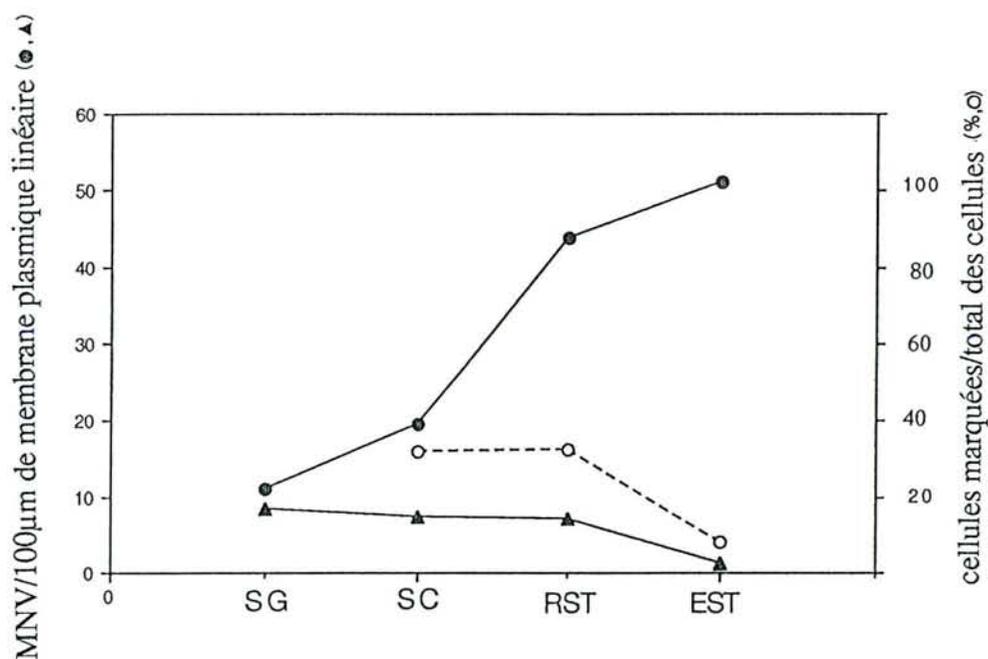


Figure 22. La distribution des vésicules recouvertes et non recouvertes dans le cytoplasme périphérique comparée à la fréquence de marquage dans les différentes étapes de maturation des cellules germinales. La distribution des vésicules non recouvertes (cercles pleins) et des vésicules recouvertes (triangles pleins) est exprimée par la valeur moyenne des vésicules (MNV) par 100  $\mu\text{m}$  de membrane plasmique linéaire. La fréquence de marquage est exprimée par le rapport entre les cellules marquées et les cellules totales (cercles vides). SG: spermatogonie, SC: spermatocytes, RST: spermatides rondes, EST: spermatides allongées.

Nombre de grains d'argent

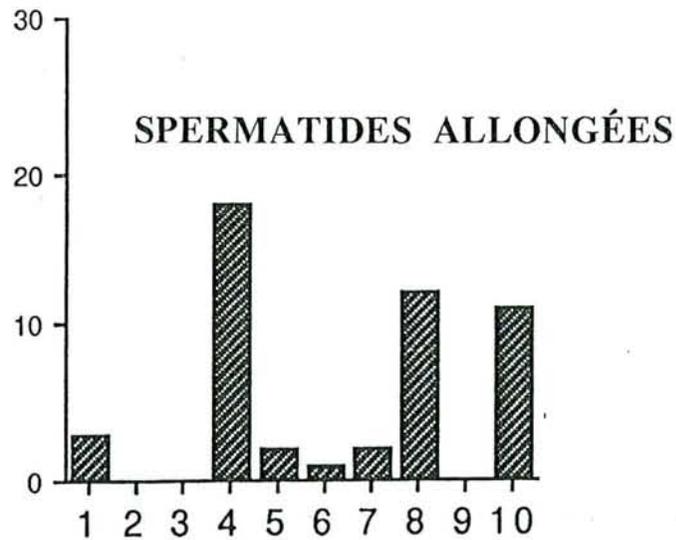
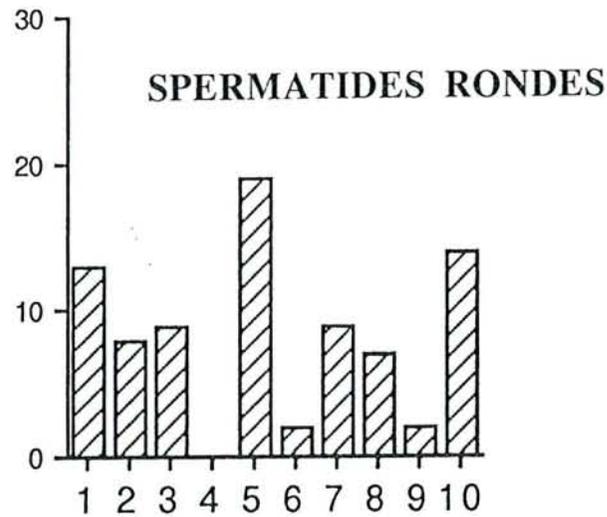
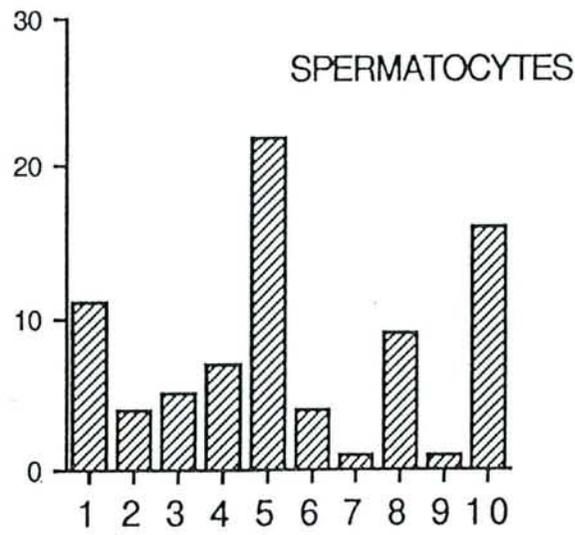


Figure 23. L'analyse du half-distance (HD) concernant différents types de cellules germinales (spermatocytes, spermatides et spermatides allongées). Les grains d'argent ont été marqués sur l'écran EM à un grossissement de 8000 fois. L'origine de l'axe HD a été localisée sur la membrane plasmique. 1HD = 140 nm.

### **3.5. ÉTUDE DE LA LIAISON TC II - RÉCEPTEUR SUR LES FRACTIONS RICHES EN MEMBRANES PLASMIQUES DES CELLULES GERMINALES**

#### **3.5.1. But de l'étude**

Après avoir montré la présence d'un récepteur spécifique de la TC II au niveau des suspensions de cellules germinales vivantes du lapin mâle, notre intérêt fut porté sur l'étude de la liaison de la TC II aux fractions riches en membranes plasmiques des cellules germinales du lapin mâle, cela afin de comparer ces résultats à ceux obtenus avec les cellules entières.

#### **3.5.2. Résultats**

##### **a. Étude cinétique**

L'étude de la cinétique de liaison a été réalisée dans les mêmes conditions que pour les cellules germinales entières. La liaison entre la TC II et la fraction riche en membrane plasmique augmentait en fonction du temps (Fig. 24). Le maximum de liaison fut obtenu en moins de 20 mn à 4°C. La liaison était réversible puisqu'un excès de 200 fois de TC II non marquée était capable de déplacer la TC II marquée des cellules germinales en 30 mn environ.

##### **b. Évaluation des paramètres de liaison**

L'analyse de Scatchard de la liaison entre la TC II marquée et la fraction riche en membrane plasmique des cellules germinales a révélé l'existence d'une seule classe de sites de liaison ayant une constante d'association ( $K_{ass}$ ) de  $13 \cdot nM^{-1}$  et  $9 \cdot 10^6$  sites par  $\mu g$  de protéine (Fig. 25).

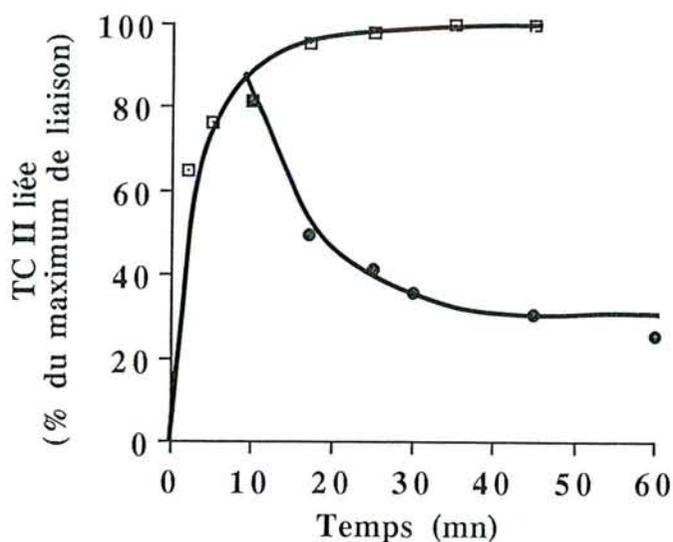


Figure 24. Cinétique de liaison de  $[^{57}\text{Co}]\text{-Cbl-TC II}$  avec les membranes plasmiques des cellules germinales à  $4^\circ\text{C}$ . L'association (carrés vides) obtenue en utilisant  $1,4 \text{ pmole}$  de TC II marquée incubée avec  $1 \text{ mg}$  de protéine de la fraction membranaire dans un volume final de  $10 \text{ ml}$ .  $1 \text{ ml}$  d'aliquot du mélange prélevé à des intervalles d'incubation allant de  $2$  à  $60 \text{ mn}$ . La dissociation (cercles pleins) obtenue de la même façon sauf qu'un excès de  $200$  fois de la TC II froide a été ajouté avec le traceur  $15 \text{ mn}$  après l'incubation des cellules germinales. Les données représentent la moyenne pour des valeurs en double.

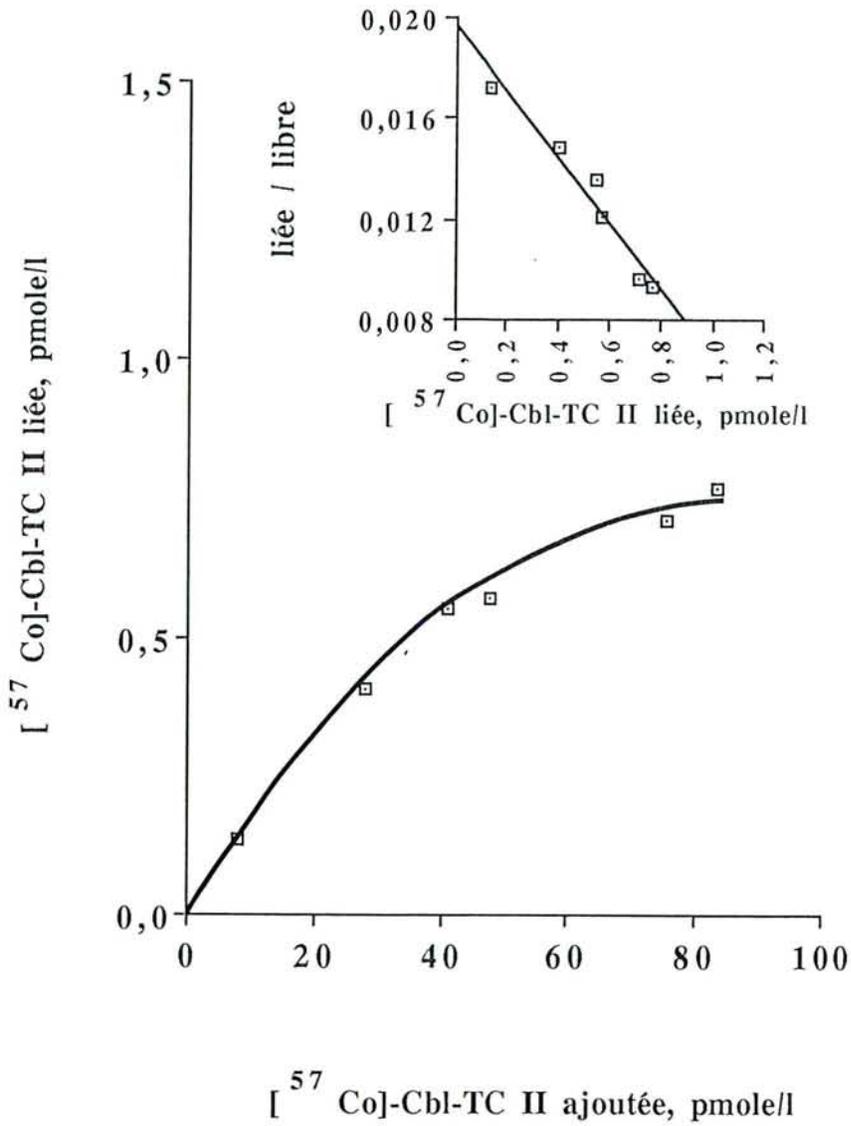


Figure 25. Courbe de saturation et graphique de l'analyse de Scatchard de l'interaction entre la fraction de membrane plasmique de cellules germinales et la TC II marquée à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 1h. Le total de la  $[^{57}\text{Co}]\text{-Cbl-TC II}$  liée aux cellules est estimé en déduisant la liaison non spécifique de la liaison totale.

**c. Effet du calcium**

La liaison de la TC II marquée est calcium dépendante puisqu'une incubation de cellules germinales avec 20 mM d'EDTA entraîne une baisse de 43% de la liaison spécifique (Fig. 26).

**d. Spécificité de la liaison**

La liaison entre la ( $^{57}\text{Co}$ )Cbl-TCII et les sites de liaison des membranes plasmiques est spécifique. Une inhibition maximale de la liaison est observée en présence de la TCII non marquée et non en présence d'autres protéines telles que la fétuine, la lactotransferrine et la transferrine (Fig. 26).

**e. Effet du pH**

L'effet du pH sur la liaison de [ $^{57}\text{Co}$ ]-Cbl-TC II avec les membranes plasmiques des cellules germinales a été étudié par incubation des membranes à 4°C avec le traceur à des pH allant de 2 à 8. Le pH optimal de liaison était aux alentours de 7, et la liaison était abolie à pH acide (Fig. 27).

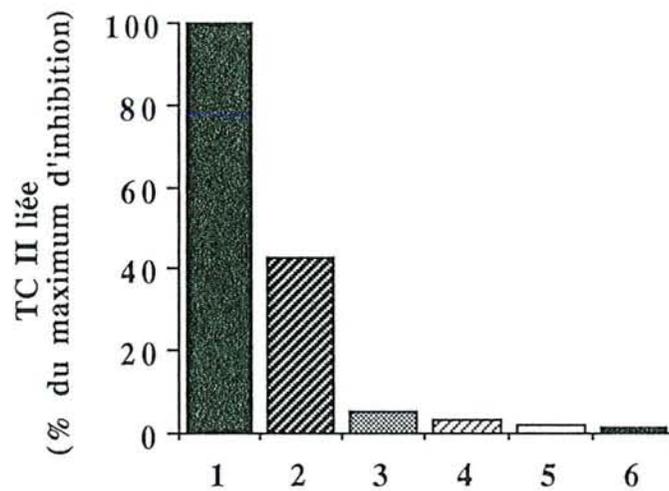


Figure 26. La spécificité de la liaison de la TC II avec les membranes plasmiques des cellules germinales étudiée par incubation à 4°C de 0,1 mg de protéine de la fraction membranaire, avec 0,2 pmole de [ $^{57}\text{Co}$ ]-Cbl-TC II dans un volume final de 1 ml, en présence de 40 pmole de TC II non marquée (1), 20 mM d'EDTA (2), 1 nM de fétuine (3), 1 nM de lactotransferrine (4), 1 nM de transferrine (5) et 1 nM de sérum albumine bovine (6).

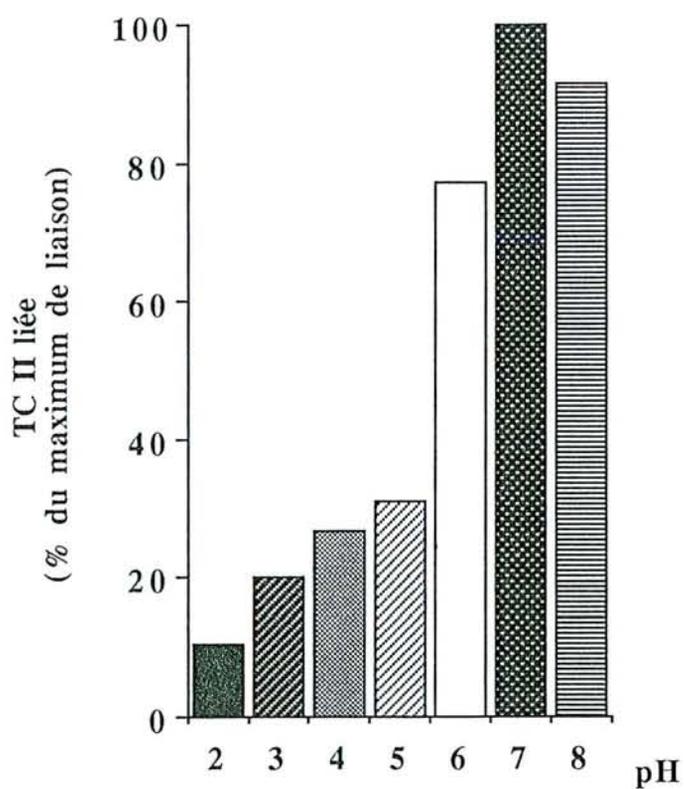


Figure 27. L'effet du pH sur la liaison de la TC II avec les membranes plasmiques des cellules germinales étudié par incubation à 4°C de l'équivalent en membrane de 0,1mg de protéines, avec 0,2 pmole de [<sup>57</sup>Co]-Cbl-TC II à 4°C, à des pH allant de 2 à 8.

### 3.5.3. Discussions

Nous avons démontré antérieurement la présence d'un récepteur de la TC II dans les cellules germinales du lapin (Boukhzer et coll 1992; En-nya et coll 1993). Dans ce travail nous avons étudié la liaison de la  $^{57}\text{Co}$ -Cbl-TC II avec une préparation de membrane plasmique des cellules germinales du lapin.

La cinétique d'association de la liaison de la  $^{57}\text{Co}$ -Cbl-TC II avec son récepteur membranaire et de sa dissociation en présence d'un excès de TC II froide était similaire à celle observée avec les suspensions des cellules germinales.

La constante d'association ( $K_a$ ) de la liaison entre la TC II marquée et la fraction membranaire est identique à celle observée avec les suspensions cellulaires ( $13 \text{ nM}^{-1}$ ).

Il a été estimé que la capacité du récepteur de la TC II était de  $9.10^9$  sites par mg de protéines. Étant donné que la fraction de membrane isolée était préparée à partir d'aliquote de  $10^7$  cellules, il a été donc calculé qu'environ 500 sites de récepteurs étaient présents par cellule germinale. Cette capacité était proche de celle observée avec les cellules entières (700 sites de récepteurs par cellule).

La liaison de la  $^{57}\text{Co}$ -Cbl-TC II avec son récepteur membranaire était spécifique. Une inhibition maximale de la liaison fut observée en présence de la TCII non marquée et non en présence d'autres protéines.

La liaison de la  $^{57}\text{Co}$ -Cbl-TC II avec la fraction membranaire se révéla être pH dépendante. Elle fut abolie à pH acide, ce qui laisse entrevoir que la TC II pourrait se dissocier dans le compartiment acidifié.

### **3.6. ETUDE PRELIMINAIRE DE LA LIAISON DE LA $^{57}\text{Co}$ -TCII DU LAPIN AVEC LES CELLULES GERMINALE DU RAT**

#### **3.6.1. But de l'étude**

Le but de cette étude est de mettre en évidence dans un autre modèle animal, en l'occurrence le rat, l'existence des récepteurs membranaires des cellules germinales.

#### **3.6.2. Résultats**

L'étude de la liaison entre la TCII du lapin marquée au cobalt  $^{57}$  et les cellules germinales du rat montre l'existence d'un site de liaison saturable, spécifique et présentant une forte affinité pour cette TC II. L'analyse de Scatchard révèle l'existence d'une seule classe de sites de liaison, d'une constante d'association de  $10,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  et de 710 sites par cellule ont (Fig. 28). Ces données sont proches de celles observées avec les cellules germinales de lapin .

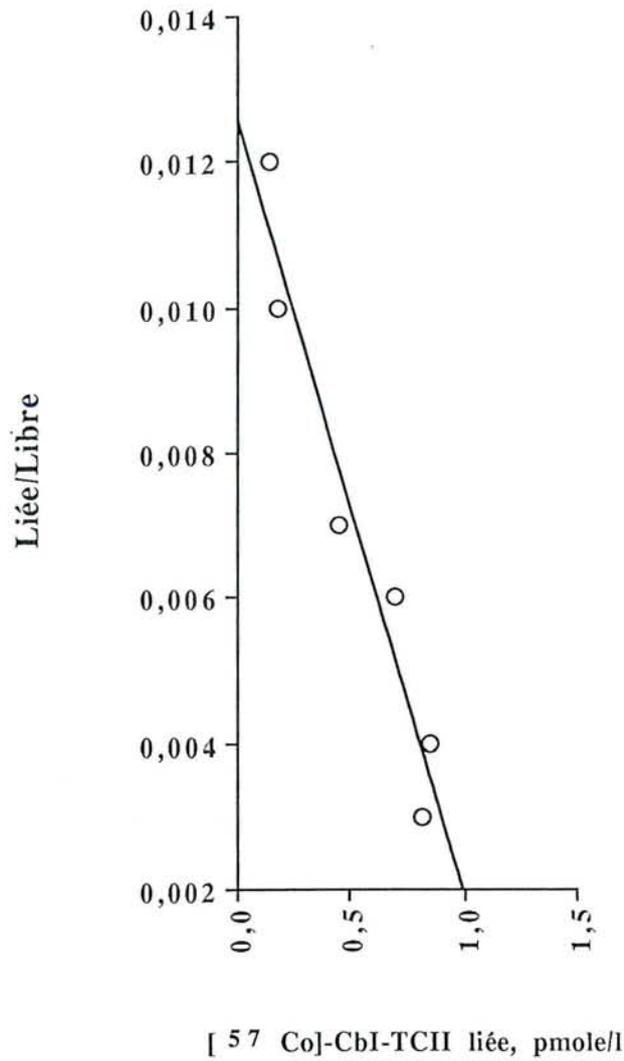


Figure 28 . Le graphique de l'analyse de Scatchard de l'interaction entre les cellules germinales de rat et la [ <sup>57</sup>Co]-Cbl-TC II de lapin à 4°C pendant 1h.

## **IV. DISCUSSION GENERALE**

Le rapport entre la vitamine B12 et la fertilité remonte à 1957, date à laquelle Busch E. a montré que dans le sperme du taureau, stocké pour être utilisé dans l'insémination artificielle, l'addition de la vitamine B12 améliore sa motilité éventuelle et augmente son degré de fertilité.

En 1971, Ronald H. et coll. ont montré, chez des jumelles stériles et atteintes d'anémie pernicieuse, la restauration de la fertilité par administration d'hydroxocobalamine.

Selon Carmel R. et Bernsein G.S., la concentration de la TC II dans le liquide séminal est dix fois plus importante que dans le sang.

Ces différentes études montrent que la cobalamine pourrait avoir un rôle dans le développement et la maturation des cellules germinales.

Suite à l'intérêt éveillé par ce problème, que nous nous sommes proposé d'élucider, nous avons étudié la présence de sites récepteurs de la TC II qui est, chez la plupart des espèces, la protéine de liaison sérique et tissulaire principale de la cobalamine, et la protéine qui permet l'endocytose récepteur-médiée de la vitamine.

Au cours de ce travail, nous avons partiellement purifié la TC II sérique du lapin qui sera marquée d'une façon spécifique par  $^{57}\text{Co}$ -Cobalamine.

#### 4.1. LA PRESENCE DE SITES DE LIAISON DE LA TC II ET LEUR NATURE

Nous avons montré qu'il existe, pour la TC II, des sites de liaison spécifiques au niveau de la membrane plasmique des cellules germinales du lapin. Ces récepteurs sont saturables, spécifiques et présentent une forte affinité pour la TC II. L'analyse par la méthode de Scatchard révèle l'existence d'une seule classe de sites de liaison, la constante d'association ( $K_a$ ) est de  $13 \cdot \text{nM}^{-1}$  et 700 sites par cellule ont été trouvés. Ces données sont proches de celles rapportées sur la liaison de la TC II-Cbl sur des préparations de membranes placentaires humaines,  $K_a = 7 \cdot \text{nM}^{-1}$  (Friedman et coll, 1977) et des fibroblastes humaines  $K_a = 20 \cdot \text{nM}^{-1}$  (Youngdhal-Turner et coll, 1978). La TC II du lapin est également capable de reconnaître le récepteur membranaire des cellules germinales du rat (Tab. 7).

La caractérisation physico-chimique de ce récepteur montre que la liaison est calcium dépendante et qu'il s'agirait d'une protéine. En effet, la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse des protéines, diminue d'une façon significative le pourcentage de liaison de la TC II avec son récepteur. Cela suggère alors que les cellules germinales sont capables de synthétiser et d'exprimer les récepteurs au niveau de leur membrane plasmique pour l'endocytose de la vitamine B<sub>12</sub>.

Seligman et Allen (1978) ont solubilisé, par le triton X-100, et purifié, 40000 fois, le récepteur de la TC II. La forme essentielle du récepteur purifié a un seul site de liaison de la TC II-B<sub>12</sub>, un poids moléculaire d'environ 50000, contient 33% de sucre et une composition particulière d'acide aminé plutôt similaire à la TC II.

Bien que la TC II ne soit pas une glycoprotéine, les deux protéines contiennent essentiellement le même nombre d'acides aminés dans leurs portions polypeptidiques. Les compositions des acides aminés du récepteur et de la TC II sont aussi pareils bien qu'il existe des différences portant sur au moins cinq acides aminés.

Le rayon de stock apparent du récepteur humain saturé augmente d'environ 30%, alors que la taille du récepteur du lapin reste inchangée suite à la formation du complexe. Tout apparaît comme si la TC II-Cbl entre dans une concavité du récepteur membranaire du lapin.

| Forme de TC II | Marquage  | Tissus cibles          | Ka(nM-1)    | Réf. Bibliographique                  |
|----------------|-----------|------------------------|-------------|---------------------------------------|
| Holo TC II (H) | Cobalt 57 | Foie de rat (M)        | 5,5         | <i>Fiedler-Nagy et col., 1975</i>     |
| B12 libre      | Cobalt 57 | Foie de rat (M)        | 5,5         |                                       |
| Holo TC II (H) | Cobalt 57 | Placenta humain (M)    | 7,2         | <i>Friedman et col., 1977</i>         |
| Apo TC II (H)  | Cobalt 57 | Placenta humain (M)    | 2           |                                       |
| B12 libre      | Cobalt 57 | Placenta humain (M)    | Trop faible |                                       |
| Holo TC II (H) | Iode 125  | Fibroblaste humain (E) | 20          | <i>Youngdhal-Turner et col., 1978</i> |
| Apo TC II (H)  | Iode 125  | Fibroblaste humain (E) | Faible      |                                       |
| B12 libre      | Iode 125  | Fibroblaste humain (E) | Nulle       |                                       |
| Holo TC II (H) | Cobalt 57 | Placenta humain (R)    | 56          | <i>Seligman et Allen, 1978</i>        |
| Apo TC II (H)  | Cobalt 57 | Placenta humain (R)    | 28          |                                       |
| Holo TC II (H) | Cobalt 57 | Placenta humain (M)    | 3,3         |                                       |
| Apo TC II (H)  | Cobalt 57 | Placenta humain (M)    | 1,5         |                                       |
| Holo TC II (H) | Cobalt 57 | Placenta humain (M)    | 2,3         | <i>Nexø et Hollenberg, 1980</i>       |
| Holo TC II (L) | Cobalt 57 | Placenta humain (M)    | 1,1         |                                       |
| Holo TC II (H) | Cobalt 57 | Foie de lapin (M)      | 6,7         |                                       |
| Holo TC II (L) | Cobalt 57 | Foie de lapin (M)      | 1,9         |                                       |
| Holo TC II (H) | Cobalt 57 | Placenta humain (R)    | 2,4         |                                       |
| Holo TC II (H) | Cobalt 57 | Foie de lapin (R)      | 8,7         |                                       |
| B12 libre      | Cobalt 57 |                        | Nulle       |                                       |
| Holo TC II (L) | Cobalt 57 | Cel. germ. lapin (E)   | 13          | <i>Résultats personnels</i>           |
| Holo TC II (L) | Iode 125  | Cel. germ. lapin (E)   | 14          |                                       |
| Holo TC II (L) | Cobalt 57 | Cel. germ. lapin (M)   | 13          |                                       |
| Holo TC II (L) | Cobalt 57 | Cel. germ. rat (E)     | 10,6        |                                       |

Tableau 7. Les constantes d'association de la liaison de la TC II avec son récepteur membranaire dans différents tissus cibles. TC II (H): TC II humaine, TC II (L): TC II du lapin, (E): cellules entières, (M): fraction de membrane, (R): extrait de récepteur.

#### 4.2. LE RÔLE DU RÉCEPTEUR DANS L'INTERNALISATION DE LA VITAMINE B<sub>12</sub>

La captation de la TC II-B<sub>12</sub> a été étudiée dans plusieurs systèmes à la fois animal et humain. Il y a une phase de captation initiale rapide qui est insensible à la température, aux changements du pH ou aux inhibiteurs métaboliques. Toutefois, elle est inhibée par la trypsine et la papaine, ce qui endommage la surface cellulaire. Ceci est suivi d'une deuxième phase qui est pH et température dépendante, phase qui est bloquée par les inhibiteurs métaboliques (à basse température, l'internalisation est inhibée alors que l'augmentation du pH endosomal entrave le cycle intracellulaire de la TC II). Osroy et Gams ont montré que la captation de la TC II-B<sub>12</sub> par les cellules leucémiques L1210 suivait la cinétique de Michaelis-Menten et qu'elle était inhibée par l'apoTC II.

L'internalisation de la cobalamine nécessite la présence d'un récepteur. Celui-ci reconnaît un site sur la molécule de la TC II (Berliner N. et Rosenberg L.E., 1981). La captation de la cobalamine libre par les cellules est cependant très controversée. Un récepteur spécifique de la cobalamine libre a été proposé par Fiedler-Nagy et coll. (1975) en étudiant la liaison spécifique de la cobalamine avec des préparations de la membrane du foie du rat. Ils ont trouvé que la constante d'association de la liaison de la cobalamine libre était similaire à celle médiée par la TC II. Berliner N. et Rosenberg L.E. (1981) ont montré que les fibroblastes humains en culture ainsi que des cellules appartenant à un patient ayant une déficience complète de TC II captaient la cyanocobalamine libre. Friedman et coll. ont remarqué que la cobalamine libre possédait une faible affinité pour les préparations membranaires du placenta humain. Cependant, E. Nexø et M.D. Hollenberg (sur le placenta humain et le foie de lapin) de même que P. Youngdal-Turner et L.E. Rosenberg (sur les fibroblastes humains) n'ont observé aucune liaison de la cobalamine libre avec leurs préparations de membranes.

Considérant que la quasi-totalité de la cobalamine dans le sang est liée à la TC II, le contact entre la cobalamine libre et les cellules est très rare. Ce mécanisme, qui existe également chez l'homme, explique que les patients ayant une déficience congénitale de la TC II peuvent être traités progressivement avec des doses de cobalamine importantes (Hall, 1973), et peuvent présenter une stérilité par carence vitaminique.

Il est peu probable que le récepteur de la TC II-cobalamine puisse médier la captation de la cobalamine libre puisque un excès de 10 000 fois de cobalamine libre ne concurrence pas la captation de la TC II-cobalamine. En plus les résultats de Fiedler-Nagy et coll. mesuraient la liaison plutôt que la captation totale c'est à dire la liaison et l'internalisation.

Notre étude in vitro, par autoradiographie, a clairement montré que le complexe  $^{125}\text{I}$ -TC II-Cbl du lapin n'était pas seulement liée à la membrane plasmique de la cellule germinale du lapin, mais qu'il était aussi internalisé par les cellules. La distribution du marquage selon les catégories de cellules était positivement corrélée avec la distribution des vésicules couvertes. La participation des structures couvertes dans l'endocytose récepteur-médiée a été établie par des études ultrastructurelle dans plusieurs cellules (Goldstein et coll, 1985). L'analyse en microscopie électronique réalisée dans le laboratoire d'Embryologie du professeur Gérard avec notre préparation cellulaire montre l'existence de structure recouvertes dans les cellules germinales de lapin. Deux autres structures apparentées à l'endocytose étaient observées dans tout le cytoplasme: 1) des structures vésiculaires petites et vides avec une membrane lisse de 150-300 nm de diamètre qui pourront correspondre à des endosomes "eulyendosome". 2) des corps multivésiculaires de 1500-3000 nm de diamètre considérés comme des éléments prélysosomiaux (Gérard et coll., 1991). La présence de marquage associé à ces structures montre bien que le complexe  $^{125}\text{I}$ -TC II-Cbl est internalisé par les cellules germinales.

#### **4.3. CYCLE INTRACELLULAIRE DE LA VITAMINE B<sub>12</sub>**

Après internalisation, les complexes " récepteur-TC II-Cbl " se trouvent dans les vésicules recouverte. Ces vésicules vont fusionner entre eux pour former des endosomes. La présence de grains d'argent en superposition de la membrane des endosomes et des corps multivésiculaires, derniers endosomes qui sont considérés comme des éléments prélysosomiaux, indique que le complexe franchit toutes les étapes depuis les vésicules recouvertes jusqu'aux lysosomes. La diminution importante du taux de liaison de la TC II avec le récepteur à pH acide suggère une dissociation du complexe "récepteur-TC II" dans le compartiment endosomiale acidifié de la cellule.

La chloroquine est capable de bloquer la pompe à proton et d'augmenter le pH au sein des endosomes (de Duve et coll., 1974). La diminution significative du taux de liaison après l'incubation avec la chloroquine, pourrait correspondre au blocage de cette dissociation. Tous ces résultats soutiennent le fait que la TC II se dissocie de son récepteur dans le compartiment endosomal et qu'il est donc possible que le récepteur soit recyclé. Ainsi, on peut dire qu'après internalisation du complexe "récepteur-TC II-Cbl", la TC II va se dissocier de son récepteur dans les endosomes, le récepteur va être recyclé, la TC II va être dégradé dans les lysosomes et la cobalamine va être libéré pour se transformer en MeCbl dans le cytoplasme ou en AdoCbl dans les mitochondries.

Le mécanisme intracellulaire de la TC II-cobalamine est alors similaire à la captation d'autres protéines. Goldstein et Brown ont défini un modèle semblable dans leurs études de la liaison, la captation et la dégradation de la LDL par les fibroblastes humains. La captation de la LDL est fonctionnellement semblable à la captation de la TC II (Youngdal-Turner et Rosenberg, 1978). Les deux premières protéines servent de transportrices intervenant dans la livraison respective de nutriments cellulaires, le cholestérol et la cobalamine.

La captation de l'ABP, protéine transportrice d'hormones androgène, par les cellules germinales de rat (Felden F. et Coll., 1992) est spécifique, saturable, calcium dépendante et est inhibée par la trypsine et les pH acides.

Les fibroblastes humains relient le complexe  $^{125}\text{I}$ -TC II- $\text{B}_{12}$  à un site spécifique qui est calcium dépendant, saturable et inhibé par l'apoTCII. Lorsque le complexe est incubé à  $4^\circ\text{C}$ , il reste sur la surface cellulaire et il est libéré par digestion avec la trypsine. Lorsqu'il est incubé à  $37^\circ\text{C}$ , le complexe TC II- $\text{B}_{12}$  devient progressivement moins libérable par la trypsine, ce qui indique le passage de la TC II- $\text{B}_{12}$  dans la cellule. Des fragments marqués à l' $^{125}\text{I}$  apparaissent par la suite dans le milieu. Ce qui suggère la dégradation intracellulaire de la TC II. Ce dernier processus peut être inhibé par la chloroquine, ce qui suggère que la TC II est dégradée dans les lysosomes, permettant ainsi à la  $\text{B}_{12}$  d'être disponible pour le métabolisme intermédiaire de la cellule.

Bien que le récepteur de la LDL soit sous la régulation d'un feed-back dépendant du contenu intracellulaire en cholestérol, ce mode de régulation semble ne pas exister chez le récepteur de la TC II. Pourtant, si l'on considère que le premier composant de la captation représente la liaison, tel qu'il a été proposé au cours des premières études sur la captation de la TC II-cobalamine (Parenchych et Cooper, 1962; DiGirolamo et Heunnekens, 1975), un mode de régulation pourrait exister pour la captation de la TC II. L'observation selon laquelle la  $K_a$ , apparente de l'apo-TCII, est égale à environ la moitié de celle de la TC II-cobalamine (Youngdal-Turner et Rosenberg, 1978 ; Seligman et Allen, 1978) soutient la possibilité que la liaison TC II-récepteur constitue l'étape limitante de la captation de la TC II-Cbl plasmatique.

#### **4.4. L'EFFET DE LA B<sub>12</sub> SUR LA MATURATION DES CELLULES GERMINALES**

Notre étude, par autoradiographie, a montré que le nombre de vésicules couvertes était à son plus haut degré pendant les premières étapes de maturation, alors que le nombre de vésicules non couvertes était plus élevé pendant les dernières étapes de maturation. La densité de marquage était très élevée dans les spermatocytes et les spermatides rondes. Ces données sont proches de celles rapportées sur la transferrine et la ferritine cationique (Segretain et coll, 1992). Des résultats similaires furent obtenus par Holmes et coll. (1983) sur la transferrine. Il peut donc être suggéré que la cobalamine pourrait jouer un rôle essentiel dans la maturation des spermatocytes pachytènes. Tout cela soutient les travaux de Watson (1962) qui, partant de la constatation simple selon laquelle la baisse de la proportion de spermatozoïdes à morphologie normale pourrait être une conséquence d'un défaut de maturation des spermatozoïdes, avait procédé à l'examen, chez 30 patients, du quotient:

la vitamine B<sub>12</sub> dans le sperme

---

la vitamine B<sub>12</sub> dans le sérum

Ces travaux montrent que presque tous les patients qui avaient un quotient inférieur à 1, avaient au moins 30% de leurs spermatozoïdes qui présentaient des anomalies. Ils confirment aussi les travaux de Sharp A.A. et Witts L.J. (1962) qui ont pu améliorer la fertilité chez un patient atteint d'anémie pernicieuse. Le patient était stérile, et 60% de ses spermatozoïdes étaient anormaux, ainsi qu'un grand nombre de spermatides et de spermatogonies étaient présents dans le sperme. A la suite d'un traitement à la vitamine B<sub>12</sub>, le sperme du patient contenait au moins 75% de spermatozoïdes normaux et aucune spermatogonie n'était décelable.

Ceci pourrait expliquer pourquoi l'infertilité est l'un des symptômes cliniques de la carence en Cbl (Chanarin, 1979).

#### **4.5. ORIGINE DE LA TC II SEMINIFERE**

Le liquide séminal est un site riche en TC II et sa teneur est supérieure de dix fois celle du sérum. Quant aux cellules de Sertoli, elles produisent les protéines de transport des vitamines telles que la folate-binding protein, la biotine-binding protein et la retinol-binding protein (Fetterolf P.M., Skinner M.K., 1987; Ong D.E., Chytil F., 1988; Schingleton J.L., Skinner M.K., 1989;). La synthèse de la TC II par les cellules germinales n'est pas encore démontrée. Le mécanisme par lequel la Cobalamine est transporté à travers le courant sanguin et délivrée aux cellules germinales reste à clarifier. Il pourrait correspondre soit à une synthèse de la TC II par les cellules de Sertoli soit à une transcytose de la TC II-Cbl sanguine à travers les cellules de Sertoli.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Ailenberg M., McCabe D. and Fritz I. B.

Androgens inhibit plasminogen activator activity secreted by Sertoli cells in culture in a two-chambered assembly.

*Endocrinology*, (1990), 126, (3), 1561-1568

Allen R. H. and Majerus P. W.

Isolation of vitamin B12 binding proteins using affinity chromatography III. Purification and properties of a human plasma transcobalamin II.

*J. Biol. Chem.*, (1972), 247, 7709-7717

Allen R. H. and Majerus P. W.

Isolation of vitamin B12 binding proteins using affinity chromatography II. Purification and properties of a human granulocyte vitamin B12 binding protein.

*J. Biol. Chem.*, (1972), 247, 7702-7708

Allen R. H. and Majerus P. W.

Isolation of vitamin B12 binding proteins using affinity chromatography I. Preparation and properties of vitamin B12-sepharose.

*J. Biol. Chem.*, (1972), 247, 7695-7701

Allen R. H.

Human vitamin B12 transport proteins.

*Prog. Hematol.*, (1975), 9, 57-84

Allen R. H.

The plasma transport of vitamin B12.

*Br. J. Haematol.*, (1976), 33, 161-171

Anderson R. G. W., Goldstein J. L. and Brown M. S.

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*, (1976), 73, 2434-2438

Aoki A. and Fawcett D. W.

Impermeability of Sertoli cell junctions to prolonged exposure to peroxidase.

*Andrologia*, (1975), 7, (1), 63-76

Ayer-Le Lievre C., Olson L., Ebandal T., Hallböök F. and Persson H.

Nerve growth factor mRNA and protein in the testis and epididymis of mouse and rat.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1988), 85, (8), 2628-2632

Bardin C. W., Cheng C. Y., Musto N. A. and Gunsalus G. L.  
The Sertoli cell. In "The physiology of reproduction", (1988), Knobil E. and Neill J. (eds), Raven press Ltd, New York, 933-974

Barker H. A.  
Corrinoid- dependent enzymatic reactions.  
*Ann. Rev. Biochem*, (1972), 41, 55-90

Bartlett J. M., Kerr J. B. and Sharpe R. M.  
The selective removal of pachytene spermatocytes using methoxy acetic acid as an approach to the study in vivo of paracrine interactions in the testis.  
*J. Androl.*, (1988), 9, (1), 31-40

Beck W. S. and Ochoa S.  
Metabolism of propionic acid in animal tissues - IV. Further studies on the enzymatic isomerization of methyl malonyl coenzyme A.  
*J. Biol. Chem.*, (1958), 232, (1), 931-938

Beckman J. K. and Coniglio J. G.  
The metabolism of polyunsaturated fatty acids in rat Sertoli and germinal cells.  
*Lipids*, (1980), 15, (6), 389-394

Begley J. A., Morelli T. A. and Hall C. A.  
B12-binding proteins after injection of cyanocobalamin.  
*N. Engl. J. Med.*, (1977), 297, 614-615

Beguinet L., Hanover J. A., Ito S., Richert N. D., Willingham M. C. and Pastan I.  
Phorbol ester induce transient internalization without degradation of unoccupied epidermal growth factor receptors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1985), 82, 2774-2778

Bellve' A. R. and Feig L. A.  
Cell proliferation in the mammalian testis: biology of the seminiferous growth factor (SGF).  
*Recent. Prog. Horm. Res.*, (1984), 40, 531-567

Berliner N. and Rosenberg L. E.  
Uptake and metabolism of free cyanocobalamin by cultured human fibroblasts from controls and a patient with transcobalamin II deficiency.  
*Metabolism*, (1981), 30, (3), 230-236

- Bloomfield F. J. and Scott J. M.  
Identification of a new vitamin B12 binder (transcobalamin III) in normal human serum.  
*Br. J. Haematol.*, (1972), 22, 33-42
- Bretscher M. S. and Pearse B. M. F.  
Coated pits in action.  
*Cell*, (1984), 38, 3-4
- Brokelmann J.  
Fine structure of germ cells and Sertoli cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat.  
*Z Zellforsch Mikrosk Ana.*, (1963), 59, 308-823
- Brown M. S. and Goldstein J. L.  
How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis.  
*Sci. Am.*, (1984), 51, 58-66
- Buch J. P., Lamb D. J., Lipshultz L. I. and Smith R. G.  
Partial characterization of a unique growth factor secreted by human Sertoli cells.  
*Fertil. Steril*, (1988), 49, (4), 658-665
- Burger R. L., Melhman C. S. and Allen R. H.  
Human plasma R type vitamin B12 binding proteins.  
*J. Biol. Chem.*, (1975), 250, 7700-7706
- Carmel R.  
Cobalamin binding proteins of man.  
In "Contemporary Hematology / Oncology", (1981), Silber R., Gordon A., Lobue J. and Muggia F. (eds), 2, 79-125
- Carmel R. and Bernstein G. S.  
Transcobalamin II in human seminal plasma.  
*J. Clin. Invest.*, (1984), 73, 868-872
- Carpenter G. and Cohen S.  
Epidermal growth factor.  
*Ann. Rev. Biochem.*, (1979), 48, 193-216
- Carpenter G.  
Receptors of epidermal growth factor and other polypeptide mitogens.  
*Ann. Rev. Biochim.*, (1987), 56, 881-914

Carpentier J. L., Gorden P., Anderson R. G. W., Goldstein J. L., Brown M. S. and al

125I-epidermal growth factor and ferritin-low density lipoprotein in coated pits: A quantitative electron microscopic study in normal and mutant fibroblasts.

*J. Cell Biol.*, (1982), 95, 73-77

Castellon E., Janecki A. and Steinberger A.

Age-dependent Sertoli cell responsiveness of germ cells in vivo.

*Int. J. Androl.*, (1989), 12, (6), 439-450

Castle W. B. and Townsend W. C.

Observations on the etiologic relationship of achylia gastrica to pernicious anaemia II. The effects of the administration to patients with pernicious anaemia of beef muscle after incubation with normal human gastric juice.

*J. Am. Med. Soc.*, (1929), 178, 764-777

Chanarin I.

The megaloblastic anaemias, (1978), Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 2 (ed),

Chanarin I., Muir M., Hughes A. and Hoffbrand A. V.

Evidence for intestinal origin of transcobalamin II during vitamin B12 absorption.

*Br. Med. J.*, (1978), 1, 1453-1455

Chatelain P. G., Naville D. and Saez J. M.

Somatomedin-C/insuline-like growth factor I-like material secreted by porcine Sertoli cells in vitro: characterization and regulation.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1987), 146, 1009-1017

Cheng C. Y., Grima J., Stahler M. S., Lockshin R. A. and Bardin C. W.

Testins are structurally related Sertoli cell proteins whose secretion is tightly coupled to the presence of germ cells.

*J. Biol. Chem.*, (1989), 264, (25), 21386-21393

Chistensen A. K., Komorowski T. E., Wilson B., Ma S. F. and Stevens R. W.

The distribution of serum albumin in the rat testis, studied by electron microscope immunocytochemistry or ultrathin frozen sections.

*Endocrinology*, (1985), 116, 1983-1991

Clermont Y. and Perey B.

Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats.

*Am. J. Anat.*, (1957), 100, 1009-1017

Clermont Y.

Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelial cycle and spermatogonial renewal.

*Physiol. Rev.*, (1972), 52, 198-236

Clermont Y., Mc Coshen J. and Hermo L.

Evolution of the endoplasmic reticulum in Sertoli cell cytoplasm encapsulating the head of late spermatids in the rat.

*Anat. Rec.*, (1980), 196, (1), 83-89

Closset J., Gothot A., Sente B., Scippo M. L., Igout A., Vandebroeck M., Dombrowicz D. and Hennen G.

Pituitary hormone dependent expression of insuline-like growth factor I and II in the immature hypophysectomized rat testis.

*J. Mol. Endocrinol.*, (1989), 3, 1125-1131

Cooksley W. G. E., Englend J. M., Louis L., Down M. C. and Tavill A. S.

Hepatic vitamin B12 release and transcobalamin II synthesis in the rat.

*Clin. Sci. Mol. Med.*, (1974), 47, 531-545

Cooper B. A.

Equilibrium of vitamin B12 binding proteins between transudates and plasma in man: evidence that TC II in vivo is smaller than albumin.

*Biochim. Biophys. Acta*, (1974), 336, 270-276

Dautry-Varsat A., Ciechanover A. and Lodish H. F.

pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1983), 80, 2258-2262

De Felici M., Dolci S. and Siracusa G.

Fetal germ cells establish cell coupling with follicle cells in vitro.

*Cell. differ. Dev.*, (1989), 28, (1), 65-69

De Kretzer D. M.

The cytology of testis.

In "The physiology of reproduction", (1988), Knobil E. and Neill J. (eds), Raven Press New York, 837-932

De Philip R. M. and Danahey D. G.

Germ cell binding to rat Sertoli cell in vitro.

*Biol. Reprod.*, (1987), 37, (5), 1271-1282

Di Girolamo P. M. and Huennekens F. M.

Transport of vitamin B12 into mouse leukemia cells.

*Arch. Biochem. Biophys.*, (1975), 168, 386-393

DiPaolo M. and Maxfield F. R.

Conformational changes in the receptors for epidermal growth factor and asialoglycoproteins induced by the mildly acidic pH found in endocytosis vesicles.

*J. Biol. Chem.*, (1984), 259, 9163-9171

Djakiew D. and Dym M.

Pachytene spermatocyte proteins influence Sertoli cell function.

*Biol. Reprod.*, (1988), 39, (5), 1193-1205

Donaldson R. M., Brand M. and Serfillipi D.

Changes in circulating transcobalamin II after injection of cyanocobalamin.

*N. Engl. J. Med.*, (1977), 296, 1427-1430

Dym M. and Fawcett D. W.

The blood testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium.

*Biol. Reprod.*, (1970), 3, 308-315

Dym M.

The fine structure of the monkey Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis Macaca barrier.

*Anat. Rec.*, (1973), 175, 639-656

Eddy E. M. and Kahri A. I.

Cell association and surface features in cultures of juvenile rat seminiferous tubules.

*Ana. Rec.*, (1976), 185, (3), 333-358

Elsenhans B. and Rosenberg I. H.

Influence of metal substitution on vitamin B12 binding to human intrinsic factor and transcobalamin I and II.

*Biochemistry*, (1984), 23, 805-808

England J. M., Down M. C., Tavill A. S., Clarke H. G. M. and Chanarin I.

The origin and function of the transcobalamins.

*Br. J. Haematol.*, (1973), 25, 544.

England J. M., Clarke H. G. M., Down M. C. and Chanarin I.

Studies on the transcobalamins.

*Br. J. Haematol.*, (1973), 25, 737-749

Englend J. M., Tavill A. S. and Chanarin I.

Hepatic synthesis of ranscobalamin II in the rat.

*Clin. Sci. Mol. Med.*, (1973), 45, 479-483

- Erickson-Lawrence M., Zabludoff S. D. and Wright W. W.  
Cyclic protein-2 a secretory product of rat Sertoli cells, is the proenzyme from cathepsin-L.  
*J. Cell. Biol.*, (1990), 111, 107
- Fabbri A., Ulisse S., Bolotti M., Ridolfi M., Spera G., Dufau M. L. and Isidori A.  
Opioid regulation of testicular function.  
*Perspect. Androl.*, (1989), 53, 203-209
- Feig L. A., Bellve' A. R., Erickson N. H. and Klagsbrun M.  
Sertoli cells contain a mitogenic polypeptide.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1980), 77, (8), 4774-4778
- Feig L. A., Klagsbrun M. K. and Bellve' A. R.  
Mitogenic polypeptide of the mammalian seminiferous epithelium: biochemical characterization and partial purification.  
*J. Cell. Biol.*, (1983), 97, (5 pt1), 1435-1443
- Felden F., Guéant J. L., En-nya A., Gerard A., Fremont S., Nicolas J. P. and Gerard H.  
Photoaffinity labelled rat androgen-binding protein and human sex steroid-binding protein bind specifically to rat germ cells.  
*J. Mol. Endocrinol.*, (1992), 9, 39-46
- Fetterlof P. M. and Skinner M. K.  
Sertoli cells produce vitamin-binding proteins.  
*Ann. NY Acad. Sci.*, (1987), 513, 480-481
- Fiedler-Nagy C., Rosley G. R. and Coffey J. W.  
Binding of vitamin B12-rat transcobalamin II and free vitamin B12 to plasma membranes isolated from rat liver.  
*Br. J. Haematol.*, (1975), 31, 311-321
- Finkler A. E. and Hall C. A.  
Nature of the relationship between vitamin B12 and cell uptake.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, (1967), 120, 79-85
- Finkler A. E., Green P. D. and Hall C. A.  
Immunological properties of human vitamin B12 binders.  
*Biochim. Biophys. Acta*, (1970), 200, 151-159
- Fischer J. M. and Taylor K. B.  
Placental transfer of gastric antibodies.  
*Lancet*, (1967), 1, 685-689

Flickinger C. and Fawcett D. W.

The junctional specializations of Sertoli cells in the seminiferous epithelium.

*Anat. Rec.*, (1967), **158**, 207-221

Franke W. D., Grund C., Fink A., Weber K., Jockusch B. M., Zentgraf H. and Osborn M.

Location of actin of the microfilament bundles associated with the junctional specializations between Sertoli cells and spermatids.

*Biol. Cell.*, (1978), **31**, 7-12

Frieden E. and Hsieh H. S.

Ceruloplasmin: The cooper transport protein with essential oxidase activity.

*Adv Enzymol.*, (1976), **44**, 187-192

Friedman P. A., Shia M. A. and Wallas J. K.

A saturable high affinity binding site for transcobalamin II-vitamin B12 complexes in human placental membrane preparations.

*J. Clin. Invest.*, (1977), **59**, 51-58

Fritz I. B., Rommerts F. G., Louis B. G. and Dorrington J. H.

Regulation of FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of Androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures.

*J. Reprod. Fertil.*, (1976), **46**, 17-22

Friz I. B.

Sites of action of androgens and follicle stimulating hormone on cells of the seminiferous tubule. In "Biochemical actions of hormones", (1978), Liwack G. (eds), Academic press, New York, 249

Fritz I. B. and Karmally K.

Hormonal influences on function of plasminogen activator by cultured testis tubule segments at defined stages of the cycle of the seminiferous epithelium.

*Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, (1983), **61**, (3), 553-560

Froesch E. R., Schwander J. and Zapf J.

Actions of insulin-Like growth factors.

*Physiol. Rev.*, (1985), **47**, 443-467

Galdieri M., Zani B. M., Monaco L., Ziparo E. and Stefanini M.  
Change of Sertoli cell glycoproteins induced by removal of the associated germ cells.

*Exp. Cell. Res.*, (1983), 145, (1), 191-198

Galdieri M., Monaco L. and Stefanini M.

Secretion of androgen binding protein by Sertoli cells is influenced by contact with germ cells.

*J. Androl.*, (1984), 5, (6), 409-415

Geiger D., Carpentier J. L., Gordon P. and Orci L.

Down-regulation of insulin receptors is related to insulin internalization.

*Exp. Cell Res.*, (1989), 185, 33-40

Geuze H. J., Slot J. W., Strous G. J. A. M., Peppard J., Von Figura K. and al  
intracellular receptor sorting during endocytosis: comparative immunoelectron microscopy of multiple receptors in rat liver.

*Cell*, (1984), 37, 195-204

Gérard A., Gérard H. and Grignon G.

In "radioautography Data Book" (Ed. T. Nagata).

IPC, Tokyo, (1982), 44, 361-362

Gérard A., Khanfri J., Guéan 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*, (1988), 122, 1297-1307

Gérard A., En-nya A., Egloff M., Domingo M., Degrelle H. and Gérard H.

Endocytosis of human sex steroid-binding protein in monkey germ cells.

*Ann. NY Acad. Sci.*, (1991), 637, 258-277

Girdwood R. H., Eastwood M. A. and Finlayson N. D. C.

Pernicious anæmia as a cause of infertility in twins.

*Lancet*, (1971), 528-530

Giugliani E. R. J., Jorge S. M. and Goncalves A. L.

Serum vitamin B12 levels in parturients, in the intervillous space of the placenta, and in full-term newborns and their interrelationships with folate levels.

*Am. J. Clin. Nut.*, (1985), 41, 330-335

Goldstein J. L. and Brown M. S.

Binding and degradation of low density lipoprotein by cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia.

*J. Biol. Chem.*, (1974), 249, 5153-5162

Goldstein J. L., Anderson R. G. W. and Brown M. S.

Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis.

*Nature*, (1979), 279, 679-685

Goldstein J. L., Brown M. S., Anderson R. G. W., Russel D. W. and Schneider W. J.  
Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system.

*Annu. Rev. Cell. Biol.*, (1985), 1, 1-39

Gräsbeck R., Simons K. and Sinkkonen I.

Isolation of intrinsic factor and its probable degradation product as their vitamin B12 complexes from human gastric juice.

*Biochim Biophys. Acta*, (1966), 127, 47-58

Green P. D., Savage C. R. and Hall C. A.

Mouse transcobalamin II: Biosynthesis and uptake by L929 cells.

*Arch. Biochem. Biophys.*, (1976), 176, 683-689

Guéant J. L., Kouvonen I., Michalski M. C., Masson C., Grasbeck R. and Nicolas J. P.

Purification of human intrinsic factor using high performance ion exchange chromatography as the final step.

*FEBS Lett.*, (1985), 184, 14-19

Guéant J. L.

Malabsorption of cobalamins.

In "Cobalamin and Related Binding Proteins in clinical nutrition", (1990),

Guéant J. L. and Nicolas J. P. (eds), Elsevier, Amsterdam, 55-68

Guéant J. L., Frémon 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. Mol. Endocrinol.*, (1991), 7, 113-122

Hagenäs L., Ritzen E. M., Ploën L., Hansson V., French F. S. and Nayfeh S. N.

Sertoli cell origin of testicular Androgen-binding protein (ABP).

*Mol. Cel. Endocrinol.*, (1975), 2, 339-351

- Hall C. A. and Finkler A. E.  
A second vitamin B12 binding substance in human plasma.  
*Biochim. Biophys. Acta*, (1963), 78, 233-236
- Hall C. A. and Finkler A. E.  
The dynamics of TC II-A vitamin B12 binding substance in plasma.  
*J. Lab. Clin. Med.*, (1965), 65, (3), 459-468
- Hall C. A. and Rappazzo M. E.  
Uptake of protein bound vitamin B12 by canine organs.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, (1974), 146, 898-900
- Hall C. A.  
Transcobalamin I and II as natural transport proteins of vitamin B12.  
*J. Clin. Invest.*, (1975), 56, 1125-1131
- Hall C. A. and Rappazzo M. E.  
Release of transcobalamin II by canine organs.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, (1975), 148, 1202-1205
- Handelsman D. J., Spaliviero J. A., Scott C. D. and Baxter R. C.  
Identification of insulin-like growth factor-I and its receptor in the rat testis.  
*Acta Endocr.*, (1985), 109, 543-549
- Hansen M. and nexø E.  
Cobalamin binding in human seminal plasma.  
*Scand. J. Clin. Lab. Inves.*, (1993), (in press),
- Hansson H. A., Billig H. and Isgaard J.  
Insulin-like growth factor-I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects.  
*Biol. reprod.*, (1989), 40, 1321-1328
- Hatier R., Grignon G. and Touati F.  
Ultrastructural study of seminiferous tubules in the rat after prenatal irradiation.  
*Anat. Embryol.*, (1982), 165, (3), 425-435
- Herbert V.  
Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin B12 in humans.  
*Am. J. Clin. Nut.*, (1987), 45, 671-678

Hippe E. and Olesen H.

Nature of vitamin B12 binding - III. thermodynamics of binding to human intrinsic factor and transcobalamins.

*Biochim. Biophys. Acta*, (1971), 243, 83-89

Hogenkamp H. P. C.

Enzymatic reactions involving corrinoids.

*Ann. Rev. Biochem.*, (1968), 37, 225-245

Holmes S. D., Bucci L. R., Lipshulz L. I. and Smith R. G.

Transferrin binds specifically to pachytene spermatocytes.

*Endocrinology*, (1983), 113, 1916-1918

Holmes S. D., Spotts G. and Smith R. G.

Rat Sertoli cells secrete a growth factor that blocks epidermal growth factor (EGF) binding to its receptor.

*J. Biol. Chem.*, (1986), 261, (9), 4076-4080

Hom B. L.

Plasma turnover of 57cobalt-vitamin B12 bound to transcobalamin I&II.

*Scand. J. Haematol.*, (1967), 4, 321-322

Hom B. L. and Olesen H. A.

Plasma clearance of 57cobalt-labelled vitamin B12 bound in vitro and in vivo to transcobalamin I and II.

*Scand. J. Clin. Invest.*, (1969), 23, 201-211

Huang H. F. and Hembree W. C.

Spermatogenic response to vitamin A in vitamin A deficient rats.

*Biol. Reprod.*, (1979), 21, 891

Huang H. F., Dyrenfurth I. and Hembree W. C.

Endocrine changes associated with germ cell loss during vitamin A induced recovery of spermatogenesis.

*Endocrinology*, (1983), 112, (4), 1163-1171

Huang H. F. C. and Nieschlag E.

Suppression of the intratesticular testosterone is associated with quantitative changes in spermatogonial populations in intact adult rats.

*Endocrinology*, (1986), 118, 619-627

Ireland M. E. and Wesh M. J.

Germ cell stimulation of Sertoli cell protein phosphorylation.

*Endocrinology*, (1987), 120, (4), 1317-1326

Jackson I. M. D., Doig W. B. and MacDonald G.  
Pernicious anæmia as a cause of infertility.  
*Lancet*, (1967), 11, 1159-1160

Jegou B., Laws A. O. and de Kretser D. M.  
Changes in testicular function induced by short-term exposure of the rat testis to heat: further evidence for interaction of germ cells, Sertoli cells and Leydig cells.  
*Int. J. Androl.*, (1984), 7, 244-251

Jutte N. H. P. M., Grootedgoed J. A., Rommerts F. F. G. and van der Molen H. J.  
Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids.  
*J. Reprod. Fertil.*, (1981), 62, 399-409

Jutte N. H. P. M., Jansen R., Grootedgoed J. A., Rommerts F. F. G. and van der Molen H. J.  
FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis.  
*J. Reprod. Fertil.*, (1983), 68, 219-226

Khan S. A., Söder O., Syed V., Gustafsson K., Lindh M. and Ritzen E. M.  
The rat testis produces large amounts of an interleukin-1-like factor.  
*Int. J. Androl.*, (1987), 10, (2), 495-503

Klausner R. D., Ashwell G., Van Renswoude J., Harford J. B. and Bridges K. R.  
Binding of apotransferrin to K562 cells: Explanation of the transferrin cycle.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1983), 80, 2263-2266

Kopenhagen V. B., Warmuth E., Schlingmann G. and Dresow B.  
Novel metal-free corrinoids and metal analogues. In "Vitamin B12", (1979), Zagalak B. and Friedrich W. (eds), Walter de Gruyter, Berlin, New York, 635-646

Lacroix M., Smith F. E. and Fritz I. B.  
Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell enriched cultures.  
*Mol. Cell. Endocrinol.*, (1977), 9, 227-232

Lacroix M., Parvinen M. and Fritz I. B.  
Localization of testicular plasminogen activator in discrete proteins (stages VII and VIII) of the seminiferous tubule.  
*Biol. Reprod.*, (1981), 25, (1), 143-146

Larra F. and Droz B.

Techniques radioautographiques et leur application à l'étude du renouvellement des constituants cellulaires.

*J. Microsc.*, (1970), 9, 845-880

Larrabee A. R., Rosenthal S., Cathou R. E. and Buchanan J. M.

Enzymatic synthesis of the methyl group of methionine. IV. Isolation, characterization and role of the methyl group of 5-methyl-tetrahydrofolate.

*J. Biol. Chem.*, (1963), 238, 1025-1031

Le Magueresse B., Le Gac F., Loir M. and Jegou B.

Stimulation of rat Sertoli cell secretory activity in vitro by germ cells and residual bodies.

*J. Reprod. Fertil.*, (1986), 77, 489-494

Le Magueresse B. and Jegou B.

Possible involvement of germ cells in the regulation of oestradiol-17 $\beta$  and ABP secretion by immature rat Sertoli cells (in vitro studies).

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1986), 141, (2), 861-869

Le Magueresse B. and Jegou B.

In vitro effects of germ cells on the secretory activity of Sertoli cells recovered from rats of different ages.

*Endocrinology*, (1988), 122, (4), 1672-1680

Le Magueresse B. and Jegou B.

Paracrine control of immature Sertoli cells by adult germ cells, in the rat (an in vitro study). Cell-cell interactions within the testis.

*Mol. Cell. Endocrinol.*, (1988), 58, (1), 65-72

Le Magueresse B., Pineau C., Guillot F. and Jegou B.

Influence of germ cells upon transferrin secretion by rat Sertoli cells in vitro.

*J. Andrology*, (1988), 118, (3), R13-R16

Leblond C. P. and Clermont Y.

Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat.

*Ann. NY Acad. Sci.*, (1952), 55, 548

Malone J.

A study Sertoli spermatid tubulobulbar complexes in selected mammals.

*Ana. Rec.*, (1979), 193, 610-617

Marcoullis G. and Nicolas J. P.

The interactions of cobalamin in the gastrointestinal tract.

*Prog. Gastroenterology*, (1983), IV, 133-171

Mareschal J. C., Rama R. and Crichton R. R.

The role of ceruloplasmin in Fe(III)-transferrin formation in vitro.

*FEBS Lett*, (1980), 110, 268

Markwell M. A. K.

A new solid-state reagent to iodinate proteins. I. conditions for the efficient labeling of antiserum.

*Ann. Biochem.*, (1982), 125, 427-432

Marzouki Z. M. and Coniglio J. G.

Effect of essential fatty acid deficiency on lipids of rat Sertoli and germinal cells.

*Biol. Reprod.*, (1982), 27, (2), 312-315

Mc Ginley D. M., Posalaky Z., Porvasnik M. and L. R.

Gap junctions between Sertoli cells and germ cells of rat seminiferous tubules.

*Tissue Cell.*, (1979), 11, 741-454

Minot G. R. and Murphy W. P.

Treatment of pernicious anaemia by a special diet.

*J. Am. Med. Soc.*, (1926), 87, 470-476

Morales C. and Griswold M. D.

Retinol-induced stage synchronization in seminiferous tubule of the rat.

*Endocrinology*, (1987), 121, (1), 432-434

Morris I. D., Bardin C. W., Musto N. A., Thau R. B. and Gunsalus G. L.

Evidence suggesting that germ cells influence the bidirectional secretion of androgen binding protein by the seminiferous epithelium demonstrated by selective impairment of spermatogenesis with busulphan.

*Int. J. Androl.*, (1987), 10, (5), 691-700

Nagano T. and Suzuki F.

Cell to cell relationships in the seminiferous epithelium in the mouse embryo.

*Cell. Tissue Res.*, (1987), 189, 389-395

Nexø E., Olesen D. and Thomsen J.

Purification and characterization of transcobalamin II.

*Biochim. Biophys. Acta.*, (1977), 494, 395-402

Nexø E.

Purification of rabbit transcobalamin II by labile ligand affinity chromatography.

*Can. J. Physiol. Pharmacol.*, (1977), 55, 923-924

Nexø E. and Hollenberg M. D.

Characterization of the particulate and soluble acceptor for transcobalamin II from human placenta and rabbit liver.

*Biochim. Biophys. Acta*, (1980), 628, 190-200

Nexø E. and Olesen H.

Intrinsic factor, transcobalamin and haptocorrin.

In "B12", (1982), Dolphin D. (eds), John Wiley and Sons Incorporated, New York, 57-84

Nicander L.

An electron microscopical study of cell contacts in the seminiferous tubules of some mammals.

*Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.*, (1967), 83, 375

O'Brien J. S., Kretz K. A., Wenger D. A., Esch F. and Fluharty A. L.

Coding of two sphingolipide activator proteins (SAP-1 and SAP-2) by same genetic locus.

*Science*, (1988), 241, (4869), 1098-1101

Octave J. N., Schneider Y. J., Trouet A. and Crichton R. R.

Iron uptake and utilization by mammalian cells. I: Cellular uptake of transferrin and iron.

*Trends Biochem. Sci.*, (1983), 8, 217-220

Olson L., Ayer-Le Lievre C., Ebandal T. and Seiger A.

Nerve growth factor-like immunoreactivities in rodent salivary glands and testis.

*Cell. Tissue Res.*, (1987), 248, (2), 275-286

Ong D. E., Takase C. and Chytil F.

Cellular vitamin A-binding proteins in the testis.

*Ann. NY Acad. Sci.*, (1987), 613, 172-178

Ong D. E. and Chytil F.

Presence of novel retinoid acid-binding proteins in the lumen of rat epididymis.

*Arch. biochem. Biophys.*, (1988), 267, (2), 474-478

Oonk R. B., Jansen R. and Grootegoed J. A.

Insulin-like growth factor-I receptors on Sertoli cells from immature rat and age dependent testicular binding of IGF-I and insulin.

*Mol. Cel. Endocrinol.*, (1988), 55, 33-43

Parenchych W. and Cooper B. A.

Selective uptake of specifically bound <sup>58</sup>Co-vitamin B12 by human and mouse tumor cells.

*Nature*, (1961), 191, 393-398

Parenchych W. and Cooper B. A.

Factors influencing the uptake of cyanocobalamin (vitamin B12) by Ehrlich ascites carcinoma cells.

*Biochym. Biophys. Acta*, (1962), 60, 393-403

Parmentier Y.

Absorption des cobalamines (vitamine B12) chez l'Homme.

Thèse d'état es-science, Université Nancy I, UFR Alimentation et Nutrition, (1986)

Parvinen M.

Regulation of the seminiferous epithelium.

*Endocr. Rev.*, (1982), 3, 404-417

Pastan I. and Willingham M. C.

Receptor-mediated endocytosis: Coated pits, receptosomes and the Golgi.

*Trends Biochem. Sci.*, (1983), 8, 250-254

Pelletier R. M. and Friend D. S.

The Sertoli cell junctional complex: structure and permeability to filipin in the neonatal and adult guinea pig.

*AM. J. Anat.*, (1983), 168, (2), 213-228

Persson H., Ayer-Le Lievre C., Soder O., Villar M. J., Metsis M., Olson L., Ritzen M. and Hokfelt

Expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in Sertoli cells downregulated by testosterone.

*Science*, (1990), 247, (4943), 704-707

Pierce K., Abe T. and Cooper B.

Incorporation and metabolic conversion of cyanocobalamin by Ehrlich ascites carcinoma cells in vitro and in vivo.

*Biochym. Biophys. Acta*, (1975), 381, 348-358

- Pineau C., Velez de la Calle J. F., Pinon-Ltaillade G. and Jegou B.  
 Assessment of testicular function after acute and chronic irradiation:  
 further evidence for an influence of late spermatids on Sertoli cell function  
 in the adult rat.  
*Endocrinology*, (1989), 124, (6), 2720-2728
- Pinon-Lataillade G., Velez de la Calle J. F., Viguier-Martinez M. C., Garnier D.  
 H., Folliot R., Mass J. and Jegou B.  
 Influence of germ cells upon Sertoli cells during continuous low-dose rate  
 gamma-irradiation of adult rats.  
*Moll. Cell. Endocrinol.*, (1988), 58, (1), 51-63
- Pitney W. R., Beard M. D. and Van Loon E. J.  
 Observations on the bound form of vitamin B12 in human serum.  
*J. Biol. Chem.*, (1954), 207, 143-149
- Pollanen P., Soder O. and Parvinen M.  
 Interleukin-1alpha stimulation of spermatogonial proliferation in vivo.  
*Reprod. Fertil. Dev.*, (1989), 1, (1), 85-87
- Putula L. and Gräsbeck R.  
 One millionfold purification of transcobalamin II from human plasma.  
*Biochim. Biophys. Acta.*, (1972), 263, 734-746
- Rachmilewitz B., Rachmilewitz M., Chaouat M. and Schlesinger M.  
 The synthesis of transcobalamin II, a vitamin B12 transport protein by  
 stimulated mouse peritoneal macrophage.  
*Biomedicine*, (1977), 27, 213-214
- Radigue C.  
 Protection de la spermatogenèse contre les effets du cyclophosphamide et  
 l'irradiation chez le rat adulte.  
 Doctorat d'université, Paris VII, (1992)
- Rappazzo M. E. and Hall C. A.  
 Transport function of transcobalamin II.  
*J. Clin. Invest.*, (1972), 51, 1915-1918
- Retief F. P., Gottlieb C. W. and Herbert V.  
 Mechanism of vitamin B12 uptake by erythrocytes.  
*J. Clin. Invest.*, (1966), 45, 1915-1966

Ritzen E. M., Hansson V. and French F. S.

The Sertoli cell.

In "The testis", (1989), Burger H. and DeKretser D. (eds), Raven Press, New York, 269-302

Rivarola M. A., Sanchez P. and Saez J. M.

Stimulation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid synthesis in spermatogenic cells by their coculture with Sertoli cells.

*Endocrinology*, (1985), 117, (5), 1796-1802

Rivarola M. A., Sanchez P. and Saez J. M.

Inhibition of RNA and DNA synthesis in Sertoli cells by co-culture with spermatogenic cells.

*Int. J. Androl.*, (1986), 9, (6), 424-434

Roberts A. B. and Sporn M. B.

Transforming growth factor beta.

*Adv. Cancer Res.*, (1988), 51, 107-145

Rosenberg L. E., Lilljeqvist A. C. and Allen R. H.

Transcobalamin II facilitated uptake of vitamin B12 by cultured fibroblasts: studies in methylmalonicaciduria.

*J. Clin. Invest.*, (1973), 52, 69a-70a

Ross M. H.

The Sertoli cell junctional specialization during spermiogenesis and at spermiation.

*Ana. Rec.*, (1976), 186, 79-83

Rothenberg S. P., Weiss J. P. and Cotter R.

Formation of transcobalamin II-vitamin B12 complex by guinea pig ileal mucosa in organ culture after in vivo incubation with intrinsic factor-vitamin B12.

*Br. J. Haematol.*, (1978), 40, 401-414

Russell L. D. and Clermon Y.

Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules.

*Anat. Rec.*, (1976), 185, 259-263

Russell L.

Movement of spermatocytes from the basal to the abluminal compartment of the rat testis.

*Am. J. Anat.*, (1977), 148, 313-318

Russell L. D.

Observation on rat Sertoli ectoplasmic "junctional" specialization in their association with germ cells of the rat testis.

*Tissue Cell.*, (1977), 9, 475-481

Russell L.

Desmosome-like junctions between Sertoli and Germ cells in the rat testis.

*Am. J. Anat.*, (1977), 148, 301-308

Russell L. D.

Testosterone induced deformities in rat spermiogenesis: failure of tubulobulbar complexes to form in late spermatids.

*Anat. Rec.*, (1978), 190, 527-533

Russell L. D.

The blood testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum tracer study.

*Anat. Rec.*, (1978), 190, 99-111

Russell L. D., Tallon-Doran M., Weber J. E., Wong V. and Peterson R. N.

Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. III. A study of specific cellular relationships.

*Am. J. Anat.*, (1983), 167, (2), 181-192

Russell L. D., Alger L. E. and Nequin L. G.

Hormonal control of pubertal spermatogenesis.

*Endocrinology*, (1987), 120, (4), 1615-1632

Saez J. M., Avallet D., Perrard-sapri M. H. and Chatelain P. G.

Sertoli leydig cell communications.

In "Regulation of testicular function", (1989), Ewing L. L. and Robaire B. (eds), *Ann. NY Acad. Sci.*, 210-231

Salpeter M. M., McHenry F. A. and Salpeter E. E.

Resolution in electron microscope autoradiography. IV. Application to analysis of autoradiographs.

*J. Cell. Biol.*, (1978), 76, 127-145

Savage R. C. and Green P. D.

Biosynthesis of transcobalamin II by adult rat liver parenchymal cells in culture.

*Arch. Biochem. Biophys.*, (1976), 173, 691-702

- Savage C. R., Meehan A. M. and Hall C. A.  
Improved method for purification of biologically active transcobalamin II.  
*Prep. Biochem.*, (1976), 6, 99-111
- Scatchard G.  
The attraction of proteins for small molecules and ions.  
*Ann. NY Acad. Sci.*, (1949), 51, 660-672
- Schneider R. J., Burger R. L., Mehlman C. S. and Allen R. H.  
The role and fate of rabbit and human transcobalamin II in the plasma transport of vitamin B12 in the rabbit.  
*J. Clin. Invest.*, (1976), 57, 27-38
- Schohn H., Guéant J. L., Girr M., Nexø E., Baricault L., Zweibaum A. and Nicolas J. P.  
Synthesis and secretion of a cobalamin-binding protein by HT 29 cell line.  
*Biochem. J.*, (1991), 248, 427-430
- Schteingart H. F., Rivarola M. A. and Cigorraga S. B.  
Hormonal and paracrine regulation of gamma-glutamyl transpeptidase in rat Sertoli cells.  
*Mol. Cell. Endocrinol.*, (1989), 67, (1), 73-80
- Scott A. I., Townsend C. A., Okada K. and Kajiwara M.  
Biosynthesis of corrins. I. Experiments with <sup>14</sup>C-Porphobilinogen and <sup>14</sup>C-Uroporphyrinogens.  
*J. Am. Chem. Soc.*, (1974), 96, (26), 8054-8069
- Scott A. I., Townsend C. A., Okada K., Kajiwara M., Cushley R. J. and Whitman P. J.  
Biosynthesis of corrins. II. Incorporation of <sup>13</sup>C-Labeled substrates into vitamin B12.  
*J. Am. Chem. Soc.*, (1974), 96, (26), 8069-8080
- Segretain D., Egloff M., Gérard N., Pineau C. and Jégou B.  
Receptor-mediated and adsorptive endocytosis in male germ cells of different mammalian species.  
*Cell Tissue Res.*, (1992), 268, 471-478
- Seligman P. A. and Allen R. H.  
Characterization of the receptor for transcobalamin II isolated from human placenta.  
*J. Biol. Chem.*, (1978), 253, 1766-1772

Sertoli E.

On the existence of special branched cells in the seminiferous tubules of the human testis.

*Morgagni*, (1865), 7, 261-266

Setchell B. P.

Do the Sertoli cells secrete the rete testis fluid?

*J. Reprod. Fertil.*, (1960), 19, 391-396

Setchell B. P.

The blood-testicular fluid barrier in sheep.

*J. Physiol. (Lond)*, (1967), 189, 63P-65P

Setchell B. P.

The functional significance of the blood-testis barrier.

*Andrology*, (1980), 1, 3

Sharp A. A. and Witts L. J.

Seminal vitamin B12 and sterility.

*Lancet*, (1962), 11, 779

Shingleton J. L., Skinner M. K. and Ong D. E.

Characteristics of retinol accumulation from serum retinol-binding proteins by cultured Sertoli cells.

*Biochemistry*, (1989), 28, (25), 9641-9647

Simons K. and Gräsbeck R.

Immunoelectrophoresis of human gastric juice.

*Clin. Chim. Acta.*, (1963), 8, 425-433

Skinner M. K. and Griswold M. D.

Sertoli cells synthesize and secrete a transferrin-like protein.

*J. Biol. Chem.*, (1980), 255, 9525-9532

Skinner M. K. and Griswold M. D.

Sertoli cells synthesize and secrete a ceruloplasmin-like protein.

*Biol. Reprod.*, (1983), 28, 1225-1229

Skinner M. K.

Cell-cell interaction in the testis.

*Ann. NY Acad. Sci.*, (1987), 513, 158-171

Skinner M. K., Takacs K. and Coffey R. J.  
transforming growth factor-alpha gene expression action in the  
seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interaction.  
*Endocrinology*, (1989), 124, 845-854

Skinner M. K.  
Cell-cell interaction in the testis.  
*Endocr. Rev.*, (1991), 12, 45-77

Smith E. L.  
Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver.  
*Nature Lond.*, (1948), 161, 638-639

Smith E. P., Hall S. H., Monaco L., French F. S., Wilson M. W. and Conti M.  
A rat Sertoli cell factor similar to basic fibroblast growth factor increases  
c-fos messenger ribonucleic acid in cultured Sertoli cells.  
*J. Mol. Endocrinol.*, (1989), 3, 954-961

Solari R. and Kraehenbuhl J. P.  
Biosynthesis of the IgA antibody receptor: A model for the transepithelial  
sorting of a membrane glycoprotein.  
*Cell*, (1984), 36, 61-71

Sonneborn D. W., Abouna G. and Mendezpicon G.  
Synthesis of transcobalamin II in totally hepatectomised dogs.  
*Biochim. Biophys. Acta.*, (1972), 273, 283-286

Stallard B. J. and Griswold M. D.  
Germ cell regulation of Sertoli cell transferrin mRNA levels.  
*Mol. Endocrinology*, (1990), 4, (3), 393-401

Stastny M. and Cohen S.  
The stimulation of ornithine decarboxylase activity in testes of the  
neonatal mouse.  
*Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 261, 177-180

Steinberger A., Dighe R. R. and Diaz J.  
Testicular peptides and their endocrine and paracrine function.  
*Arch. Biol. Med. Exp.*, (1984), 17, 267-271

Steinberger A., Janecki A. and Jakubowiak A.  
New experimental approaches to the study of inhibin physiology in vitro.  
In "Inhibition non steroidal regulation of follicle stimulating hormone  
secretion", (1987), Burger G. H., De Kretser D. M., Findlay J. K. and Igaraski M.  
(eds), Raven press, New-York, 163-177

- Sylvester S. R., Skinner M. K. and Griswold M. D.  
A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane.  
*Biol. Reprod.*, (1984), 31, (5), 1087-1101
- Sylvester S. and Griswold M. D.  
localization of transferrin and transferrin receptors in rat testes.  
*Biol. Reprod.*, (1989), 31, 195-203
- Tan C. H. and Hansen H. J.  
Studies on the site of synthesis of transcobalamin.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, (1968), 127, 740-744
- Tindall D. J., Rowley D. R., Murthy L., Lipschultz L. I. and Chang C. H.  
Structure and biochemistry of the Sertoli cell.  
*Int. Rev. Cytol.*, (1985), 94, 127-149
- Tres L. L. and Kierszenbaum A. L.  
Viability of rat spermatogenic cell in vitro is facilitated by their coculture with Sertoli cells in serum-free hormone-supplemented medium.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1983), 80, (11), 3377-3381
- Tsutsumi O., Kurachi H. and Oka T.  
A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function.  
*Science*, (1986), 233, 975-977
- Tuck R. R., Sechell B. P., Waites G. M. and A. Y. J.  
The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats.  
*Pflueger Arch.*, (1970), 318, 225-232
- Tycko B. and Maxfield F. R.  
Rapid acidification of endocytosis vesicles containing  $\alpha_2$ macroglobulin.  
*Cell*, (1982), 28, 643-651
- Vannelli B. G., Natali A., Barni T., Serio M., Orlando C. and Balboni G. C.  
Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study.  
*Fertil. Steril.*, (1988), 49, 666-669
- Waites G. M. H.  
Fluid secretion.  
In "The testis", (1977), Johnson A. and Gomes W. (eds), Acad. press New York, 91-123

Waites G. M. and Gladwell R. T.

Physiological significance of fluid secretion in the testis and blood-testis barrier.

*Physiol. Rev.*, (1982), 62, (2), 624-671



Watson A. A.

Seminal vitamin B12 and sterility.

*Lancet*, (1962), 11, 644-645

Wong V. and Russell L. D.

Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. I. Methods, basic configuration of a dimensions.

*Am. J. Anat.*, (1983), 167, (2), 143-161

Wright W. W., Zabludoff S. D., Erickson-Lawrence M. and Karzai A. W.

Germ cell-Sertoli cell interactions. Studies cyclic protein-2 in the seminiferous tubule.

*Ann. NY. Acad. Sci.*, (1989), 564, 173-185

Youngdahl-Turner P. and Rosenberg L. E.

Binding and uptake of transcobalamin II by Human Fibroblasts.

*J. Clin. Invest.*, (1978), 61, 133-141

Youngdahl-Turner P., Mellman I. S., Allen R. H. and Rosenberg L. E.

Protein mediated vitamin uptake, adsorptive endocytosis of the transcobalamin II-Cobalamin complex by cultured human fibroblasts.

*Exp. Cell Res.*, (1979), 118, 127-134

# ANNEXE

## Transcobalamin II – cobalamin binding sites are present on rabbit germ cells

E. Boukhzer<sup>a</sup>, A. Ennya<sup>b</sup>, F. Felden<sup>a</sup>, A. Gérard<sup>b</sup>, E. Nexo<sup>c</sup>, J.P. Nicolas<sup>a</sup>,  
H. Gérard<sup>b</sup> and J.L. Guéant<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Biochimie Nutritionnelle, INSERM U 308, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy (France),

<sup>b</sup> Laboratoire d'Histologie-Embryologie II, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy (France) and

<sup>c</sup> University Hospital of Aarhus, Aarhus (Denmark)

(Received 4 September 1992)

Key words: Transcobalamin; Transcobalamin II receptor; Cobalamin; Endocytosis; (Germ cell)

Specific binding sites for rabbit transcobalamin II have been found on isolated adult rabbit germ cells. Scatchard analysis revealed a single class of binding sites for [<sup>57</sup>Co]cyanocobalamin–transcobalamin II with an association constant ( $K_a$ ) of  $1.3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$  and 700 sites per cell. Binding was reversible, saturable and calcium dependent. Electron microscope radioautography following incubation with iodinated transcobalamin II at 4°C led to a detectable labeling mainly restricted to the plasma membrane.

Transcobalamin II (TC II) is required for receptor-mediated endocytosis of cobalamin [1–3]. The presence of TC II receptors has been reported in target cells from human placenta [4] and liver cell suspension [5], in human fibroblasts [6] and in intestinal epithelial cells [7].

Several mammalian cells such as endothelial cells and epithelial cells are able to synthesize and secrete TC II [8–12].

The concentration of TC II is 10-fold higher in seminal plasma than in blood plasma. Its role and fate remain undetermined [13]. In the male reproductive tract endocytosis of micronutrients may be important for growth and differentiation of germ cells [13]. Previous studies on germ cells demonstrated a receptor-mediated uptake of transferrin [14] and of steroid-binding proteins [15,16]. In the present work, we have studied the specific binding of labeled rabbit TC II to isolated rabbit germ cells.

Germ cells were isolated from adult rabbit (Fauve de Bourgogne, Nancy, France) as described previously [15,16]. Briefly, germ cells were isolated using mechanical means from seminiferous tubules, washed with RPMI medium, filtered through cotton wool in order

to trap testicular sperm and cellular debris and centrifuged at  $1000 \times g$  for 5 min. Pellets were resuspended in fresh culture medium. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion test (> 95%). Germ cells were adjusted to  $10^6$  cells/ml and quantified with respect to their maturation stage. The relative frequency of each germ cell type was: spermatogonia  $4.0 \pm 1.5\%$  (mean  $\pm$  S.E.), primary and secondary spermatocytes  $31 \pm 2.5\%$ , round spermatids  $36 \pm 0.6\%$ , elongated spermatids  $20 \pm 0.2\%$ , residual bodies  $5 \pm 1.8\%$ , spermatozoa  $1 \pm 0.3\%$  and damaged cells  $2 \pm 1.1\%$ . Erythrocyte contamination was eliminated by hemolysis pretreatment. The different cell types were defined according to their known morphological characteristics.

Rabbit [<sup>57</sup>Co]cyanocobalamin–TC II complex ([<sup>57</sup>Co]Cbl–TC II) was obtained by Sephacryl S200 gel filtration of rabbit serum incubated with labeled cyanocobalamin as described recently [12]. Non-labeled TC II was purified by one of the authors (E. Nexo) using cobalamin-Sepharose affinity chromatography and gel filtration [17]. Iodination of rabbit TC II was performed as described previously for Intrinsic Factor [18].

Binding assays were performed in 1.4 ml polypropylene Eppendorf centrifuge tubes. [<sup>57</sup>Co]Cbl–TC II ( $10$ – $150$  fmol) was incubated for 1 h at 4°C with  $10^6$  germ cells per test tube, in duplicate, and in the presence or absence of a 200-fold excess of non-labeled TC II, in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 100 mM



Correspondence to: J.L. Guéant, Laboratoire de Biochimie Nutritionnelle, INSERM U 30, Faculté de Médecine, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

Abbreviations: TC II, transcobalamin II; BSA, bovine serum albumin; Cbl, cobalamin, vitamin B-12.

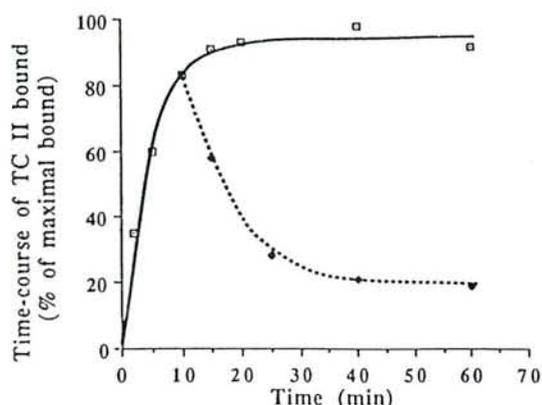


Fig. 1. Time-course of [ $^{57}\text{Co}$ ]cobalamin-transcobalamin II ([ $^{57}\text{Co}$ ]Cbl-TC II) binding to germ cells at  $4^\circ\text{C}$ . Association ( $\square$ ) was performed using 1.4 pmol of labeled TC II incubated with  $10^7$  cells in a final volume of 10 ml. 1-ml aliquot of the mixture was collected at incubation times ranging from 2 to 60 min. Dissociation ( $\bullet$ ) was obtained in the same way except that a 200-fold excess of non-labeled TC II was added 15 min after incubating germ cells with the tracer. Data are the mean of duplicate determinations.

NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  and 0.2% (w/v) BSA, in a final volume of 1 ml. After incubation, bound and free ligand were separated by centrifugation at  $700 \times g$  during 15 min at  $4^\circ\text{C}$  and the pellet was washed in the buffer described above. The radioactivity of the pellet was measured by  $\gamma$ -counting. Non-specific binding was estimated in the presence of a 200-fold excess of non-labeled TC II. It corresponded to about 8% of bound labeled TC II.

Radioautography was performed with aliquots of  $10^6$  cells in 100  $\mu\text{l}$  RPMI medium, incubated in the presence of 9 pmol [ $^{125}\text{I}$ ]TC II (0.2  $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ ) at  $4^\circ\text{C}$ . After incubation, cells were centrifuged at  $700 \times g$  for 15 min, washed and fixed for electron microscope radioautography as described recently [15]. Radioautography processing was performed on ultra-thin sections using an Ilford emulsion and Microdol-X (Kodak) developer after 2 months of exposure at  $4^\circ\text{C}$  as described [15].

The binding of labeled TC II to rabbit germ cells increased as a function of time (Fig. 1). Maximum binding was obtained in less than 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . The binding was reversible since a 200-fold excess of non-labeled TC II was able to displace labeled TC II from germ cells in about 20 min. Scatchard analysis of binding of labeled TC II to germ cells revealed a single class of binding sites with an association constant ( $K_a$ ) of  $1.3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$  and 700 sites per cell (Fig. 2). These data are close to those reported for TC II-cobalamin in binding to human placental membranes [3]. The binding of labeled TC II was calcium dependent, since an incubation of germ cells with EDTA (20 mM) resulted in a decrease of 40% of the specific binding (Fig. 3). Previous studies with leukemia cells and fi-

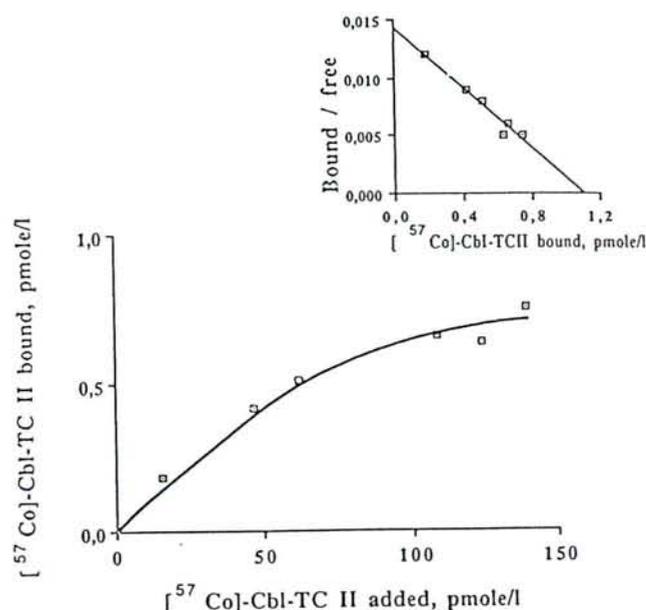


Fig. 2. Saturation curve and Scatchard plot (inset) of the interaction between germ cells and labeled transcobalamin II (TC II) at  $4^\circ\text{C}$  for 1 h. The amount of [ $^{57}\text{Co}$ ]cobalamin-transcobalamin II ([ $^{57}\text{Co}$ ]Cbl-TC II) bound to cells is estimated by subtracting non-specific binding from total binding.

broblasts have shown that TC II-Cbl binding was calcium dependent [19,20]. The binding of [ $^{57}\text{Co}$ ]Cbl-TC II to germ cells was specific: a maximum inhibition of the binding was observed in the presence of unlabeled TC II but not in the presence of other proteins (Fig. 3). Electron microscopy autoradiography of iodinated TC II incubated with rabbit germ cells showed an accumulation of the tracer over the plasma membrane in different germ cell types ranging from spermatogonia to late spermatids (Fig. 4). Coated pits and vesicles were often seen in the apical cytoplasm (Fig.

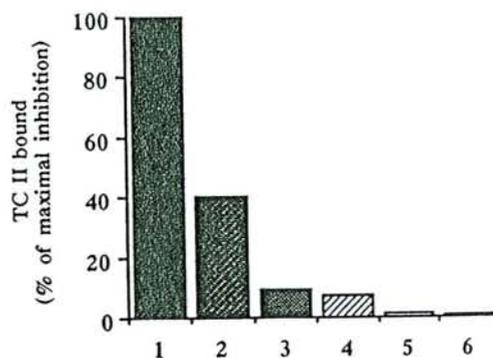


Fig. 3. Specificity of the binding of transcobalamin II (TC II) to germ cells was studied by incubating the cells for 1 h with 0.2 pmol of labeled TC II at  $4^\circ\text{C}$  either in the presence of 40 pmol of non-labeled TC II (1), 20 mM of EDTA (2), 1 nmol of fetuine (3), human lactotransferrin (4), transferrin (5) or bovine serum albumin (6).

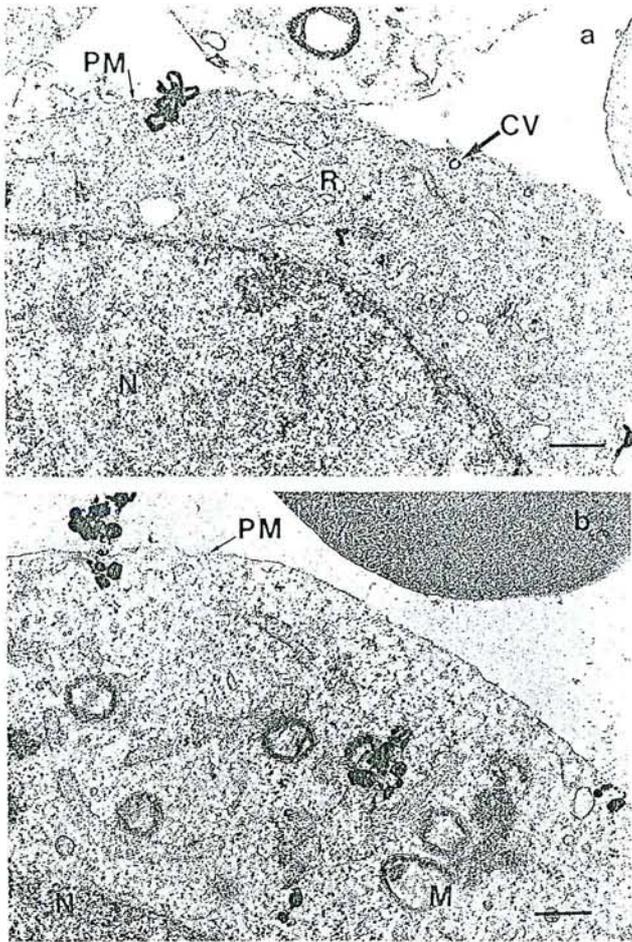


Fig. 4. Electron microscope radioautography of rabbit germ cells after incubation with iodinated transcobalamin II ( $9 \text{ pmol}/10^6$  cells in  $100 \mu\text{l}$  culture medium) for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . (a) A cluster of silver grains is associated with the plasma membrane (PM) of an isolated spermatogonia. In the peripheral cytoplasm of this cell a coated vesicle (CV) is visible; N, nucleus; R, reticulum; bar =  $0.5 \mu\text{m}$ . (b) Silver grains are localized over the peripheral cytoplasm of a primary spermatocyte; PM, plasma membrane; M, mitochondria; N, nucleus; bar =  $0.75 \mu\text{m}$ .

4). Labeling of the cells could be prevented by an excess of unlabeled TC II.

These results clearly show the presence of specific binding sites for rabbit TC II on rabbit germ cells. In addition, coated structures usually involved in receptor-mediated endocytosis are present at the germ cell surface and could be involved in the first step of receptor-mediated endocytosis of TC II. It has been shown by Youngdahl-Turner et al. that endocytosis of TC II in fibroblasts is responsible for TC II degradation and release of cobalamin in lysosomes [2]. It is likely that the same fate of cobalamin and TC II occurs in germ cells. Additional experiments are currently underway to demonstrate this. Recently, several plasma membrane receptors have been identified in rat germ cells, with specific binding for transport proteins such as transferrin and androgen-binding protein [14,16].

These and the present findings suggest that the germ cell is able to synthesize and express receptors on its plasma membrane surface for endocytosis of micronutrients and hormones which are needed for its growth and differentiation. This could explain why infertility is one of the clinical symptoms of cobalamin deficiency [21]. The mechanism by which cobalamin is taken up from the blood stream and is delivered to germ cells still remains to be elucidated. It could involve either a synthesis of TC II by Sertoli cells or a transcytosis of blood TC II-cobalamin through Sertoli cells. A synthesis of transport proteins by Sertoli cells has already been demonstrated for androgen-binding protein, transferrin, ceruloplasmin and retinol-binding protein [22-25].

In conclusion, we have identified a plasma membrane-specific receptor of TC II-cobalamin in germ cells. This suggests that cobalamin is needed for growth and differentiation of germ cells. The mechanism by which cobalamin is taken up by Sertoli cells from the blood stream remains to be elucidated.

## References

- Carmel, R. (1981) In Contemporary Hematology Oncology (Silber, R., Gordon, A., Lobue, J. and Muggia, F., eds.), Vol. 2, p. 79.
- Youngdahl-Turner, P., Mellman, I.S., Allen, R.H. and Rosenberg, L.E. (1979) *Exp. Cell Res.* 118, 127-134.
- Frideman, P.A., Shia, M.A. and Wallas, J.K. (1977) *J. Clin. Invest.* 59, 51-58.
- Nexo, E. and Hollenberg, M.D. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 628, 190-200.
- Soda, R., Tavassoli, M. and Jacobsen, D.W. (1985) *Blood* 65, 795-802.
- Youngdahl-Turner, P. and Rosenberg, L.E. (1978) *J. Clin. Invest.* 61, 133-141.
- Masson, C., Guéant, J.L., Picquot, S., Girr, M. and Nicolas, J.P. (1990) *Regard Biochim.* 4, 27.
- Savage, R.C. and Green, P.D. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 691-702.
- Frater-Schroder, M., Porck, H.J., Muller, M.R., Steinman, B., Kierat, L. and Arwert, F. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 845, 421-427.
- Rachmilewitz, B., Rachmilewitz, M., Chaouat, M. and Schlesinger, R.M. (1977) *Biomedicine* 27, 213-214.
- Hall, C.A., Pamela, D., Colligan, G. and Begley, J.A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 838, 387-389.
- Schohn, H., Guéant, J.L., Girr, M., Nexo, E., Baricault, L., Zweibaum, A. and Nicolas, J.P. (1991) *Biochem. J.* 284, 427-430.
- Carmel, R. and Bernstein, G.S. (1984) *J. Clin. Invest.* 73, 868-872.
- Holmes, S.D., Bucci, L.R., Lipshultz, L.I. and Smith, R.G. (1983) *Endocrinology* 113, 1916-1918.
- Gérard, A., Ennya, A., Egloff, M., Domingo, M., Degrelle, H. and Gérard, H. (1991) *Ann. NY Acad. Sci.* 637, 258-277.
- Felden, F., Guéant, J.L., Ennya, A., Gérard, A., Frémont, S., Nicolas, J.P. and Gérard, H. (1992) *J. Mol. Endocrinol.* 9, 39-46.
- Nexo, E., Olsen, H., Bucher, D. and Thomsen, J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 494, 395-402.
- Guéant, J.L., Kouvonon, I., Michalski, J.C., Masson, C., Gräsbeck, R. and Nicolas, J.P. (1985) *FEBS Lett.* 184, 14-19.
- Di Girolamo, P.M. and Huennekens, F.M. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 386-393.

- 20 Rosenberg, L.E., Lillejeqvist, A.C., Hsia, Y.E. and Rosenbloom, F.M. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 607-614.
- 21 Guéant, J.L. (1990) In *Cobalamin and Related Binding Proteins in Clinical Nutrition* (Guéant, J.L. and Nicolas, J.P., eds.), pp. 55-68, Elsevier, Amsterdam.
- 22 Hagenäs, L., Ritzen, E.M., Ploën, L., Hansson, V., French, F.S. and Nayfeh, S.N. (1975) *Mol. Cell. Endocrinol.* 2, 339-351.
- 23 Skinner, M.K. and Griswold, M.D. (1983) *Biol. Reprod.* 28, 1225-1229.
- 24 Skinner, M.K. and Griswold, M.D. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9525-9532.
- 25 Carson, D.D., Rosenberg, L.I., Blaner, W.S., Kato, M. and Lennarz, W.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3117-3123.

## Endocytosis of transcobalamin in male rabbit germ cells: electron microscope radioautography study

AMINA EN-NYA<sup>1</sup>, JEAN LOUIS GUEANT<sup>2\*</sup>, EBBA NEXØ<sup>3</sup>, ANNE GERARD<sup>1</sup>, EL BACHIR BOUKHZER<sup>2</sup>, JEAN PIERRE NICOLAS<sup>2</sup> and HUBERT GERARD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Histologie-Embryologie II, Faculté de Médecine de Nancy, <sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie Médicale INSERM U 308, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy, France and <sup>3</sup>Aarhus Hospital, Aarhus, Denmark

**ABSTRACT** The binding of <sup>125</sup>I-iodinated transcobalamin to a suspension of isolated rabbit germ cells was studied by Scatchard plot. The number of binding sites was evaluated to about 1000 per cell, and its association constant (K<sub>ass</sub>) in order of 14.6 l/nmole. The distribution of structures related to endocytosis was determined by ultrastructural histomorphometric studies. Both coated and uncoated structures were present regardless of maturation stage. The number of coated vesicles was at its highest in the initial maturation steps, whereas the number of uncoated vesicles was highest in the final maturation steps. The endocytosis of <sup>125</sup>I-iodinated transcobalamin by the suspension of germ cells was studied by electron microscope radioautography. The tracer was mostly detected over the plasma membrane, coated vesicles and multivesicular bodies of germ cells. The grains were observed mainly over spermatocytes and round spermatids; 31.6% and 32% of these cells, respectively, were labeled. In contrast the tracer was detected in only 8.11% of elongated spermatids. In conclusion, iodinated transcobalamin is internalized in rabbit germ cells by receptor-mediated endocytosis. This phenomenon was predominant in the early stages of germ cell maturation.

**KEY WORDS:** rabbit, germ cells, transcobalamin, binding, internalization

Transcobalamin (TC) is a cobalamin (Cbl, vitamin B12) transport protein found in plasma of man and other mammals (Hall, 1975). It facilitates Cbl uptake by various cell types *in vivo* and *in vitro*. The uptake of the TC-Cbl complex is mediated by a receptor on the cell membrane (Youngdahl-Turner *et al.*, 1979).

Gametogenesis depends on hormonal (Parvinen, 1982; Huang and Nieschlag, 1986) and non-hormonal factors (Saez *et al.*, 1989; Skinner, 1991). Vitamin deficiencies can have a dramatic effect on the morphology of the seminiferous tubules and can disturb spermatogenesis. Disturbance of fertility has been reported in cobalamin deficiencies such as pernicious anemia (Watson, 1962; Jackson *et al.*, 1967). Seminal plasma has been demonstrated to be the most concentrated site of transcobalamin, compared to other body fluids (Carmel and Bernstein, 1984; Hansen and Nexø, 1993). Little is known about the transport of cobalamin in the initial segments of the reproductive tract, such as the testis and epididymis. The purpose of the present study was to analyze the interactions of TC with the spermatogenic cells. We have studied the specific binding of radiolabeled rabbit TC on rabbit germ cells by Scatchard plot and its subsequent uptake within these cells by electron microscope radioautography.

The initial suspension of germ cells contained 4%±1.5 spermatogonia, 32%±2.5 primary and secondary spermatocytes, 36%±0.56 round spermatids, 20%±0.12 elongated spermatids,

5%±1.8 residual bodies, 1%±0.5 interstitial cells, and 2%±1.15 damaged cells (Giemsa stained smears analysis). The cell composition was not significantly modified after *in vitro* binding studies and the viability of the cells was more than 95% in all experiments. The ultrastructural study of these cells did not show morphological alterations.

### Binding of the <sup>125</sup>I- labeled TC to isolated cells

As shown in Fig. 1, a specific binding of <sup>125</sup>I-iodide labeled TC to the mixed isolated germ cells was found. The Scatchard plot analysis showed a single class of binding site with an association constant K<sub>a</sub> of 14.6 l/nmole and 1032 sites per cell.

Previous studies have found specific binding sites in rat pachytene spermatocytes for transferrin (Holmes *et al.*, 1983; Steinberger *et al.*, 1984; Sylvester and Griswold, 1984) and for steroid binding protein (Steinberger *et al.*, 1984; Felden *et al.*, 1992). The present data show that germ cells also have a specific binding site for transcobalamin, another transport protein from seminal plasma. The binding was calcium dependent since incubation of germ cells with EDTA resulted in a sharp decrease in cellular uptake of the

*Abbreviations used in this paper:* cbl, cobalamin; TC, transcobalamin; HD, half distance; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid.

\*Address for reprints: Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine de Nancy I, BP 184, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France. FAX: 33-83592718.

0214-6282/93/\$03.00

© UBC Press  
Printed in Spain

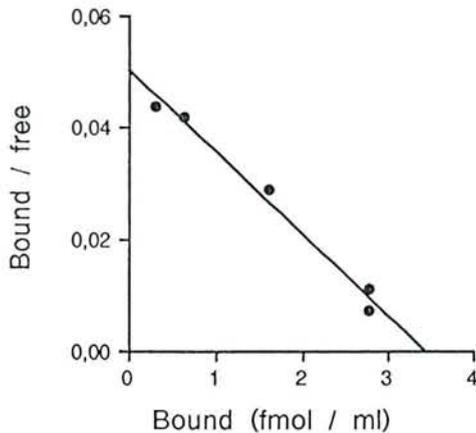


Fig. 1. Scatchard plot of the interaction between germ cells and  $^{125}\text{I}$ -iodinated transcobalamin (TC). Binding studies were performed at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 hour; each point is the mean of three different experiments.

tracer (Fig. 4). In a previous study, we observed 40% inhibition of the TC binding to germ cells by EDTA, when using cyano ( $^{57}\text{Co}$ ) cobalamin TC (TC saturated with labeled vitamin  $\text{B}_{12}$ ) (Boukhzer *et al.*, 1992).

#### Morphological evidence of an endocytic apparatus in rabbit germ cells

Most of isolated rabbit germ cells exhibited coated and uncoated structures in the peripheral cytoplasm (Fig. 2a,b). Coated pits were frequently arranged as paired structures (Fig. 2a). Coated vesicles of  $113\pm 67$  nm in diameter were observed just below the plasma membrane (Fig. 2b). Uncoated endocytic vesicles were also present below the plasma membrane in all germ cells (Fig. 2a). Their shape was somewhat irregular and they measured  $283\pm 84$  nm in diameter. As shown in Fig. 3, the mean number of coated vesicles per  $100\ \mu\text{m}$  linear plasma membrane was highest in the early stages of germ cell maturation, whereas the mean number of uncoated vesicles was highest in the final stages of germ cell maturation. The involvement of coated structures in receptor-mediated endocytosis has been established by ultrastructural studies in numerous cells (Goldstein *et al.*, 1985). Our study is the first report of the existence of coated structures in rabbit germ cells and makes these cells a good candidate for receptor-mediated endocytosis. Such structures have been also described in monkey germ cells (Gerard *et al.*, 1991). Two other endocytosis related structures were scattered in the whole cytoplasm: 1) small, empty, vesicular structures with smooth membrane, 150-300 nm in diameter. They have been referred to as early endosomes (Fig. 2c). 2) Multivesicular bodies 1500-3000 nm in diameter, located in the perinuclear cytoplasm

(Fig. 2e). They were referred to as late endosomes and considered as prelysosomal elements (Gerard *et al.*, 1991).

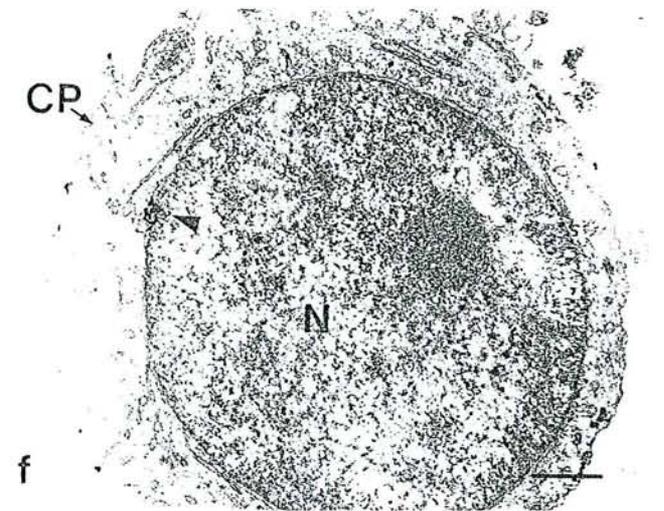
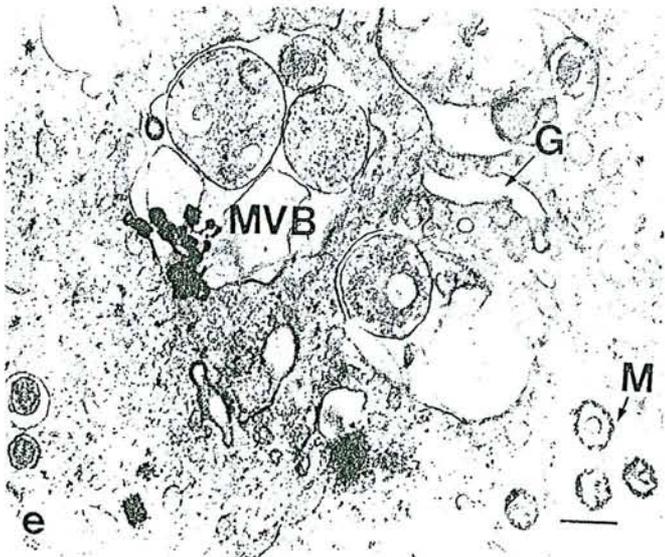
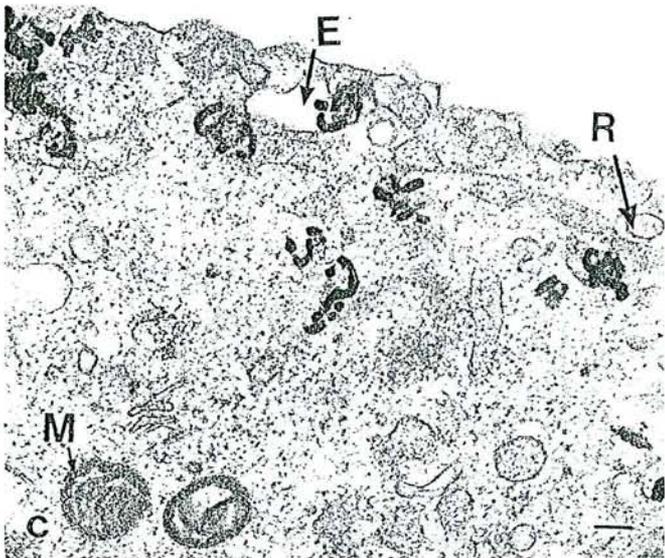
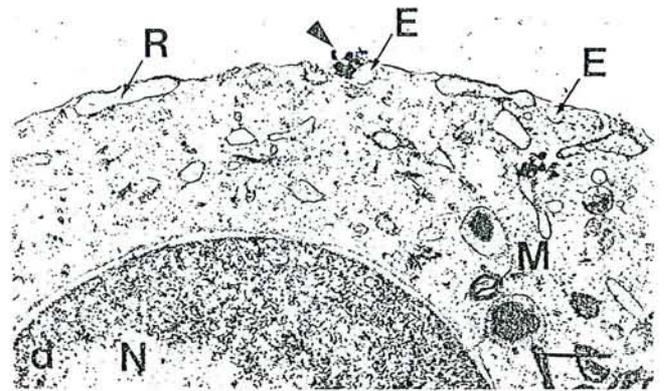
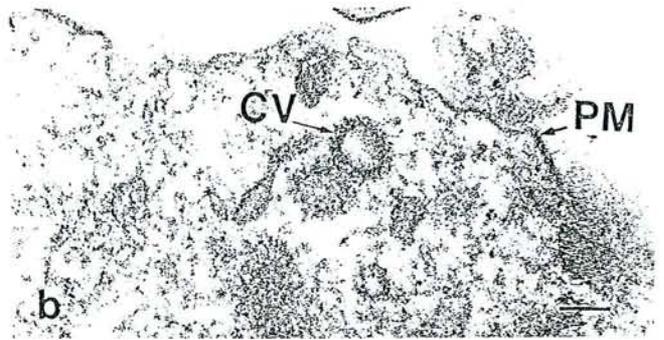
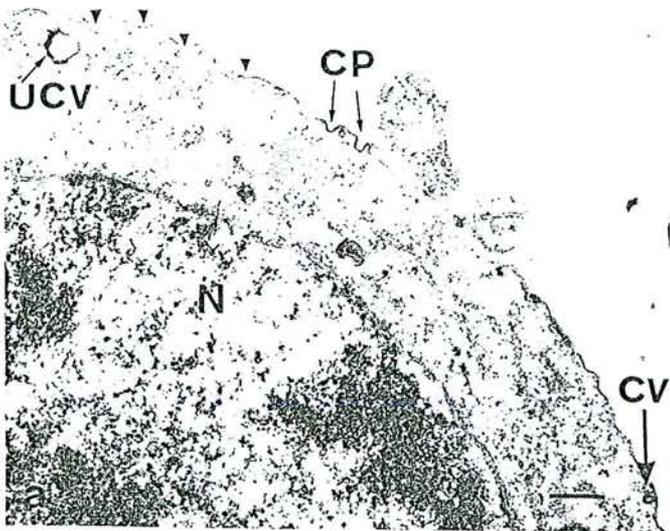
#### Cellular localization of transcobalamin

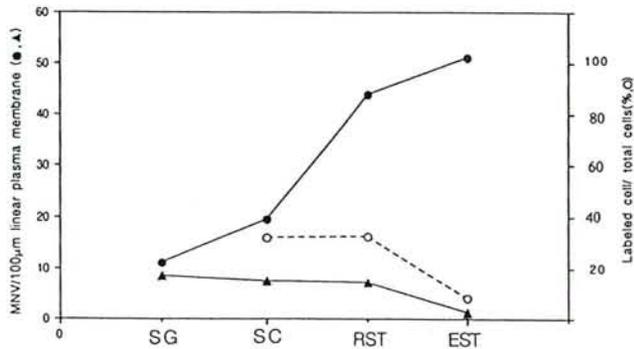
The results should be interpreted with caution since we do not know if the iodine label remained attached to the TC molecule as it travelled through the different cellular compartments. The cell labeling was significantly different from the background activity since the number of silver grains was 5.46, 14.84, 2.48, respectively per  $1000\ \mu\text{m}^2$  of spermatocytes, round spermatids and elongated spermatids, versus 0.83 per  $1000\ \mu\text{m}^2$  of extracellular compartment. The proportion of labeled spermatocytes, round spermatids and elongated spermatids was 31.6%, 32%, 8.11% respectively (Fig. 3). EDTA pretreatment reduced significantly the proportion of labeled spermatocytes and round spermatids to 8.9, 14.17 respectively (Fig. 4). HD analysis demonstrated that only 15.8%, 3.3% and 14.3% of the silver grains were located within one HD of the plasma membrane in spermatocytes, round spermatids and elongated spermatids respectively (Fig. 5). At higher magnification silver grains were seen in association with the plasma membrane (Fig. 2d), and with small coated pits and vesicles (Fig. 2c). At the intracellular level, clusters of silver grains were observed over endosomes and multivesicular bodies (Fig. 2e). The tracer was detected over the delineating membrane rather than over the lumen. Finally, some grains were also located over the nuclear membrane (Fig. 2f) and the nucleus (Fig. 2g).

Numerous studies have shown the importance of TC to facilitate cobalamin uptake by cells (Youngdahl-Turner *et al.*, 1979). A specific receptor for TC has been demonstrated in target cells from liver and placenta, in human fibroblasts and in intestinal epithelial cells. After internalization of TC, the protein is degraded by lysosomal proteases (Youngdahl-Turner *et al.*, 1979).

Our *in vitro* study showed clearly that purified radio-iodinated rabbit TCII was not only bound to rabbit germ cell plasma membrane but also internalized by cells, as confirmed by half distance analysis. Since the distribution of the labeling according to the maturation stage correlated positively with the distribution of coated vesicles (Fig. 3), it is suggested that the internalization of TC required coated structures. The labeling density was the highest in spermatocytes and round spermatids. These data are close to those reported for transferrin and cationic ferritin (Segretain *et al.*, 1992), and indicate that TC is required during the early stages of spermatogenesis, but not in the late stages. It may therefore be suggested that the transcobalamin could play a major role in the maturation of pachytene spermatocytes. Similar results were obtained by Holmes *et al.* (1983) with transferrin. Many vitamins utilize binding proteins in the circulatory system to facilitate their transport and localization. Preliminary evidence exists for the production of vitamin binding proteins by Sertoli cells, such as

Fig. 2. Transmission electron microscope observation of isolated rabbit germ cells. (a-b) Endocytic structures; standard preparation. (c-d-e-f-g) Internalization fate of transcobalamin; autohistoradiographic preparation after incubation with  $^{125}\text{I}$ -iodinated transcobalamin (TC) for 60 min. (a) Primary spermatocyte. Arrowhead: plasma membrane indentations, CP: coated pit, CV: coated vesicle, UCV: uncoated vesicle, N: nucleus. Bar=  $1\ \mu\text{m}$ . (b) Primary spermatocyte. CV: coated vesicle, PM: plasma membrane. Bar=  $0.1\ \mu\text{m}$ . (c) Round spermatid. Silver grains are located in the peripheral cytoplasm associated with endosomes (E). R: smooth endoplasmic reticulum, M: mitochondria. Bar=  $0.3\ \mu\text{m}$ . (d) Round spermatid. A silver grain (arrowhead) is located on the plasma membrane in close relation with an endosome (E). R: smooth endoplasmic reticulum, M: mitochondria. Bar=  $1\ \mu\text{m}$ . (e) Elongated spermatid. A cluster of silver grains is located on a multivesicular body (MVB) near the Golgi area (G). M: mitochondria. Bar=  $0.3\ \mu\text{m}$ . (f) Type B spermatogonia. One cluster of silver grains (arrowhead) is associated with the nuclear envelope. N: nucleus, CP: coated pits. Bar=  $1\ \mu\text{m}$ . (g) Acrosome phase spermatid. One Cluster of silver grains (arrowhead) is located within the nucleus (N). AV: acrosomal vesicle, N: nucleus. Bar=  $0.5\ \mu\text{m}$ .





**Fig. 3.** Distribution of uncoated and coated vesicles in the peripheral cytoplasm compared to the labeling frequency within different germ cell maturation stages. The distribution of uncoated (filled circles) and coated (filled triangles) vesicles is expressed as the mean number of the vesicles (MNV) per 100  $\mu\text{m}$  linear plasma membrane. The labeling frequency is expressed as the labeled cells/total cells ratio (open circles). SG: spermatogonia, SC: spermatocytes, RST: round spermatids, EST: elongated spermatids.

folate-binding protein and biotin-binding protein (Skinner, 1991). In the case of vitamin A, Sertoli cells synthesize and secrete Retinol-binding protein that binds and transports vitamin A to germ cells (Fetterolf and Skinner, 1987; Ong *et al.*, 1987). TC may play a similar role in the development of the male gametes by facilitating the uptake of cobalamin in the spermatogenic cells.

In conclusion, rabbit germ cells share a specialized endocytic apparatus involving coated pits and vesicles which internalize TC by receptor-mediated endocytosis. It remains to be determined whether this endocytosis is required for internalization of cobalamin by germ cells or whether cobalamin itself plays a direct role in spermatogenesis.

## Experimental Procedures

### Chemicals

Culture media were obtained as described recently (Gueant *et al.*, 1991).

### Ligand and cell preparation

#### Purification

Transcobalamin was purified from rabbit blood plasma, using a sequence of Cbl-sepharose thermolabile affinity chromatography and Sephadex G-200 gel filtration (Nexø *et al.*, 1977).

#### Labeling

Iodination of purified transcobalamin was carried out according to the method of Markwell (1982) as previously described by Gueant *et al.* (1985) for intrinsic factor. The specific activity of the tracer was estimated at 0.2  $\mu\text{Ci/nmole}$ .

#### Isolation of germ cells

Rabbits (Fauve de Bourgogne, mean age 22 weeks and mean weight 1.5 kg) were anesthetized with sodium phenobarbital (3 mg/kg), and the testes were removed and rinsed carefully in the RPMI culture medium (pH 7.4). The seminiferous tubules were dissected out of interstitial and connective tissue under a stereomicroscope, and placed in the culture medium. Germ cells were isolated from seminiferous tubules using mechanical method with a potter homogenizer. The resultant cell suspension was filtered on cotton wool, and centrifuged at 150 g for 10 min. The pellet was washed twice and resuspended in fresh culture medium. Germ cells were counted under a phase contrast microscope, and the viability of the cells was

checked by trypan blue (Sigma) exclusion test. Cell smears were stained with May-Grunwald Giemsa in order to quantitate the different cell types.

### Binding of labeled TC with isolated germ cells

Binding of rabbit TC to the isolated cells was studied as described (Gueant *et al.*, 1991; Boukhezr *et al.*, 1992) by incubating increasing amounts (10-300 fmol) of  $^{125}\text{I}$ -iodide labeled transcobalamin (approx. 5000 cpm to 60,000 cpm) with  $10^6$  cells per test tube in Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.12 mole/l NaCl, 1mmole/l  $\text{CaCl}_2$ . Non-specific binding of the tracer to germ cells was tested in presence of 100-fold excess of non-labeled Transcobalamin. Non-specific binding was determined at 18%.

After each series of experiments, cells were fixed for ultrastructural control of their integrity.

### Cellular uptake

Aliquots of  $10^6$  cells in 100  $\mu\text{l}$  RPMI medium were incubated in the presence of  $^{125}\text{I}$ -TCII (15000 cpm in 100  $\mu\text{l}$  RPMI) at 34°C in a shaking waterbath for 60 min. For inhibition studies, aliquots were incubated with EDTA (10 mmole/l) for 15 min before adding  $^{125}\text{I}$ -TCII (9 pmoles/100  $\mu\text{l}$  RPMI, 15000 cpm) for 60 min at 34°C. After incubation, cells were centrifuged at 150 g for 10 min, washed, and fixed for electron microscope radioautography.

### TEM procedures

Cells were fixed for 1 h in glutaraldehyde 2.5% in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.4 at 4°C (vol/vol), and then for 1 h in 5% glutaraldehyde in the same buffer and routinely embedded (Gerard *et al.*, 1991). Specimens were examined under Zeiss EM 952 or Philips CM12 transmission electron microscope.

Morphometric parameters of germ cells were determined, using the Philips computer software connected to the CM12 Philips microscope.

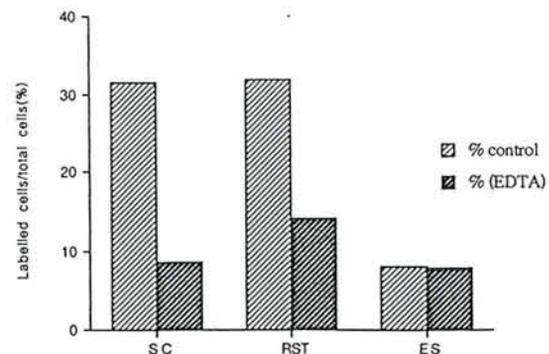
### Radioautography

Ultrathin sections of radiolabeled samples were processed as described by Larra and Droz (1970). The sections (80 nm) were placed on celloidin coated glass slides and contrasted with 2.5% uranyl acetate and lead citrate (vol/vol). The slides were coated with an Ilford L4 nuclear emulsion and radioautographs were developed as described (Gerard *et al.*, 1982).

### Silver grain quantification

Silver grains were counted in randomly observed material.

1) The cell labeling density was determined at x8000 magnification by counting the silver grains overlying the spermatocytes, round spermatids and elongated spermatids, and expressed as the number of silver grains/



**Fig. 4.** Relative labeling of the isolated rabbit germ cells following incubation in presence of  $^{125}\text{I}$ -iodinated transcobalamin (TC) (9 pmol/ml; 15000 cpm) with or without EDTA pretreatment (10 mM for 15 min). SC: spermatocytes, RST: round spermatids, ES: elongated spermatids.

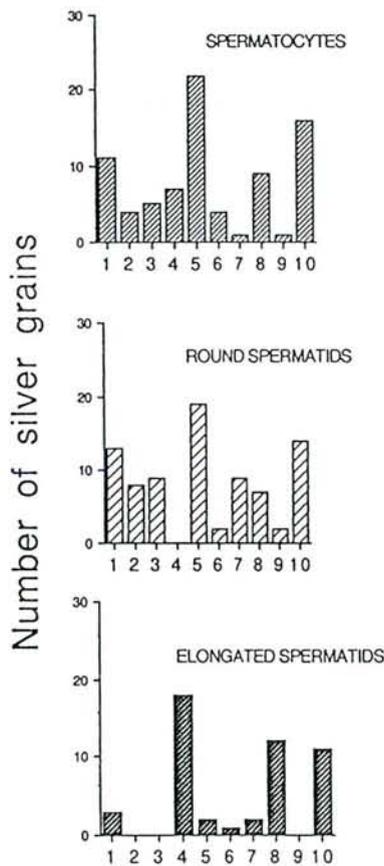


Fig. 5. Half-distance (HD) analysis for each cell type (spermatocytes, round spermatids and elongated spermatids). Silver grains were scored on the EM screen at a magnification of x8000. The HD axis origin was located on the plasma membrane. One HD= 140 nm.

1000  $\mu\text{m}^2$  of cell section, in each category. The number of silver grains counted over celloidin in random fields at some distance from the cell was estimated at 0.83 grain/1000  $\mu\text{m}^2$  and was considered to be the background index.

2) The cell labeling frequency was determined at x8000 magnification by counting the number of labeled and unlabeled spermatocytes, round spermatids and elongated spermatids, and expressed as the labeled/total cells ratio, in each category. A cell was considered labeled as soon as at least one silver grain was located on it. The label was determined by counting the incidence of at least 100 grains in each cell type.

3) The cellular localization of the radioactive sources was determined by the half-distance (HD) analysis (Salpeter *et al.*, 1978) as used in a previous study (Gerard *et al.*, 1988). With regard to the section size (80 nm), the nuclear emulsion (L4) and the radioelement ( $^{125}\text{I}$ ), one HD was calculated to be at 140 nm (Salpeter *et al.*, 1978). For this analysis the HD axis origin was located on the plasma membrane only.

*acknowledgments*

The authors express their gratitude to J. Poirson for technical electron microscope assistance and to Professors M. Duprez and F. Plenat for Itramicrotome facilities.

**References**

OUKHZER, E., EN-NYA, A., GERARD, H., FELDEN, F., GERARD, A., NICOLAS, J.P., NEXO, E. and GERARD, H. (1992). Transcobalamin II-Cobalamin receptors are present on rabbit germ cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1175: 128-131.

CARMEL, R. and BERNSTEIN, G.S. (1984). Transcobalamin II in human seminal plasma. *J. Clin. Invest.* 73: 868-872.

FELDEN, F., GUEANT, J.L., EN-NYA, A., GERARD, A., FREMONT, S., NICOLAS, J.P. and GERARD, H. (1992). Photoaffinity labelled rat androgen-binding protein and human sex steroid-binding protein bind specifically to rat germ cells. *J. Mol. Endocrinol.* 9: 39-46.

FETTEROLF, P.M. and SKINNER, M.K. (1987). Sertoli cells produce vitamin-binding proteins. *Ann. NY Acad. Sci.* 513: 480-481.

GERARD, A., EN-NYA, A., EGLOFF, M., DOMINGO, M., DEGRELLE, H. and GERARD, H. (1991). Endocytosis of human sex steroid-binding protein in monkey germ cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 637: 258-277.

GERARD, A., GERARD, H. and GRIGNON, G. (1982). In *Radiography Data Book* (Ed. T. Nagata). IPC, Tokyo, 44: 361-362.

GERARD, A., KHANFRI, J., GUEANT, J.L., FREMONT, S., NICOLAS, J.P., GRIGNON, G. and GERARD, H. (1988). Electron microscope radioautographic evidence of *in vivo* androgen-binding protein internalization in the rat epididymis principal cells. *Endocrinology* 122: 1297-1307.

GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S., ANDERSON, R.G.W., RUSSEL, D.W. and SCHNEIDER, W.J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 1-39.

GUEANT, J.L., FREMONT, S., FELDEN, F., NICOLAS, J.P., GERARD, A., LEHEUP, B., GERARD, H. and GRIGNON, G. (1991). Evidence that androgen-binding protein endocytosis *in vitro* is receptor mediated in principal cells of the rat epididymis. *J. Mol. Endocrinol.* 7: 113-122.

GUEANT, J.L., KOUVONEN, I., MICHALSKI, M.C., MASSON, C., GRASBECK, R. and NICOLAS, J.P. (1985). Purification of human intrinsic factor using high performance ion exchange chromatography as the final step. *FEBS Lett.* 184: 14-19.

HALL, C.A. (1975). Transcobalamin I and II as natural transport proteins of vitamin B<sub>12</sub>. *J. Clin. Invest.* 56: 1125-1131.

HANSEN, M. and NEXO, E. (1993). Cobalamin binding proteins in human seminal plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (In press).

HOLMES, S.D., BUCCI, L.R., LIPSHULTZ, L.I. and SMITH, R.G. (1983). Transferrin binds specifically to pachytene spermatocytes. *Endocrinology* 113: 1916-1918.

HUANG, H.F.S. and NIESCHLAG, E. (1986). Suppression of the intratesticular testosterone is associated with quantitative changes in spermatogonial populations in intact adult rats. *Endocrinology* 118: 619-627.

JACKSON, I.M.D., DOIG, W.B. and MacDONALD, G. (1967) Pernicious anaemia as a cause of infertility. *Lancet* II: 1159-1160.

LARRA, F. and DROZ, B. (1970). Techniques radioautographiques et leur application à l'étude du renouvellement des constituants cellulaires. *J. Microsc.* 9: 845-880.

MARKWELL, M.A.K. (1982). A new solid-state reagent to iodinate proteins. I. Conditions for the efficient labeling of antiserum. *Ann. Biochem.* 125: 427-432.

NEXO, E., OLESEN, D. and THOMSEN, J. (1977). Purification and characterization of transcobalamin II. *Biochim. Biophys. Acta* 494: 395-402.

ONG, D.E., TAKASE, C. and CHYTIL, F. (1987). Cellular vitamin A-binding proteins in the testis. *Ann. NY Acad. Sci.* 613: 172-178.

PARVINEN, M. (1982). Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr. Rev.* 3: 404-417.

SAEZ, J.M., AVALLET, D., PERRARD-SAPRI, M.H. and CHATELAIN, P.G. (1989). Sertoli Leydig cell communications. In *Regulation of Testicular Function* (Eds. Ewing L.L. and B. Robaire). *Ann. NY Acad. Sci.* 564: 210-231.

SALPETER, M.M., MCHENRY, F.A. and SALPETER, E.E. (1978). Resolution in electron microscope autoradiography. IV. Application to analysis of autoradiographs. *J. Cell Biol.* 76: 127-145.

SEGRETAIN, D., EGLOFF, M., GERARD, N., PINEAU, C. and JÉGOU, B. (1992). Receptor-mediated and adsorptive endocytosis in male germ cells of different mammalian species. *Cell Tissue Res.* 268: 471-478.

SYLVESTER, S. and GRISWOLD, M.D. (1984). Localization of transferrin and transferrin receptors in rat testes. *Biol. Reprod.* 31: 195-203.

SKINNER, M.K. (1991). Cell-cell interactions in the testis. *Endocr. Rev.* 12: 45-77.

STEINBERGER, A., DIGHE, R.R. and DIAZ, J. (1984). Testicular peptides and their endocrine and paracrine function. *Arch. Biol. Med. Exp.* 17: 267-271.

WATSON, A.A. (1962). Seminal vitamin B<sub>12</sub> and sterility. *Lancet* II: 644.

YOUNGDHAL-TURNER, P., MELLMAN, I.S., ALLEN, R.H. and ROSENBERG, L.E. (1979). Protein mediated vitamin uptake, adsorptive endocytosis of the Transcobalamin II-Cobalamin complex by cultured human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 118: 127-134.

# SOMMAIRE

INTRODUCTION  
BIBLIOGRAPHIE

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| I. GÉNÉRALITÉS SUR LE TESTICULE.....                              | 4  |
| 1.1. STRUCTURE DU TESTICULE.....                                  | 4  |
| 1.2. LES CELLULES DE SERTOLI.....                                 | 4  |
| 1.3. LES CELLULES GERMINALES ET LA SPERMATOGENÈSE.....            | 6  |
| 1.3.1. Les Spermatogonies.....                                    | 6  |
| 1.3.2. Les spermatocytes.....                                     | 9  |
| 1.3.3. Les spermatides.....                                       | 9  |
| 1.3.4. Les spermatozoïdes.....                                    | 11 |
| 1.3.5. Cycle spermatogénétique.....                               | 11 |
| II. Les interactions cellules de Sertoli-cellules germinales..... | 14 |
| 2.1. LES INTERACTIONS ENVIRONNEMENTALES.....                      | 17 |
| 2.2. LES INTERACTIONS NUTRITIONNELLES.....                        | 19 |
| 2.3. LES INTERACTIONS REGULATRICES.....                           | 21 |
| III. LA VITAMINE B12.....                                         | 24 |
| 3.1. GÉNÉRALITÉS SUR LA VITAMINE B12.....                         | 25 |
| 3.1.1. Structure de la vitamine B12.....                          | 26 |
| 3.1.2. Biosynthèse de la vitamine B12.....                        | 28 |
| 3.1.4. Le rôle biochimique de la vitamine B12.....                | 30 |
| IV. LA TRANSCOBALAMINE II.....                                    | 24 |
| 4.1. DÉFINITION ET NOMENCLATURE DE LA TC II.....                  | 36 |
| 4.2. CARACTÉRISTIQUE PHYSICO-CHIMIQUE DE LA TC II.....            | 36 |
| 4.3. PURIFICATION DE LA TC II.....                                | 36 |
| 4.4. SITE DE SYNTHÈSE DE LA TC II.....                            | 37 |
| 4.5. RÔLE BIOCHIMIQUE DE LA TC II.....                            | 39 |
| V. ENDOCYTOSE.....                                                | 41 |
| 5.1. LES CHEMINS DE L'ENDOCYTOSE RECEPTEUR-MÉDIÉE.....            | 43 |
| 5.2. MODÈLE D'INTERNALISATION DE LA TC II.....                    | 43 |

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 99. MATIERE ET METHODES.....                                                                                  | 49 |
| 2.1. MATIERE BIOLOGIQUE.....                                                                                  | 50 |
| 2.1.1. Les animaux.....                                                                                       | 50 |
| 2.1.2. Préparation du sérum du lapin.....                                                                     | 50 |
| 2.1.3. Isolement des cellules germinales.....                                                                 | 50 |
| 2.1.4. Préparation de fraction riche en membrane plasmique des cellules germinales.....                       | 51 |
| 2.2. METHODES BIOCHIMIQUES.....                                                                               | 52 |
| 2.2.1. Semi-purification de la TC II.....                                                                     | 52 |
| 2.2.2. Test de charbon-hémoglobine.....                                                                       | 53 |
| 2.2.3. Marquage de la TC II.....                                                                              | 54 |
| 2.2.3.1. Marquage de la TC II au cobalt.....                                                                  | 54 |
| 2.2.3.2. Marquage de la TC II à l'iode 125.....                                                               | 54 |
| 2.2.4. Etude de la liaison de la TC II avec le récepteur membranaire des cellules germinales.....             | 55 |
| 2.2.4.1. Etude cinétique.....                                                                                 | 55 |
| 2.2.4.2. Effet du pH et des chélateurs sur l'activité membranaire de liaison de la TC II.....                 | 55 |
| 2.2.4.3. Etude de la spécificité de la liaison.....                                                           | 57 |
| 2.2.4.4. Evaluation des paramètres de la liaison.....                                                         | 57 |
| 2.2.4.5. Effet des drogues.....                                                                               | 60 |
| 2.3.1. Principe de l'Autobistoradiographie A haute résolution.....                                            | 60 |
| 2.3.2. Les étapes de l'Autobistoradiographie à haute résolution.....                                          | 62 |
| 2.3.3. La localisation des grains d'argent dans les compartiments cellulaires.....                            | 62 |
| 999. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....                                                                            | 63 |
| 3.1. SEMI-PURIFICATION DE LA TC II.....                                                                       | 64 |
| 3.2. MARQUAGE SPECTRIQUE DE LA TC II.....                                                                     | 66 |
| 3.3. CARACTÉRISATION D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA TC II<br>A L'AIDE DES CELLULES GERMINALES ENTIERES..... | 66 |
| 3.3.1. Etude biochimique (Publication I).....                                                                 | 82 |
| 3.3.1.1. But de l'étude.....                                                                                  | 69 |
| 3.3.1.2. Résultats et discussions.....                                                                        | 69 |
| a. Etude cinétique.....                                                                                       | 69 |
| a1. Détermination de la constante cinétique $k_{-1}$ .....                                                    | 71 |
| a2. Détermination de la constante cinétique $k_1$ .....                                                       | 71 |
| b. Evaluation des paramètres de liaison.....                                                                  | 73 |
| c. Etude de la spécificité de liaison.....                                                                    | 76 |
| d. Effet du calcium.....                                                                                      | 76 |
| e. Effet des drogues.....                                                                                     | 79 |

|                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.2. Etude morphologique (Publication II).....                                                                               | 82        |
| 3.3.2.1. But de l'étude.....                                                                                                   | 82        |
| 3.3.2.2. Résultats et discussions.....                                                                                         | 82        |
| a. Preuve morphologique de l'existence d'un dispositif<br>endocytique dans les cellules germinales du Lapin.....               | 84        |
| b. Localisation cellulaire de la TC II.....                                                                                    | 86        |
| 3.5. ÉTUDE DE LA LIASON TC II - RÉCEPTEUR SUR LES<br>FRACCTIONS RICHES EN MEMBRANES PLASMIQUES DES<br>CELLULES GERMINALES..... | 89        |
| 3.5.1. But de l'étude.....                                                                                                     | 89        |
| 3.5.2. Résultats.....                                                                                                          | 89        |
| a. Étude cinétique.....                                                                                                        | 89        |
| b. Évaluation des paramètres de liaison.....                                                                                   | 89        |
| c. Effet du calcium.....                                                                                                       | 92        |
| d. Spécificité de la liaison.....                                                                                              | 92        |
| e. Effet du pH.....                                                                                                            | 92        |
| 3.5.3. Discussions.....                                                                                                        | 95        |
| 3.6. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE LA LIASON DE LA $^{57}\text{Co}$ -TC II DU LAPIN<br>AVEC LES CELLULES GERMINALES DU RAT.....        | 96        |
| 3.6.1. But de l'étude.....                                                                                                     | 96        |
| 3.6.2. Résultats.....                                                                                                          | 96        |
| <b>VU. DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>                                                                                            | <b>98</b> |
| 4.1. La présence de sites de liaison de la TC II et leur nature.....                                                           | 100       |
| 4.3. Cycle intracellulaire de la vitamine B12.....                                                                             | 103       |
| 4.4. L'effet de la B12 sur la maturation des cellules germinales.....                                                          | 105       |
| 4.5. Origine de la TC II SEMINAIRE.....                                                                                        | 106       |

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## ANNEXE

## SOMMAIRE



Nom : **BOUKHZER**

Prénom : **El Bachir**

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1**

en **BIOLOGIE ET SANTÉ**

Spécialité : **Génie Biologique et Médical**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le **21 MARS 1995 n o 21**

Le Président de l'Université

