

2 m.u. 3112.7

11485824
v.006

Université de Montréal

**Caractérisation des protéines AQN-1 et pB1 du plasma séminal porcine et leur
rôle dans la capacitation des spermatozoïdes**

par

Marie-Hélène Crête

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.) en Biochimie

Août 2003

© Marie-Hélène Crête, 2003



W
4
U58
2004
V.006

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Caractérisation des protéines AQN-1 et pB1 du plasma séminal porcine et leur
rôle dans la capacitation des spermatozoïdes

présenté par:
Marie-Hélène Crête

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Franz Lang, Ph.D.

Puttaswamy Manjunath, Ph.D.

Gilles Bleau, Ph.D.

Président-Rapporteur

Directeur de Recherche

Membre du jury

Résumé

La caractérisation des facteurs présents dans le plasma séminal est importante pour la compréhension du mécanisme de la capacitation ainsi que pour le développement des techniques d'insémination artificielle et de cryoconservation. Chez le porc, certaines protéines du plasma séminal ont été identifiées, mais aucune étude n'a encore été conduite afin d'identifier leur rôle biologique.

Le but de notre étude était de purifier et de déterminer le rôle des protéines pB1 et AQN-1 dans la capacitation des spermatozoïdes porcins. Les protéines ont été purifiées par chromatographie. Les spermatozoïdes épидидymaires ont été lavés et incubés 20 min en présence de différentes concentrations de protéines. Ensuite, ils ont été lavés et incubés 3 h à 39°C dans un milieu capacitant. La coloration au CTC a été utilisée pour déterminer leurs effets sur la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires.

À des concentrations de 0, 5, 25 et 50 µg/ml, on observe que la protéine AQN-1 fait diminuer le pourcentage de spermatozoïdes épидидymaires capités, passant de $30,9 \pm 2,3\%$, à $27,6 \pm 0,6\%$, $26,2 \pm 2,7\%$ et $17,2 \pm 1,3\%$ respectivement. De leur côté, les résultats préliminaires obtenus avec la protéine pB1 démontrent une augmentation du nombre de spermatozoïdes capités de 150%, 184% et 215% pour des concentrations respectives de 25, 50 et 100 µg/ml, comparativement au contrôle (sans pB1). Ces résultats suggèrent pour la première fois que la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins est stimulée par la protéine pB1 alors qu'elle est inhibée par la spermadhésine AQN-1.

Mots Clés: capacitation porcine, spermadhésine AQN-1, protéine pB1, spermatozoïdes, homologues aux protéines BSP.

Abstract

Seminal plasma contains several protein factors and to better understand the mechanism underlying capacitation their characterization is important. This knowledge is also important for the development of methods for sperm cryopreservation used in artificial insemination. In boar seminal plasma, nine proteins have been identified until now, but no studies have been done with respect to their biological role.

The objective of our study was to determine the role of pB1 protein and AQN-1 spermadhesin in sperm capacitation. Proteins were purified by chromatography techniques. Epididymal sperm were washed and incubated for 20 min with different concentrations of proteins. Then, they were washed and incubated for 3 h at 39°C in capacitating media. The CTC colorations was used to assess the state of capacitation of the spermatozoa.

With the presence of spermadhesin AQN-1, concentrate to 0, 5, 25 and 50 µg/ml, we observed that the percentages of capacitated sperm were $30.9 \pm 2.3\%$, $27.6 \pm 0.6\%$, $26.2 \pm 2.7\%$ and $17.2 \pm 1.3\%$ respectively. With the pB1 protein, preliminary result shown that sperm capacitation is stimulated up to levels of 150, 184 and 215%, as compared to control (without pB1), at concentrations 25, 50 and 100 µg protein/ml respectively. For the first time we show that boar sperm capacitation seems to be stimulated by pB1 protein and is inhibited by spermadhesin AQN-1.

Key words: boar capacitations, spermadhesin AQN-1, pB1 protein, sperm, phospholipid binding protein, BSP homologues.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations et des sigles.....	xi
Remerciements.....	xvi
1 Introduction	1
1.1 La spermatogenèse et les spermatozoïdes	2
1.2 Système reproducteur mâle	5
1.2.1 Les testicules	6
1.2.2 Les épидидymes.....	6
1.2.3 Les canaux déférents et les ampoules.....	7
1.2.4 Les vésicules séminales	7
1.2.5 La prostate.....	7
1.2.6 Les glandes de Cowper (ou glandes bulbo-uréthrales).....	8
1.2.7 Le pénis.....	8
1.3 Le plasma séminal.....	8
1.4 L'éjaculation	10
1.5 Tractus génital femelle.....	10
1.6 Capacitation et réaction de l'acrosome	11
1.7 Les protéines du PS bovin	15
1.7.1 La découverte des protéines BSP	15
1.7.2 Structures et propriétés chimiques	16
1.7.3 Affinité et fonctions.....	16
1.7.4 Modèle de capacitation chez le bovin	20
1.7.5 Les homologues aux protéines BSP	21
1.8 Les protéines du PS de bélier, de bouc et de bison.....	21
1.9 Les protéines du PS de cheval	22

1.10	Les protéines du plasma séminal porcin	24
1.10.1	Le système reproducteur du mâle chez le porc	24
1.10.2	La protéine pB1	26
1.10.3	Les spermadhésines	27
1.10.4	La formation de complexes dans le PS porcin	30
1.10.5	Mécanisme de capacitation du spermatozoïde porcin	31
1.11	La production porcine	32
1.12	Objectifs du projet	33
2	Matériel et Méthodes	35
2.1	Matériel	35
2.2	Méthodes	36
2.2.1	Précipitation à l'éthanol des protéines du plasma séminal porcin .	36
2.2.2	Chromatographie	36
2.2.3	Synthèse d'un peptide et conjugaison	38
2.2.4	Production d'anticorps polyclonaux contre la protéine pB1	39
2.2.5	Électrophorèse	39
2.2.6	Dialyse	41
2.2.7	Analyse des fonctions spermatiques	41
3	Résultats	45
3.1	Purification par affinité à la gélatine	45
3.2	Autres chromatographies d'affinité	49
3.3	Purification sur tamis moléculaire	51
3.3.1	À pH neutre	51
3.3.2	À pH acide	57
3.4	Expériences de capacitation	61
3.4.1	Capacitation modulée par les protéines totales du plasma séminal	62
3.4.2	Capacitation modulée par la spermadhésine AQN-1	63
3.4.3	Capacitation modulée par la protéine pB1	67
4	Discussion	69
4.1	La solubilité des protéines du PS porcin	69
4.2	Purification par chromatographie d'affinité	70

4.3	HPLC.....	71
4.4	Purification sur tamis moléculaire.....	72
4.5	La production d'anticorps polyclonaux.....	75
4.6	Capacitation des spermatozoïdes porcins.....	76
4.6.1	Modulée par le plasma séminal.....	76
4.6.2	Modulée par AQN-1.....	77
4.6.3	Modulée par pB1.....	79
4.7	Modèle de capacitation porcine.....	80
4.8	Comparaison entre les mécanismes de la capacitation porcine et bovine	84
4.9	Amélioration possible des techniques de production porcine.....	87
4.10	Les protéines du plasma séminal porcin et l'immunologie.....	89
4.11	Perspectives.....	90
4.12	Conclusions.....	91
5	Bibliographie.....	93
	Annexe I : Biologie Moléculaire.....	xvii
	Annexe II : Exemple de données brutes obtenues par comptage au CTC.....	xxviii

Liste des figures

Figure 1: Structure d'un testicule	2
Figure 2: Structure d'un spermatozoïde	4
Figure 3: Système reproducteur mâle	5
Figure 4: Réaction de l'acrosome.	15
Figure 5: Structure des protéines BSP montrant leurs domaines de type II.	17
Figure 6: Système reproducteur mâle chez le porc	25
Figure 7: Domaine CUB	28
Figure 8: Profils de fluorescence des spermatozoïdes colorés au CTC.....	43
Figure 9: Chromatographie d'affinité sur gélatine-agarose des protéines du PS porcin.	46
Figure 10: Chromatographie d'affinité sur gélatine-agarose de protéines du PS porcin avec un gradient d'urée.	47
Figure 11: Chromatogramme de rpHPLC des fractions adsorbées sur gélatine- agarose.	48
Figure 12: Chromatographie d'affinité à l'héparine du PS porcin.....	50
Figure 13: Chromatographie d'affinité sur colonne p-aminophényl PPC des fractions adsorbées sur héparine-sépharose.	52
Figure 14: Analyse par rpHPLC des fractions obtenues par affinité à l'héparine et à la PPC.....	53
Figure 15: Chromatographie d'exclusion de taille sur Séphadex G-50 sf du PS porcin à pH neutre.	55
Figure 16: Chromatographie par rpHPLC de la fraction D obtenue sur colonne Séphadex G-50 sf à pH neutre.....	55
Figure 17: Séquençage par la dégradation d'Edman de la protéine majoritaire de la fraction D obtenue par chromatographie sur Séphadex G-50 sf à pH neutre. 56	
Figure 18: Immunobuvardage de type Western des fractions obtenues par chromatographie sur colonne Séphadex G-50 sf à pH neutre.	56
Figure 19: Chromatographie d'exclusion de taille sur colonne Séphadex G-50 sf à pH acide du PS porcin.....	58

Figure 20: Immunobuvardage de type Western des fractions obtenues par chromatographie d'exclusion de taille à pH acide du PS porcin.	58
Figure 21 : rpHPLC des fractions obtenues par chromatographie d'exclusion de taille à pH acide du PS porcin.	59
Figure 22: Séquençage par la dégradation d'Edman des protéines contenues dans la fraction F obtenue lors de la chromatographie d'exclusion de taille à pH acide du PS porcin.	60
Figure 23 : Chromatographie d'affinité sur gélatine-agarose de la fraction F obtenue par chromatographie d'exclusion de taille à pH acide du PS porcin..	61
Figure 24 : rpHPLC de la fraction B obtenue par chromatographie d'affinité à la gélatine.	62
Figure 25 : Modulation de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par les protéines totales du PS précipitées à l'éthanol.	64
Figure 26 : Inhibition de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par la protéine AQN-1.	66
Figure 27 : Stimulation de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par la protéine pB1.	68
Figure 28 : Modèle hypothétique de la capacitation porcine.....	83
Figure 29 : Modèle de la capacitation bovine	86
Figure 30: Carte du vecteur pCR2.1.....	xxi
Figure 31: Carte du vecteur pcDNA3.1-	xxiii
Figure 32 : Analyse des produits de la réaction de PCR mis sur gel d'agarose 1%..	xxv
Figure 33 : Analyse des produits de la digestion du vecteur pCR2.1/pB1 par les enzymes de restriction Xba1/BamH1 placé sur gel d'agarose 1%.....	xxvi
Figure 34 : Séquence du cDNA cloné dans le vecteur pcDNA3.1-.	xxvii

Liste des tableaux

Tableau I: Résumé des caractéristiques des protéines BSP	18
Tableau II: Homologues aux protéines BSP chez différentes espèces animales ...	27
Tableau III : Propriétés des protéines du PS porcin	29
Tableau IV : Comparaison des séquences des extrémités C-terminales de différentes protéines homologues aux protéines BSP.....	76
Tableau V: Données brutes obtenues par comptage, au microscope à fluorescence, des profils de CTC des spermatozoïdes porcins aux temps 1,5 h.	xxviii

Liste des abréviations et des sigles

%	Pourcentage
μ	Micro (10 ⁻⁶)
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire
°C	Degré Celsius
A	Ampère
Å	Angström (10 ⁻¹⁰ m)
aa	Acide aminé
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
aSFP	Protéine acide du plasma séminal « acidic Seminal Fluid Protein »
ATP	Adénosine triphosphate
BiSV	Protéines des vésicules séminales de bison « Bison Seminal Vesicles proteins »
BSP	Protéines majeures du plasma séminal bovin, « Bovine Seminal Plasma proteins »
BTS	Beltsville Thawing Solution
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire
CHO	Cellules d'ovaire de hamster chinois « Chinese Hamster Ovary »
cm	Centimètre
coll	Collaborateur
CRISP	Protéine sécrétée riche en cystéine « Cystein Rich Secretory Protein »
CTC	Chlortétracycline
Ctrl	Témoin
CUB	Domaine identifié dans les protéines <i>Clr/Cl s</i> , <i>Uegf</i> et <i>Bmp1</i>

DEPC	« Diéthyl pyrocarbonate »
dNTP	Désoxynucléotidetriphosphate
EDTA	Éthylènediamine tétra-acétate
FPLC	« Fast Protein Liquid Chromatography »
FPPQ	Fédération des producteurs de porcs du Québec
FSH	Hormone folliculo-stimulante « Follicule Stimulating Hormone »
g	Accélération gravitationnelle (9,81 m/s ²)
g	Gramme
GAG	Glycosaminoglycane
GSP	Protéines du plasma séminal de bouc « Goat Seminal Plasma proteins »
h	Heure
HDL	Lipoprotéine de haute densité « High Density Lipoprotein »
HFBA	Acide n-heptafluorobutyrique anhydre
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HSP	Protéines du plasma séminal de cheval « Horse Seminal Plasma proteins »
IA	Insémination artificielle
kDa	KiloDalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
L	Litre
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LH	Hormone lutéinisante « Luteinizing Hormone »
LHRH	Hormone stimulant la relâche de l'hormone lutéinisante « Luteinizing-Hormone-releasing hormone »
LSD	Test protégé de Fisher de la plus petite différence significative « Protected Fisher Least Significant Difference »
M	Molaire (mole / litre)
m	Mètre
mg	Milligramme
min	Minute

ml	Millilitre
mM	Millimolaire
M-MLV	Maloney-Virus murin de la leucémie
n	Nombre de répétition
nm	Nanomètre
oligo dT	Oligonucléotide polydésoxythymidine triphosphate
pAIF	Facteur inducteur de l'adhésion « porcine adhesion inducing factor »
pb	Paire de bases
PB	Tampon phosphate « Phosphate Buffer »
pB1	Protéine du porc 1
PBS	Tampon phosphate salin « Phosphate Buffer Saline »
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PKA	Protéine Kinase A
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PPC	Phosphorylcholine
PS	Plasma séminal
PSP	Protéines du Plasma Séminal Porcin
RIA	Dosage radioimmunologique « RadioImmunoAssay »
rp	Phase inverse « reverse phase »
RSP	Protéines du plasma séminal de bélier « ram seminal plasma proteins »
RT	Transcription inverse « Reverse Transcription »
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec sodium dodécylsulphate « Sodium Dodécylsulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis »
sec	Seconde
sf	« Super fine »
Spz	Spermatozoïde
TBS	Tampon tris salin « Tris Buffer Saline »
TFA	Acide trifluoroactétique

TN	Tampon tris-NaCl
U	Unité
V	Volt
v	Volume
w	Poids

Il faut juger son succès par ce que l'on
a dû laisser tomber pour y arriver.

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier le Dr Puttaswamy Manjunath pour m'avoir permis de faire ma maîtrise au sein de son laboratoire. Merci de m'avoir donné un projet intéressant et stimulant qui m'a permis d'élargir mes connaissances dans le domaine de la purification de protéines.

Merci aux membres du laboratoire. Annick tu m'as montré toutes les techniques de capacitation que je connais et ton aide à tous les égards de mon projet a toujours été très appréciée. Jasmine et Yanie, merci pour toutes les discussions qui m'ont permis de me sortir des impasses dans lesquelles je me trouvais. Yanie, merci pour ton aide en biologie moléculaire. Michèle, merci pour ton aide pour l'apprentissage du fonctionnement du HPLC. Isabelle, merci d'avoir pris le temps de m'apprendre les techniques de chromatographies lorsque je suis arrivée au labo comme stagiaire d'été il y a 3 ans.

Je tiens aussi à remercier la compagnie FMénard Inc (Ange-Gardien), et Les abattoirs Héberts (Ste-Hélène de Bagote) qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux en me fournissant de la semence et des testicules de vérrats.

Merci à Sophie, de l'animalerie, qui a pris soin de mes lapins lors de la production d'anticorps. Merci au Dr. Euridice Carmona pour son aide en biologie moléculaire.

Finalement, je voudrais remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenue tout au long de cette aventure. Merci Maman et Papa de m'avoir donné la chance de continuer mes études. Merci à tout le monde, de m'avoir encouragé dans les moments plus éprouvants et félicité dans les moments de réussite. Je n'ai pas de place pour tous vous nommer mais Marie-Claude, Julie, Josianne (François), Geneviève, Jasmine, Yanie, Vincent, Catherine, Papa et Maman, je ne peux passer votre nom sous silence, votre support m'a été trop précieux. MERCI

1 Introduction

Pour la continuité de la vie, chaque être vivant doit se reproduire, que ce soit un organisme unicellulaire ou un organisme pluricellulaire. Les modes de reproduction sont très variés, mais on peut les diviser en deux grandes classes : la reproduction asexuée et celle sexuée [1, 2]. Dans la reproduction asexuée, on retrouve tous les modes qui nécessitent la présence d'un seul organisme parental. Par exemple, un unicellulaire qui se scinde en deux cellules filles ou encore un certains types de plantes donnant des descendants par bourgeonnement. Par contre, dans la reproduction sexuée, il y a toujours le mélange de matériels génétiques provenant de deux organismes parentaux pour former un seul descendant qui sera génétiquement différent de ses parents [1].

Même si la reproduction asexuée est simple et efficace, il semble que la reproduction sexuée soit plus avantageuse. Si on étudie les modes de reproduction des différents organismes, on se rend compte que la majorité des espèces primitives ont des modes de reproduction asexuée alors que les végétaux et les animaux utilisent majoritairement la reproduction sexuée [1]. L'avantage principal qu'il y a à la reproduction sexuée est la présence de deux génomes complets, soit celui du père et celui de la mère. Le mélange de deux génomes permet de produire une très grande variété d'individus en plus de favoriser la présence de mutations positives à l'intérieur d'une même espèce [1]. Ainsi, si un stress est infligé à une population à reproduction sexuée, une proportion significative des individus va survivre. Dans la population asexuée, des mutations sont aussi présentes, mais la présence d'un seul génome parental permet un taux de mutation plus bas. Ainsi, si la même situation de stress se produit dans ce type de population, une plus grande proportion de la population va succomber puisqu'il y a moins de mutations positives.

Chez les mammifères, la continuité des espèces dans le temps est assurée par la reproduction sexuée. C'est-à-dire que, lors de l'éjaculation, le mâle dépose

ses gamètes, les spermatozoïdes, dans le tractus génital femelle à l'intérieur duquel ceux-ci progressent jusqu'à ce qu'ils rencontrent le ou les gamètes femelles, nommé(s) l'ovocyte(s). Lorsque les deux gamètes se rencontrent, il y a fusion des noyaux et formation du zygote. Le zygote est la première étape dans la formation d'un nouvel organisme [1, 2].

Dans ce chapitre, les sujets abordés seront la formation et la maturation des spermatozoïdes. L'accent sera plus particulièrement mis sur différents aspects qui influencent la maturation des spermatozoïdes.

1.1 La spermatogénèse et les spermatozoïdes

Contrairement à la femelle où les ovocytes sont déjà tous produits à la naissance, chez le mâle, la spermatogénèse débute avec la puberté et continue tout au long de la vie. Ce processus se déroule à l'intérieur des tubules séminifères des testicules, plus particulièrement au niveau de leurs cellules épithéliales (figure 1) [1, 3].

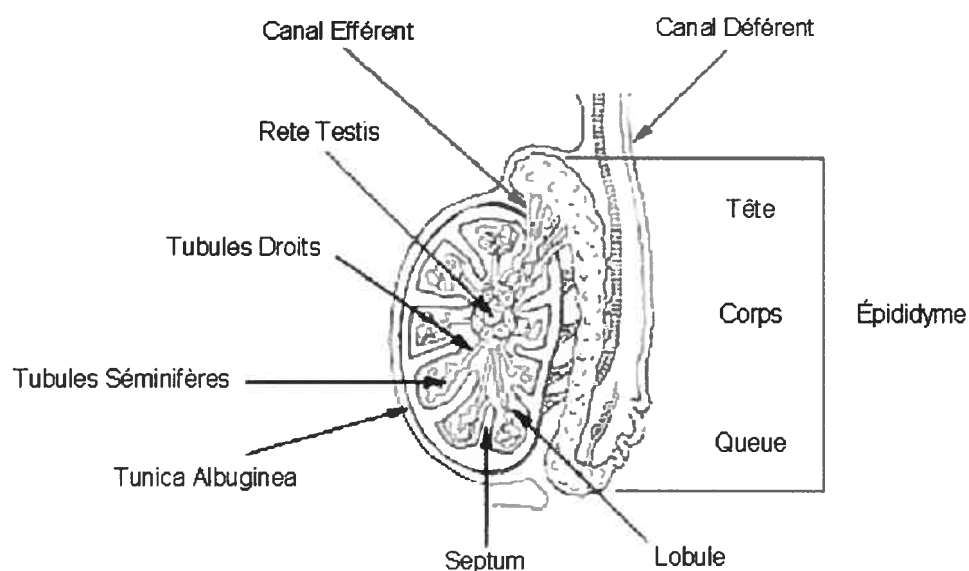


Figure 1: Structure d'un testicule

Les spermatogonies se développent à partir de cellules germinales primordiales qui migrent dans les testicules et commencent à proliférer rapidement, engendrant quelques descendants qui conservent la capacité de continuer à se diviser indéfiniment et d'autres descendants qui, après un nombre limité de cycles normaux de division, entreront en méiose pour devenir des spermatocytes primaires [1-3]. Ceux-ci vont poursuivre la méiose pour devenir des spermatocytes secondaires. Suite à la division II de la méiose, ces spermatocytes deviennent des spermatides ronds haploïdes. Il y a ensuite différenciation en cellules allongées, les spermatozoïdes [1-4]. À la fin de leur différenciation, les spermatozoïdes sont transférés dans la lumière du tubule séminifère dans lequel ils se trouvent. Tout le processus de spermatogenèse est régulé par l'environnement spécifique fourni par les cellules de Sertoli et de Leydig, par des facteurs endocrines et para-autocrines ainsi que par des interactions cellule-cellule [5, 6]. Les spermatozoïdes acquièrent leur motilité et augmentent leur pouvoir fécondant lors de leur passage dans l'épididyme (figure 1) [1-4].

Les spermatozoïdes sont des cellules pourvues d'un flagelle qui leur permet de se propulser dans un milieu aqueux. Toutefois, ils n'ont pas d'organites tel que les ribosomes, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. De plus, le cytoplasme ne contient que les éléments essentiels à la survie de la cellule. Le métabolisme minimal du spermatozoïde le rend optimal pour transporter l'ADN génomique du mâle jusqu'au gamète femelle, l'ovocyte [1-3].

Il y a trois parties principales au spermatozoïde, la tête, la pièce intermédiaire et la queue qui sont tous enveloppés par la membrane plasmique (figure 2) [1-3]. La tête contient le noyau et l'acrosome, une vésicule contenant plusieurs enzymes. Contrairement au noyau des autres cellules, celui du spermatozoïde contient un seul élément de chaque paire de chromosome, ce qu'on appelle haploïde. De plus, l'ADN nucléaire se retrouve sous forme extrêmement condensée. Les histones, protéines qui sont liées à l'ADN pour permettre sa

condensation dans tous les autres types cellulaires, sont remplacées par des protéines plus petites nommées protamines. Les protamines ont entre 27 et 65 acides aminés (aa) et sont riches en cystéines et arginines ce qui les rend généralement basiques [3]. Le complexe protamine ADN est stabilisé par des ponts disulfures entre les protamines [3]. Formant une vésicule située entre le noyau et la membrane plasmique, l'acrosome dérive de l'appareil de Golgi du spermatozoïde. Les enzymes contenues dans l'acrosome correspondent à celles retrouvées dans un lysosome primaire et sont nécessaires à la digestion des couches extérieures de l'ovocyte lors de la pénétration du spermatozoïde au début de la fécondation [3, 7].

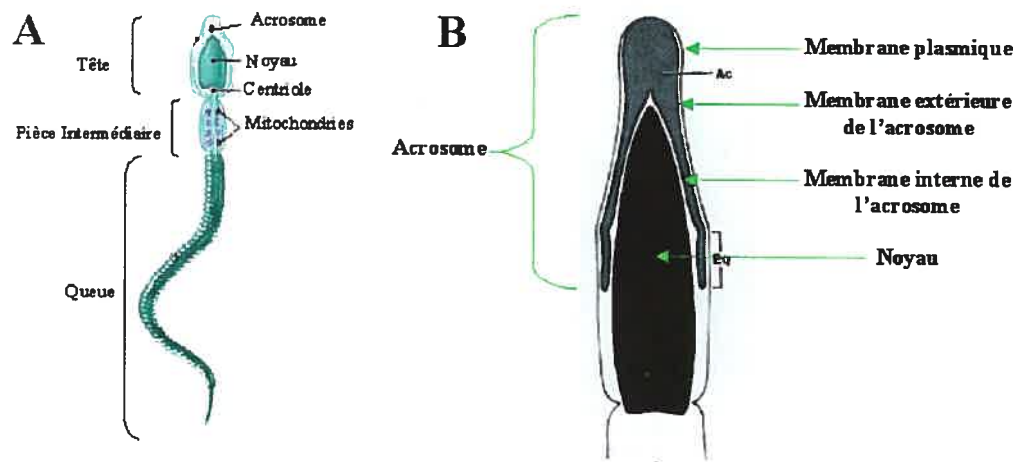


Figure 2: Structure d'un spermatozoïde A) Schéma d'un spermatozoïde complet.
B) Schéma de la tête d'un spermatozoïde.

La pièce intermédiaire renferme le moteur du flagelle ainsi que toutes les mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire au mouvement du flagelle [1, 2]. L'ATP produit par les mitochondries sert à activer les molécules de dynéine liées aux microtubules et c'est cette activation qui induit le mouvement du flagelle [1]. La queue du spermatozoïde est uniquement composée du flagelle et sert à propulser le spermatozoïde. Une des particularités qui a été observée au niveau du

flagelle est qu'il y a présence d'histone H1 pour empêcher le désassemblage des microtubules et rendre la structure stable [1, 2].

1.2 Système reproducteur mâle

Le système reproducteur mâle est composé de plusieurs organes et glandes, comme le montre la figure 3.

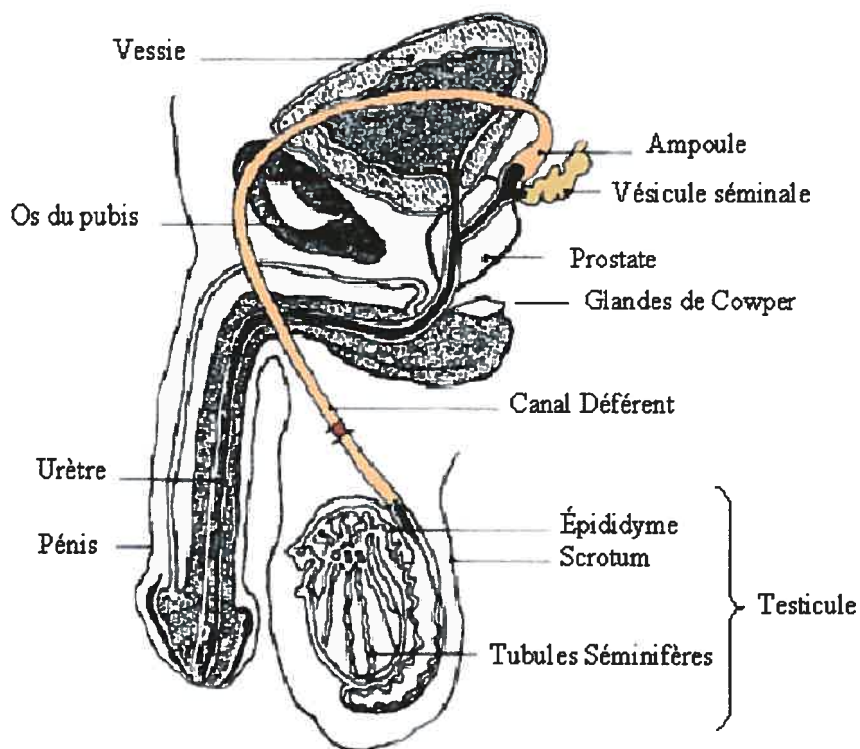


Figure 3: Système reproducteur mâle

1.2.1 Les testicules

Les testicules sont le lieu de formation des spermatozoïdes (section 1.1). Ils contiennent les tubules séminifères, les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli (figures 1 et 3). Les tubules séminifères sont des tubes d'environ 250 μm de diamètre qui occupent la majorité de l'espace du testicule et dont les deux extrémités ouvrent sur le rete testis [3]. Les cellules de Sertoli sont les cellules qui recouvrent les tubules séminifères et une partie de leur rôle serait de bloquer le reflux de fluide du rete testis vers les tubules séminifères [3, 7]. Toutefois, leur rôle principale est de donner aux spermatocytes un milieu adéquat à leur développement en spermatozoïdes matures [6]. Enfin, les cellules de Leydig sont des cellules de la matrice qui régulent, par les androgènes qu'elles sécrètent, l'action des autres cellules en plus de réguler leur propre activité [3]. Les cellules de Leydig produisent des androgènes sous l'influence de l'hypothalamus et l'hypophyse [3]. Les cellules de Leydig sont elles aussi responsable de la qualité de l'environnement entourant le spermatocyte [5]. Les testicules sont à l'extérieur du corps ce qui permettrait de garder une température légèrement plus basse que celle du reste du corps favorisant ainsi le développement et la conservation des spermatozoïdes.

1.2.2 Les épидидymes

L'épididyme est placé à la surface postérieure du testicule et consiste en un tube divisé en trois parties : une tête (caput), un corps (corpus) et une queue (caudal) (figure 1) [8]. La tête et le corps sont des lieux de maturation pour les spermatozoïdes tandis que la queue est un endroit de stockage des spermatozoïdes qui seront éjaculés [3]. Le diamètre de l'épididyme va en diminuant de la tête vers la queue [8]. Environ une douzaine de tubes efférents entrent à la tête de l'épididyme. Par contre, un seul tube déférent est relié à la queue de l'épididyme [8].

1.2.3 Les canaux déférents et les ampoules

Le tube déférent a une longueur qui varie d'une espèce à l'autre et sert à relier l'extrémité de l'épididyme aux vésicules séminales [8]. L'ampoule est une structure qui n'est pas toujours présente d'une espèce à l'autre et qu'on remarque par un renflement du canal déférent juste avant d'arriver aux vésicules séminales [3, 8]. C'est une petite vésicule qui agit comme un réservoir de fluide [3].

1.2.4 Les vésicules séminales

Les vésicules séminales sont absentes chez plusieurs espèces animales et leur nom provient de la croyance qui voulait que ce soit un réservoir de spermatozoïdes [3]. En fait, ce sont deux glandes (elles sont toujours observées en paire) qui forment des poches d'environ 5 à 10 cm et qui sont reliées au canal déférent par leur extrémité proximale pour former la voie éjaculatoire [3, 8]. Chaque vésicule est en réalité un tube enroulé sur lui-même donnant plusieurs irrégularités à la forme [8]. Chez les espèces où les vésicules séminales sont présentes, leur contenu est très important lors de l'éjaculation.

1.2.5 La prostate

Cette glande est présente chez presque tous les mammifères, mais sa morphologie varie grandement [3]. La prostate est en contact avec la surface inférieur de la vessie et elle est traversée à la fois par l'urètre et par les canaux éjaculatoires [3, 8]. La prostate est composée de plusieurs tubules, formant des alvéoles et reliés à des canaux. Ceux-ci permettent à la glande de se vider à l'intérieur de l'urètre [3].

1.2.6 Les glandes de Cowper (ou glandes bulbo-uréthrales)

Ce sont des glandes multi-lobulaire, multi-tubulaire ou multi-alvéolaire qui sont présentes chez la majorité des espèces de mammifères. Elles ont un aspect lisse et compact et sont d'une couleur brune jaunâtre [3, 8]. Les glandes de Cowper sont situées sur chacun des côtés de l'urètre juste sous la prostate près du pénis [8]. Cette paire de glandes est remplie de mucus et est reliée à l'urètre par un canal [3].

1.2.7 Le pénis

Cet organe est à l'extérieur du corps et il permet de déposer les spermatozoïdes à l'intérieur du tractus génital femelle.

Les sécrétions des glandes accessoires tel que l'ampoule, les glandes de Cowper, les vésicules séminales et la prostate ont un rôle très important à jouer lors de l'éjaculation. Elles font en sorte que les spermatozoïdes sont dans un milieu idéal, lors de leur course vers l'ovocyte, en leur fournissant des facteurs important à leur maturation extra-testiculaire.

1.3 Le plasma séminal

Après avoir été transférés par les cellules épithéliales dans les tubules séminifères, les spermatozoïdes sont continuellement baignés dans un milieu nommé plasma séminal (PS) dont le pH varie entre 7,2 et 7,8 [3, 8]. Le PS est un milieu aqueux qui contient plusieurs facteurs nécessaires au déplacement et à la maturation du spermatozoïde, en fait, la composition du PS change selon l'étape de maturation du spermatozoïde. Lors de l'éjaculation, le PS est le mélange des sécrétions de la prostate, des glandes de Cowper, des épидидymes, des vésicules séminales et des ampoules et représente la portion liquide de l'éjaculat. Bien que

chacune de ces glandes contribue à la formation du PS, ce sont les sécrétions des vésicules séminales qui sont majoritaires [8]. Le volume des sécrétions des vésicules séminales représente environ 60% du PS alors que celui des sécrétions de la prostate représente environ 30% [3].

La composition du PS est très variable entre les espèces, mais aussi chez un même individu où elle dépend de la période de temps entre la collecte des éjaculats. On peut remarquer des variations entre les types de substances retrouvées dans le PS mais aussi entre la concentration de chacune de ces substances [3]. Toutefois, il a été identifié que les vésicules séminales ont des sécrétions riches en fructose, en prostaglandines et en ions sodium et potassium, alors que les sécrétions de la prostate sont riches en acide citrique, en phosphatase acide, en zinc et en magnésium [3]. Le fructose est le principal sucre retrouvé dans le PS, mais la présence de sorbitol et d'inositol a aussi été observée [3]. Le métabolisme du spermatozoïde utilise le fructose comme source principale d'énergie en le transformant en acide lactique, mais il peut aussi transformer le sorbitol en fructose. Chez certaines espèces, uniquement du glucose est sécrété dans le PS ce qui oblige le métabolisme du spermatozoïde à le transformer en sorbitol pour ensuite le transformer en fructose pour pouvoir l'utiliser [3]. Le fructose est la source d'énergie des spermatozoïdes aussi bien en conditions aérobiques qu'en conditions anaérobiques [3].

Quant à la prostate, elle sécrète des enzymes protéolytiques, principalement la plasminogène et la séminine dont le rôle est de liquéfier le plasma séminal [8]. Aussi, elle sécrète de l'acide citrique qui a un rôle à jouer dans le maintien de l'équilibre osmotique et du zinc qui a un rôle d'agent antibactérien [3].

Le rôle du plasma séminal est de permettre aux spermatozoïdes de se rendre à l'ovocyte dans les meilleures conditions possibles et c'est pourquoi on y retrouve plusieurs types de molécules : des protéines, des sucres et des ions.

Toutes ces molécules contribuent à maintenir un environnement optimal pour la maturation et la progression des spermatozoïdes. Elles le font en permettant le maintien d'un pH et d'une osmolalité optimale et en fournissant l'énergie nécessaire aux spermatozoïdes. Sans les facteurs du PS, *in vivo*, le spermatozoïde ne serait pas en mesure de féconder l'ovocyte.

1.4 L'éjaculation

Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes sont expulsés du tractus génital mâle pour être déposés dans le tractus génital femelle. L'éjaculat est composé des spermatozoïdes et du plasma séminal. L'éjaculat est aussi appelé le sperme. Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes passeront de l'épididyme, où ils étaient conservés, au canal déférent, où ils entreront en contact avec les sécrétions des glandes accessoires, avant de traverser l'urètre. Lorsqu'ils sortent de l'urètre, le pénis fait en sorte que les spermatozoïdes sont déposés dans le vagin ou dans le col de l'utérus de la femelle, selon l'espèce.

1.5 Tractus génital femelle

La fécondation se produit dans le système reproducteur de la femelle. Par contre, avant que le spermatozoïde soit en mesure de féconder l'ovocyte, plusieurs étapes doivent être franchies. Tout d'abord, le spermatozoïde doit se déplacer dans l'utérus et rejoindre l'oviducte (aussi nommé trompes de Fallope chez l'humain) où il rencontrera l'ovocyte. Durant ce parcours, il doit passer par un mécanisme de maturation nommé capacitation (section 1.6) et suite à cette maturation, il pourra interagir avec les couches extérieures de l'ovocyte et commencer la réaction de l'acrosme (section 1.6) qui va lui permettre ultimement de fusionner avec l'ovocyte.

1.6 Capacitation et réaction de l'acrosome

En 1951 Chang [9] et Austin [10] ont observé pour la première fois qu'un délai était nécessaire pour que le spermatozoïde déposé dans le tractus génital femelle soit en mesure de féconder l'ovocyte; ils ont nommé ce laps de temps la capacitation [7]. Le temps requis pour la capacitation varie entre les espèces passant de moins d'une heure à plusieurs heures. Chez le porc, environ 3 heures sont requises. Lors de la capacitation, il y aurait retrait ou transformation des substances liées à la membrane plasmique du spermatozoïde qui ont été acquises lors du passage dans l'épididyme ou lors du contact avec le PS [3]. Malgré les nombreuses études réalisées depuis plus de 50 ans afin de comprendre ce processus, plusieurs aspects restent à être éclaircies.

Avec les années, plusieurs substances ont été suggérées comme étant des régulateurs (positifs ou négatifs) de la capacitation. Il faut toutefois faire preuve de prudence dans l'interprétation de ces résultats car la capacitation peut être spontanée lors d'expériences *in vitro*. D'autres expériences ont montré qu'un spermatozoïde et un ovocyte d'une espèce donnée pouvaient réussir la fécondation dans le tractus génital d'une autre espèce, ce qui démontrait que les facteurs capacitants n'étaient pas spécifiques à une espèce [3]. Par contre, ultérieurement, des études *in vitro* ont démontré que chaque espèce avait ses conditions de capacitation particulières [3]. Même s'il y a des différences entre la composition des milieux capacitants utilisés *in vitro*, un milieu capacitant doit toujours contenir une source d'énergie, des ions calcium, du bicarbonate et un accepteur de cholestérol [7]. La concentration de chacun de ces substrats et la température d'incubation des spermatozoïdes sont des facteurs qui varient d'une espèce à l'autre.

Lorsqu'ils sont dans l'épididyme, les spermatozoïdes baignent dans un milieu à forte concentration en potassium et à faible concentration en sodium et en bicarbonate [11]. Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes se retrouvent dans le

PS qui lui est riche en sodium et en bicarbonate et est pauvre en potassium [11]. Ce changement de concentration ionique serait à l'origine de l'enclenchement de la capacitation. Le bicarbonate causerait des altérations majeures dans la membrane plasmique du spermatozoïde en perturbant le processus de contrôle enzymatique, permettant ainsi d'enclencher la capacitation [12, 13].

Lors de la capacitation, la membrane plasmique du spermatozoïde subirait des changements dans sa composition protéique, lipidique et il y aurait une diminution du nombre d'antigènes présents à la surface du spermatozoïde [3] [14]. Plusieurs études ont démontré qu'une des premières étapes de la capacitation était un efflux de cholestérol de la membrane plasmique du spermatozoïde [7]. Dans les études *in vitro*, l'albumine serait le principal accepteur de cholestérol alors qu'*in vivo* les HDL (lipoprotéines de haute densité) et l'albumine présents dans le fluide folliculaire se partageraient la tâche [7, 15, 16]. Cette perte de cholestérol induirait une augmentation de la fluidité membranaire, qui à son tour induirait un mouvement des lipides, un regroupement des protéines membranaires et un changement dans la distribution des antigènes de surface [3, 7].

Le remaniement de la membrane plasmique a aussi comme effet d'activer des canaux calciques et d'augmenter la perméabilité aux ions calcium et bicarbonate [7, 16, revu en 14]. Il a été démontré que la concentration de bicarbonate dans l'épididyme est très faible comparativement à celle du PS et du fluide oviductal, ce qui indiquerait un rôle à jouer pour cet anion [7]. L'influx d'ions dans le spermatozoïde a pour effet d'activer l'adénylate cyclase et de faire augmenter le pH intracellulaire [7, 12]. L'adénylate cyclase va produire de l'AMPc qui à son tour va faire augmenter l'activité de la protéine kinase A (PKA) et par conséquent le taux de protéines membranaires phosphorylées sur tyrosine [3, 7, 17, 18]. La phosphorylation des protéines du spermatozoïde régule la motilité et la reconnaissance de la zone pellucide entourant l'ovocyte [19]. L'augmentation de la concentration d'AMPc va aussi faire augmenter la motilité du spermatozoïde, ce qui est couramment identifié comme l'hyperactivation [7, revu en 14].

Récemment, des études portant sur l'influence d'autres facteurs sur la capacitation ont été réalisées. L'oxyde nitrique est une petite molécule qui serait aussi impliquée dans l'hyperactivation, la capacitation et la réaction de l'acrosome, mais les mécanismes auxquels elle fait appel n'ont pas encore été identifiés [20-21]. Il y aurait aussi la norépinéphrine qui induirait la capacitation lorsqu'elle est présente à faible concentration [22]. Les autres cathécolamines (épinéphrine, dopamine) et une forte concentration de norépinéphrine inhibent la capacitation [22].

Les glycosaminoglycanes (GAGs) semblables à l'héparine sécrétés par les cellules épithéliales du tractus génital femelle induisent aussi la capacitation [23]. Un GAG est un polysaccharide linéaire souvent relié à une protéine pour former un protéoglycane. Ils sont des composants de la matrice extracellulaire et sont aussi retrouvés à la surface des cellules. Les GAGs retrouvés dans le fluide folliculaire sont l'héparane sulfate et la chondroïtine sulfate [24]. Il a été démontré que les protéines du PS ayant la propriété de lier l'héparine et couvrant la surface du spermatozoïde régulent l'action de ces GAGs [25]. Ces protéines agissent comme des récepteurs, la liaison des GAGs à ces protéines est saturable, spécifique et réversible. Bien que l'on sache depuis quelques années que l'héparine active la capacitation chez le boeuf, on ne connaît pas encore le mécanisme intracellulaire qu'elle enclenche. De plus, on ne sais pas si l'action est la même chez toutes les espèces.

Il a été démontré qu'à l'entrée de l'oviducte, dû à des interactions d'affinité aux hydrates de carbone, il y a formation d'un réservoir de spermatozoïdes [26-28]. La vitesse de la capacitation des spermatozoïdes peut être régulée par cette liaison aux cellules de l'oviducte. Le groupe de Suarez a démontré que les spermatozoïdes ayant une faible concentration de calcium intracellulaire se lient aux cellules épithéliales de l'oviducte et qu'une fois liés, la concentration intracellulaire de calcium reste faible ce qui ralentit la progression de la

capacitation [29]. Les spermatozoïdes restent liés jusqu'à ce que la capacitation soit assez avancée. La présence du réservoir oviductal pourrait contribuer à diminuer le risque de polyspermie et permettrait de garder les spermatozoïdes fertiles et motiles plus longtemps. Dans l'attente de l'ovulation, le réservoir permet de garder une quantité suffisante de spermatozoïdes présents dans l'oviducte [26]. Ainsi, la présence du réservoir oviductal augmenterait les chances de fécondation.

La capacitation donne aux spermatozoïdes le potentiel d'enclencher la réaction de l'acrosome. L'acrosome qui n'a pas subi de réel changement lors de la capacitation va maintenant se fusionner à la membrane plasmique du spermatozoïde et permettre le relargage des enzymes qu'il contient (Figure 4). Les GAGs présents dans le fluide utérin et oviductal vont permettre de transformer la proacrosine inactive, une enzyme de l'acrosome, en acrosine active [3, 24]. Ainsi, l'augmentation de la fluidité membranaire, la présence de hyaluronidase dans l'acrosome et l'activation de la proacrosine va permettre aux spermatozoïdes de faire la réaction de l'acrosome. Par contre, aucun de ces facteurs n'est l'élément déclencheur de la réaction de l'acrosome. Il semblerait que la liaison du spermatozoïde avec la zone pellucide (enveloppe externe de l'ovocyte), l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium et l'alcalinisation du pH intracellulaire soient les éléments déclencheurs [3, 7, 30]. Lors de la réaction de l'acrosome, il y a vésiculation des membranes, ce qui permet aux enzymes contenues dans l'acrosome de s'échapper par les pores formés (figure 4). L'action des enzymes relâchées lors de la réaction de l'acrosome permet au spermatozoïde de traverser les couches externes de l'ovocyte et d'aller fusionner avec la membrane plasmique de l'ovocyte [3]. Les couches externes de l'ovocyte sont principalement composées de glycoprotéines et d'acide hyaluronique [3].

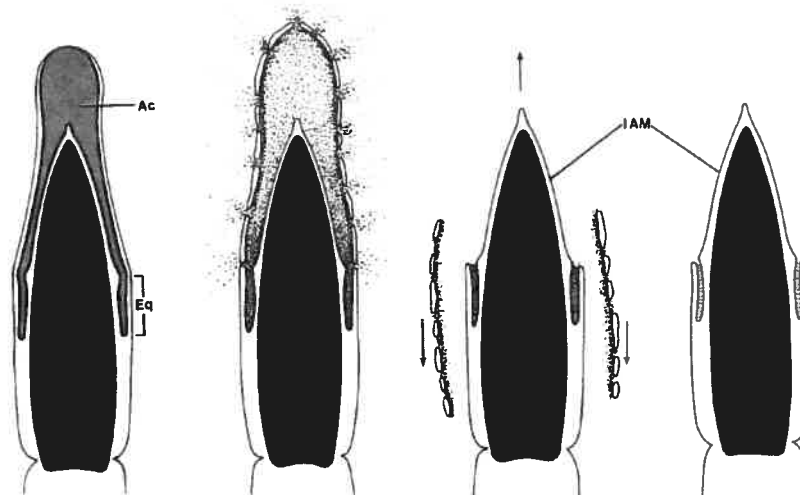


Figure 4: Réaction de l'acrosome. (Eq) segment équatorial, (Ac) acrosome, (IAM) membrane interne de l'acrosome. [3]

1.7 Les protéines du PS bovin

Le plasma séminal de bovin contient à la fois des facteurs activateurs et des facteurs inhibiteurs de la capacitation. Les protéines majeures sont les protéines BSP et comme il va être discuté plus loin, elles peuvent induire la capacitation, mais elles peuvent aussi stabiliser la membrane. Elles sont donc d'importants régulateurs de la capacitation. Une autre protéine du PS qui a été identifiée est la spermadhésine aSFP [31]. Le rôle de cette petite protéine capable de lier le spermatozoïde n'a pas encore été identifié.

1.7.1 La découverte des protéines BSP

En 1984, en étudiant le rôle de différentes fractions protéiques sur le relâchement d'hormones par des cellules hypophysaires en culture, Manjunath [32] a identifié trois protéines du PS bovin qui avaient à la fois un rôle activateur et un rôle inhibiteur de la relâche de gonadotropines (tel que la LH et la FSH) selon la concentration à laquelle elles étaient présentes dans le milieu. Avant de pouvoir les caractériser, ces protéines ont été purifiées par chromatographie FPLC

(chromatographie liquide rapide de protéine), par filtration sur gel et par affinité (sépharose couplé à la lectine de germe de blé). Une fois isolées, il a pu être observé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en deux dimensions (2D SDS-PAGE) que les trois protéines avaient une taille variant entre 15 et 17 kDa et que leur point isoélectrique était d'environ 4,3 [33]. De plus, il a été observé que chacune d'elles semblait être glycosylée [32]. Ces protéines ont été nommées BSP-A1, -A2 et -A3 [32].

1.7.2 Structures et propriétés chimiques

Par la suite, le séquençage de chacune de ces protéines a démontré que BSP-A1 et BSP-A2 possédaient la même séquence primaire de 109 acides aminés, mais que ces protéines différaient par la nature de leur glycosylation [34]. C'est ce qui explique que l'on parle souvent de BSP-A1 et de BSP-A2 comme étant BSP-A1/-A2. La protéine BSP-A1/-A2 porte aussi le nom de PDC-109, pour protéine avec un acide aspartique en N-terminal et une cystéine en C-terminal [35]. Le séquençage de BSP-A3 a permis de connaître la séquence des 115 acides aminés qui la composent et de voir qu'il n'y avait aucune glycosylation [34]. Il a aussi été remarqué que chacune des trois structures primaires contenait 2 domaines de liaison au collagène (domaine de type II) placés en tandem (figure 5) [34, 36]. Le domaine de type II a été identifié pour la première fois dans une protéine à multiples domaines, la fibronectine. La capacité de ce type de domaine à lier le collagène a été confirmée par des études de structure sur la fibronectine et sur la protéine BSP-A1/-A2 par Banayai en 1990 [37].

1.7.3 Affinité et fonctions

Lorsqu'il a été démontré que les protéines BSP contenaient chacune deux domaines de type II, il n'avait pas encore été prouvé que les domaines de type II étaient responsables de l'affinité à la gélatine (collagène dénaturé à l'acide), bien qu'on le soupçonnait [38, 39]. Ainsi, une technique de purification des protéines

BSP en une étape a été essayée, soit la chromatographie d'affinité sur gélatine-agarose. Du plasma séminal bovin a donc été placé sur une colonne de gélatine-agarose et c'est de cette façon que, en 1987, Manjunath et coll a démontré la présence d'une quatrième protéine BSP nommée BSP-30 kDa [40]. Cette protéine possède aussi deux domaines de type II placés en tandem et lie la gélatine (structure à la figure 5) [40]. Cette protéine a été séquencée en entier par le groupe de Calvete en 1996 [41]. Comparativement aux autres protéines BSP, la protéine BSP-30 kDa a une structure primaire de 158 acides aminés et un poids moléculaire d'environ 30 kDa. Comme BSP-A1/A2, elle est glycosylée [42]. Le tableau I résume les caractéristiques des protéines BSP.

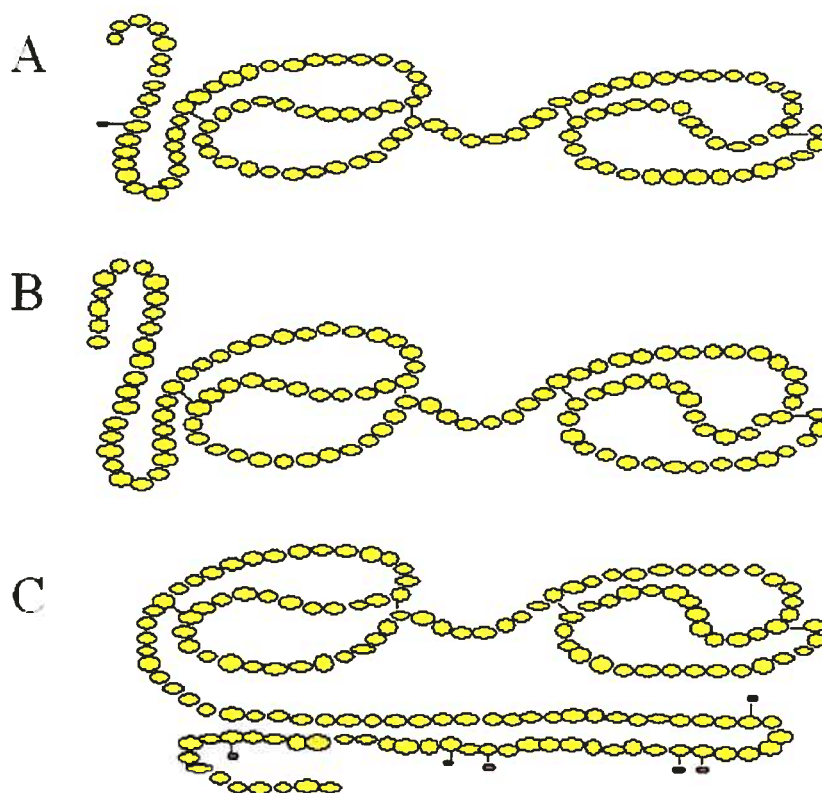


Figure 5: Structure des protéines BSP montrant leurs domaines de type II. A) BSP-A1/A2, B) BSP-A3 et C) BSP-30 kDa. Les sites de glycosylation sont indiqués par la présence d'un rond rouge

Tableau I: Résumé des caractéristiques des protéines BSP [33]

	Taille (aa)	Poids moléculaire (kDa)	pI	Glycosylation
BSP-A1	109	16,5	4,8	+
BSP-A2	109	16,0	5,1	+
BSP-A3	115	15,0	5,0	-
BSP-30kDa	158	28,0	4,3	+

Une fois les études de caractérisation terminées, l'équipe de Manjunath a tenté d'identifier le rôle joué par ces protéines sur la relâche des gonadotropines. Par contre, en effectuant des expériences utilisant différentes concentrations de protéines BSP, ils découvrirent que ces protéines étaient inhibées par un facteur contenu dans le sérum [43]. En utilisant une colonne d'affinité aux protéines BSP-A1/A2, ils arrivèrent à isoler l'apolipoprotéine A-I, composante majoritaire des lipoprotéines de haute densité (HDL). Ceci suggérait que les protéines BSP avaient un rôle à jouer dans le transport et/ou dans le métabolisme des lipoprotéines [43].

Des études de dosage radioimmunologique (RIA) ont démontré que les vésicules séminales étaient la principale source des protéines BSP. En fait, la concentration des protéines BSP varie 20 à 40 mg/ml, soit 65% des protéines totales du plasma séminal [42]. Par immunofluorescence, il a été observé que les protéines BSP recouvrent la tête des spermatozoïdes éjaculés [42, 44].

Suite à l'obtention de ces résultats, des études sur le rôle joué par les protéines BSP dans la capacitation des spermatozoïdes bovins ont débuté. Sachant que les GAGs présents dans le tractus génital femelle étaient impliqués dans la capacitation [24], la première étape a été de vérifier la liaison des protéines BSP à l'héparine. Les protéines totales du plasma séminal ont été placées sur une colonne d'affinité à l'héparine (héparine-sépharose) et les quatre protéines BSP ont été

retrouvées parmi les protéines adsorbées [45]. La deuxième étape a été de trouver le site de liaison des protéines BSP à la membrane plasmique des spermatozoïdes. Plusieurs expériences permirent de déterminer que les protéines BSP lient les phospholipides, plus particulièrement leur groupement choline [46].

Dans la littérature, il était déjà connu que la capacitation et la réaction de l'acrosome étaient calcium dépendantes. Il était aussi connu que la calmoduline était une protéine membranaire responsable de la régulation de plusieurs mécanismes calcium dépendants. Puisqu'il avait déjà été démontré que la calmoduline était présente à la surface des spermatozoïdes [47], le groupe de Manjunath a voulu vérifier si les protéines BSP s'y liaient. Il a été découvert que les protéines BSP se liaient à la calmoduline [48].

Finalement, en 1995 le groupe de Manjunath a démontré que les protéines BSP régulent la capacitation des spermatozoïdes induite par l'héparine [49]. Ils sont arrivés à cette conclusion après avoir incubé des spermatozoïdes épидидymaires bovins avec différentes concentrations de protéines BSP et avec de l'héparine et avoir analysé les patrons de capacitation [49]. Par le même type d'expériences, ils ont aussi démontré que les protéines BSP potentialisaient la capacitation induite par les HDL et par l'apolipoprotéine A1 [15]. Par la suite, des études ont démontré l'importance des protéines BSP et des HDL dans l'efflux de cholestérol et de lipides de la membrane plasmique du spermatozoïde lors de la capacitation [50, 51]. La présence d'un seul domaine de type II est suffisante pour la liaison à l'héparine et à la phosphorylcholine donc à la membrane du spermatozoïde. Par contre, les deux domaines doivent être présents pour induire l'efflux lipidique et la capacitation [52].

1.7.4 Modèle de capacitation chez le bovin

Un mécanisme d'induction de la capacitation des spermatozoïdes bovins a pu être élaboré suite à l'obtention de résultats indiquant que l'héparine et les HDL n'induisaient pas la capacitation par la même voie [53]. L'héparine induit la phosphorylation sur tyrosine des protéines alors que ce n'est pas le cas avec les HDL. Les résultats indiquent que les protéines BSP joueraient un rôle dans la modification de la membrane lipidique des spermatozoïdes [50, 51, 54]

Le modèle développé est décrit ci-après : Dans un premier temps, les spermatozoïdes entreraient en contact avec les protéines BSP lors de l'éjaculation, c'est-à-dire lors du mélange des spermatozoïdes avec le PS. Les protéines BSP, qui sont le produit majeur du PS, induiraient un efflux de cholestérol de la membrane plasmique du spermatozoïde. Ensuite, une autre portion des protéines BSP formerait une couche sur la membrane plasmique des spermatozoïdes en se liant aux groupements choline des phospholipides [54]. Cette liaison des protéines BSP permettrait de stabiliser la membrane lors de la traversée du canal cervical et de l'utérus. Une fois dans l'oviducte deux voies sont possibles: celle des GAGs et celle des HDL. Pour la première, les spermatozoïdes interagiraient avec les GAGs semblables à l'héparine présents dans le fluide oviductal. L'héparine pourrait ainsi interagir avec la membrane du spermatozoïde par le biais des protéines BSP agissant comme des récepteurs et induire une multitude de changements intracellulaires liés à la capacitation, tel que l'augmentation du pH, du calcium et de l'AMPc [53-56].

La deuxième voie d'activation de la capacitation serait celle induite par les HDL présents dans le fluide oviductal. Le HDL du fluide oviductal agissant comme accepteur de cholestérol, il y aurait un deuxième efflux de cholestérol. Ce deuxième efflux produirait des altérations significatives à la membrane en la rendant très fluide. Cette déstabilisation induirait la capacitation de façon

indépendante aux protéines BSP et indépendante à la voie impliquant la phosphorylation des tyrosines [53, 54].

1.7.5 Les homologues aux protéines BSP

L'analyse de protéines du PS d'autres espèces de mammifères, sur une colonne d'affinité à la gélatine, a permis d'identifier des homologues aux protéines BSP chez plusieurs espèces. Ainsi, chez le bouc [57], le bélier [58] et le bison [59], quatre protéines ont pu être identifiées. Aussi, l'analyse de la séquence des protéines BSP à l'aide de programmes informatiques a permis d'identifier d'autres homologues dans le PS de cheval et de porc [60-62]. De plus, il avait déjà été observé que les anticorps dirigés contre les protéines BSP réagissaient avec des protéines des sécrétions des vésicules séminales du hamster, de la souris, du rat et de l'humain [63]. Chez l'humain, trois protéines possédant un poids moléculaire semblable à celui de protéines BSP-A1/-A2 et -A3 ont été observées. Toutefois, puisque le PS d'humain est très difficile à obtenir en grande quantité, aucune étude n'a encore été réalisée pour les purifier et les caractériser davantage. Étant donnée la grande diversité des espèces où des homologues ont pu être identifiés et le rôle majeur qu'ils jouent dans l'induction de la capacitation bovine, il est juste de croire que les protéines BSP sont ubiquitaires dans le système reproducteur mâle chez les mammifères. Par contre, il reste à savoir si le rôle joué par les homologues est semblable à celui joué par les protéines BSP.

1.8 Les protéines du PS de bélier, de bouc et de bison

La présence d'homologues aux protéines BSP vient tout juste d'être identifiée dans ces espèces, il y a donc très peu de caractéristiques connues sur chacune des protéines. Aucune séquence complète n'a encore été identifiée. Par contre, la séquence en N-terminal des quatre protéines du bouc, GSP-14 kDa,

GSP-15 kDa, GSP-20 kDa et GSP-22 kDa (GSP, goat seminal plasma proteins) et des quatre protéines du bélier RSP-15 kDa, RSP-16 kDa, RSP-21 kDa et RSP-24 kDa (RSP, ram seminal plasma protein) démontre un pourcentage élevé de similitude avec les séquences d'aa des quatre protéines BSP [57, 58]. Les protéines GSP et RSP ont toutes une affinité pour la gélatine, l'héparine et pour la fraction de faible densité du jaune d'œuf (riche en lipoprotéines de faible densité, LDL) [57, 58]. Chez le bison, il y a aussi quatre protéines qui ont été identifiées : BiSV-16 kDa, BiSV-17 kDa, BiSV-18 kDa et BiSV-30 kDa (BiSV, Bison Seminal Vesicles proteins) [59]. Le séquençage des aa de l'extrémité N-terminale a démontré qu'elles sont à 100% identiques à celles des protéines BSP. BiSV-16 kDa serait homologue à BSP-A3, BiSV-17/-18 kDa seraient homologues à BSP-A1/A2 tandis que BiSV-28 kDa serait l'homologue de BSP-30 kDa. Cette homologie permet la reconnaissance des protéines BiSV par les anticorps anti-BSP. Les anticorps dirigés contre les protéines BSP n'avaient jamais montré une aussi forte affinité pour des protéines d'une autre espèce. Tout comme chez le bovin, le bouc et le bélier, les protéines BiSV se lient à la gélatine, à l'héparine (sauf pour BiSV-16 kDa) et à la fraction de faible densité du jaune d'œuf [59].

1.9 Les protéines du PS de cheval

Chez le cheval, les protéines majeurs du PS sont nommées les HSP (horse seminal plasma proteins). Jusqu'à maintenant, cinq protéines HSP ont été identifiées.

Comme il a été décrit précédemment, les protéines BSP-A1 et BSP-A2 possèdent la même structure primaire, par contre leurs glycosylations diffèrent. Chez le cheval la même chose est observée avec la protéine HSP-1 [60]. Il y aurait une forme glycosylée et une autre non-glycosylée. De plus, il y a 68% de similitude entre la séquence primaire de la protéine HSP-1 et celle de la protéine BSP-A1/A2. La protéine HSP-1 a une séquence de 121 acides aminés et un poids

moléculaire de 15 kDa pour la forme non-glycosylée et de 16 kDa pour la glycoforme. La structure secondaire contient deux domaines de type II, tout comme les protéines BSP. Les deux formes de la protéine HSP-1 lient la gélatine. Par contre, seule la forme non-glycosylée lie l'héparine et la phosphorylcholine [60, 61]. Généralement, la forme glycosylée se retrouve sous forme de monomère dans le plasma séminal alors que la forme non-glycosylée forme un hétérodimère avec la protéine HSP-2.

La protéine HSP-2 est une petite protéine glycosylée qui elle aussi lie la gélatine, l'héparine et la phosphorylcholine. Cette protéine a un poids moléculaire de 14,5 kDa. La séquence primaire n'a pas encore été élucidée totalement [60, 61].

Une nouvelle protéine HSP vient d'être identifiée, la protéine HSP-12 kDa [62]. Cette protéine d'un poids moléculaire d'environ 12 kDa lie la gélatine, la phosphorylcholine et la fraction de faible densité du jaune d'œuf. De plus, la séquence des 35 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminal présente une grande similarité avec celles des protéines BSP [62].

Dans le plasma séminal du cheval, deux autres protéines ont été identifiées, soit les spermadhésines HSP-3 et HSP-7. La famille des spermadhésines est formée de petites protéines du plasma séminal qui interagissent avec les spermatozoïdes et/ou la zone pellucide. La protéine HSP-3 n'est pas glycosylée et a un poids moléculaire de 26 kDa [64], tout comme HSP-2 la séquence primaire n'a pas encore été élucidée. Par contre, on sait que HSP-3 a un domaine riche en cystéine (CRISP) qui contient 8 ponts disulfures [64]. Cette protéine basique se retrouve sous forme de monomère [64]. La structure primaire de HSP-7 contient 133 acides aminés et a une identité de 98% avec la séquence primaire de la spermadhésine AWN-1 du plasma séminal de porc [65]. C'est pourquoi parfois, on entend parler de protéine AWN de cheval et non de la protéine HSP-7. Le point isoélectrique de cette protéine est d'environ 8 et le poids moléculaire est de 14

kDa. Comme les autres protéines HSP, HSP-7 est capable de lier la zone pellucide de l'ovocyte [65, 66]. Comme les spermadhésines présentes chez le porc la structure secondaire de la protéine HSP-7 contient un domaine CUB [66].

Aucune étude n'a encore été faite quant aux rôles joués par ces protéines lors de la capacitation des spermatozoïdes de cheval. Par contre, des études préliminaires indiquent que chacune des protéines auraient un rôle à jouer dans la capacitation et/ou dans l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovocyte. De plus, d'après leur affinité de liaison à l'héparine, les protéines HSP-1 et HSP-2, pourraient réguler la capacitation induite par l'héparine.

1.10 Les protéines du plasma séminal porcine

Avant de poursuivre avec la description des protéines du PS porcine, le système reproducteur mâle du porc sera décrit. En effet, puisque la capacitation des spermatozoïdes porcins est le sujet de ce mémoire, il est important que les caractéristiques du système reproducteur mâle soient identifiées.

1.10.1 Le système reproducteur du mâle chez le porc

Dans le système reproducteur du verrat, les glandes de Cowpers sont très développées, la prostate se situe autour de l'urètre et il n'y a pas d'ampoules (Figure 6) [113-114]. Aussi, le gland a une forme légèrement spiralée, ce qui permet un emboîtement avec le col de l'utérus. Ainsi, lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes n'ont pas à traverser le vagin, ils sont directement déposés dans l'utérus, ceci facilite la fécondation [113,115]. La sécrétion de gel par les glandes de Cowpers est un autre mécanisme qui favorise la fécondation. Le gel dans le col de l'utérus forme un bouchon empêchant ainsi le reflux du sperme dans la cavité vaginale [113-115].

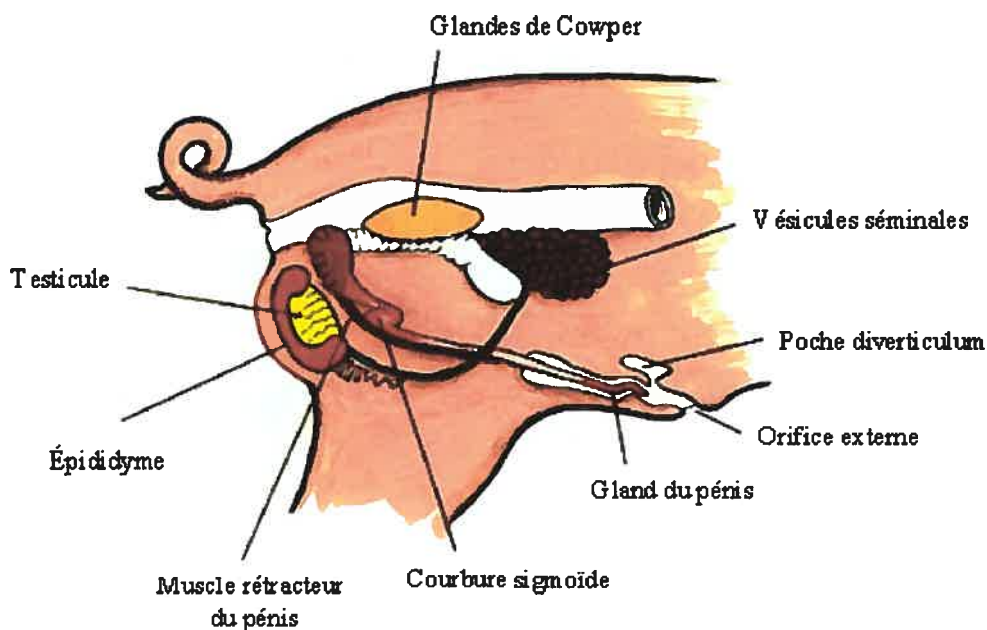


Figure 6: Système reproducteur mâle chez le porc

La spermatogénèse, comme dans toutes les espèces de mammifères, s'effectue à l'intérieur des testicules, dans l'environnement contrôlé par les cellules de Sertoli [116]. Ces dernières agissent sous l'influence de la FSH [113]. Par la suite, la maturation des spermatozoïdes se poursuit dans les tubules séminifères sous l'influence des cellules de Leydig et de la LH [113]. L'hypophyse, une glande située dans le cerveau, est responsable de la synthèse et de la sécrétion de la LH et de la FSH [113]. La FSH, en plus de stimuler la spermatogénèse, stimule la synthèse de l'hormone inhibine par les cellules de Sertoli. Cette hormone agit sur l'hypophyse et est responsable de la rétroinhibition de la production de FSH [113]. La LH stimule la synthèse de la testostérone, hormone sexuelle mâle, par les cellules de Leydig. Un des rôles de la testostérone est d'inhiber la synthèse de LH par l'hypophyse [113].

Chez le porc, l'éjaculat a un volume variant entre 150 et 400 ml (la moyenne étant d'environ 250 ml) et la concentration des spermatozoïdes est approximativement $0,3 \times 10^9$ spermatozoïdes/ml [113-116]. La tête des spermatozoïdes porcins a une forme ovoïde semblable à celle des spermatozoïdes

humains et bovins [113]. Le sperme contient des ions calcium, sodium et potassium, du fructose, de l'acide citrique, de l'acide lactique et des prostaglandines [113-115]. Le fructose fournit l'énergie aux spermatozoïdes, l'acide citrique permet de garder le pH stable, l'acide lactique est le produit du métabolisme des spermatozoïdes et finalement les prostaglandines aident les spermatozoïdes à remonter le tractus génital femelle jusqu'à l'ovocyte [113].

1.10.2 La protéine pB1

En 1997, le groupe de Calvete a identifié pour la première fois une protéine du PS porcin qui était de la même famille que les protéines BSP [61]. Suite à une chromatographie d'affinité sur héparine, sur gélatine agarose et sur HPLC en phase inverse, ils sont parvenus à purifier une protéine qu'ils ont nommée pB1 (boar protein 1). La structure primaire de pB1 a été déterminée et la présence de deux domaines de type II placés en tandem a été observée [61]. Des analyses de séquences, à l'aide de bases de données informatisées, ont montré que cette protéine avait déjà été identifiée par Hadjisavas et coll. En effet, cette équipe avait identifié une protéine de 15 kDa induisant l'adhésion des leukocytes dans les vésicules séminales de porc lors de la réaction inflammatoire et l'avait nommée pAIF-I (porcine adhesion inducing factor-I) [61, 67]. Les protéines pB1 et pAIF possédaient la même séquence primaire pour les 32 premiers acides aminés.

À ce jour, plusieurs protéines ont été identifiées dans le PS du porc, mais une seule, la protéine pB1, est un homologue aux protéines BSP, les autres sont des spermadhésines. Contrairement aux autres espèces, les protéines majeures du plasma séminal porcin sont les spermadhésines. L'homologue aux protéines BSP représente seulement 0,6 à 1,5% des protéines totales du PS [68].

La protéine pB1 est une petite protéine de 105 acides aminés (130 avec le peptide signal) qui contient un site de glycosylation sur la thréonine 10 [61, 68]. Comme pour les protéines BSP, la structure primaire contient 8 cystéines impliquées dans quatre ponts disulfures formant deux domaines de type II [61].

Les pourcentages de similitude entre pB1 et BSP-A1/A2, BSP-A3 et BSP-30K sont respectivement de 74, 67 et 59%. Sans la glycosylation, le poids moléculaire est de 12,6 kDa tandis que la forme majeure de glycosylation a un poids moléculaire de 13 kDa [69]. Contrairement aux protéines BSP qui sont acides, la protéine pB1 est basique avec un point isoélectrique de 8,6 (Jonakova1998). Cette protéine est aussi nommée DQH (pour les trois premiers acides aminés en N-Terminal) ou pAIF [67, 70]. Tout comme les protéines BSP, la protéine pB1 est sécrétée par l'épithélium des vésicules séminales [71].

Comme il a été mentionné précédemment, les domaines de type II permettent la liaison au collagène [37] et à la gélatine. Ainsi, la protéine pB1 peut lier la gélatine [70]. Il a aussi été démontré que pB1 possède une affinité pour lier la zone pellucide, la phosphorylcholine, l'héparine et les GAGs semblables à l'héparine [72].

Tableau II: Homologues aux protéines BSP chez différentes espèces animales

Espèce animale	Protéines homologues
Bovin	BSP-A1/-A2; BSP-A3; BSP-30 kDa
Bouc	GSP-14 kDa; GSP-15 kDa; GSP-20 kDa et GSP-22 kDa
Bélier	RSP-15 kDa; RSP-16 kDa; RSP-21 kDa et RSP-24 kDa
Bison	BiSV-16 kDa; BiSV-17 kDa; BiSV-18 kDa et BiSV-30 kDa
Cheval	HSP-1; HSP-2 et HSP-12 kDa
Porc	pB1

1.10.3 Les spermadhésines

Comme mentionné plus haut, les spermadhésines sont les protéines majeures du PS porcin, elles représentent environ 30% des protéines totales. Dans le PS de porc, sept spermadhésines ont été identifiées jusqu'à présent : AQN-1, -2, -3, Awn-1, -2, PSP-I et PSP-II. La protéine majoritaire étant AQN-1 [72-74].

Les spermadhésines sont nommées d'après leurs trois premiers acides aminés de l'extrémité N-terminal, excepté pour PSP-I et II (porcine Seminal Plasma protein [75]). La famille des spermadhésines est caractérisée par des propriétés de liaison semblables à celles des lectines et par la présence du domaine CUB (Figure 7). La famille des lectines regroupe des protéines non-immunogéniques capables de lier les sucres des glycoprotéines et de former des agrégats. Une lectine possède plus d'un site de liaison aux sucres ce qui permet de former des agrégats [76]. Le domaine CUB, nommé d'après les protéines où il a été identifié pour la première fois (*Clr/Cl_s*, *Uegf* et *Bmp1*), est caractérisé par la formation d'un baril de feuillets β [74]. Il faut environ 110 acides aminés pour former un domaine de type CUB et chaque domaine contient 2 ponts disulfures [74]. Les spermadhésines sont présentes chez toutes les espèces, mais c'est dans le PS de porc qu'il y a la plus grande variété.



Figure 7: Domaine CUB

Toutes les spermadhésines possèdent un poids moléculaire compris entre 11,5 et 16 kDa et elles sont toutes des protéines basiques et glycosylées (voir Tableau III) [73, 74]. À l'exception de PSP-I, chacune d'elle lie la zone pellucide et l'héparine [74, 77, 78]. Seule la spermadhésine AWN est retrouvée sur les spermatozoïdes épидидymaires car elle est non seulement synthétisée dans les vésicules séminales mais aussi dans le rete testis [79]. De plus, elle est aussi sécrétée par les cellules épithéliales du tractus génital femelle [80].

Tableau III : Propriétés des protéines du PS porcin [61, 71, 72, 78]

Nom	Nombre d'aa		MW (kDa)		pI	Conc. dans PS (µg/µl)	Domaine	Affinité *			
	Précurseur	Prot	Sans glycosylation	Avec glycosylation				Gélatine	ZP	Héparine	PPC ¹
pB1 (DQH, pAIF)	130	105	12,6	12,903	8,6	0.6-1.5% ~0.3 µg/µl	Type II (2X)	+	+	+	+
				13,065**							
				13,358							
AQN-1		111	11,9		9,0	1.1	CUB	-	+	+	+
AQN-2			Entre 14 & 20		9,3 à 9,5	6.4	CUB	-	-	+	-
AQN-3		116	12,9		9,4	0.5	CUB	-	+	+	+
AWN-1		133	14,8		8,7 à 9,3	1.8	CUB	+	+	+	-
AWN-2			16		6,4		CUB	+	+	+	-
PSP-I		109	13	14,501	8.0		CUB		-	-	-
PSP-II		137	12,6	14,816	8.6		CUB				+/-

*Toutes lient la concavaline A **Forme majeure de glycosylation ¹PPC : phosphorylcholine

Les spermadhésines PSP-I et PSP-II semblent être différentes des autres spermadhésines. Elles sont sécrétées par l'épithélium de la prostate et non par celui des vésicules séminales [81]. Ce sont les seules qui ne lient pas la zone pellucide et la phosphorylcholine et il a été démontré que ces spermadhésines régulaient l'activité immunitaire au niveau de l'utérus des truies [75, 82].

En 1994, Dostalova et coll ont démontré, à l'aide d'anticorps dirigés contre AWN et du HPLC en phase inverse, que les spermadhésines des familles AQN et AWN lient seulement la partie apicale de la membrane plasmique du spermatozoïde [71]. Par contre, après une incubation de 3 h dans un milieu capacitant, entre 60 et 90% des spermadhésines ne lient plus la membrane des spermatozoïdes. Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle les spermadhésines agissent comme inhibiteur de la capacitation [71]. En 1998, le groupe de Calvete a toutefois démontré par immunofluorescence que AWN se localisait partout à la surface des spermatozoïdes [83]. Ces résultats ont par la suite été confirmés par le groupe de Topfer-Petersen [84]. Depuis, aucune étude n'a été réalisée afin de connaître le site de liaison des spermadhésines AQN-1 et AWN-1 ou d'élucider leur rôle dans la capacitation et/ou l'interaction spermatozoïde-ovocyte.

1.10.4 La formation de complexes dans le PS porcin

Le complexe AQN-1 et pB1 a été observé, mais il y aurait dissociation en dimère de AQN-1 et en monomère de pB1 en présence de phosphorylcholine [61]. Plusieurs études ont montré que les spermadhésines forment des homodimères ou des hétéromères les unes avec les autres ainsi qu'avec la protéine pB1 [72]. Pratiquement toutes les combinaisons de protéines ont été observées par contre, il n'a pas été vérifié s'il s'agissait d'artéfactes ou si c'était des complexes biologiquement actifs avec un rôle spécifique [72, 77, 85]. Le fait que les spermadhésines soient retrouvées sous forme d'agrégats empêche d'émettre une

hypothèse quant à leurs rôles individuels dans la capacitation, la réaction de l'acrosome et/ou l'interaction spermatozoïdes-ovocyte. Selon la composition des agrégats, les affinités ne sont jamais les mêmes, il devient difficile de définir un rôle tant pour les complexes que pour les protéines qui les forment. Comme ce ne sont jamais les mêmes proportions de protéines qui sont observées dans un complexe, il est plausible que les agrégats soient des artéfacts. Il se peut que la nature des spermadhésines, soit leur affinité pour les sucres et le fait qu'elles soient toutes glycosylées, provoque la formation d'agrégats lorsque le PS est étudié *in vitro* ce qui expliquerait la formation de complexes aléatoires.

Présentement, le rôle des spermadhésines dans la capacitation, la réaction de l'acrosome et /ou l'interaction entre les gamètes n'est pas connu. Tel que mentionné plus haut, il y a une hypothèse selon laquelle les spermadhésines seraient des inhibiteurs de la capacitation [71]. De plus, une seconde hypothèse a été émise selon laquelle les spermadhésines joueraient un rôle dans la capacitation lorsqu'elles sont agrégées et qu'elles seraient inactives lorsqu'elles sont sous forme de monomère [78]. Une troisième hypothèse stipule que les spermadhésines joueraient un rôle majeur lors de la liaison du spermatozoïde à l'ovocyte [86].

1.10.5 Mécanisme de capacitation du spermatozoïde porcine

La capacitation des spermatozoïdes porcins est un mécanisme qui n'est pas encore très bien compris. Certaines études démontrent que les protéines de la membrane spermatique sont phosphorylées, d'autres observent une augmentation de l'AMPc, du calcium, du bicarbonate et du pH intracellulaire [104]. Par contre, aucune étude n'a encore démontré clairement quel est l'agent déclencheur de la capacitation. Aussi, contrairement à ce qui a été démontré chez d'autres espèces, la BSA ne joue aucun rôle dans la capacitation *in vitro* des spermatozoïdes porcins [104]. L'étude des protéines du PS porcine n'est pas très avancée et par conséquent le rôle que joue chacun des facteurs n'est pas connu. Toutefois, il est connu que les protéines présentes dans le PS porcine possèdent une affinité pour l'héparine

(voir tableau III, section 1.10.3), par contre, l'influence qu'a l'héparine sur la capacitation porcine n'a pas été évaluée. Pour de plus amples détails sur le mécanisme de la capacitation porcine se référer à la section 4.7.

1.11 La production porcine

L'insémination artificielle (IA) est une technique utilisée depuis plus de 50 ans [87]. Cette technique est aussi bien utilisée chez les animaux en voie de disparition, chez les animaux de ferme, chez les animaux de laboratoire que chez les humains. Chez les producteurs de porcs, cette technique est la seule qui soit utilisée pour la reproduction car elle diminue les risques de réaction inflammatoire, elle permet un contrôle de la qualité des spermatozoïdes et elle permet l'optimisation du nombre de gestation par truie. Il est important ici de noter que ce sont des facteurs très importants pour l'optimisation de la production porcine. Seulement au Québec, pour l'année 2001, il y a eu 7,1 millions de porcs produits, ce qui représente 829 millions de dollars en exportation et 3,7 milliards de dollars en retombés économiques (FPPQ, Statistique Canada). Puisque la production de porcs est énorme, il est important d'utiliser des techniques de reproduction très efficaces et sans danger pour la santé des animaux afin de pourvoir à la demande de l'industrie alimentaire.

Outre l'IA, la cryoconservation est une autre technique qui est grandement utilisée dans la production d'animaux de consommation. Chez le bovin, on peut garder des éjaculats dilués dans un agent protecteur pour plusieurs semaines, voir des années, à -196°C . Par contre, chez le porc, les éjaculats qui sont congelés et décongelés sont pratiquement inutilisables car le taux de fécondation obtenu à partir de ces spermatozoïdes est trop bas. Des études ont montré que la congélation et/ou le refroidissement des spermatozoïdes induisaient un changement membranaire semblable à celui induit par la capacitation [88-90]. Puisqu'il y a un plus grand nombre de spermatozoïdes capités, il y a une baisse du taux de fécondation qui est observé car les spermatozoïdes n'ont pas le temps

de se rendre au site de fécondation avant que la réaction de l'acrosome n'ait lieu [91, 92]. De plus, une conservation de plus de 5 jours à 15-20°C provoque une baisse du taux de fertilité et une baisse du nombre de porcelets par portée [93, 94].

Puisque la technique de cryoconservation n'est pas optimisée chez le porc, on observe une baisse du taux de fécondation, une baisse du nombre de porcelets par portée et une augmentation du nombre de spermatozoïdes utilisés par dose d'insémination lors de l'IA effectué avec des spermatozoïdes cryoconservés par rapport à l'IA réalisé à l'aide d'un éjaculat frais. Tous ces inconvénients s'expliquent par la baisse de la qualité des spermatozoïdes lors de la conservation de la semence [92, 94]. En 2001, le groupe de Burh a démontré que l'ajout de lipides dans la membrane plasmique du spermatozoïde de porc diminue sa sensibilité au froid. Cependant, ce n'est qu'un pas sur la voie d'optimisation de la cryoconservation des spermatozoïdes de porc [95].

Il y a plusieurs raisons pour lesquelles la cryoconservation des spermatozoïdes de porc doit être développée. Premièrement, il serait possible de garder le matériel génétique d'un individu particulièrement performant sur de longues périodes de temps. Deuxièmement, il serait possible d'échanger le matériel génétique partout à travers le monde. Troisièmement, la cryoconservation des spermatozoïdes permettrait aux agriculteurs de diminuer le nombre de verrats sur leur ferme car un éjaculat pourrait être conservé plus efficacement et produire un plus grand nombre de doses d'insémination. De plus, il faut noter que d'un point de vue environnemental, il serait très avantageux de réduire le nombre de porcs par ferme. Finalement, il serait possible d'optimiser les techniques d'IA.

1.12 Objectifs du projet

Il est connu que le PS des mammifères contient des facteurs stimulant la capacitation et d'autres l'inhibant. Comme il a été mentionné, les protéines BSP stimulent la capacitation des spermatozoïdes bovins. Puisque la protéine pB1

possède une structure similaire à celle des protéines BSP, nous croyons qu'elle joue un rôle similaire à celui joué par les protéines BSP lors de la capacitation des spermatozoïdes bovins. De plus, comme il a été suggéré, nous croyons que la spermadhésine AQN-1 inhibe la capacitation des spermatozoïdes. Par contre, aucune de ces deux affirmations n'a encore été vérifiées.

Le but de mon projet consistait à établir un modèle de capacitation porcine, c'est-à-dire identifier quels sont les activateurs et les inhibiteurs de la capacitation porcine. Le premier objectif était de purifier la protéine pB1 et une spermadhésine présentes dans le PS porcin à l'aide des techniques classiques de chromatographie. Le deuxième objectif était d'établir l'influence de chacune des protéines purifiées sur la capacitation afin d'établir un modèle expliquant les mécanismes impliqués lors de la capacitation des spermatozoïdes porcins.

La compréhension des mécanismes impliqués lors de la capacitation porcine pourrait améliorer les techniques d'IA et de conservation à long terme des spermatozoïdes. Les techniques d'IA étant peu efficaces, chaque fermier doit avoir un bon nombre de verrats pour produire assez de semence pour inséminer chacune des truies. De plus, l'impossibilité de conserver efficacement les spermatozoïdes porcins empêche les agriculteurs d'échanger de la semence entre eux et d'ainsi augmenter la variété génétique de leur troupeau. En connaissant les facteurs qui affectent l'intégrité de la membrane plasmique et la capacitation des spermatozoïdes porcins, l'optimisation de ces techniques serait à la portée de tous.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Matériel

La gélatine (purifiée à partir de la peau de veau) a été achetée chez Eastman Kodak Company (Rochester, New-York, Etats-Unis). Le couplage de la gélatine à l'agarose a été fait comme décrit par Manjunath [40]. Les matrices d'héparine sépharose CL-6B et de Séphadex G-50 sf (super fine) proviennent d'Amersham Bioscience (Baie d'Urfé, Québec, Canada). La p-aminophényl phosphorylcholine provient de Pierce Chemical Co. (Oakville, Ontario, Canada). L'albumine de sérum bovin (BSA) et les adjuvants de Freund (complet et incomplet) proviennent de Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, Ontario, Canada). Tous les produits utilisés pour les électrophorèses sur gel de polyacrylamide ainsi que l'anticorps de chèvre anti-IgG de lapins couplés à la peroxydase provenaient de la compagnie BioRad Laboratories Ltd. (Mississauga, Ontario, Canada). Les membranes de fluorure de polyvinyle P (PVDF, Immobulon P) ont été achetées chez Millipore Corporation (Bedford, Massachusetts, États-Unis). Les réactifs de chimiluminescence ont été achetés chez NEN Life Science Products Inc. (Boston, Massachusetts, États-Unis). Les films utilisés étaient de marque Fuji Medical X-Ray (Christie Ltee, St-Eustache, Québec, Canada). Les membranes à dialyse provenaient de Spectrum Laboratories inc. (Rancho Dominguez, Californie, Etats-Unis).

Tous les autres produits chimiques utilisés ont été achetés chez des fournisseurs commerciaux et étaient de grades analytiques.

2.2 Méthodes

2.2.1 Précipitation à l'éthanol des protéines du plasma séminal porcin

Le plasma séminal de porc a été obtenu en centrifugeant un éjaculat complet à 1 500 x g à la température de la pièce pendant 15 min. Le surnageant a été centrifugé à 14 000 x g à la température de la pièce durant 15 min. Ce deuxième surnageant correspond au PS. Neuf volumes d'éthanol 95% à - 20°C ont été ajoutés au PS pour précipiter les protéines totales. Après une heure d'agitation, les protéines ont été récupérées en centrifugeant durant 10 min à 10 000 x g. Le précipité obtenu a été lavé deux fois à l'éthanol avant d'être lyophilisé [34].

2.2.2 Chromatographie

Toutes les chromatographies ont été effectuées à 4°C à moins d'indication contraire. Avant d'être déposés sur une colonne chromatographique, les échantillons ont toujours été centrifugés 10 min à 10 000 x g pour éliminer toutes les particules qui seraient susceptibles de bloquer la colonne. Sauf indication contraire, les protéines étaient détectées par spectrophotométrie à 280 nm.

2.2.2.1 Affinité à la gélatine

Les protéines totales du PS porcin précipitées à l'éthanol ont été dissoutes dans du tampon PB 50 mM (Na_2HPO_4 81,2 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 18,9 mM, pH 7,4) et placées sur une colonne gélatine-agarose (2,5 x 22 cm) préalablement équilibrée avec du tampon PB 50 mM. Le tampon utilisé afin d'éluer les protéines adsorbées était du PBS (PB contenant 150 mM de NaCl) dans un premier temps et du PBS-urée 7 M dans un deuxième temps. Le débit de la colonne était de 75 ml/h et les fractions collectées avaient un volume de 5 ml.

Dans une deuxième série d'expériences, les protéines du PS de porc diluées dans du tampon PB 50 mM étaient placées sur colonne gélatine-agarose (1 x 20 cm) reliée à un système de chromatographie liquide à haute vitesse (FPLC). Le débit était de 30 ml/h et les fractions récoltées avaient un volume de 1 ml. Un gradient de tampon PBS-urée 7 M a été utilisé lors de l'élution des protéines adsorbées.

2.2.2.2 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (rpHPLC)

Ces expériences ont été réalisées à la température de la pièce. Les protéines totales du PS de porc précipitées à l'éthanol (entre 0,01 et 1 mg), les protéines adsorbées ou les protéines non-adsorbées ont été dissoutes dans du tampon acide trifluoroacétique 0,1% (TFA) dans de l'eau et appliquées sur colonne Vydac C4, Vydac C18 et/ou Vydac diphényl (0,4 x 25 cm, 300 Å, 5 µm) sur un système Beckman Gold. Le tampon A était du TFA 0,1% ou acide n-heptafluorobutyrique anhydre 0,1% (HFBA) dans de l'eau et le tampon B était du TFA 0,1% ou HFBA 0,1% dans de l'acétonitrile (ACN). Le gradient d'élution utilisé pour chacune des expériences est décrit dans la légende des figures. Avant d'être chargés sur la colonne, les échantillons ont été filtrés sur filtre de 0,2 µm. Les protéines ont été détectées à 235 nm.

2.2.2.3 Affinité à l'héparine et la phosphorylcholine

Le PS de porc a été directement déposé sur une colonne (1,5 x 26 cm) d'héparine sépharose CL-6B préalablement équilibrée avec du TBS pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM et 0,025% azide de sodium) et les protéines adsorbées ont été éluées à l'aide d'un gradient de NaCl (0 à 1,5 M en 400 ml). Les fractions collectées avaient un volume de 4 ml. Le débit de la colonne était de 45 ml/h [61].

Les fractions adsorbées étaient combinées, dialysées dans du tampon TBS pH 7,4 et passées sur colonne p-aminophényl phosphorylcholine (1 x 5,6 cm). Le débit était de 15 ml/h. Les fractions collectées avaient un volume de 1 ml. Les tampons utilisés étaient du TBS pH 7,4 et du TBS-PPC 10 mM pour l'élution des protéines adsorbées. Finalement, les fractions adsorbées sur colonne p-aminophényl phosphorylcholine étaient passées sur rpHPLC.

2.2.2.4 Exclusion de taille Séphadex G-50 sf

Le PS de porc a été déposé sur une colonne Séphadex G-50 sf (2,5 x 90 cm). Dans un premier temps, la chromatographie a été effectuée en condition neutre en utilisant du tampon PBS 50 mM pH 7,4 et dans un deuxième temps en condition acide avec l'utilisation d'acide acétique 50 mM pH 4. Le débit de la colonne était de 30 ml/h. Les fractions collectées avaient un volume de 4 ml. À pH neutre, les fractions correspondant au pic D (figure 15) ont été combinées et analysées sur rpHPLC.

À pH acide, ce sont les fractions correspondant au pic F (figure 19) qui ont été combinées et passées sur colonne gélatine-agarose (1 cm x 20 cm). Le tampon d'équilibration était du PB 50 mM pH 7,4 et le tampon d'élution était du PBS 50 mM-urée 7 M. Le débit de la colonne était de 30 ml/h et les fractions collectées avaient un volume de 4 ml. La pureté des protéines a été vérifiée par rpHPLC.

2.2.3 Synthèse d'un peptide et conjugaison

Un peptide correspondant aux 15 acides aminés (TVTPNYDRDRAWKYC) carboxy-terminaux de la protéine pB1 a été synthétisé et conjugué à la protéine KLH (Keyhole limpet hemocyanin) au Centre de Biotechnologie Sheldon (Montréal, Québec, Canada).

2.2.4 Production d'anticorps polyclonaux contre la protéine pB1

Deux lapins mâles de race Nouvelle-Zélande ont été injectés à huit reprises avec 200 µg de la protéine KLH couplée au peptide pB1. Pour les injections, le peptide était dissout dans 500 µl de NaCl 0,9% et de l'adjuvant de Freund incomplet (50%, v/v), excepté pour la première injection où l'adjuvant utilisé était complet. Étant donné la grande viscosité de l'adjuvant, l'échantillon a été émulsifié une dizaine de fois avant d'être injecté afin de s'assurer que la préparation était homogène. Les immunisations ont eu lieu à tous les 10-15 jours et des prises de sang (environ 10 ml) ont eu lieu 10 jours après l'injection afin de titrer les anticorps sériques à l'aide de la technique d'immunobuvardage de type Western. Le sang obtenu lors des prises de sang était laissé à la température de la pièce durant 2-3 h avant d'être placé à 4°C pour 3 à 5 h. Suite à cette incubation, le sérum a été séparé par centrifugation à 1 000 x g pendant 10 min. Ensuite, le surnageant était centrifugé à 10 000 x g pendant 10 min afin d'enlever tous les débris cellulaires. Le surnageant obtenu par cette deuxième centrifugation correspondait à le sérum immun et était aliquoté et congelé à -80°C. Une fois, la production d'anticorps terminée, les lapins ont été anesthésiés et sacrifiés par ponction cardiaque. La spécificité des anticorps a été vérifiée par immunobuvardage de type Western à une dilution de 1/1000. Le sérum immun de la première prise de sang a été utilisé lors des immunobuvardages de type Western (adapté de [96]).

2.2.5 Électrophorèse

2.2.5.1 Gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE)

Les gels de polyacrylamide (15%) étaient faits en utilisant l'appareil Mini-Protean 3 de BioRad. L'agent réducteur utilisé était le β-mercaptoéthanol. Le tampon de chargement utilisé était celui décrit par Laemmli [97]. Le temps d'électrophorèse était de 1 h à 200 V et les protéines du gel ont été colorées au

bleu de Coomassie R-250 (adapté de [97]). Les poids moléculaires ont été estimés par rapport à une courbe d'étalonnage (trousse de faible poids moléculaire de Amersham Biosciences : phosphorylase b (94 kDa), albumine (67 kDa), ovalbumine (43 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), inhibiteur de trypsine (20 kDa) et α -lactalbumine (14 kDa)).

2.2.5.2 Coloration au nitrate d'argent

Après l'électrophorèse, le gel a été fixé 20 min dans la solution de fixation (méthanol 50%, acide acétique 10%, glycérol 0,25%). Ensuite, le gel a été plongé 2 fois dans de l'eau pendant 10 min. Pendant que le deuxième lavage du gel s'effectuait, une solution fraîche a été préparée contenant 2 ml de solution A (2% nitrate d'argent, 2% nitrate d'ammonium), B (10% acide tungstosilique) et C (3% formaldéhyde) étaient mélangés à 14 ml d'eau distillée et à 20 ml de solution de développement (5% carbonate de sodium). Après le lavage le gel était immédiatement incubé dans cette solution pour une période variant de 10 à 15 min, dépendant de la vitesse du développement. Une fois la production de couleur complétée, le gel était placé dans le réactif d'arrêt (5% d'acide acétique) (adapté de [98]).

2.2.5.3 Immunobuvardage de type Western

Suite au SDS-PAGE, le transfert des protéines du gel d'acrylamide vers la membrane de PVDF était effectué durant la nuit à 0,7 A à 4°C dans du tampon de transfert (tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20% v/v). Après un blocage de 2 h dans du tampon PBS-Tween BSA 1,1% (PBS 50 mM, BSA 1,1% (w/v) et Tween-20 0,5% (v/v)) la membrane était incubée avec le sérum immun contre pB1 dilué dans du tampon PBS-Tween BSA 0,1% pendant 1 h. Ensuite, la membrane était lavée quatre fois avec du tampon PBS-Tween BSA 0,1% et était incubée 1 h avec l'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-IgG de lapins couplées à la

péroxidase). Finalement, la membrane était lavée trois fois avec du tampon PBS-Tween BSA 0,1% et les anticorps ont été détectés à l'aide des réactifs de chimiluminescence. Suite à l'exposition, les membranes étaient colorées à l'amido black (amido black 10B 0,1% (w/v), isopropanol 25% (v/v), acide acétique 10% (v/v)) [99].

2.2.6 Dialyse

Les membranes à dialyse utilisées avaient des pores laissant passer les molécules de tailles inférieures à 5-8 kDa. Les dialyses étaient faites dans du bicarbonate d'ammonium 50 mM ou dans de l'acide acétique 50 mM. Les échantillons placés dans la membrane ont été mis à 4°C dans un volume de tampon 100 fois plus grand pour environ 4 h. Cette dernière étape était répétée quatre fois.

2.2.7 Analyse des fonctions spermatiques

2.2.7.1 Prélèvement des tissus et récupération des spermatozoïdes

Les testicules étaient prélevés sur des verrats fraîchement abattus à un abattoir régional. Pour maintenir le plus possible la température à 39°C, les testicules étaient transportés dans un contenant isolant jusqu'au laboratoire. Environ 1 h après le prélèvement, les spermatozoïdes ont été récupérés de la partie caudale de l'épididyme en pratiquant une petite incision dans l'épididyme et en appliquant une légère pression pour faire sortir les spermatozoïdes. Ces derniers ont été centrifugés (350 x g pendant 10 min) deux fois dans 10 volumes de BTS (Beltsville Thawing Solution, D-glucose (+) 0,2 M, citrate de sodium 20 mM, NaHCO₃ 15 mM, Na₂EDTA 3,36 mM, chlorure de potassium 10 mM, hepes 20 mM, pH ajusté à 7,4 avec du NaOH) [95].

2.2.7.2 Capacitation des spermatozoïdes

Suite au lavage, les spermatozoïdes ont été resuspendus dans du milieu BTS (non-capacitant) à une concentration de 80×10^6 spermatozoïdes/ml. Un aliquot de 0,5 ml de cette dilution a été incubé 20 minutes avec 0,5 ml d'une solution de protéines diluées dans le BTS. Les concentrations utilisées pour chacune des protéines sont indiquées dans la section résultats. Les spermatozoïdes ont ensuite été lavés dans 10 volumes de milieu BTS et resuspendus dans du milieu Tyrode pH 7,4 (NaCl 96 mM, KCl 3,1 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 0,4 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, rouge de phénol 10 µg/ml, hepes 20 mM, D-glucose (+) 5 mM, NaHCO₃ 15 mM, lactate de sodium 21,6 mM, pyruvate de sodium 1 mM, CO₂ 5%), à une concentration de 40×10^6 spermatozoïdes/ml. Il est à noter que le lactate de sodium et le pyruvate de sodium ont été ajoutés avant l'utilisation. Le milieu a été équilibré au moins 1 h à 39°C dans un milieu humidifié et contenant 5% de CO₂ avant que le pH ne soit ajusté à 7,4 avec du NaOH. Les spermatozoïdes étaient incubés dans ce milieu capacitant pendant 3 h à 39°C dans un environnement humide contenant 5% de CO₂. Après 0, 1,5 et 3 h d'incubation 100 µl de la suspension de spermatozoïdes étaient incubés avec 1 µl d'ionophore calcique A23187 (0,2 µM dans du DMSO) ou avec 1 µl de DMSO pendant 30 min. Suite à cette incubation, l'état de capacitation des spermatozoïdes a été évalué à l'aide de la coloration à la chlortétracycline (CTC). La viabilité a été observée à l'aide de la coloration éosine/nigrosine [95].

2.2.7.3 Coloration à la chlortétracycline (CTC)

La solution de CTC a été préparée en ajoutant 5 mM de cystéine et 750 µM de CTC à une solution de tampon TN (20 mM Tris base, 130 mM de NaCl; pH 7,4). Le pH a été ajusté à 7,8 avec du NaOH 0,1 N. Les lames ont été préparées en ajoutant 15 µl de la suspension de spermatozoïdes à 22,5 µl de solution de CTC et 0,75 µl de glutaraldéhyde 12,5% (v/v dans du Tris Base 2,5 M). Deux fois 15

µl de ce mélange ont été placés sur une lame préchauffée à 39°C et a ensuite été recouvert d'une lamelle. Chacune des lames a été faite en duplicata. Les lames ont été conservées dans une chambre humide et opaque à 4°C jusqu'à leur lecture. À l'aide d'un microscope à fluorescence (Leitz Diaplan, filtre pour FITC, 100X sous immersion), les spermatozoïdes ont été évalués sous immersion selon trois profils de fluorescence : F, B et AR (figure 8). Le profil F correspond aux spermatozoïdes normaux (la tête est uniformément fluorescente). Le profil B correspond aux spermatozoïdes capacités (la partie post-acrosomique est fluorescente) et le profil AR correspond aux spermatozoïdes acrosome réagi (seul le segment équatorial est fluorescent). Au total, 200 cellules ont été comptées sur chacune des lames (soit 100 cellules par duplicata) [95]. Lors de l'analyse des résultats, le pourcentage de spermatozoïdes capacités correspond aux spermatozoïdes AR en présence d'ionophore dont les spermatozoïdes AR en absence d'ionophore avaient été soustraits, puisqu'ils correspondaient aux spermatozoïdes spontanément AR.

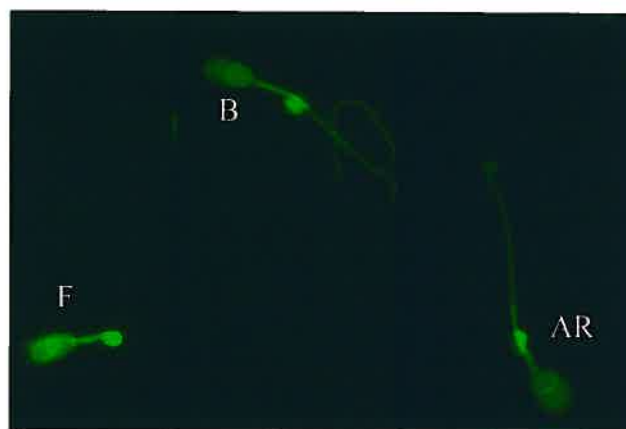


Figure 8: Profils de fluorescence des spermatozoïdes colorés au CTC. Spermatozoïde normal (F), Spermatozoïde capacité (B), Spermatozoïde acrosome réagi (AR)

2.2.7.4 Test de viabilité

La viabilité des spermatozoïdes a été évaluée avec la coloration éosine B/nigrosine (une part d'éosine B 5% (w/v) pour une part de nigrosine 10% (w/v)). Un aliquot de 15 µl de la suspension de spermatozoïdes étaient mélangés avec 15 µl de la solution éosine B/nigrosine. Le mélange était ensuite étalé sur une lame préchauffée à 39°C. Chacune des lames était préparée en duplicata. À l'aide du microscope optique (100X), 200 cellules étaient comptées sur chacune des lames. Les spermatozoïdes blancs étaient comptabilisés comme vivants et les spermatozoïdes roses étaient identifiés comme morts [24].

2.2.7.5 Statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS 10,0 pour Windows. Les résultats de capacitation ont été analysés à l'aide d'une ANOVA pour vérifier l'homogénéité des données et un test LSD (protected Fisher least significant difference) a été fait pour identifier les différences entre les traitements. Une valeur de $P < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. Avant l'analyse, les données de capacitation avec la protéine AQN-1 ont été transformées en pourcentage de spermatozoïdes capités du temps 0 h en absence de protéine (le temps 0 h et 0 µg est égal à 100%).

3 Résultats

3.1 Purification par affinité à la gélatine

Comme il a été mentionné dans l'introduction, les protéines BSP jouent un rôle très important dans l'induction et la régulation de la capacitation des spermatozoïdes bovins [100]. Puisque le but de mon étude était de déterminer si le modèle de capacitation bovine par les protéines BSP peut s'appliquer chez le porc, la première étape était de purifier l'homologue porcin des protéines BSP, soit la protéine pB1. Les protéines BSP et leurs homologues sont purifiés en utilisant leur affinité de liaison à la gélatine [40, 57].

Dans le but de purifier la protéine pB1, une chromatographie d'affinité à la gélatine a été faite en utilisant comme produit de départ les protéines totales du PS porcin précipitées à l'éthanol. La première étape a été de dissoudre les protéines précipitées dans du tampon PBS 50 mM. Toutefois, même dans un grand volume de tampon (10 ml), les 300 mg de protéines n'étaient que partiellement solubles. Les protéines insolubles étaient séparées par centrifugation et le surnageant contenant les protéines solubilisées était déposé sur la colonne gélatine-agarose.

Tel que montré à la figure 9, les protéines non-adsorbées éluent en deux pics (pics A et B) tandis que les protéines adsorbées (pic D) sont éluées avec du tampon PBS 50 mM-urée 7 M. Une analyse des fractions sur gel SDS-PAGE 15% (figure 9, mortaise) indique qu'aucune des fractions n'est pure. En fait, les fractions A, B et D semblent contenir les mêmes deux protéines majoritaires (d'un poids moléculaire d'environ 15 et 18 kDa). De plus, si on compare au témoin (produit de départ, Ctrl), il semble qu'aucune séparation n'ait été obtenue. Seule la fraction C semble contenir une seule protéine majoritaire. Toutefois, en tenant compte de la proportion des pics, la fraction C ne contient qu'une très faible quantité de protéines et la présence de traînées indique que la protéine n'est pas pure. Étant présente en quantité infime et puisque les étapes subséquentes de la

purification entraînent inévitablement une perte de protéine, il ne valait pas la peine de poursuivre notre étude sur cette fraction. De plus, les études antérieures ont démontré que la protéine d'intérêt, pB1, a une affinité pour la gélatine, donc normalement, elle devrait se retrouver dans la fraction correspondant aux protéines adsorbées (pic D, figure 9) [61]. Il est à noter qu'aucune protéine n'a été observée sur le gel SDS-PAGE à un poids moléculaire inférieur à 14 kDa bien que la protéine pB1 et la majorité des spermadhésines aient un poids moléculaire entre 11 et 13 kDa.

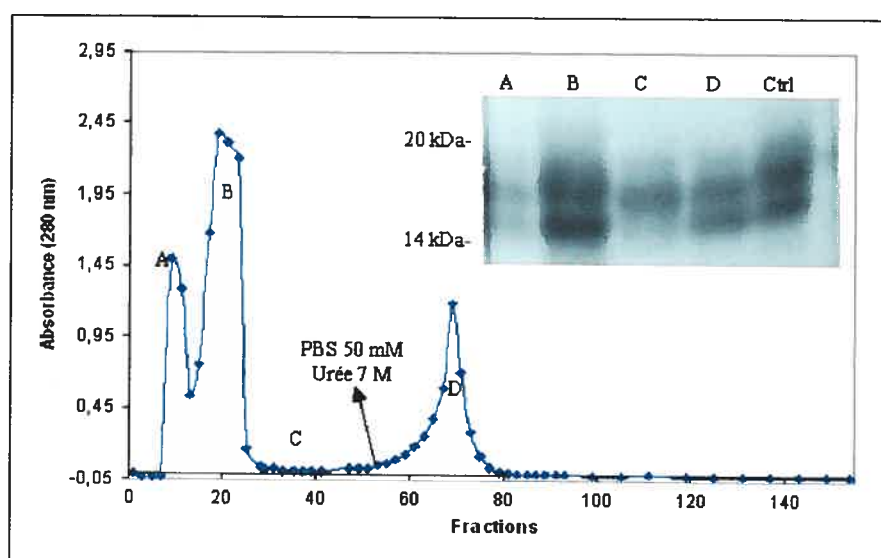


Figure 9: Chromatographie d'affinité sur gélatine-agarose des protéines du PS porcine (colonne de 2,5 x 22 cm). 300 mg de protéines totales du PS porcine précipitées à l'éthanol ont été dissoutes dans 10 ml de tampon PB 50 mM et la fraction soluble a été déposée sur la colonne. Les fractions récoltées avaient un volume de 5 ml et le débit était de 75 ml/h. Pour l'élution, du tampon PBS 50 mM-urée 7 M a été utilisé. L'électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% montre le patron de migration des différentes fractions (5 µg de protéines ont été déposés sur le gel). Le gel a été coloré au nitrate d'argent. Ctrl, 10 µg de protéines totales du PS précipitées à l'éthanol.

Puisqu'il semblait y avoir au moins deux protéines majeures dans la fractions adsorbées (pic D, figure 9) un gradient d'urée a été utilisé dans l'expérience suivante, afin de séparer les deux protéines adsorbées. Le même

échantillon de départ a été utilisé, soit les protéines totales du PS porcin précipitées à l'éthanol dissoutes dans du tampon PB. Afin d'obtenir un gradient d'urée très flexible et très précis, nous avons relié notre colonne gélatine-agarose à un système de chromatographie FPLC.

L'utilisation d'un gradient d'urée nous a permis de séparer la fraction adsorbée en deux pics distincts (figure 10, pics B et C). Comme on peut le voir sur le gel SDS-PAGE de la figure 10 (mortaise), les fractions B et C obtenues après le début du gradient d'urée sont formées elles aussi d'au moins deux protéines ayant un poids moléculaire compris entre 14 et 20 kDa. Donc, le gradient d'urée ne permet pas de séparer les protéines adsorbées sur gélatine.

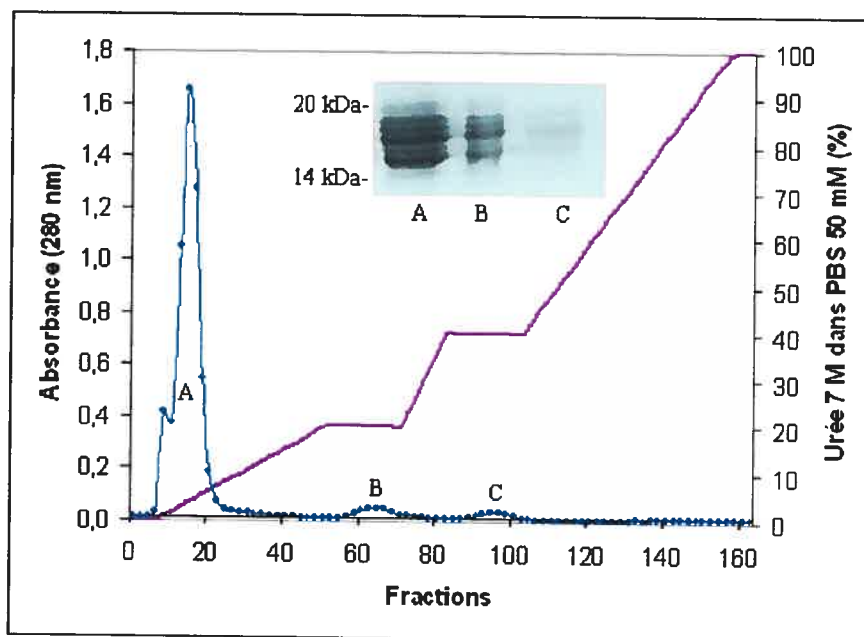


Figure 10: Chromatographie d'affinité sur gélatine-agarose de protéines du PS porcin avec un gradient d'urée. Environ 24 mg de protéines totales du PS porcin précipitées à l'éthanol ont été utilisées pour cette expérience et toutes les protéines dissoutes dans 3 ml de tampon PB 50 mM ont été déposées sur la colonne (1 x 20 cm) après une centrifugation. Les protéines ont été éluées avec un gradient d'urée tel qu'indiqué sur la figure. Les fractions récoltées avaient un volume de 1 ml et le débit de la colonne était de 30 ml/h. 10 µg de protéines ont été analysés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE 15% pour chacune des fractions. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie R-250.

Puisque la gélatine semblait séparer deux protéines dans les fractions adsorbées, nous avons pensé faire une chromatographie en phase inverse (rp) sur HPLC afin de séparer ces protéines. Les fractions B et C ont été dialysées contre de l'ammonium bicarbonate avant d'être lyophilisées. Les protéines lyophilisées des pics B et C ont été dissoutes dans du TFA 0,1% et elles ont été chromatographiées sur colonne Vydac C4 sur rpHPLC (figure 11). Les deux chromatogrammes ont démontré que les fractions contiennent plus d'une protéine. Même en essayant d'autres gradient, les séparations ne pouvaient être meilleures que celles présentées à la figure 11 (données non montrées). Cette observation s'explique par le fait que la base des pics sont superposés les unes aux autres et que l'élution commence à la même concentration de tampon B, ainsi même en ralentissant le gradient, l'élution commence toujours en même temps.

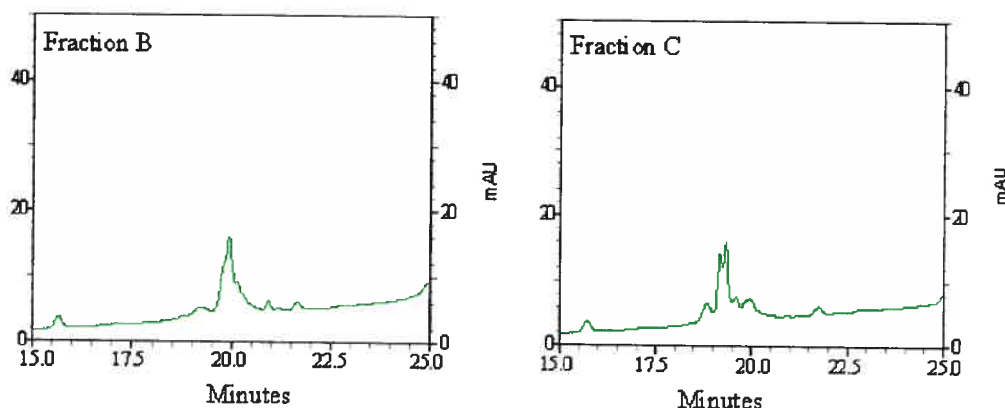


Figure 11: Chromatogramme de rpHPLC des fractions adsorbées sur gélatine-agarose. 10 μg de protéines ont été analysés pour chacune des fractions. Le tampon A est du TFA 0,1% dans de l'eau et le tampon B est du TFA 0,1% dans de l'ACN. La colonne utilisée est de type Vydac C4 (0,4 X 25 cm; 300 Å; 5 μm) sur un système Beckmann Gold. Un gradient isocratique de 5 min à 25% suivi de 35 min à 1%/min a été utilisé. 10 μg de protéines ont été injectés sur la colonne.

3.2 Autres chromatographies d'affinité

Puisque la technique utilisée pour la purification des homologues aux protéines BSP ne semblait pas fonctionner pour purifier la protéine pB1, d'autres approches chromatographiques ont été employées.

Étant la plus simple et la plus rapide, la première technique alternatives utilisée fut la chromatographie sur HPLC. Plusieurs conditions de chromatographies sur HPLC ont été essayées pour séparer les protéines du PS porcin. Les protéines précipitées à l'éthanol étaient dissoutes dans du TFA 0,1% ou du HFBA 0,1% et étaient ensuite passées sur colonne Vydac C4, Vydac C18 et sur Vydac diphenyl. Plusieurs gradients ont été utilisés, mais aucun n'est parvenu à isoler une protéine (données non montrées). Indépendamment des conditions d'élution, le chromatogramme obtenu était toujours sensiblement le même (exemple figure 11), soit un enchevêtrement d'une dizaine de pics dans la région correspondant à 40% de tampon B.

Comme les données disponibles dans la littérature indiquaient que la protéine pB1 (notre protéine d'intérêt) était l'homologue aux protéines BSP et qu'elle liait l'héparine, la deuxième technique essayée fut une chromatographie d'affinité à l'héparine [72]. En fait, un article publié par la groupe de Calvete [61] proposait de purifier la protéine pB1 en utilisant la combinaison de deux colonnes d'affinités, soit une première sur héparine-sépharose et une deuxième sur p-aminophényl phosphorylcholine.

Le PS porcin a été déposé directement sur une colonne d'héparine sépharose CL-6B. En regardant le patron d'élution, à la figure 12, on observe que trois fractions ont été éluées à une même concentration de NaCl (0,75 M). L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide montre qu'encore une fois chaque fraction contient plusieurs protéines de poids moléculaires différents. Les protéines de la fraction C ne sont pas visibles car une quantité trop faible de

protéine a été utilisée pour être détectées au bleu de Coomassie. Sachant que pB1 lie l'héparine, les protéines des fractions A et B n'ont pas été étudiées davantage [61, 72]. Pour tenter de purifier les protéines des fractions C et D, ces fractions ont été dialysées contre du tampon TBS 50 mM avant d'être passées sur une colonne p-aminophényl PPC. Pour chacune des deux fractions, une très faible quantité de protéines a été adsorbée sur la colonne (figure 13, pic I et M). La fraction E n'a pas été étudiée car, selon le patron d'électrophorèse (figure 12) et le chromatogramme de rpHPLC (figure 14), cette fraction contient les mêmes protéines que la fraction D, mais en plus faible quantité. Le but de notre étude était de purifier la protéine pB1, par conséquent une protéine qui lie à la fois l'héparine et la PPC. Puisque les fractions F, G, H, J, K et L ne lient pas la PPC, les protéines contenues dans ces fractions n'étaient pas intéressantes pour nous.

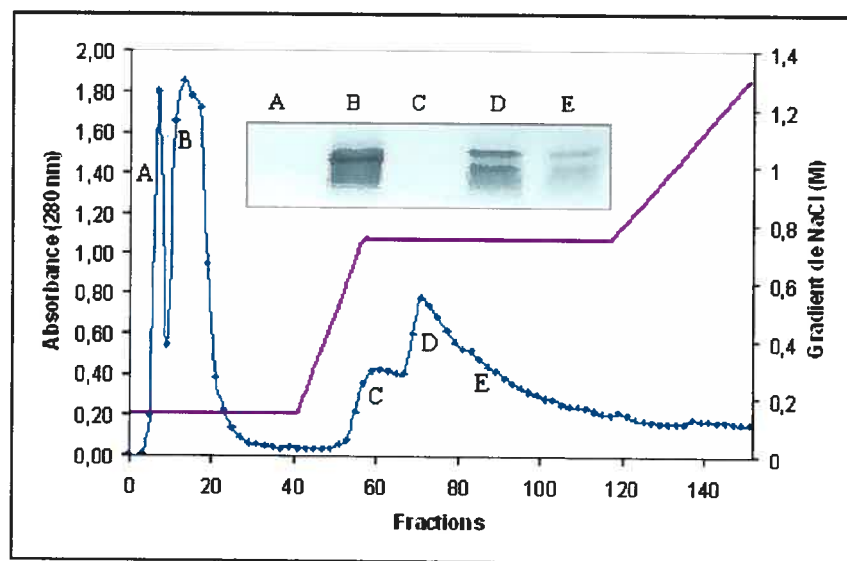


Figure 12: Chromatographie d'affinité à l'héparine du PS porcine. 10 ml (~ 3 mg de protéines) de PS porcine, préalablement centrifugé à 10 000 x g durant 10 min, ont été placés sur la colonne héparine-sépharose CL-6B (1,5 x 26 cm). Le débit était de 45 ml/h et les fractions récoltées avaient un volume de 4 ml. L'éluion c'est fait avec un gradient de NaCl dans du tampon TBS. Le gel d'électrophorèse SDS-PAGE 15% a été coloré au bleu de coomassie (10 µg de protéines lyophilisées a été déposés pour chacune des fractions).

À la figure 13, le patron de migration sur gel SDS-PAGE 15% de chacune des fractions obtenues par chromatographie d'affinité à la p-aminophényl PPC est

représenté. Les fractions F, G H, I et J contiennent encore une fois plusieurs protéines ayant une taille d'environ 15 kDa. Les fractions K, L et M ne contiennent pas assez de protéines pour qu'elles soient détectées au bleu de Coomassie.

Une analyse par rpHPLC de toutes les fractions obtenues lors de la chromatographie sur héparine ainsi que les fractions adsorbées obtenues avec la colonne p-aminophényl PPC est montrée à la figure 14. La protéine majeure des fractions, I et M, a été purifiée par rpHPLC (figures 13 et 14), malheureusement, une fois lyophilisé, une trop petite quantité a été obtenue pour qu'une analyse par spectrométrie de masse ou par dégradation d'Edman soit effectuée. Bien qu'il soit fort probable que la protéine purifiée dans les fractions I et M soit pB1, puisque c'est une protéine qui lie à la fois l'héparine et la PPC et qu'elle a un poids moléculaire apparent d'environ 14,5 kDa, cette méthode de purification a été abandonnée car il était impossible d'identifier la ou les protéines purifiées. La quantité de protéines obtenues par cette méthode de purification étant insuffisante, une autre technique de purification a été essayée.

3.3 Purification sur tamis moléculaire

3.3.1 À pH neutre

Puisque les techniques précédemment décrites étaient longues et ne permettaient pas de purifier la protéine pB1, une nouvelle approche a été essayée afin de purifier pB1. Étant donné que les protéines du PS porcin semblent former des complexes, la chromatographie par exclusion de taille a été tentée [72] [77]. De cette façon, nous croyions pouvoir isoler des complexes et par la suite, briser les interactions protéines-protéines ce qui pourrait nous permettre d'isoler pB1.

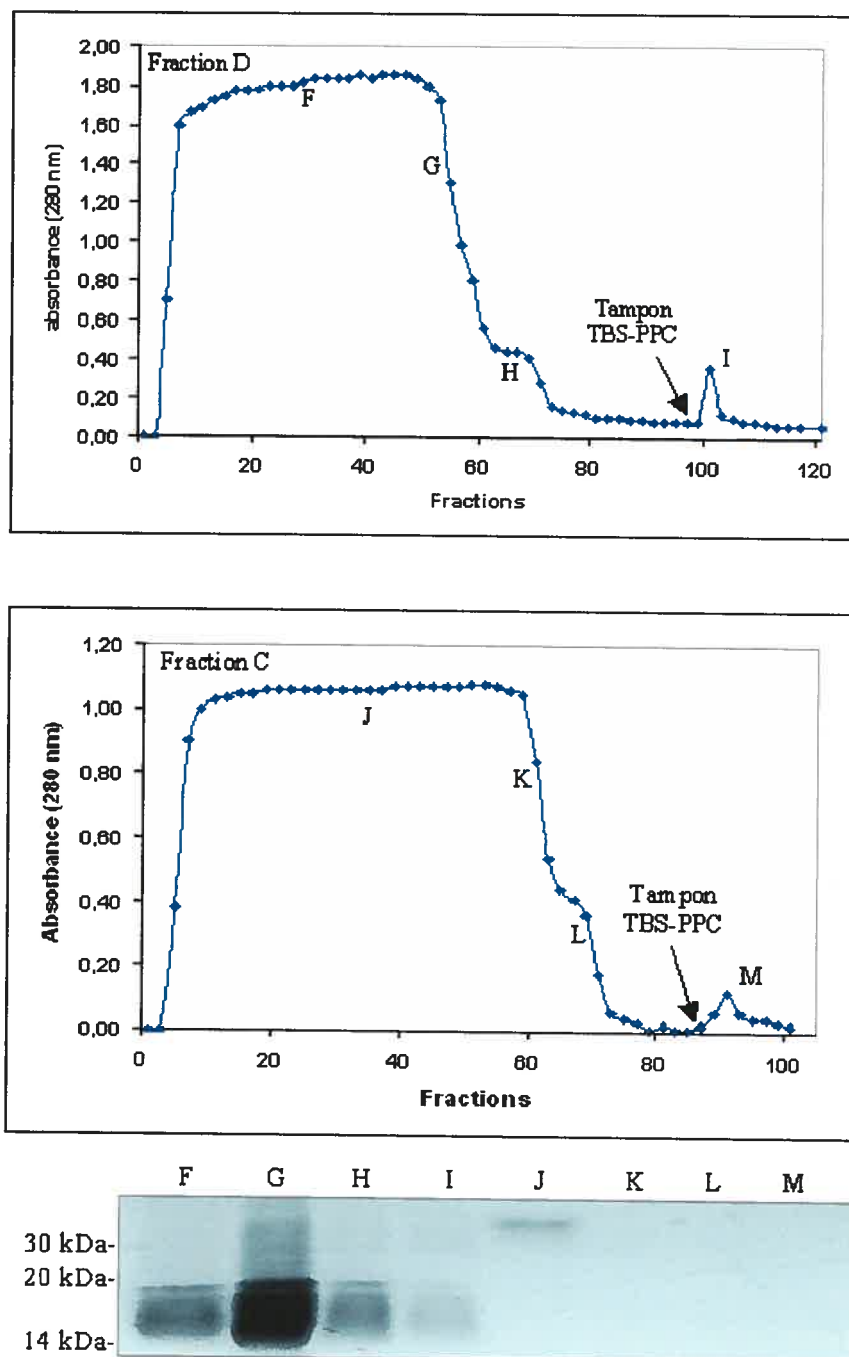


Figure 13: Chromatographie d'affinité sur colonne p-aminophényl PPC des fractions adsorbées sur héparine-sépharose. La colonne (1 x 5,6 cm) avait un débit de 15 ml/h et les fractions récoltées avaient un volume de 1 ml. Le tampon utilisé était du TBS et du TBS-PPC 10 mM pour l'éluion. Le gel SDS-PAGE 15% a été coloré au bleu de coomassie R-250. Pour les fractions F à J, 10 µg de protéines ont été déposés sur gel contrairement à 5 µg pour les autres fractions.

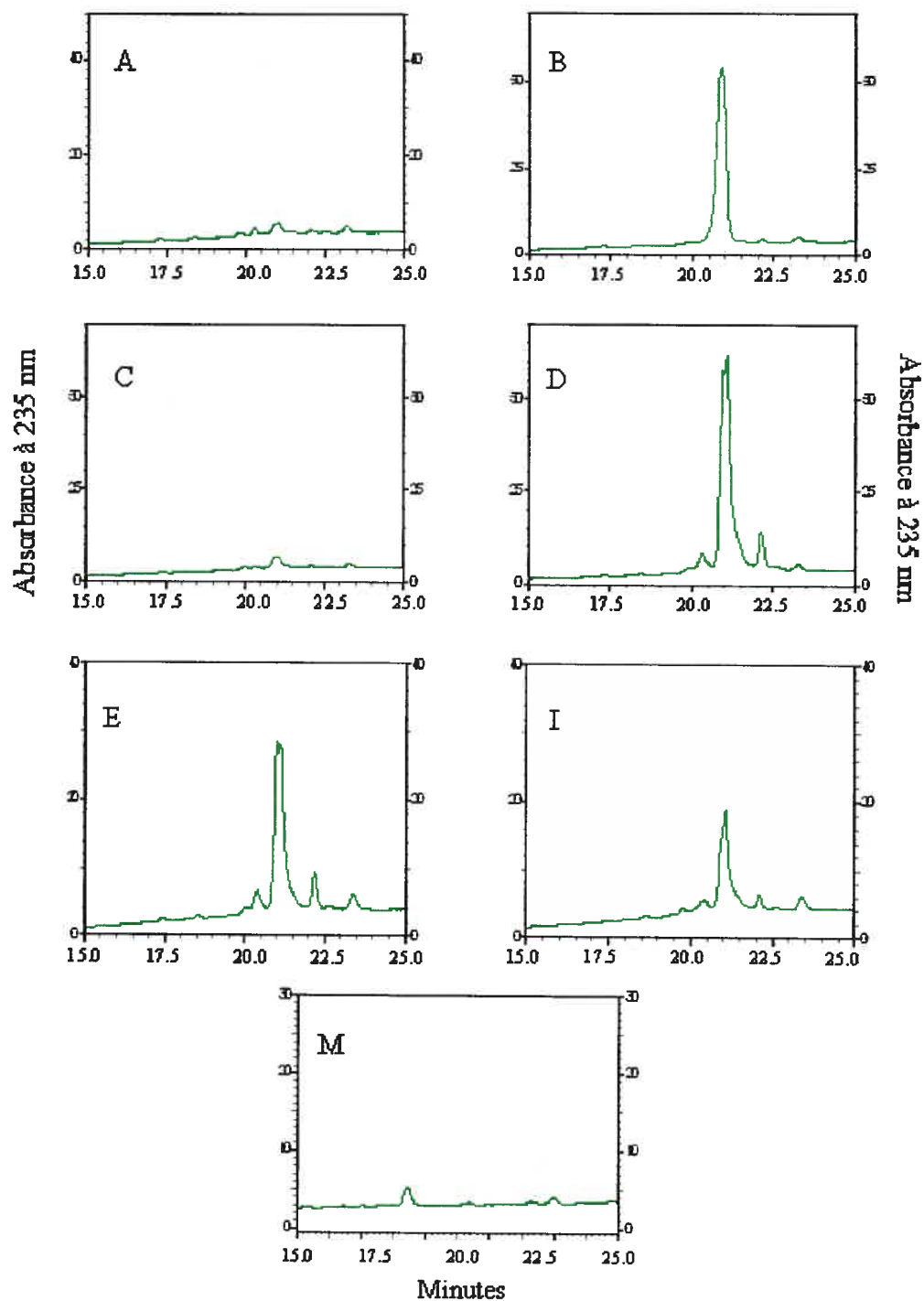


Figure 14: Analyse par rpHPLC des fractions obtenues par affinité à l'héparine et à la PPC. La colonne utilisée était de type Vydac C18 (0,4 x 25 cm; 300 Å; 5 µm) sur un système Beckman Gold. Le tampon A était du TFA 0,1% dans de l'eau et le tampon B était du TFA 0,1% dans de l'ACN. Le gradient utilisé était un isocratique de 5 min à 25%, suivi de 10 min à 1 %/min et de 60 min à 0,25 %/min. Entre 10 et 50 µg de protéines ont été injectés sur la colonne.

Une chromatographie sur colonne Séphadex G-50 sf a été effectuée dans les conditions physiologiques, soit avec du tampon PBS 50 mM pH 7,4. Trois millilitres (~ 90 mg de protéines totales) de PS ont été déposés directement sur la colonne. Comme montré à la figure 15, 5 pics d'éluion ont été observés. Chacune des fractions fut analysée par SDS-PAGE (figure 15, mortaise). Les fractions A, B et C contenaient plusieurs protéines possédant une taille d'environ 14 kDa et toutes étaient présentes dans des ratios similaires. Par contre, la fraction D contenait une protéine majoritaire ayant un poids moléculaire d'environ 14 kDa, très près de celui de la protéine pB1. La fraction E semble contenir uniquement des pigments puisque la détection se fait seulement par spectrophotométrie.

Une chromatographie sur rpHPLC a été faite afin de purifier la protéine majoritaire de la fraction D (figure 16). Pour ce faire, la fraction D a été dialysée dans de l'acide acétique 50 mM avant d'être lyophilisée. Les protéines ont été dissoutes dans du TFA 0,1% dans de l'eau avant d'être injectées sur une colonne de type Vydac C18. Des fractions de 200 µl ont été collectées, ce qui a permis de purifier complètement la protéine majoritaire. Cette fois, une assez grande quantité (300 µg) de protéines a été obtenue pour permettre le séquençage par dégradation d'Edman. En comparant la séquence des 15 premiers acides aminés obtenue avec celles répertoriées dans la base de donnée de Swiss Prot, une identité de 93% a été trouvée avec la spermadhésine AQN-1 (figure 17). En fait, outre le neuvième résidu, la séquence obtenue est identique à la séquence de AQN-1. Sachant que la dégradation d'Edman n'identifie pas les cystéines et que le neuvième résidu en est probablement une on peut affirmer que la chromatographie sur tamis moléculaire à pH neutre permet la séparation de la spermadhésine AQN-1. Le poids moléculaire de la spermadhésine AQN-1 obtenue, ~14 kDa, est similaire à celui qui avait été publié, soit 11,9 kDa [72]. Donc, au lieu de purifier la protéine pB1, cette méthode nous a permis de purifier la spermadhésine AQN-1.

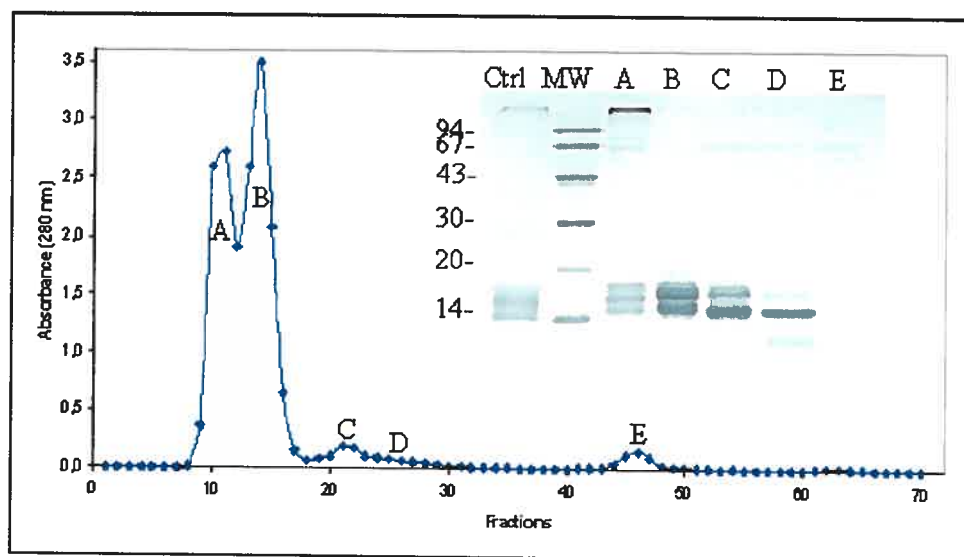


Figure 15: Chromatographie d'exclusion de taille sur Séphadex G-50 sf du PS porcin à pH neutre. 3 ml de PS porcin (~ 90 mg) ont été déposés sur la colonne (2,5 x 90 cm). La colonne avait un débit de 30 ml/h et les fractions récoltées avaient un volume de 4 ml. Le tampon d'éluion était du PBS 50 mM. Pour chacune des fractions, 10 µg de protéines ont été analysés sur gel SDS-PAGE 15%. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie R-250. Ctrl : 10 µg de protéines totales du PS précipité à l'éthanol.

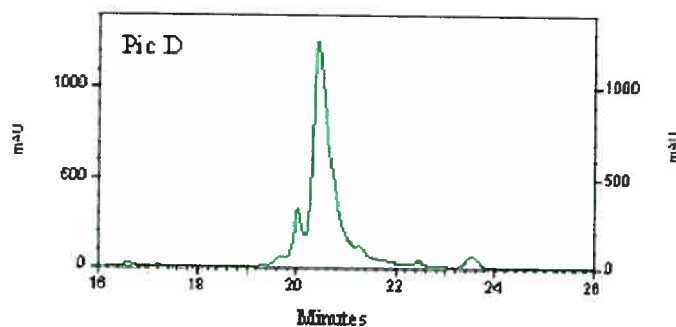


Figure 16: Chromatographie par rpHPLC de la fraction D obtenue sur colonne Séphadex G-50 sf à pH neutre. 1 mg de protéines a été injecté sur une colonne de type Vydac C18 (0,4 x 25 cm; 300 Å; 5 µm) sur un système Beckman Gold. Le tampon A était du TFA 0,1% dans de l'eau et le tampon B était du TFA 0,1% dans de l'ACN. Le gradient isocratique utilisé était de 5 min à 25%, suivi de 10 min à 1 %/min et de 60 min à 0,25 %/min. Des fractions de 200 µl étaient récoltées.

Protéine D	Ala-Gln-Asn-Lys-Gly-Pro-His-Lys-Xaa-Gly-Gly-Val-Leu-Arg-Asp
AQN-1	Ala-Gln-Asn-Lys-Gly-Pro-His-Lys-Cys-Gly-Gly-Val-Leu-Arg-Asn
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Figure 17: Séquençage par la dégradation d'Edman de la protéine majoritaire de la fraction D obtenue par chromatographie sur Séphadex G-50 sf à pH neutre.

Suite à ce résultat, il a été décidé de produire des anticorps polyclonaux contre la protéine pB1 pour aider à sa purification. Se référer à la section Matériel et Méthodes pour la procédure suivie. Un protocole de biologie moléculaire a aussi été commencé, sans toutefois être complété puisque la production d'anticorps polyclonaux a donnée des résultats plus rapidement. Se référer à l'Annexe I pour le protocole de biologie moléculaire.

Suite à l'obtention du premier antiserum contre la protéine pB1, il a été possible de faire des immunobuvardages de type Western sur les fractions obtenues lors de la chromatographie sur colonne Séphadex G-50 sf à pH neutre (figure 18). On voit que la fraction A contient la majorité de la protéine pB1, bande à environ 15 kDa, mais que des traces de la protéine sont retrouvées dans la fraction D.

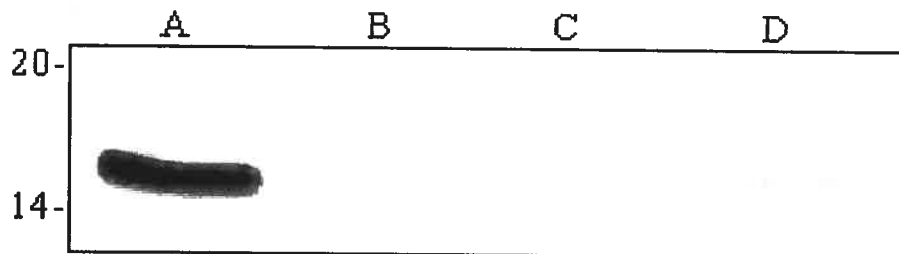


Figure 18: Immunobuvardage de type Western des fractions obtenues par chromatographie sur colonne Séphadex G-50 sf à pH neutre. Pour chacune des fractions, 10 μ g de protéines ont été analysés. Le sérum immun anti-pB1 a été dilué 1/1000. L'échelle de poids moléculaire est en kDa.

3.3.2 À pH acide

Puisque le tamis moléculaire semble séparer la protéine AQN-1 en conditions neutres (pH 7,4), mais pas la protéine pB1, et que nous savons que les protéines du PS porcin sont plus solubles en conditions acides, la même colonne a été utilisée mais conditions acides (pH 4,0) afin de purifier la protéine pB1. Après avoir été acidifiés avec de l'acide acétique glacial, 3 ml (~90 mg de protéine totales) du PS de porc ont été déposés directement sur la colonne Séphadex G-50 sf. Le tampon utilisé était de l'acide acétique 50 mM. Comme on peut le voir sur le chromatogramme obtenu (figure 19), les protéines semblent interagir plus ou moins ensemble puisque la base du pic est très large. De plus, sur le gel d'électrophorèse (figure 19, mortaise), on observe que la taille des protéines est sensiblement la même d'une fraction à l'autre. Une même protéine semble se retrouver dans plus d'une fraction et ce serait le cas pour plus d'une protéine. Les fractions A, E et F contiennent chacune une bande majoritaire, une à 100 kDa pour la fraction A et une à 15 kDa pour les fractions E et F.

Avant de continuer la purification, un immunobuvardage de type Western a été fait pour identifier la fraction qui contenait la protéine pB1. Les résultats présentés à la figure 20, démontrent que la fraction F réagit fortement avec le sérum immun contre la protéine pB1. La fraction E réagit aussi mais plus faiblement. Il est possible que la protéine pB1 se retrouve dans les deux fractions car la base des pics se superposent, donc les protéines de la fraction E se retrouvent dans la fraction F et vice versa (figure 19). Une analyse par rpHPLC de toutes les fractions a aussi été effectuée (figure 21). Ces analyses ont confirmé la présence de plusieurs protéines dans chacune des fractions obtenues suite à la chromatographie sur colonne Séphadex G-50 sf. Si on regarde attentivement la fraction d'intérêt pour la protéine pB1, la fraction F, on remarque que cette fraction donne deux pics distincts sur rpHPLC (figure 21) correspondant probablement à deux protéines distinctes.

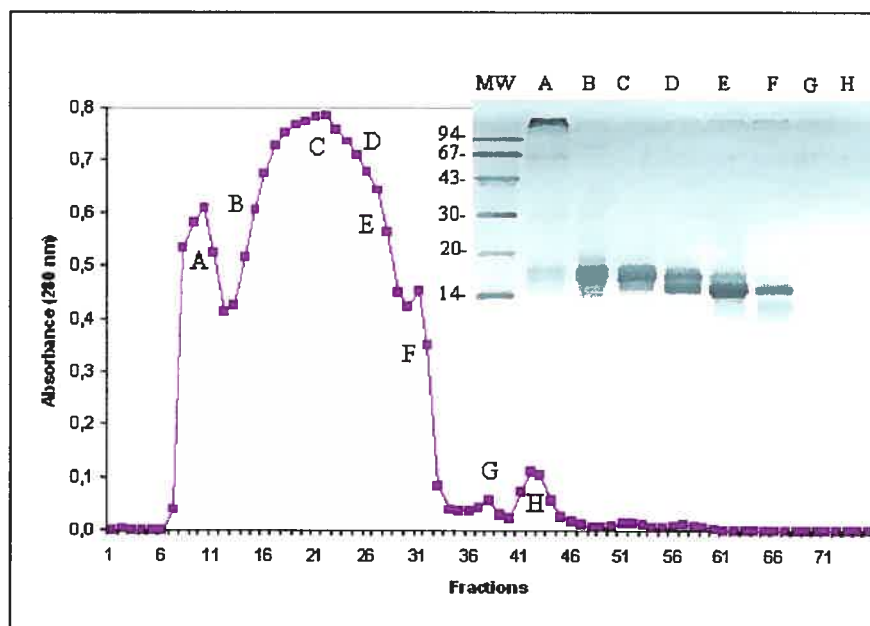


Figure 19: Chromatographie d'exclusion de taille sur colonne Séphadex G-50 sf à pH acide du PS porcin. 3 ml (~ 90 mg) de PS acidifié à l'acide acétique glaciale a été déposés sur la colonne (2,5 x 90 cm). Les fractions récoltées avaient un volume de 4 ml et le débit était de 30 ml/h. Le tampon utilisé était de l'acide acétique 50 mM. 10 µg de chacune des fractions ont été analysés sur gel SDS-PAGE 15%. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie R-250.

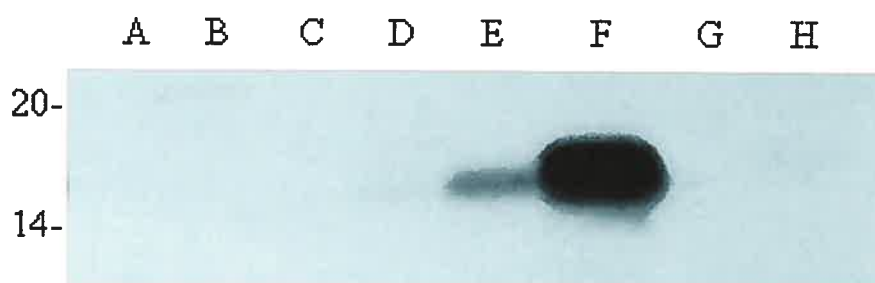


Figure 20: Immunobuvardage de type Western des fractions obtenues par chromatographie d'exclusion de taille à pH acide du PS porcin. Pour chacune des fractions, 10 µg a été analysés. Le sérum immun contre la protéine pB1 était dilué 1/1000.

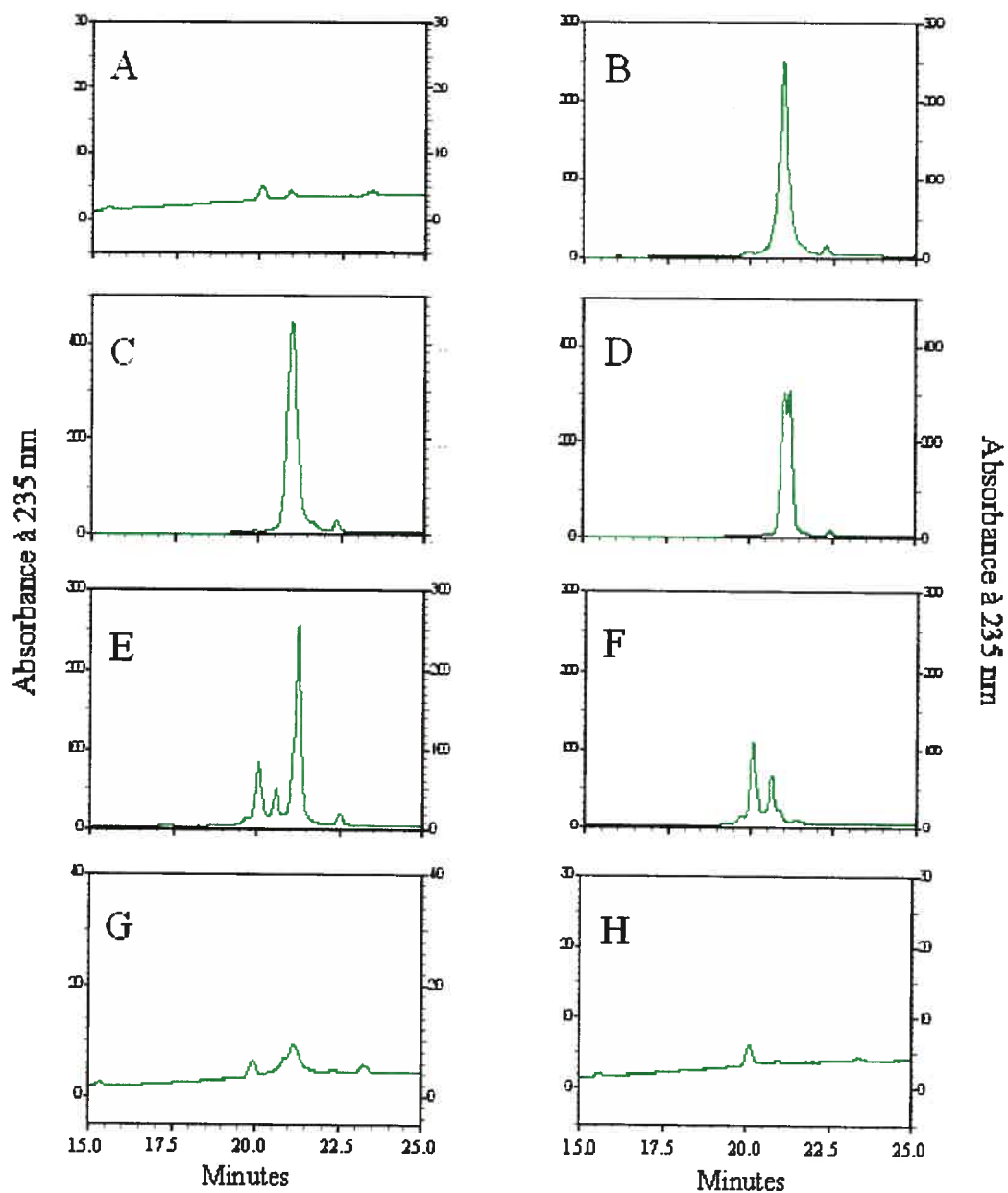


Figure 21 : rpHPLC des fractions obtenues par chromatographie d'exclusion de taille à pH acide du PS porcine. Entre 10 μg et 500 μg de protéine ont été injectés sur la colonne de type Vydac C18 (0,4 x 25 cm; 300 Å; 5 μm) sur un système Beckman Gold. Le tampon A était du TFA 0,1% dans de l'eau et le tampon B était du TFA 0,1% dans de l'ACN. Le gradient isocratique utilisé était de 5 min à 25% suivi de 10 min à 1%/min et de 60 min à 0,25%/min.

Les protéines de la fraction F a été séquencée pour identifier laquelle des deux protéines était pB1, la majoritaire ou la minoritaire. À la figure 22, les résultats du séquençage ont démontré que la fraction F contenait un mélange de pB1 majoritaire et de AQN-1 minoritaire. Un échantillon de la fraction F a été envoyé à séquencer, car à ce moment, une trop faible quantité de protéines purifiées par rpHPLC était disponible.

Forme Majeure : protéine pB1	Asp-Gln-His-Leu-Pro-Gly-Arg-Phe-Leu-Thr-Pro-Ala-Ile-Thr-Ser
Forme Mineure : protéine AQN-1	Ala-Gln-Asn-(Pro)-His-Lys-Xaa-Gly-Xaa-Val-Leu-Arg-Xaa

Figure 22: Séquençage par la dégradation d'Edman des protéines contenues dans la fraction F obtenue lors de la chromatographie d'exclusion de taille à pH acide du PS porcin.

Pour séparer pB1 de AQN-1, une colonne d'affinité à la gélatine a été utilisée puisque, contrairement à pB1, AQN-1 n'a pas la propriété de lier la gélatine [72]. La fraction F fut lyophilisée et dissoute dans du PB 50 mM avant d'être déposée sur la colonne de gélatine-agarose. À la figure 23, on observe que la colonne de gélatine-agarose a permis d'obtenir un pic de protéines non-adsorbées (pic A) et un pic de protéines adsorbées (pic B). L'immunobuvardage de type Western (mortaise) avec le sérum immun contre la protéine pB1 nous a permis de voir que la protéine pB1 se retrouvait dans la fraction B confirmant la propriété de pB1 à lier la gélatine.

Après avoir lyophilisé la fraction B, 10 µg ont été dissous dans du TFA 0,1% et ont été injectés sur une colonne Vydac C18. Le chromatogramme obtenu (figure 24) a démontré que la fraction B contenait une protéine pure à environ 95% selon la forme de la base du pic. Puisque des petites fractions ont été récoltées (200 µl), la protéine majeure de la fraction B a pu être isolée, c'est-à-dire la

protéine pB1. Pour avoir la protéine pB1 en quantité suffisante pour effectuer les expériences de capacitation, plusieurs cycles de chromatographies ont été faits.

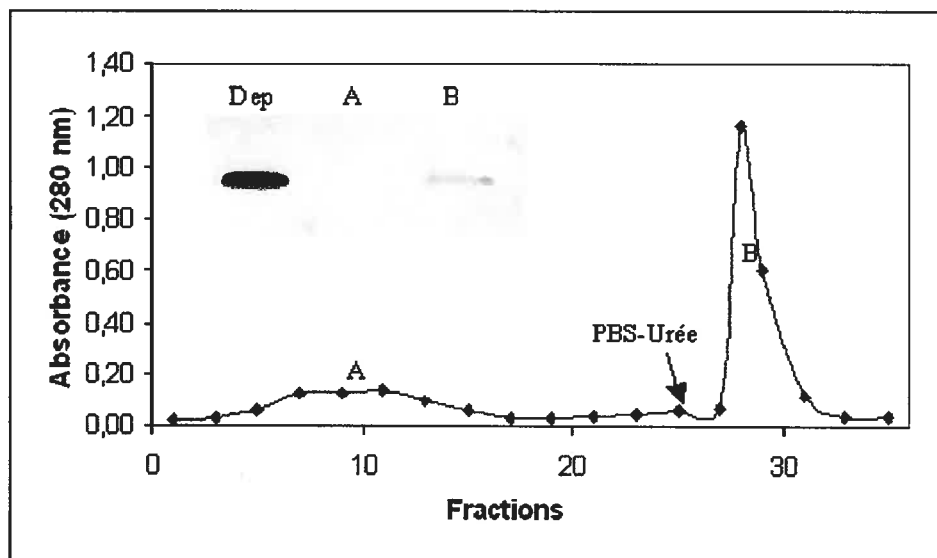


Figure 23 : Chromatographie d'affinité sur gélatine-agarose de la fraction F obtenue par chromatographie d'exclusion de taille à pH acide du PS porcin. Environ 3 mg ont été déposés sur la colonne (1 x 20 cm). La colonne avait un débit de 30 ml/h et les fractions récoltées avaient un volume de 4 ml. Le tampon d'éluion était du PB 50 mM et du PBS 50 mM-urée 7 M. 10 µg de chacune des fractions ont été transférés sur membrane pour l'immunobuvardage de type Western. Une dilution de le sérum immun contre la protéine pB1 de 1/1000 a été utilisé. Le produit de départ (Dep) était la fraction F (figure 19).

3.4 Expériences de capacitation

Une fois que les protéines pB1 et AQN-1 ont été purifiées et caractérisées, il fallait identifier leur rôle dans la capacitation des spermatozoïdes porcins. Pour y parvenir, des expériences de capacitation ont été effectuées.

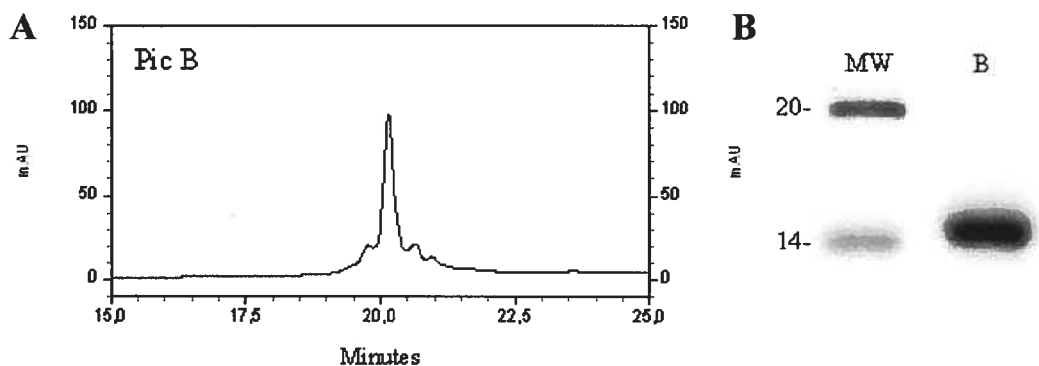


Figure 24 : rpHPLC de la fraction B obtenue par chromatographie d'affinité à la gélatine. A) 50 μ g de protéines ont été injectés sur la colonne de type Vydac C18 (0,4 x 25 cm; 300 Å; 5 μ m) sur un système Beckman Gold. Le tampon A était du TFA 0,1% dans de l'eau et le tampon B était du TFA 0,1% dans de l'ACN. Le gradient utilisé était un isocratique de 5 min à 25%, suivi de 10 min à 1%/min et de 60 min à 0,25%/min. B) 10 μ g de la protéine purifiée par HPLC ont été analysés sur gel SDS-PAGE 15%. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie R-250.

3.4.1 Capacitation modulée par les protéines totales du plasma séminal

La première étape a été de déterminer si les protéines totales du plasma séminal avaient une influence sur la capacitation des spermatozoïdes porcins. Comme chez toutes les espèces de mammifères, le PS porcine contient des facteurs inhibiteurs et d'autres activateurs de la capacitation. Il fallait donc déterminer qu'elle était la résultante des activités présentes dans le PS.

Les spermatozoïdes épидидymaires ont été pré-incubés 20 min avec 0, 10, 50 et 250 μ g/ml de protéines totales du PS précipitées à l'éthanol. Un cinquième tube était pré-incubé avec 100 μ l de PS décongelé (~3 mg). Suite à la pré-incubation, les spermatozoïdes lavés ont été incubés pour 3 h dans un milieu capacitant. Leur état de capacitation a été évalué avec la technique de CTC (se référer à la section Matériel et Méthodes pour plus de détails). À l'Annexe II se trouve un exemple de la façon dont les données brutes sont analysées.

Comme démontré à la figure 25, les protéines totales du PS porcin induisent la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires de façon dose et temps-dépendant. En effet, après 1,5 et 3 h d'incubation, le pourcentage de spermatozoïdes capités était plus élevé lorsque les spermatozoïdes avaient été pré-incubés avec 250 µg/ml ($p < 0,05$ par rapport au temps 0). À 3 h, on observe que deux fois plus de spermatozoïdes étaient capités lorsqu'ils étaient pré-incubés avec 250 µg/ml par rapport au contrôle (0 µg/ml) alors que l'augmentation était de une fois et demi à 1,5 h. En absence de protéines, il ne semble pas y avoir de capacitation dans le temps, puisqu'il n'y a pas de différence entre le pourcentage de spermatozoïdes capités obtenus à 0, 1,5 et 3 h d'incubation.

Une augmentation de la concentration de protéines totales avec lesquelles les spermatozoïdes épидидymaires sont pré-incubés induit une augmentation du nombre de spermatozoïdes capités, pour un temps d'incubation de 3 h. En présence de 250 µg/ml de protéines totales du PS, il y a deux fois plus de spermatozoïdes capités qu'en présence de 10 µg/ml de protéines totales du PS. Toutefois, à faible concentration, 10 µg/ml, il n'y a pas de différence avec le contrôle négatif, c'est-à-dire en absence de protéines. Les données de viabilité et de motilité ne sont pas montrées mais ces deux paramètres sont restés constants tout au long de l'expérience (environ 70% dans les deux cas).

3.4.2 Capacitation modulée par la spermadhésine AQN-1

Dans la littérature, l'hypothèse selon laquelle les spermadhésines sont des inhibiteurs de la capacitation a été posée il y a environ 10 ans. Cependant, aucune étude ne l'a encore démontrée [71]. Puisque nous avons purifié la spermadhésine AQN-1, nous avons testé son effet sur la capacitation des spermatozoïdes porcins. De plus, la connaissance de l'influence de AQN-1 sur la capacitation va permettre l'élaboration d'un modèle de capacitation porcine.

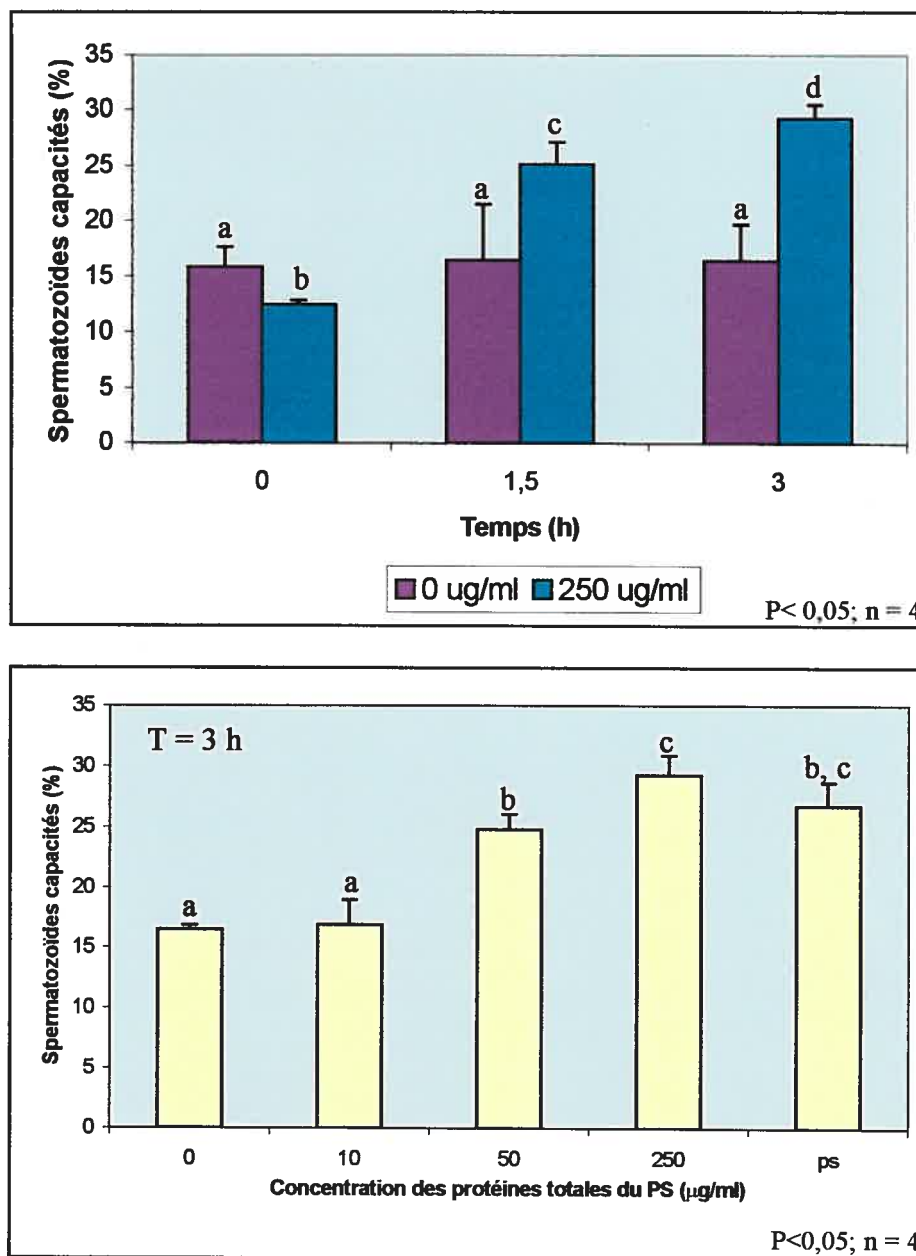


Figure 25 : Modulation de la capacitation des spermatozoïdes épididymaires porcins par les protéines totales du PS précipitées à l'éthanol. Les spermatozoïdes épididymaires étaient pré-incubés avec différentes concentrations de protéines totales du PS, avant d'être lavés et incubés pour 3 h dans un milieu capacitant. L'état de capacitation des spermatozoïdes a été évalué par la coloration au CTC. **Panneau du haut,** pourcentage de spermatozoïdes capités en fonction du temps d'incubation dans le milieu capacitant après une pré-incubation des spermatozoïdes épididymaires avec 0 ou 250 µg/ml de protéines totales du PS. **Panneau du bas,** pourcentage de spermatozoïdes capités en fonction de la concentration des protéines totales du PS après 3 h d'incubation. Des lettres différentes signifient que les traitements sont significativement différents. PS signifie 100 µl de PS. (Moyenne ± SE)

Comme dans l'expérience précédente, les spermatozoïdes épидидymaires ont été pré-incubés avec diverses concentrations de la spermadhésine AQN-1 avant d'être incubés dans un milieu capacitant. Sachant que les spermadhésines formaient beaucoup de complexes, nous voulions tenter de représenter la concentration physiologique de AQN-1 libre lors du choix des concentrations que nous allons utiliser. Étant donné le rendement de la purification de AQN-1, il a été estimé qu'environ 100 µg de spermadhésine AQN-1 circulaient librement dans 1 ml de PS. D'après la concentration moyenne de spermatozoïdes dans un éjaculat porcine (162,5 millions/ml), il y faudrait 27 µg de AQN-1 a été ajouté aux échantillons (40 millions/ml) afin de reproduire les conditions physiologiques. Les concentrations utilisées étaient donc de 0, 5, 25 et 50 µg/ml de spermadhésine AQN-1 pure, en plus du contrôle positif (100 µl de PS soit environ 3 mg de protéines totales).

Sur le panneau du haut (figure 26), on voit que pour une concentration donnée, le pourcentage de capacitation est resté pratiquement inchangé dans le temps. Une pré-incubation des spermatozoïdes avec 50 µg/ml de protéine AQN-1 garde les spermatozoïdes capités à 20% durant les 3 h d'incubation. On remarque aussi, qu'une absence de protéines lors de la pré-incubation induit un plus grand pourcentage de capacitation des spermatozoïdes par rapport au spermatozoïdes pré-incubés avec 50 µg/ml de protéine AQN-1. On peut voir, sur le panneau du bas (figure 26), qu'immédiatement après la pré-incubation, le pourcentage de capacitation des spermatozoïdes épидидymaires diminue de façon significative en fonction de l'augmentation de la concentration de AQN-1. Pour une concentration de 50 µg/ml de protéine AQN-1, il y a 50% moins de spermatozoïdes capités qu'en présence de 5 µg/ml de la spermadhésine AQN-1. Au temps 1,5 et 3 h l'inhibition est aussi forte (données non montrées). Ici aussi la viabilité (environ 65%) et la motilité (environ 60%) des spermatozoïdes étaient très bonnes tout au long de l'expérience.

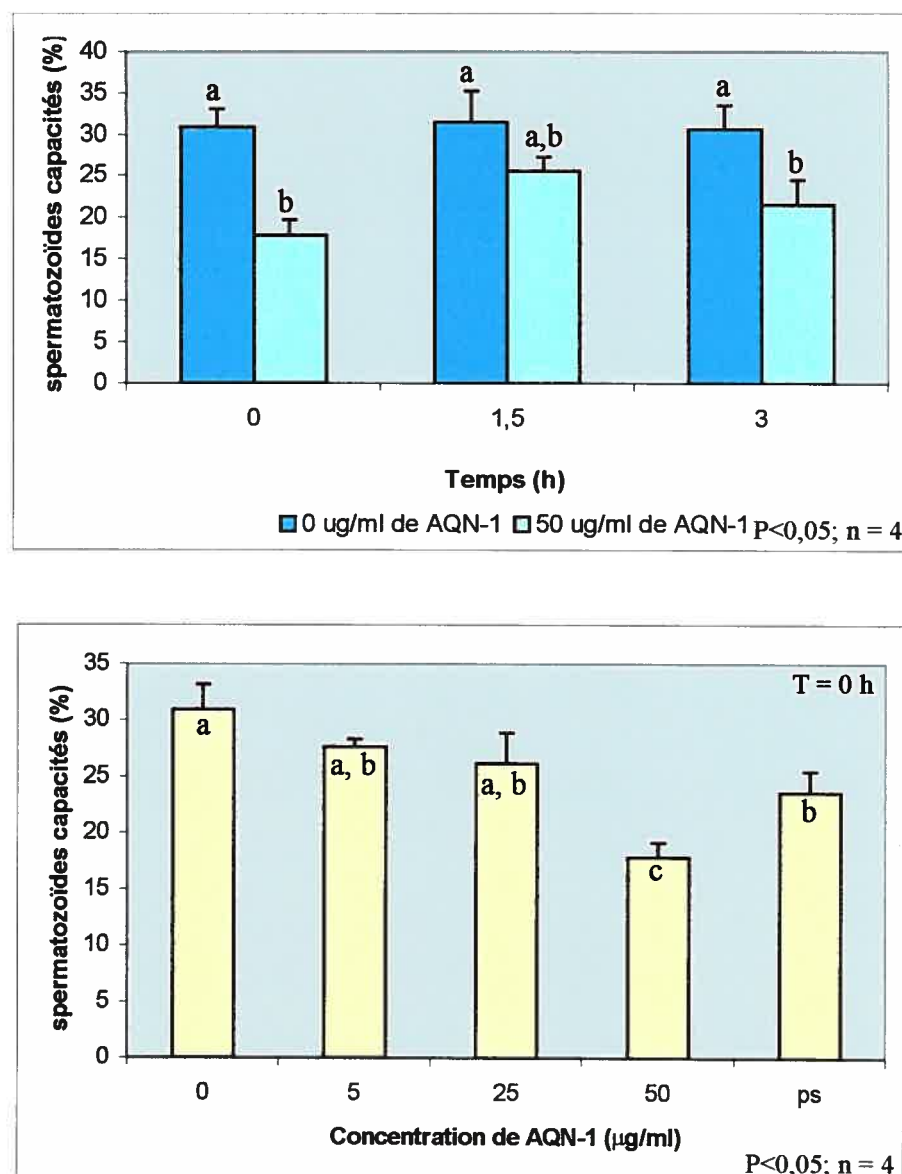


Figure 26 : Inhibition de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par la protéine AQN-1. Les spermatozoïdes épидидymaires étaient pré-incubés avec différentes concentrations de spermadhésine AQN-1, avant d'être lavés et incubés pour 3 h dans un milieu capacitant. L'état de capacitation des spermatozoïdes a été évalué par la coloration au CTC. **Panneau du haut,** pourcentage de spermatozoïdes capités en fonction du temps d'incubation dans le milieu capacitant après une pré-incubation des spermatozoïdes épидидymaires avec 0 ou 50 µg/ml de spermadhésine AQN-1. **Panneau du bas,** pourcentage de spermatozoïdes capités immédiatement après la pré-incubation avec différentes concentrations de la spermadhésine AQN-1. Des lettres différentes signifient que les traitements sont significativement différents. (Moyenne ± SE)

3.4.3 Capacitation modulée par la protéine pB1 (résultats préliminaires)

La protéine pB1 est l'homologue aux protéines BSP, il est donc important de savoir quel est son rôle dans la capacitation des spermatozoïdes porcins pour l'établissement d'un parallèle entre la capacitation bovine et porcine.

Comme pour les deux séries d'expériences précédentes, les spermatozoïdes épидидymaires ont été pré-incubés avec différentes concentrations de la protéine pB1 avant d'être incubés dans un milieu capacitant. Les concentrations utilisées étaient 0, 25, 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ en plus du contrôle positif (100 μl de PS, environ 3 mg de protéines totales). Ces concentrations ont été déterminées d'après la concentration de pB1 présente dans le PS, soit environ 300 $\mu\text{g/ml}$, et la concentration en spermatozoïdes. Dans l'éjaculat porcine, il y a en moyenne 162,5 millions de spermatozoïdes par ml de PS alors que dans mes échantillons les spermatozoïdes sont dilués à 40 millions/ml. Ainsi, pour conserver les mêmes proportions, il faudrait 74 $\mu\text{g/ml}$ de la protéine pB1 dans mes échantillons, d'où les concentrations mentionnées précédemment. L'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois en raison de la baisse de la qualité spermatique durant la saison estivale.

Tel que démontré à la figure 27, le pourcentage de spermatozoïdes capités a augmenté en fonction du temps et de la concentration de la protéine pB1 dans le milieu de pré-incubation. En pré-incubant les spermatozoïdes avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de protéine pB1, on observe, après 3 h d'incubation, qu'il y a 2 fois plus de spermatozoïdes capités par rapport à ceux pré-incubés en absence de protéines et qu'il y en a 4 fois plus que s'ils avaient été pré-incubés avec 25 $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats indiquent que vraisemblablement, la protéine pB1 stimule la capacitation des spermatozoïdes porcins. La viabilité des spermatozoïdes était bonne (environ 60%). Par contre, une baisse de la motilité spermatique, par rapport aux deux autres séries d'expériences, a été remarquée suite aux traitements (motilité d'environ 40% pour tous les traitements). Cette baisse pourrait s'expliquer par le fait que cette expérience préliminaire a été réalisée durant l'été.

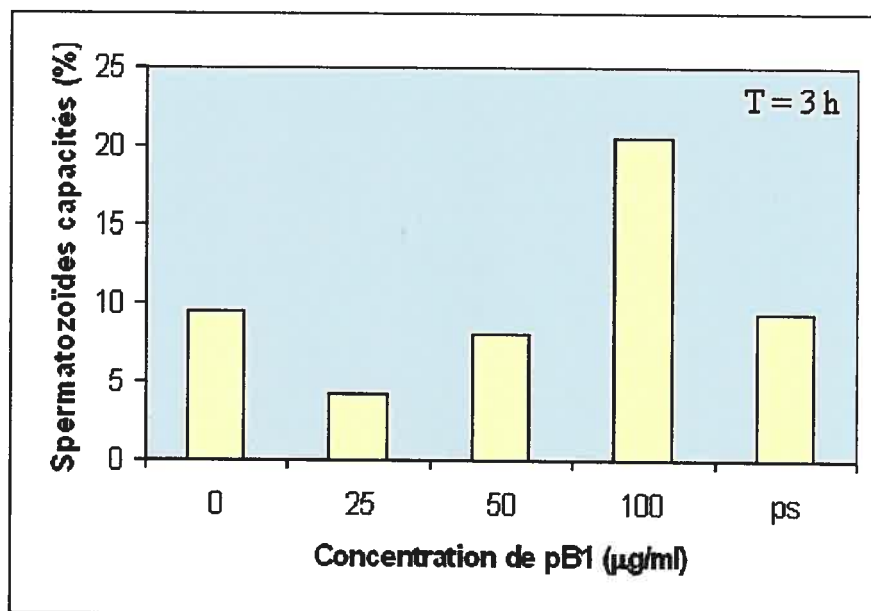
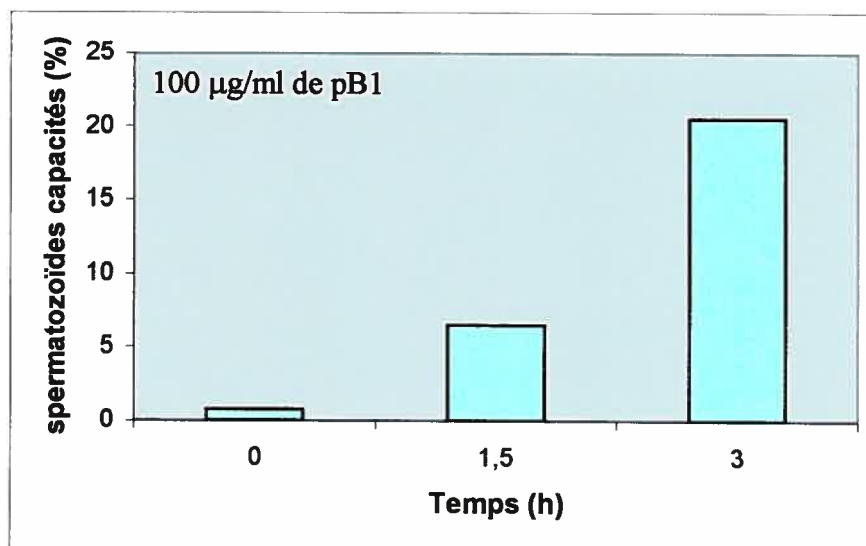


Figure 27 : Stimulation de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par la protéine pB1. Les spermatozoïdes épидидymaires étaient pré-incubés avec différentes concentrations de la protéine pB1, avant d'être lavés et incubés pour 3 h dans un milieu capacitant. L'état de capacitation des spermatozoïdes a été évalué par la coloration au CTC. **Panneau du haut**, pourcentage de spermatozoïdes capités en fonction du temps d'incubation dans le milieu capacitant après une pré-incubation des spermatozoïdes épидидymaires avec 100 µg/ml de protéine pB1. **Panneau du bas**, pourcentage de spermatozoïdes capités en fonction de la concentration de la protéine pB1 après 3 h d'incubation. PS signifie 100 µl de PS. (n = 1)

4 Discussion

Comprendre le mécanisme général de la capacitation des spermatozoïdes porcins est très important. Premièrement, les techniques de production porcine pourraient être améliorées. Deuxièmement, la comparaison entre le modèle de capacitation des spermatozoïdes bovins et celui des spermatozoïdes porcins permettra l'établissement d'un mécanisme général de la capacitation des spermatozoïdes. Sachant que les études sur l'influence des différents facteurs présents dans le PS sur la capacitation sont très difficiles à réaliser chez l'humain, puisque les spermatozoïdes épидидymaires sont très difficiles à obtenir, la connaissance d'un principe général accélérera grandement les recherches. Lorsque le rôle de la majorité des facteurs présents dans le PS humain auront été identifiés, il sera plus facile de trouver des nouveaux traitements à l'infertilité masculine. À ce stade, il sera aussi possible de développer des nouveaux moyens contraceptifs. Par contre, avant de faire des études chez l'humain, le mécanisme de capacitation chez d'autres espèces, tel que le porc, doit être élucidé.

4.1 La solubilité des protéines du PS porcine

La purification des protéines du PS porcine a été rendue laborieuse due à l'insolubilité de ces protéines dans certains tampons. En effet, la solubilité des protéines du PS porcine est très faible lorsque le pH de la solution est neutre. En fait, des expériences ont démontré que la solubilité des protéines du PS porcine augmente avec l'acidification du milieu. Dans un milieu aqueux à pH 9 seulement 50% des protéines étaient solubilisées contrairement à 100% lorsque le pH était de 2 (données non montrées). De plus, la présence de sels dans le milieu favorise la solubilisation des protéines. Lors de la préparation des échantillons, il est arrivé de solubiliser les protéines dans une solution à pH 7 contenant du sel et de dialyser avant de mettre l'échantillon sur la colonne d'affinité. Cette technique de préparation des échantillons est très longue mais la perte de protéines est plus

faible que si les protéines avaient été solubilisées directement dans une solution à pH neutre et non-salée. Par contre, il est plus facile de travailler directement avec le PS porcin que d'utiliser les protéines lyophilisées.

4.2 Purification par chromatographie d'affinité

Contrairement à ce qui avait été observé chez le bœuf, le bélier, le bouc et le bison, la chromatographie d'affinité à la gélatine n'a pu séparer les protéines du PS porcin. Seuls des groupes de protéines ont pu être isolés, même en utilisant un gradient d'urée (figures 9 et 10). La raison pour laquelle les protéines éluent à la même concentration d'urée est peut-être que les protéines possèdent toutes une affinité semblable pour la gélatine ou parce qu'elles forment des complexes dans le PS ou encore que des complexes sont formés lors de la manipulation du PS.

En utilisant une matrice d'héparine, trois fractions protéiques ont été éluées après adsorption sur la colonne (pics C, D et E, figure 12). Par contre, comme on le voit sur le gel SDS-PAGE, ce sont, encore une fois, des groupes de protéines qui ont été séparés. Dans la littérature, après liaison à l'héparine, différents complexes protéiques ont été identifiés [77].

En combinant l'affinité à l'héparine et à la phosphorylcholine une protéine a pu être isolée mais la quantité obtenue était trop faible pour qu'une analyse de séquence soit effectuée (figures 13 et 14). Cette technique permet de purifier une protéine, mais elle prenait beaucoup de temps et le rendement était très faible (5 μ g, environ 0,2% si c'était la protéine pB1, de protéine étaient obtenus). Il aurait fallu répéter l'expérience environ 200 fois avant d'obtenir la quantité de protéines nécessaire à la réalisation des études sur le rôle biologique de cette protéine. C'est pourquoi, malgré l'obtention d'une protéine pure, nous avons laissé tomber cette approche.

Que ce soit en utilisant une matrice de gélatine ou d'héparine, aucune protéine n'a pu être isolée. Toutes les protéines du PS porcine ont une taille d'environ 15 kDa et la majorité d'entre elles ont une affinité pour la gélatine et/ou l'héparine. Cependant, puisque les protéines n'ont pas nécessairement la même affinité pour ces composés, on croyait que la compétition allait nous permettre d'obtenir des protéines pures. C'est pourquoi, nous avons premièrement utilisé une chromatographie d'affinité à la gélatine et deuxièmement une chromatographie d'affinité à l'héparine. Par contre, la trop grande similarité entre l'affinité des diverses protéines majeures du plasma séminale nous a empêché d'isoler la protéine pB1. Aussi, si les spermadhésines forment des complexes, il est possible qu'elles n'aient pas nécessairement toutes les mêmes propriétés. Il se peut qu'une protéine n'ait plus d'affinité pour une matrice lorsque son site de liaison se retrouve caché par une autre protéine du complexe, ou qu'il y ait un encombrement stérique trop important. De plus, lors de la liaison protéines-protéines, il peut y avoir un changement de conformation provoqué par des forces ioniques. Toutes ces conditions auraient pu permettre la purification de la protéine pB1, malheureusement, les résultats ont été différents. Un autre facteur qui permettait de croire qu'il était possible d'isoler pB1 grâce à la gélatine, était que la spermadhésine bovine aSFP n'interfère pas lors de la purification par affinité à la gélatine des protéines BSP [31].

4.3 HPLC

La technique de chromatographie par rpHPLC est très avantageuse puisqu'elle est très rapide (une seule étape d'environ deux heures). C'est pourquoi cette technique fut essayée pour purifier pB1. Par contre, comme on peut le voir dans les différentes figures de la section Résultats (figures 11,14 et 21), les protéines du PS porcine éluent à la même concentration de tampon B, ce qui s'observe par la formation de pics très larges à la base et échevelés au sommet. Ce patron d'éluion est représentatif d'un groupe de protéines ayant des propriétés très

semblables dans le système eau/acétonitrile utilisé, donc très difficiles à séparer. Ainsi nous n'étions pas en mesure de déterminer lequel des pics correspondait à chacune des protéines. De plus, les protéines ont toutes plus ou moins la même taille et sont toutes des glycoprotéines existant sous plusieurs isoformes.

Il a été observé que dans les mêmes conditions le temps de rétention de la protéine AQN-1 est d'environ 20,3 minutes (figure 16) alors que celui de la protéine pB1 est d'environ 20,1 minutes (figure 21, fraction F). On remarque aussi que lorsqu'il y a une solution mixte, pB1 et AQN-1, la protéine AQN-1 éluée un peu plus rapidement (figure 21, fraction F), probablement à cause d'une interaction avec la protéine pB1. Ainsi, même si une protéine est isolée par chromatographie on doit la faire séquencer pour connaître son identité. Dans notre cas, l'établissement d'un protocole de purification par HPLC s'est avéré être une technique peu efficace puisque les protéines éluent presque toutes à la même concentration de tampon B. C'est pourquoi cette technique n'a pas été développée.

4.4 Purification sur tamis moléculaire

Bien que la purification par tamis moléculaire ne soit généralement pas utilisée à la première étape d'un protocole de purification, nous avons tenté de purifier pB1 en utilisant une colonne Séphadex G-50 sf, puisque les chromatographies d'affinités ne fonctionnaient pas. En déposant le PS porcin directement sur une colonne préalablement équilibrée dans du tampon PBS pH 7,4, afin d'éviter les problèmes de solubilisation des protéines, nous obtenons 2 pics d'élution majeurs (pics A et B, figure 15) et 3 pics mineurs (pics C, D et E, Figure 15). Il est possible que le pic E contienne seulement des pigments du PS puisqu'il est détectable seulement par spectrophotométrie. Les pics A et B semblent être formés de complexes car le patron de migration sur gel SDS-PAGE montre plusieurs protéines ayant des poids moléculaires d'environ 15 kDa.

Puisque des petites protéines sont éluées aussi rapidement sur un tamis moléculaire, il est possible de croire qu'il y a agrégation entre les protéines puisqu'autrement elles élueiraient beaucoup plus tard. De plus, l'immunobuvardage nous montre que pB1 est présent dans la fraction A, mais rien nous indique que la protéine AQN-1 n'y est pas puisqu'aucun anticorps contre AQN-1 n'a été utilisé. Le pic C semble contenir 2 protéines majeures d'environ 15 kDa, alors que le pic D contient une protéine majeure, elle aussi d'environ 15 kDa. Après une isolation complète par HPLC de la protéine majeure du pic D, le séquençage a permis d'identifier que la protéine obtenue était la spermadhésine AQN-1. Avec 3 ml de PS, nous avons obtenu environ 0,3 mg de protéine AQN-1. Selon les données disponibles dans la littérature, le recouvrement de cette purification est d'environ 10% [71].

Comme il a été discuté précédemment, la solubilité des protéines de PS porcin est meilleure à un pH acide, c'est pourquoi nous avons répété la chromatographie sur tamis moléculaire mais à un pH de 4. Le PS avait été acidifié avec une goutte d'acide acétique glaciale avant d'être déposé sur la colonne préalablement équilibrée avec de l'acide acétique 50 mM (pH 4,0). Comme démontré à la figure 19, le chromatogramme est différent de celui obtenu à pH physiologique (pH 7,4) (figure 15). D'après le chromatogramme, il est possible de voir que plusieurs fractions sont éluées plus ou moins en même temps. Par la coloration au bleu de Coomassie, on voit que les fractions semblent contenir plus d'une protéine. Comme les protéines des fractions A, B et C éluent rapidement, il semblerait que des complexes de faible affinité soient formés. Par contre, dans les fractions D, E et F, il semblerait qu'il n'y ait pas de complexes puisqu'elles éluent plus tardivement. Les fractions G et H contiennent seulement des pigments du PS puisqu'elles sont détectables seulement par spectrophotométrie. Ainsi, il apparaît que les protéines semblent se dissocier les unes des autres avec le temps, mais puisqu'elles ont des tailles similaires, elles éluent tout de même en même temps. La coloration au bleu de Coomassie nous révèle que la fraction F contient une bande majeure et des bandes de contamination de faible intensité. Cependant,

avant de poursuivre la purification, nous avons voulu vérifier que cette protéine était pB1. Comme démontré à la figure 20, seule la protéine majeure de la fraction F réagit à le sérum immun anti-pB1, on voit aussi que cette protéine est présente en plus faible quantité dans la fraction E. Les protéines de la fraction F ont été séquencées par dégradation d'Edman (figure 22). Les résultats du séquençage (figure 22) nous ont indiqué que c'était la protéine pB1 qui était majoritaire dans la fraction F. La purification de la protéine pB1 a été complétée par colonne d'affinité à la gélatine (figure 23) et par rpHPLC (figure 24). Pour 7 ml de PS on a obtenu environ 1 mg de protéine pB1, ce qui nous donne un recouvrement d'environ 50% selon les données de la littérature [68].

En utilisant la même colonne, deux protéines ont pu être isolées, AQN-1 et pB1, selon que le pH de la colonne était physiologique ou acide. Ces résultats sont attribuables aux variations des forces ioniques présentes en solution. Le pH étant relatif aux nombres d'ions d'hydrogène chargés positivement (H^+), une variation de pH implique une variation de la concentration en H^+ d'une solution [17]. Selon le pH de la solution, une protéine va être plus ou moins chargée, selon la nature de ses groupements, et elle va interagir plus ou moins avec le milieu dans lequel elle se trouve. En milieu aqueux, la majorité des interactions ioniques est sous la forme de ponts hydrogènes [17]. En règle générale, à pH neutre (pH 7), les forces ioniques sont faibles ce qui se traduit par une faible interaction entre les protéines et le milieu aqueux. Par contre, en présence d'une solution à pH acide ou basique les protéines vont interagir beaucoup plus avec le milieu, car les forces ioniques sont plus fortes, ce qui favorise la solubilisation des protéines [17].

Le pH physiologique de l'épididyme est près de 7, toutefois, celui du vagin est d'environ 5 [3]. Ce changement de pH dans l'environnement du spermatozoïde est néfaste, car si les spermatozoïdes se retrouvent dans le vagin sans être protégés par le mucus cervical, ils meurent. Suite à l'éjaculation, le pH vaginal passe de 5 à environ 7 en quelques secondes et ce pour 5 minutes. Ce laps de temps permet aux spermatozoïdes de s'envelopper de mucus cervical et de

progresser vers l'oviducte, où le pH est d'environ 7. Le fait de retrouver la spermadhésine AQN-1 seule et en complexe à pH neutre, alors que pB1 est probablement en complexe, indique le rôle probable de AQN-1 et de pB1 dans la capacitation : soit un rôle immédiat pour AQN-1 et un rôle plus tardif pour la protéine pB1. Il est possible que les complexes avec la protéine pB1 servent de transporteur en plus d'assurer la présence de la protéine pB1 au bon moment.

4.5 La production d'anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux utilisés dans cette étude ont été obtenus grâce à l'immunisation contre un peptide de 15 aa correspondant à l'extrémité C-terminale de la protéine pB1 qui était couplée à la protéine KLH. Cette protéine de plus de 1 000 kDa provient du mollusque *Megathura crenulata*. Il est donc peu probable que les anticorps produits reconnaissent d'autres protéines que pB1, car les anticorps non-spécifiques au peptide ont très peu de chance de reconnaître des protéines de mammifères.

La séquence d'aa correspondant à l'extrémité C-terminale de pB1 a été choisie pour produire des anticorps car c'était la séquence la moins hydrophobe de la protéine. De plus, aucune réaction croisée n'était prévisible lorsqu'une analyse de séquence a été réalisée par ordinateur. De plus, l'analyse des séquences a démontré que les protéines BSP ainsi que tous leurs homologues séquencés possèdent des séquences d'acides aminés carboxy-terminaux très similaires (voir tableau IV).

Tableau IV : Comparaison des séquences des extrémités C-terminales de différentes protéines homologues aux protéines BSP.

	Séquence d'acides aminés	% de similitude peptide
Peptide	TVTPNYDRDRAWKYC	
pB1	TVTPNYDRDRAWKYC	100
BSP-A1/A2	SLSPNYDKDRAWKYC	100
BSP-A3	SLSSNYDEDGVWKYC	83
BSP-30 kDa	SLTSNYDRDKAWKYC	91
HSP-1	SVTPNYDHHGAWKYC	76

Les anticorps produits deviennent donc un outil pour identifier la présence de protéines homologues aux BSP dans le PS d'autres espèces. De plus, ils permettent de suivre la purification de ces protéines par immunobuvardage de type Western. Des tests préliminaires ont montré que les anticorps anti-pB1 reconnaissent des protéines dans le plasma séminal de bœuf (BSP), de porc (pB1), de cheval (HSP), de bélier (RSP), de bouc (GSP), de bison (BiSV) et d'humain (données non montrées). La reconnaissance de protéines dans le plasma séminal porcin est spécifique à l'anticorps anti-pB1, puisque lorsque le sérum pré-immun est utilisé aucune réactivité avec les protéines totales n'est observée (données non montrées).

4.6 Capacitation des spermatozoïdes porcins

4.6.1 Modulée par le plasma séminal

Les protéines totales du PS de porc stimulent la capacitation des spermatozoïdes de façon dose et temps dépendant, tel que démontré à la figure 25. Bien que le PS contienne des facteurs activateurs et des facteurs inhibiteurs, l'effet observé est une stimulation de la capacitation. Il est à noter que dans cette série

d'expériences, comme dans les deux suivantes, la capacitation des spermatozoïdes augmente en fonction du temps dans le milieu capacitant et varie en fonction de la concentration de protéines dans le milieu de pré-incubation.

4.6.2 Modulée par AQN-1

Pour établir le modèle de capacitation, la première idée était de caractériser la protéine pB1 d'abord, étant donné son homologie avec les protéines BSP et l'importance du rôle joué par les protéines BSP dans la capacitation des spermatozoïdes bovins, pour ensuite caractériser les spermadhésines. Par contre, puisque AQN-1 a été la première à être isolée, nous avons commencé par l'étude de cette protéine. De plus, le protocole de purification de la spermadhésine AQN-1 était assez rapide et très simple, ce qui nous a permis d'avoir une quantité suffisante de protéine en peu de temps.

Comme on l'observe sur les graphiques de la figure 26, AQN-1 est un inhibiteur de la capacitation. Le pourcentage de spermatozoïdes capités diminue avec l'augmentation de la concentration en spermadhésine AQN-1 présente pendant la pré-incubation. On observe aussi que l'inhibition reste présente dans le temps, c'est-à-dire qu'à 3 h d'incubation les spermatozoïdes pré-incubés avec 50 μg d'AQN-1 sont moins capités que ceux incubés sans AQN-1. Les études ont été réalisées avec de faibles concentrations de protéines parce que selon notre rendement de purification, seulement 10% des spermadhésines AQN-1 semblaient libres dans le PS. Toutefois, pour s'assurer du pouvoir inhibiteur de AQN-1 dans la capacitation, une autre expérience devra être effectuée pour confirmer que même à une forte concentration (250 μg pour 40 millions de spermatozoïdes/ml), la spermadhésine AQN-1 inhibe toujours la capacitation. Il a déjà été observé que certaines protéines sont activatrices ou inhibitrices de la capacitation selon la concentration à laquelle elles sont présentes. De plus, une plus grande concentration de AQN-1 va permettre de voir s'il y a atteinte d'un plateau ou si

l'inhibition est toujours plus forte selon la concentration. Dans cette expérience, on observe que le pourcentage de spermatozoïdes capacités pré-incubés en absence de protéines est deux fois supérieur à celui observé dans les deux autres séries d'expériences, soit les expériences de capacitation avec les protéines totales du PS et avec la protéine pB1. Cette différence est probablement causée par une différence dans la qualité des spermatozoïdes utilisés pour chaque série d'expériences.

Des études ont démontré que des spermadhésines possédant un domaine CRISP inhibent la capacitation. Le groupe de Roberts a en effet démontré que la protéine Crisp-1 présente dans l'épididyme de rat était un inhibiteur de la phosphorylation sur tyrosine des protéines de la membrane du spermatozoïde [101]. Puisque AQN-1 possède un domaine CUB, il apparaît que les spermadhésines sont des inhibiteurs de la capacitation indépendamment de leur structure, CUB ou CRISP.

Il est possible que la spermadhésine AQN-1 décapacite les spermatozoïdes porcins en stabilisant la membrane. La stabilisation pourrait être faite par une liaison de la spermadhésine AQN-1 aux hydrates de carbone présents à la surface membranaire ou par une insertion de cette spermadhésine dans la membrane. Ces deux mécanismes auraient pour effet de bloquer l'efflux de cholestérol et de lipides de la membrane spermatique généralement observé pendant la capacitation. De plus, il se pourrait que la spermadhésine AQN-1 agisse sur la phosphorylation des protéines membranaires, soit en rendant la phosphorylation impossible ou en induisant une déphosphorylation de ces protéines membranaires. Des études sur ce sujet devront être réalisées pour que les mécanismes d'action de AQN-1 soient identifiés.

4.6.3 Modulée par pB1

Tel que suggéré à la figure 27, la protéine pB1 stimule la capacitation. On voit qu'avec le temps et l'augmentation de la concentration en pB1, le pourcentage de spermatozoïdes capités augmente. Après 3 h d'incubation, on observe aussi que l'augmentation du nombre de spermatozoïdes capités est plus grande en présence de pB1 par rapport au PS complet. Cette observation était attendue car le PS contient des facteurs inhibiteurs et des facteurs activateurs de la capacitation. Donc, il est normal que son activité stimulante soit moins forte que celle d'un activateur seul. En comparant le pourcentage de spermatozoïdes capités des échantillons pré-incubés avec 100 μ l de PS de cette expérience avec celui des deux autres séries, on remarque une diminution de 50%. Le PS étant un fluide biologique, sa composition varie d'un individu à l'autre et il semble que celui utilisé lors de cette expérience était de moins bonne qualité.

Les résultats de l'influence de pB1 sur la capacitation sont le fruit d'une seule expérience, trois expériences supplémentaires seront effectuées pour voir si statistiquement les conditions sont différentes les unes des autres. Ces expériences n'ont pu être effectuées pour l'instant dû au fait que pendant l'été, la qualité des spermatozoïdes est plus faible, la motilité et l'intégrité membranaire diminuent. Chez le bovin, des études ont démontré que la proportion de spermatozoïdes anormaux augmentait alors que la motilité et l'efficacité de liaison aux facteurs capacitants diminuaient lors de la période estivale dû à la chaleur [102]. Chez le porc, il semblerait que le même phénomène se produise, car plusieurs laboratoires, dont le nôtre, ont observé une baisse du pourcentage de capacitation lors des périodes chaudes. À cause de cette baisse de qualité, les expériences de capacitation doivent être interrompues durant l'été pour ne pas fausser les données. Les températures chaudes de l'été, et non un effet toxique de la protéine pB1, sont probablement responsable de la baisse de motilité spermatique observée lors de l'expérience puisque la motilité est la même pour tous les traitements.

4.7 Modèle de capacitation porcine

Suite aux résultats obtenus, il est possible d'émettre une hypothèse quant à la nature du mécanisme de la capacitation porcine. Le mécanisme élaboré est basé sur les résultats obtenus chez le bovin. Toutefois, il est à noter que chez le porc, la majorité des étapes restent à être démontrées. Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes entreraient en contact avec les protéines du PS. Le PS porcine contient plusieurs types de protéines, les principales étant les spermadhésines. À ce stade, les spermadhésines lieraient la membrane spermatique grâce à leur affinité aux hydrates de carbone. Il est aussi possible qu'elles soient sous forme de complexes non-spécifiques, formés par leur capacité à lier les sucres présents à la surface des autres spermadhésines. Il est possible que la protéine pB1 soit comprise dans ces complexes multiprotéiques et n'aurait aucun rôle à jouer à cette étape, mais il est plus probable qu'elle soit liée à la membrane spermatique, par les groupements choline des phospholipides, et que son action soit inhibée.

Aussi, lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes changent de milieu, passant du fluide épидидymal au PS. La composition de ces milieux est très différente et une des grandes différences est dans la concentration en bicarbonate. Généralement, chez les mammifères, le fluide épидидymal contient une faible concentration de bicarbonate alors que le PS est riche en bicarbonate [11]. Ce changement de concentration induit une perméabilisation de la membrane spermatique au bicarbonate pour permettre une équilibration entre le milieu extracellulaire et intracellulaire. Cette entrée massive de bicarbonate serait à l'origine du déclenchement de la capacitation en provoquant un changement de l'architecture membranaire [12]. Lors de se remaniement, il y aurait une perte de phospholipides et de cholestérol membranaire, mais aussi une perte de la majorité des spermadhésines membranaires. Le cholestérol et les phospholipides seraient emmagasinés dans les HDL et autres accepteurs de lipides alors que les spermadhésines seraient tout simplement dégradées par les cellules immunitaires du tractus génital femelle. La protéine pB1 ne serait pas dégradée car elle serait

toujours à la surface des spermatozoïdes. En se décrochant de la membrane spermatique, les spermadhésines permettraient à la protéine pB1 de stimuler la capacitation. À cette étape, si le modèle de la capacitation porcine est similaire à celui de la capacitation bovine, deux voies seraient possibles pour parvenir à la fin du mécanisme de la capacitation, soit la voie des GAGs et la voie des HDL.

Il a déjà été démontré que les spermadhésines et la protéine pB1 liaient l'héparine [23]. La voie des GAGs impliquerait que les GAGs du fluide folliculaire se lieraient aux spermadhésines restantes et aux protéines pB1. Lorsque les GAGs se lieraient à une protéine pB1 présente sur la membrane spermatique, il y aurait le déclenchement d'un mécanisme intracellulaire encore inconnu qui permettrait au spermatozoïde de capaciter.

La voie des HDL impliquerait que les HDL du fluide folliculaire provoqueraient un efflux de cholestérol par un mécanisme encore non identifié. Ces changements membranaires auraient un effet sur les voies de signalisation intracellulaire et seraient importants pour compléter la capacitation. Il a déjà été démontré que la protéine pB1 lie les LDL, mais il reste à démontrer qu'elle lie les HDL [62].

Au moment où se passent les changements membranaires, les canaux calciques s'ouvriraient entraînant un influx de calcium intracellulaire [16]. Chez le porc, il a été démontré que cette entrée de calcium va induire l'activation de l'adénylate cyclase qui elle, va induire la phosphorylation sur tyrosine à l'aide de l'AMPc [13, 18, 103, 104]. Ces mécanismes intracellulaires vont permettre de compléter la capacitation. Toutefois, on ne sait pas quels facteurs induisent cette signalisation, les GAGs, les HDL et la protéine pB1 sont tous des candidats.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent que la capacitation des spermatozoïdes porcins est stimulée par la seule présence de la protéine pB1. Ainsi, le modèle de la capacitation des spermatozoïdes porcins pourrait comporter

trois voies, celle des GAGs, celle des HDL et celle de la protéine pB1. Par contre, il se pourrait qu'il soit simple et qu'il ne comporte qu'une seule voie, celle de la protéine pB1. Il se pourrait que les GAGs et les HDL n'aient aucun effet sur la capacitation lorsqu'ils sont seuls, mais qu'ils aient des effets synergiques sur la stimulation de la capacitation par la protéine pB1. Des études devront être réalisées pour identifier le rôle que jouent les HDL et des GAGs dans la capacitation des spermatozoïdes porcins. Un schéma résumant le modèle élaboré est proposé à la figure 28.

Dans ce mécanisme, les spermadhésines agiraient en tant qu'inhibiteurs de la capacitation en stabilisant la membrane et en bloquant les sites de liaison aux HDL ou peut-être en induisant la déphosphorylation des protéines membranaires. Ceci empêcherait que la capacitation n'ait lieu trop tôt lors de la progression du spermatozoïde vers l'ovocyte. Une étude récente démontre que les spermadhésines autres que les PSP, c'est-à-dire celles liant l'héparine, seraient des activateurs de la capacitation lorsque les spermatozoïdes sont très dilués [105]. Il avait déjà été démontré que les spermadhésines sont enlevées de la membrane spermatique lors de la capacitation [71]. Dans l'oviducte, où il y a beaucoup moins de spermadhésines accrochées à la membrane et où les spermatozoïdes sont plus dilués, il se pourrait que l'héparine module la capacitation des spermatozoïdes porcins par l'entremise des spermadhésines. Il est possible que la protéine pB1 stimule la capacitation indépendamment de la présence de l'héparine, mais que l'héparine régule l'induction de la capacitation par les spermadhésines. La façon dont les spermadhésines sont décrochées de la membrane reste à être élucidée tout comme la façon dont la protéine pB1 stimule la capacitation et rend le spermatozoïde apte à enclencher la réaction de l'acrosome. Il est fort probable que la protéine pB1 agisse de la même façon que les protéines BSP puisque sa structure est semblable à celle des protéines BSP ainsi que ses affinités. Il se pourrait aussi que la protéine pB1 induise un influx d'ions calciques par sa liaison à la calmoduline [48]. Cet influx pourrait être à la source de l'induction de la capacitation par pB1.

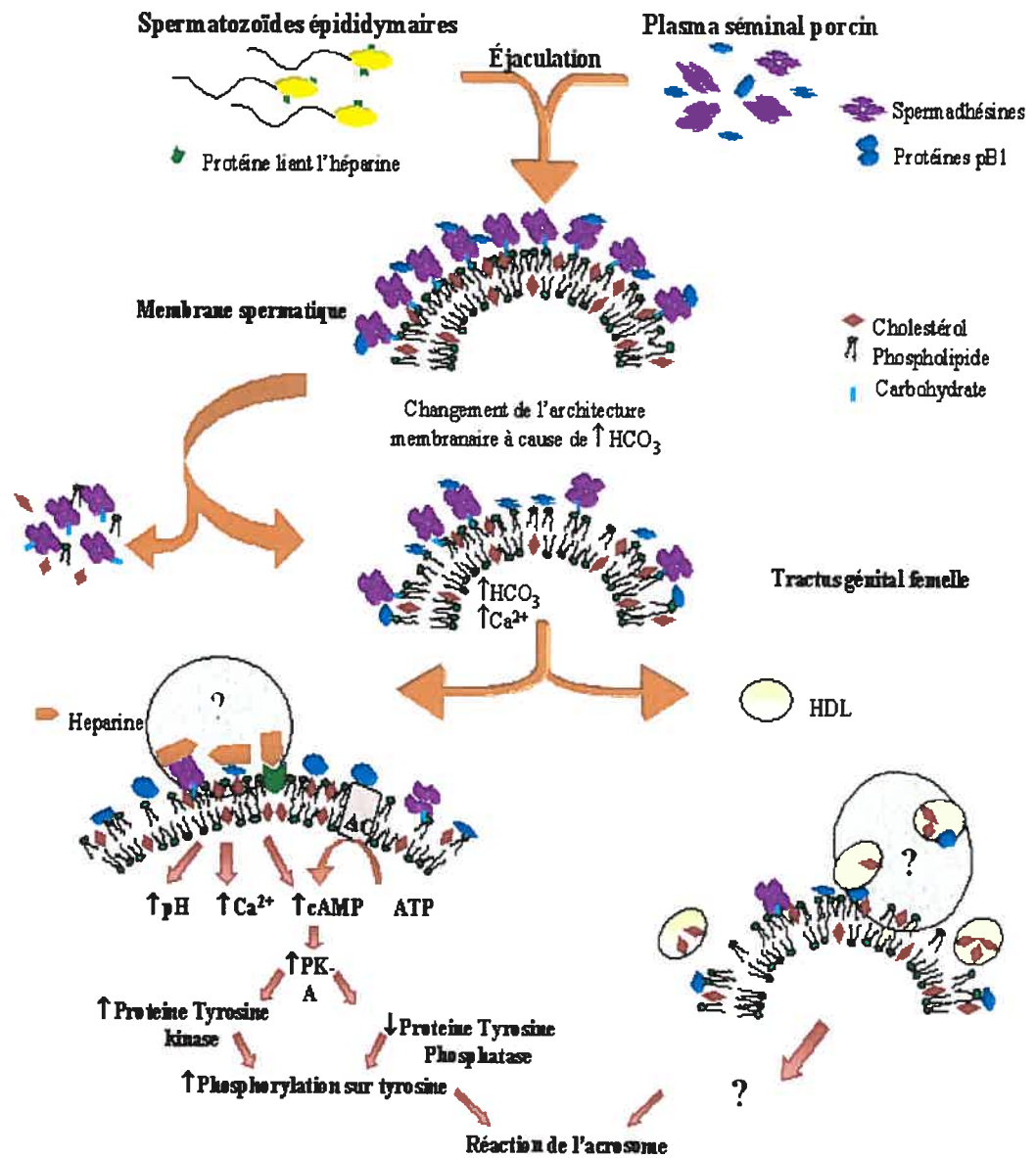


Figure 28 : Modèle hypothétique de la capacitation porcine

Le groupe de Fierro a récemment publié un article dans lequel il décrit le déplacement des sucres sur la membrane des spermatozoïdes [106]. Lors de la capacitation, le nombre de molécule de N-acétylglucosamine et d'acide sialique diminue tandis que la quantité de mannose augmente, particulièrement sur la membrane acrosomiale. Suite à la réaction de l'acrosome, la concentration en mannose devient très forte sur la bordure de la région acrosomiale [106]. Il était déjà connu que certaines spermadhésines restent liées à la membrane du spermatozoïde tout au long de la capacitation. Cette dernière étude vient appuyer l'hypothèse selon laquelle les spermadhésines pourraient agir comme récepteur et/ou ligand de la zone pellucide et ainsi favoriser l'interaction spermatozoïde-ovocyte suite à la réaction de l'acrosome [84]. Cette hypothèse implique que les spermadhésines, bien qu'elles interagissent avec l'héparine, n'ont aucun rôle à jouer dans la dernière étape du mécanisme de la capacitation. Elles resteraient plutôt liées à la membrane spermatique pour être en mesure de jouer un rôle lors de l'interaction spermatozoïde-ovocyte. Il ne faut pas oublier que les spermadhésines ont des affinités pour les sucres et que les composés majoritaires de la zone pellucide sont des glycoprotéines et de l'acide hyaluronique [3]. Les protéines ZP2 et ZP3 de la zone pellucide sont aussi des glycoprotéines connues pour leur implication lors de la liaison du spermatozoïde à l'ovocyte.

4.8 Comparaison entre les mécanismes de la capacitation porcine et bovine

Bien que le bœuf et le porc soient des espèces qui à première vue semblent très différentes, le mécanisme par lequel les spermatozoïdes capacitent pourrait être très similaire. À la figure 29, un schéma résumant la capacitation des spermatozoïdes bovin est présenté. Bien que plusieurs zones restent grises dans les deux mécanismes, il semblerait que les familles de protéines gardent le même rôle dans les deux espèces.

La première différence entre les deux espèces est sans contredit les proportions dans lesquelles les diverses familles de protéines sont présentes. Chez le bœuf, les protéines BSP représentent 65% des protéines totales du PS, soit 34 μg par million de spermatozoïdes, alors que la protéine pB1 représente entre 0,6 et 1,5% des protéines totales du PS porcin, soit 2 μg par million de spermatozoïdes [42, 68, 71]. La spermadhésine bovine (aSFP) correspond à environ 5% des protéines totales, les spermadhésines porcines représentent quant à elle 30% des protéines du PS [72, 107]. Bien que d'une espèce à l'autre les familles de protéines semblent jouer un rôle similaire, leur présence en proportions différentes porte à croire que la régulation de la capacitation ne se ferait pas de la même façon. Aussi, il ne faut pas oublier que contrairement aux protéines BSP A3 et 30-kDa, pB1 seule, incubé 20 min est capable de capaciter les spermatozoïdes.

Lors de l'éjaculation, il y a recouvrement de la membrane spermatique par les protéines du PS chez les deux espèces. Par contre, une deuxième différence surgit lorsqu'on regarde l'intégrité membranaire. Chez le bœuf, les protéines majeures du PS, les BSP, induisent un efflux de cholestérol qui aurait pour effet de déstabiliser la membrane et d'autres protéines BSP resteraient liées à la membrane pour la stabiliser. Chez le porc, les protéines majeures, les spermadhésines, se lient à la membrane et c'est l'influx de bicarbonate, causé par le changement de milieu, qui induirait le remaniement membranaire et à ce moment, la protéine pB1 pourrait stabiliser la membrane. Ainsi, chez le bœuf, les protéines BSP ont un double rôle à jouer tandis que chez le porc, les actions sont jouées par deux types de protéines différentes.

Par la suite, les données actuelles nous permettent de penser que les mécanismes de stimulation sont similaires d'une espèce à l'autre. Les GAGs semblables à l'héparine et les HDL présents dans le fluide folliculaire pourraient interagir avec la protéine pB1 de la même façon que ce qui a été décrit avec les protéines BSP [15, 49-51].

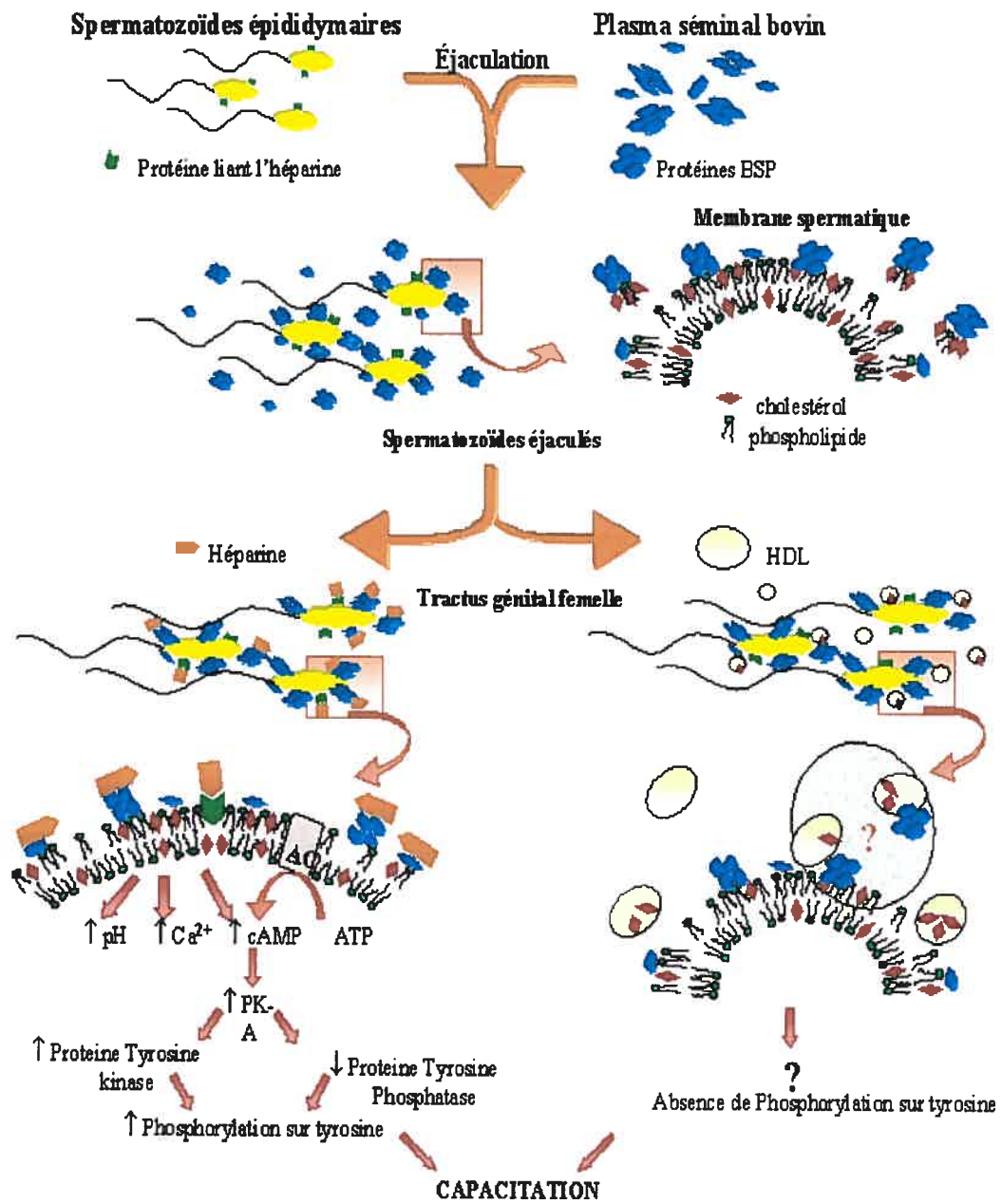


Figure 29 : Modèle de la capacitation bovine [54]

Les mécanismes intracellulaires semblent être les mêmes chez le porc et le bœuf : augmentation de calcium, de bicarbonate et du pH intracellulaire, phosphorylation sur tyrosine des protéines membranaires [16, 19].

Malgré les différences apparentes entre l'espèce bovine et l'espèce porcine, les mécanismes de capacitation des spermatozoïdes sont sensiblement les mêmes. L'étude du mécanisme de la capacitation chez deux espèces différentes favorise l'établissement d'un modèle général de la capacitation chez les mammifères.

Chez l'humain, des études préliminaires ont démontré que le PS contenait au moins trois homologues aux protéines BSP, mais qu'elles n'étaient pas des protéines majeures. De plus, jusqu'à présent, une seule spermadhésine a été identifiée dans le PS humain [108]. Il est fort probable que le mécanisme de capacitation des spermatozoïdes humains soit spécifique à l'humain, malgré qu'il suit sûrement les mêmes lignes directrices que ceux du porc et du bovin. C'est-à-dire que les protéines de la famille des protéines BSP vont induire la capacitation alors que la/les spermadhésine(s) vont l'inhiber. L'analyse de données disponibles dans la littérature nous indique que la régulation par les facteurs induisant la capacitation serait spécifique à l'espèce. La poursuite des études chez le porc et chez le bœuf va permettre de faciliter des études chez l'humain en accélérant le processus de compréhension mécanistique.

4.9 Amélioration possible des techniques de production porcine

Plusieurs études ont démontré que les changements membranaires induits par la congélation et la décongélation sont similaires aux changements provoqués lors de la capacitation. Donc, un spermatozoïde décongelé a la possibilité d'enclencher la réaction de l'acrosome beaucoup plus rapidement qu'un spermatozoïde fraîchement éjaculé. Des études ont démontré que l'incorporation de lipides dans la membrane spermatique diminue sa sensibilité au froid, mais n'a

aucun effet sur le potentiel capacitant des spermatozoïdes [95]. Donc, en ajoutant des spermadhésines, empêchant ainsi un efflux de lipides, peut-être pourrions nous développer un meilleur diluant qui permettrait de congeler les spermatozoïdes sans induire de dommages à la membrane. Les spermadhésines iraient recouvrir la membrane spermatique et la stabiliser en diminuant sa fluidité. Puisque les spermadhésines lient les hydrates de carbone des lipides, ceux-ci ne pourraient plus se déplacer à leur gré étant donné l'encombrement stérique causé par la présence des spermadhésines à leur surface. Une étude récente a aussi prouvé que la présence d'une grande quantité de glucose dans le diluant protecteur pouvait aider à préserver l'intégrité spermatique [109]. Le glucose est un inhibiteur de l'induction de la capacitation par l'héparine. Un diluant composé de glucose, de spermadhésines et de lipides pourrait s'avérer efficace pour préserver les spermatozoïdes porcins.

Les travaux du groupe de Calvete ont récemment démontré que les spermadhésines PSP-I et PSP-II, lorsque ajoutées à une solution où les spermatozoïdes sont très dilués (300 000 spermatozoïdes/ml) ont un effet inhibiteur sur la capacitation contrairement aux autres spermadhésines qui auraient un effet activateur de la capacitation sur les spermatozoïdes dilués [105]. L'addition de ces protéines dans le milieu garde les spermatozoïdes motiles et viables plus longtemps en plus de garder leur activité mitochondriale plus élevée. Puisque les spermatozoïdes sont dilués lors de la préparation des doses d'IA, il serait bon de tester l'effet d'un diluant contenant les spermadhésines PSP sur l'intégrité spermatique.

Un nouveau diluant commercial développé en ajoutant des spermadhésines, PSP-I et II, du glucose et des lipides serait très utile puisque les sources de ces produits ne sont pas dangereuses pour la propagation de maladies dépendant de leur origine. Les spermadhésines proviendraient de la même espèce, alors que le glucose est de source végétale. Les lipides quant à eux pourraient provenir du porc, d'une culture cellulaire ou des laboratoires de chimie. Depuis quelques

années déjà, il est possible de synthétiser des lipides de façon très sécuritaire en utilisant des produits chimiques (revue par [110]). En rendant plus protecteurs les diluants, les techniques d'IA pourraient se développer très rapidement puisque les doses pourraient être préparées en plus grande quantité. Aussi, il serait alors possible pour les agriculteurs d'échanger du matériel génétique entre eux où qu'ils soient dans le monde.

4.10 Les protéines du plasma séminal porcine et l'immunologie

La protéine pB1 a d'abord été identifiée par le groupe de Hadjisavas en 1994 à cause de son rôle de régulateur de l'adhésion cellulaire lors de réactions inflammatoires [67]. Lors de l'accouplement, tout comme lors de l'IA, une réaction inflammatoire est déclenchée par la présence de semence dans le tractus génital femelle. Les leucocytes s'infiltrent dans le cervix et adhèrent les uns aux autres en plus d'adhérer à la matrice extracellulaire [111]. Cette barrière bloque l'entrée des antigènes extérieurs dans l'utérus.

Outre pB1, deux autres protéines du PS porcine ont été identifiées comme étant des régulateurs de la réaction inflammatoire, les spermadhésines PSP-I et PSP-II. En effet, il a été démontré que ces protéines induisent la migration des neutrophiles dans la cavité péritonéale [82]. Il semblerait que la protéine PSP-II lie les macrophages qui eux libèrent une substance chimiotactique qui attire les neutrophiles [75]. Quant à elle, la spermadhésine PSP-I interagirait directement avec une autre protéine pour induire la migration des neutrophiles [82]. Par contre, lorsque les mastocytes sont incubés en présence des protéines PSP, elles sécrètent un facteur inhibiteur de l'activité chimiotactique des macrophages [75]. Ainsi, les spermadhésines PSP-I et PSP-II moduleraient l'activité immunitaire intra-utérine.

Ces données font ressortir le fait que toutes les protéines de la famille des spermadhésines ne jouent pas nécessairement le même rôle. Certaines auraient un rôle de régulateur de la capacitation alors que d'autres seraient des régulateurs de la réaction inflammatoire. Il se peut aussi qu'une même protéine puisse jouer plusieurs rôles.

4.11 Perspectives

Comme travaux à venir, il faudra dans un premier temps terminer les études de capacitation avec la protéine pB1 et vérifier que l'inhibition de la capacitation par AQN-1 est aussi valable à forte concentration. Pour connaître l'influence de chacune des protéines sur la capacitation des spermatozoïdes porcins, des expériences de capacitation en présence des deux protéines devront être réalisées. Ces expériences devront être faites en utilisant différentes proportions de chacune des protéines. Suite à ces expériences, il faudra raffiner le modèle de capacitation des spermatozoïdes porcins en vérifiant si les résultats restent les mêmes en présence d'héparine. Il faudra aussi voir si, comme les protéines BSP, la protéine pB1 induit un efflux de cholestérol et de phospholipides de la membrane des spermatozoïdes. D'un point de vue biochimique, on pourrait vérifier s'il y a une différence dans la signalisation intracellulaire induite par pB1 et AQN-1 lorsque la capacitation se fait en présence et en absence d'héparine. Il faudra vérifier si les protéines pB1 et AQN-1 induisent une phosphorylation ou une déphosphorylation des protéines membranaires et une variation du pH intracellulaire et de la concentration de calcium. À l'aide de la mérocyanine, on pourrait aussi vérifier si elles stabilisent la membrane spermatique ou, au contraire, la déstabilisent.

Puisque les protéines BSP semblent être responsables de la liaison des spermatozoïdes bovins à la membrane des cellules de l'oviducte lors de la formation du réservoir [112], il se pourrait que la protéine pB1 joue ce rôle chez le

porc. Par contre, il se pourrait aussi que la spermadhésine AQN-1 soit elle aussi capable d'induire cette liaison par son affinité aux hydrates de carbone. Des expériences de liaison aux cellules épithéliales de l'oviducte devront donc être réalisées pour connaître qu'elle est la protéine responsable de cette liaison chez le porc.

Dans une autre optique, il faudrait commencer à étudier l'effet de la présence des spermadhésines dans les diluants utilisés pour les doses d'IA et lors de la cryoconservation.

4.12 Conclusions

Finalement, après de multiples stratégies pour purifier la protéine pB1, homologue porcin des protéines BSP, nous avons réussi par chromatographie d'exclusion de taille à la purifier en plus de réussir à purifier la spermadhésine AQN-1. Par des expériences de capacitation, nous avons été en mesure d'évaluer le rôle biologique de ces deux protéines sur la capacitation des spermatozoïdes porcins. Les résultats obtenus nous permettent d'affirmer pour la première fois que la spermadhésine AQN-1 est un inhibiteur de la capacitation alors que pB1 semble être un inducteur.

Suite à ces résultats, un modèle hypothétique du mécanisme de la capacitation porcine a pu être élaboré. Le modèle présenté est basé sur le modèle de la capacitation bovine et partage donc plusieurs similitudes. Par contre, certains mécanismes, comme le déclenchement des changements membranaires sont différents entre les deux espèces.

Pour l'avenir, les résultats obtenus vont pouvoir aider à l'optimisation des techniques d'IA et de cryoconservation. Peut-être qu'en ajoutant des spermadhésines dans le diluant, nous serions en mesure de diminuer les effets

néfastes provoqués par la congélation et la décongélation. Si ces protéines agissaient comme protecteur, la technologie de l'IA pourrait se développer très rapidement et plus de doses d'insémination pourraient être préparées. De plus, l'utilisation d'un agent protecteur provenant de la même espèce que les spermatozoïdes à protéger est un moyen très sécuritaire pour contrer la propagation de maladies.

5 Bibliographie

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *Biologie de la cellule*. Paris: Médecine-Sciences Flammarion; 1994.
2. Gilberts S. *Developmental Biology*. Sauerland: Sinauer Associates Inc; 2000.
3. Knobil E, Neill JD. *The physiology of Reproduction*. New-York: Raven Press; 1988.
4. Abou-Haila A, Tulsiani DR. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 2000; 379: 173-182.
5. Kierszenbaum AL. Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr Rev* 1994; 15: 116-134.
6. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9: 411-416.
7. Gagnon C. *The male gamete: From basic to clinical applications*. Illinois: Cache River Press; 1999.
8. Brandes D. *Male accessory sex organs: Structure and Function in mammals*. New York: Academic Press; 1974.
9. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* 1951; 168: 697-698.
10. Austin CR. Observations on the penetration of sperm into mammalian egg. *Aust J Sci Res* 1951; 4: 581-596.
11. Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 133-150.
12. Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 378-391.

13. Harrison RA, Miller NG. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 220-228.
14. Cohen-Dayag A, Eisenbach M. Potential assays for sperm capacitation in mammals. *Am J Physiol* 1994; 267: C1167-1176.
15. Therien I, Soubeyrand S, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod* 1997; 57: 1080-1088.
16. Travis AJ, Kopf GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 2002; 110: 731-736.
17. Voet D, Voet J. *Biochimie*. Paris: De Boeck Université; 1998.
18. Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 787-792.
19. Tardif S, Dube C, Chevalier S, Bailey JL. Capacitation Is Associated with Tyrosine Phosphorylation and Tyrosine Kinase-Like Activity of Pig Sperm Proteins. *Biol Reprod* 2001; 65: 784-792.
20. Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 419-425.
21. de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; 2: 48-54.
22. Way AL, Killian GJ. Capacitation and induction of the acrosome reaction in bull spermatozoa with norepinephrine. *J Androl* 2002; 23: 352-357.
23. Varner DD, Bowen JA, Johnson L. Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm. *Arch Androl* 1993; 31: 199-207.
24. Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106: 1092-1098.

25. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* 1990; 42: 899-915.
26. Lefebvre R, Suarez SS. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol Reprod* 1996; 54: 575-582.
27. Petrunkina AM, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Topfer-Petersen E. Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca²⁺ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction* 2001; 122: 469-480.
28. Wagner A, Ekhlasi-Hundrieser M, Hettel C, Petrunkina A, Waberski D, Nimtze M, Topfer-Petersen E. Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation-studies in the pig. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 249-257.
29. Dobrinski I, Suarez SS, Ball BA. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biol Reprod* 1996; 54: 783-788.
30. Nakanishi T, Ikawa M, Yamada S, Toshimori K, Okabe M. Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation. *Dev Biol* 2001; 237: 222-231.
31. Einspanier R, Einspanier A, Wempe F, Scheit KH. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 1006-1010.
32. Manjunath P. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. In: Sairam MR, Atkinson LE (eds.), *Gonadal proteins and peptides and their biological significance*. Singapore: World Scientific Publishing Company; 1984: 49-61.
33. Desnoyers L, Thérien I, Manjunath P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 425-435.

34. Manjunath P, Sairam MR. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 et BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 1987; 241: 685-692.
35. Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Ying SY, Guillemin R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113: 861-867.
36. Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam M.R., Chrétien M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma (homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin). *Biochem. J.* 1987; 243: 195-203.
37. Banyai L, Trexler M, Koncz S, Gyenes M, Sipos G, Patthy L. The collagen-binding site of type-II units of bovine seminal fluid protein PDC-109 and fibronectin. *Eur J Biochem* 1990; 193: 801-806.
38. Engvall E, Ruoslahti E. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer* 1977; 20: 1-5.
39. Vuento M, Vaheri A. Purification of fibronectin from human plasma by affinity chromatography under non-denaturing conditions. *Biochem J* 1979; 183: 331-337.
40. Manjunath P, Sairam MR, J. U. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosciences Reports* 1987; 7: 231-238.
41. Calvete JJ, Mann K, , Sanz L, Raida M, Topfer-Petersen E. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *Febs Letters* 1996; 399: 147-152.
42. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: Chrétien M, McKerns KW (eds.), *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems*. New York: Plenum Publishing Corp; 1988: 259-273.
43. Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 1989; 264: 16853-16857.

44. Manjunath P, Chandonnet I, Leblond E, Desnoyer I. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50: 27-37.
45. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 313-318.
46. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 1992; 267: 10149-10155.
47. Jones HP, Lenz RW, Palevitz BA, Cormier MJ. Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 2772-2776.
48. Manjunath P, Chandonnet L, Baillargeon L, Roberts KD. Calmodulin-binding proteins in bovine semen. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 75-81.
49. Thérien I, Bleau G, Manjunath P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 1995; 52: 1372-1379.
50. Therien I, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1998; 59: 768-776.
51. Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1999; 61: 590-598.
52. Moreau R, Thérien I, Lazure C, Manjunath P. Type II domains of BSP-A1/A2 proteins: binding properties, lipid efflux, and sperm capacitation potential. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 148-154.
53. Lane ME, Thérien I, Moreau R., Manjunath P. Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol Reprod* 1999; 60: 169-175.
54. Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 109-119.

55. Parrish JJ, First NL. Bovine in vitro fertilization. In: Dunbar BS, O'Rand MG (eds.), A comparative overview of mammalian fertilization. New York: Plenum Press; 1991: 351-361.
56. Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998; 59: 1-6.
57. Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 39.
58. Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation of ram seminal plasma phospholipid-binding proteins homologous to the bovine seminal phospholipid-binding proteins. *Anim Reprod Sci* 2003; soumis.
59. Boisvert M, Bergeron A, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol Reprod* 2003; soumis.
60. Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Topfer-Petersen E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 1995; 310: 615-622.
61. Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 1997; 407: 201-206.
62. Menard M, Nauc V, Lazure C, Vaillancourt D, Manjunath P. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. *Biol Reprod* 2003; 69.
63. Leblond E, Desnoyers L, Manjunath P. Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mole Reprod Dev* 1993; 34: 443-449.

64. Magdaleno L, Gasset M, Varea J, Schambony AM, Urbanke C, Raida M, Topfer-Petersen E, Calvete JJ. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *FEBS Lett* 1997; 420: 179-185.
65. Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Topfer-Petersen E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur J Biochem* 1996; 242: 636-640.
66. Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Topfer-Petersen E. Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. *Andrologia* 1997; 29: 179-186.
67. Hadjisavas M, Armstrong DT, Seamark RF. Purification of a cell-cell adhesion regulator from porcine seminal vesicle fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1206-1216.
68. Plucienniczak G, Jagiello A, Plucienniczak A, Holody D, Strzezek J. Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54-kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 303-309.
69. Bezouska K, Sklenar J, Novak P, Halada P, Havlicek V, Kraus M, Ticha M, Jonakova V. Determination of the complete covalent structure of the major glycoform of DQH sperm surface protein, a novel trypsin-resistant boar seminal plasma O-glycoprotein related to pB1 protein. *Protein Sci* 1999; 8: 1551-1556.
70. Jonakova V, Kraus M, Veselsky L, Cechova D, Bezouska K, Ticha M. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *J Reprod Fertil* 1998; 114: 25-34.
71. Dostalova Z, Calvete JJ, Sanz L, Topfer-Petersen E. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of

- epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1200: 48-54.
72. Jonakova V, Manaskova P, Kraus M, Liberda J, Ticha M. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol Reprod Dev* 2000; 56: 275-277.
 73. Calvete JJ, Sanz L, Ensslin M, Topfer-Petersen E. Sperm surface protein. *Reprod Dom Animals* 1996; 31: 101-105.
 74. Topfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 1998; 30: 217-224.
 75. Assreuy AM, Alencar NM, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Feitosa RF, Cunha FQ, Calvete JJ, Ribeiro RA. Porcine Spermadhesin PSP-I/PSP-II Stimulates Macrophages to Release a Neutrophil Chemotactic Substance: Modulation by Mast Cells. *Biol Reprod* 2003; 68: 1836-1841.
 76. Blake DA, Goldstein IJ. Resolution of nucleotide sugars and oligosaccharides by lectin affinity chromatography. *Anal Biochem* 1980; 102: 103-109.
 77. Manaskova P, Meszarosova A, Liberda J, Voburka Z, Ticha M, Jonakova V. Aggregated forms of heparin-binding and non-heparin-binding proteins of boar seminal plasma and their binding properties. *Folia Biol (Praha)* 1999; 45: 193-201.
 78. Manaskova P, Liberda J, Ticha M, Jonakova V. Aggregated and monomeric forms of proteins in boar seminal plasma: characterization and binding properties. *Folia Biol (Krakow)* 2000; 46: 143-151.
 79. Sinowatz F, Amselgruber W, Topfer-Petersen E, Calvete JJ, Sanz L, Plendl J. Immunohistochemical localization of spermadhesin AWN in the porcine male genital tract. *Cell Tissue Res* 1995; 282: 175-179.
 80. Ekhlasi-Hundrieser M, Sinowatz F, De Wilke IG, Waberski D, Topfer-Petersen E. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 32-41.

81. Manaskova P, Liberda J, Ticha M, Jonakova V. Isolation of non-heparin-binding and heparin-binding proteins of boar prostate. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 770: 137-143.
82. Assreuy AM, Calvete JJ, Alencar NM, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Melo SC, Cunha FQ, Ribeiro RA. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. *Biol Reprod* 2002; 67: 1796-1803.
83. Rodriguez-Martinez H, Iborra A, Martinez P, Calvete JJ. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 491-497.
84. Petrunkina AM, Harrison RA, Topfer-Petersen E. Only low levels of spermadhesin AWN are detectable on the surface of live ejaculated boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12: 361-371.
85. Dostalova Z, Calvete JJ, Topfer-Petersen E. Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376: 237-242.
86. Topfer-Petersen E, Calvete JJ. Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida-binding molecules: structure-function correlations of boar spermadhesins. *J Reprod Fertil Suppl* 1996; 50: 55-61.
87. Bavister BD. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction* 2002; 124: 181-196.
88. Green CE, Watson PF. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 2001; 122: 889-898.
89. Huo LJ, Ma XH, Yang ZM. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 2002; 58: 1349-1360.
90. Kaneto M, Harayama H, Miyake M, Kato S. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining

- assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim Reprod Sci* 2002; 73: 197.
91. Conejo-Nava J, Fierro R, Gutierrez CG, Betancourt M. Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C. *Arch Androl* 2003; 49: 287-295.
 92. Ikeda H, Kikuchi K, Noguchi J, Takeda H, Shimada A, Mizokami T, Kaneko H. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. *Theriogenology* 2002; 57: 1309-1318.
 93. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 143-172.
 94. Eriksson BM. Cryopreservation of boar semen. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences; 2000. Doctoral.
 95. He L, Bailey JL, Buhr MM. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biol Reprod* 2001; 64: 69-79.
 96. Soubeyrand S, Lazure C, Manjunath P. Phospholipase A2 from bovine plasma seminal plasma is platelet-activating factor acetylhydrolase. *Biochem J* 1998; 329: 41-47.
 97. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
 98. Gottlieb M, Chavko M. Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agarose gels. *Anal Biochem* 1987; 165: 33-37.
 99. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4354.
 100. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Menard M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* 2002; 67: 1250-1258.
 101. Roberts KP, Wamstad JA, Ensrud KM, Hamilton DW. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. *Biol Reprod* 2003; 69: 572-581.

102. Ax RL, Gilbert GR, Shook GE. Sperm in poor quality semen from bulls during heat stress have a lower affinity for binding hydrogen-3 heparin. *J Dairy Sci* 1987; 70: 195-200.
103. Flesch FM, Wijnand E, van De Lest CH, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 2001; 60: 107-115.
104. Tardif S, Dube C, Bailey JL. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* 2003; 68: 207-213.
105. Centurion F, Vazquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Garcia EM, Martinez EA. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol Reprod* 2003; 69: 640-646.
106. Jimenez I, Gonzalez-Marquez H, Ortiz R, Herrera JA, Garcii A, Betancourt M, Fierro R. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* 2003; 59: 1171-1180.
107. Dias JM, Carvalho AL, Kolln I, Calvete JJ, Topfer-Petersen E, Varela PF, Romero A, Urbanke C, Romao MJ. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of aSFP, a bovine seminal plasma protein with a single CUB domain architecture. *Protein Sci* 1997; 6: 725-727.
108. Kraus M, Ticha M, Jonakova V. Heparin-binding proteins of human seminal plasma homologous with boar spermadhesins. *J Reprod Immunol* 2001; 51: 131-144.
109. De los Reyes M, Saenz L, Lapierre L, Crosby J, Barros C. Evaluation of glucose as a cryoprotectant for boar semen. *Vet Rec* 2002; 151: 477-480.
110. Gunstone FD. Lipid chemistry--a personal view of some developments in the last 60 years. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1631: 207-217.

111. Lovell JW, Getty R. Fate of semen in the uterus of the sow: histologic study of endometrium during the 27 hours after natural service. *Am J Vet Res* 1968; 29: 609-625.
112. Gwathmey TM, Igotz GG, Suarez SS. PDC-109 (BSP-A1/A2) Promotes Bull Sperm Binding to Oviductal Epithelium In Vitro and May Be Involved in Forming the Oviductal Sperm Reservoir. *Biol Reprod* 2003; 69: 809-815.
113. Bonnes G, Desclaude J, Drogoul C, Gadoud R, Jussiau R, Le Loc'h A, Montméas L, Robin G. *Reproduction des mammifères d'élevage*. Paris: Les éditions Foucher, INRAP, 1988.
114. Pond WG, Houpt KA. *The biology of the pig*. Ithaca: Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, 1978.
115. Cole DJA, Foxcroft GR. *Control of pig reproduction*. London: Butterworth Scientific, 1982.
116. Pond WG, Mersmann HJ. *Biology of the domestic pig*. Ithaca: Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, 2001.
117. Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K, Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 1995; 104: 305-313.
118. Ward CR, Storey BT, Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* 1984; 104: 287-296.

Annexe I : Biologie Moléculaire

Ces expériences ont été réalisées dans le but d'obtenir la protéine pB1 recombinante, puisque nous n'étions pas capables d'obtenir la protéine native. Bien qu'elles n'ont pas été menées jusqu'au bout, étant donné que nous avons finalement été en mesure de purifier la protéine pB1 native avec l'aide d'anticorps, ces expériences m'ont permis de me familiariser avec les techniques de la biologie moléculaire et c'est pourquoi je tenais à présenter ces résultats.

I. Matériel et Méthodes

Prélèvement des tissus

Les vésicules séminales ont été prélevées à un abattoir régional sur des verrats fraîchement abattus et ont été congelées immédiatement dans l'azote liquide, pour éviter que l'ARN se dégrade. Suite à quoi elles ont été conservées à -80°C .

Extraction d'ARN total

L'ARN a été extrait des tissus en utilisant la technique du TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). Le protocole fourni par la compagnie a été suivi. Environ 200 mg de vésicule séminale de porc ont été homogénéisés dans 2 ml de TRIzol en utilisant le polytron. Après une incubation de 5 min à la température de la pièce, 0,4 ml de chloroforme ont été ajoutés et la solution a été agitée vigoureusement durant 15 sec. Après une deuxième incubation de 5 min à température de la pièce, une centrifugation de 15 min à $12\ 000 \times g$ à 4°C a été effectuée. La phase aqueuse a été transférée dans un autre tube

et l'ARN a été précipité avec 1 ml d'alcool isopropylique. Le précipité a été centrifugé à 12 000 x g à 4°C pour 15 min. Le culot d'ARN a été lavé à l'éthanol 75% et séché partiellement à l'air. L'ARN a ensuite été dosé par spectrophotométrie à 260 nm.

RT

2 µg d'ARN total ont été mis en solution avec 500 µg d'oligo(dT) (Invitrogen Life Technologies) et 10 mM de dNTP (Invitrogen Life Technologies). Le volume a été ajusté à 12 µl avec de l'eau DEPC. Pour dénaturer les structures secondaires de l'ARN, les tubes ont été placés à 65°C durant 5 min avant d'être mis sur glace et d'être centrifugés. Le tampon First strand, le DTT et le RNAGuard (Invitrogen Life Technologies) ont alors été ajoutés. Après une incubation de 2 min à 37°C, l'enzyme M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies) a été ajoutée. La transcription inverse a été effectuée à 37°C et a duré 50 min. Finalement, pour éviter d'interférer lors du PCR, l'enzyme M-MLV a été dénaturée par une incubation de 15 min à 70°C, et le volume des échantillons a été ajusté à 100 µl avec de l'eau DEPC.

PCR

10 µl de cDNA (obtenue après le RT-PCR) ont été mis en solution avec 10 picomol de chacune des deux amorces. La séquence de l'amorce sens, pB1-1, était CGG AAT TCA TGG CAC CGC GTT TGG GGA TCT TTC. L'amorce anti-sens, pB1-2, avait GCC CTA GGC TAG CAG TAC CTC CAA GCT CGA TCC pour séquence. La première amorce s'hybride avec la partie 3' du cDNA alors que l'amorce pB1-2 s'hybride avec la partie 5', le produit de PCR sera donc le cDNA complet de la protéine pB1 (environ 400 pb). Outre les amorces, le cDNA était incubé avec 200 µM de dNTP (Invitrogen Life Technologies), avec du tampon PCR (Amersham

Pharmacia Biotech) et avec l'enzyme Taq polymérase (2,5 U/ μ l) (Amersham Pharmacia Biotech). Le volume final a été ajusté avec de l'eau stérile à 25 μ l. Le cycle de PCR qui a été suivi était 94°C durant 5 min suivi de 35 cycles (94°C pour 15 sec, 55°C durant 15 sec et 72°C pour 30 sec) et se terminait par 10 min à 72°C.

Électrophorèse sur gel d'agarose

Les électrophorèses sur gels d'agarose 1% ont toutes été faites dans du tampon TAE (tris 80 mM, acide acétique 0,4 M, Na₂EDTA 1 mM). La migration se faisait à 100 V pour 30 min. Le gel était coloré environ 15 min au bromure d'étidium (1 μ g/ml) avant d'être exposé aux rayons ultraviolets.

Extraction de cDNA du gel d'agarose

L'extraction de la bande d'environ 400 pb s'est faite à l'aide d'un scalpel. Une fois la bande pesée, l'extraction du cDNA a été faite à l'aide de l'ensemble QIAquick spin de QIAGEN Inc (Mississauga, Ontario, Canada). Le protocole fourni par la compagnie a été suivi. Une incubation de 10 min à 50°C dans 3 volumes de tampon QG était faite pour dissoudre l'agarose. Ensuite, 1 volume d'isopropanol a été ajouté à la solution avant de transférer le mélange sur une colonne QIAquick. Après une centrifugation d'une minute, la colonne a été lavée, dans un premier temps, avec du tampon QG et avec du tampon PE dans un second temps. L'élution du cDNA a été faite à l'aide de 30 μ l de tampon EB (tampon Tris). Le cDNA a ensuite été dosé par spectrophotométrie à 260 nm.

Clonage dans le vecteur pCR2.1

Le produit de PCR a été ligué dans le vecteur pCR2.1 (Invitrogen Life Technologies) selon un ratio de 3 pour 1. La technique de ligation utilisée était celle des crochets de polyA : Le produit de PCR se termine par des extrémités de polyA alors que le site de polyclonage du vecteur contient des extrémités polyT (voir figure 30). La T4 Ligase et le tampon de ligation provenaient aussi d'Invitrogen. L'incubation durait toute la nuit à 14°C. Les cellules INV α F' étaient ensuite transformées avec 2 μ l de produit de ligation en utilisant la technique du choc thermique. L'antibiotique de sélection était la kanamycine et le gène rapporteur était le gène LacZ. Puisque l'insertion se faisait à l'intérieur du gène LacZ, les colonies qui possédaient l'insert ne pouvaient pas réagir avec la β -galactosidase, ce qui les laissait blanches. Après 18 h d'incubation à 37°C, les colonies blanches ont été repiquées pour pouvoir effectuer une miniprep.

MiniPrep, midiPrep, maxiPrep

Les miniprep, midiprep et les maxiprep ont toutes été faites selon le protocole des ensembles fournies par Quiagen (Quiagen Inc). Ces trois techniques servent à purifier le plasmide transformé dans les bactéries. La différence entre les trois techniques est la quantité d'ADN qui est purifié. Les miniprep purifient une quantité beaucoup plus petite que les maxiprep. Les midiprep sont un intermédiaire entre la mini et la maxiprep. Pour les miniprep, 1,5 ml de suspension bactérienne ont été centrifugée 1 min à 10 000 x g. Après avoir enlevé le surnageant, le culot a été resuspendu dans 250 μ l de tampon P1. Ensuite, pour lyser les membranes, 250 μ l de tampon P2 ont été ajoutée et mélangé 4 à 6 fois par inversion. Toujours en mélangeant par inversion, 350 μ l de tampon N3 ont été ajouté pour précipiter les protéines. La suspension était alors centrifugée 10 min à

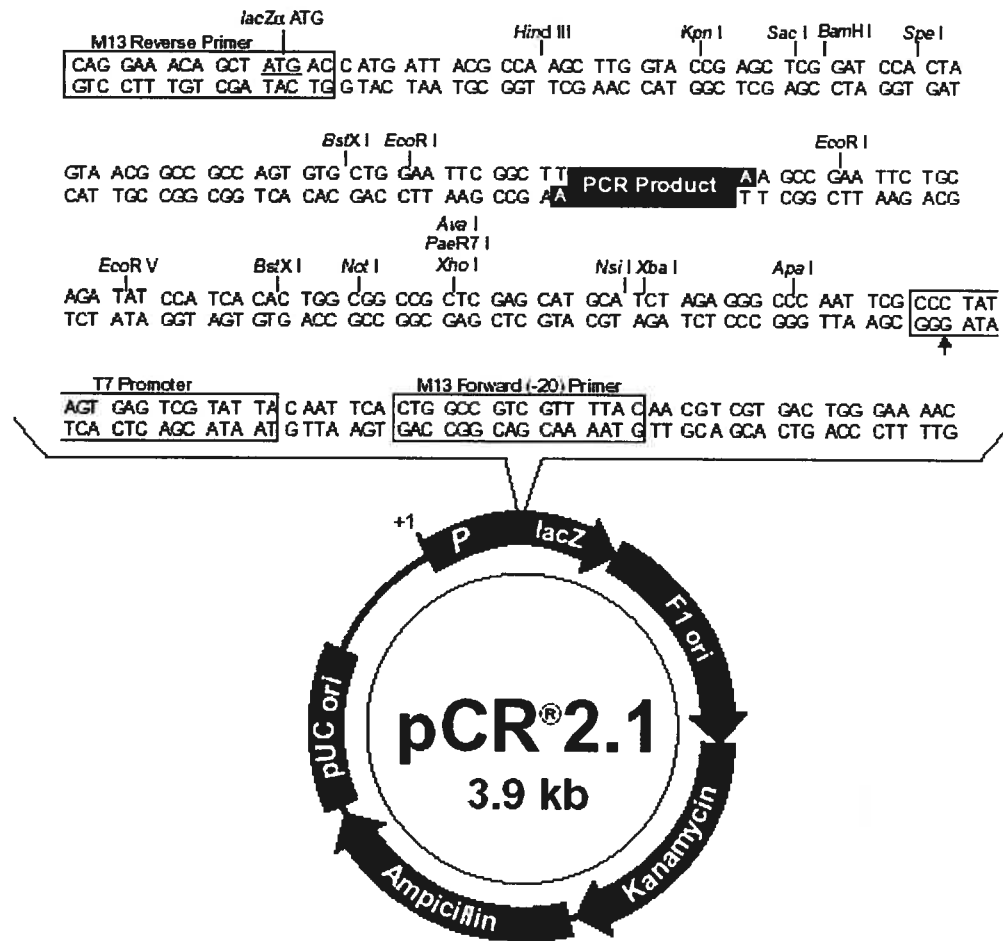


Figure 30: Carte du vecteur pCR2.1 (Invitrogen Life Technologies)

la vitesse maximale de la centrifugeuse de table. Le surnageant a été placé sur une colonne QIAprep avant de faire une centrifugation de 1 min pour permettre à l'ADN de fixer la colonne. Un lavage avec 0,5 ml de tampon PB suivi d'un deuxième avec 0,75 ml de tampon PE ont été faits. Finalement, le cDNA a été élué avec 50 µl de tampon EB. Le cDNA a ensuite été dosé par spectrophotométrie à 260 nm avant d'être digéré et placé sur gel d'agarose 1% pour vérifier la taille.

Digestion enzymatique

Après les miniprep, les vecteurs ont été digérés par l'enzyme de restriction EcoR1 (Amersham Pharmacia Biotech) dans le cas de pCR2.1 et par les enzymes BamH1 et Xba1 (Amersham Pharmacia BioTech) dans le cas de pcDNA3.1-. L'utilisation d'une unité d'enzyme par microgramme d'ADN à digérer était la règle suivie. Les digestions, d'une durée de 1,5 h, ont été réalisées à 37°C lorsque les enzymes étaient EcoR1 ou Xba1 et à 30°C lorsque l'enzyme était BamH1. Les digestions par EcoR1 ont été réalisées pour vérifier la présence de l'insert dans le vecteur pCR2.1 alors que les digestions Xba1/BamH1 ont été réalisées pour vérifier la présence de l'insert dans le vecteur pcDNA3.1- ou pour sortir le cDNA du vecteur pCR2.1.

Clonage dans le vecteur pcDNA3.1-

Une digestion enzymatique du vecteur pCR2.1/pB1 a été effectuée dans un premier temps. Le vecteur a été digéré dans le site de polyclonage par les enzymes de restriction BamH1 (1 unité) et Xba1 (1 unité) dans du tampon « one-phore all » durant 1,5 h (Amersham Pharmacia Biotech). Après une électrophorèse sur gel d'agarose 1% la bande correspondant au cDNA de pB1 a été extraite comme décrit plus haut. Le produit de digestion a été inséré dans le vecteur pcDNA3.1- (voir figure 31) (Invitrogen Life Technologies). Le vecteur pcDNA3.1- avait préalablement été digéré par BamH1 et Xba1 et déphosphorylé avec la phosphatase alcaline (Amersham Pharmacia Biotech) pour éviter sa recircularisation. Encore une fois, la ligation durait environ 18 h et était effectuée à 14°C. Finalement, les cellules DH5 α ont été transformées avec 2 μ l de produit de ligation en utilisant la technique du choc thermique. L'antibiotique de sélection était l'ampicilline et il n'y avait pas de gène rapporteur. Après environ 18 h

d'incubation à 37°C, les colonies ont été repiquées pour effectuer une miniprep et vérifier l'efficacité de la ligation par digestion enzymatique.

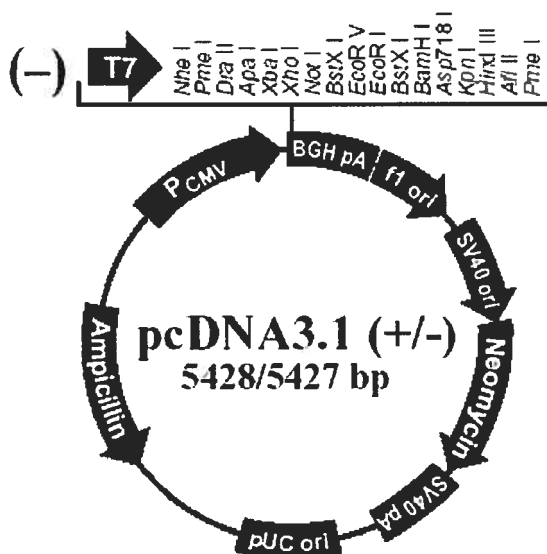


Figure 31: Carte du vecteur pcDNA3.1- (Invitrogen Life Technologies)

Séquençage

Le cDNA a été séquençé par la technique de Big Dye Terminator en utilisant un appareil ABI PRISM 3100. Un aliquot de 500 ng de plasmide a été mis en solution avec 1 µl de solution de la réaction terminatrice (terminator reaction mix), 1,5 µl de diluant 5X, 5 picomole d'amorce (une seule amorce par tube) et le volume était complété à 10 µl avec de l'eau. Les amorces utilisées étaient les mêmes que celles décrites à la section PCR. Après avoir bien mélangé, les tubes ont été placés dans l'appareil à PCR et les conditions suivantes ont été

suivi : 96°C pour 2 min et 25 cycles (30 sec à 96°C, 15 sec à 50°C et 4 min à 60°C). Il faut ensuite précipiter la réaction de séquence.

Tout d'abord, 3 µl d'acétate de sodium 3 M (pH 4,6), 62,5 µl d'éthanol 95% et 14,5 µl d'eau ont été ajoutés à chacun des tubes en mélangeant par inversion. Après une incubation de 15 min à la température de la pièce, les tubes ont été centrifugés 45 min à 2 000 x g. Le surnageant a été retiré en inversant les tubes sur un papier absorbant. Pour s'assurer que le surnageant était totalement retiré, les tubes ont été centrifugés 1 min à 50 x g en position inversée. Pour laver, 150 µl d'éthanol 70% ont été placés dans chacun des tubes. Une centrifugation de 10 min à 2 000 x g a été effectuée avant de retirer le surnageant de la même façon que précédemment. Le culot a été séché à l'air libre, avant d'être resuspendu dans 30 µl de formamide. Finalement, avant de passer les échantillons dans le séquenceur automatique (ABI PRISM 3100), on devait dénaturer l'ADN à 95°C pendant 5 min avant de le mettre dans un bain glace/eau pour 5 min.

II. Résultats

Suite à l'extraction de l'ARN total d'un échantillon de tissus des vésicules séminales de porc, à l'aide de la méthode du TRIzol, un RT-PCR a été fait afin d'amplifier le cDNA correspondant à la protéine pB1. Le résultat du PCR a été mis sur gel d'agarose pour vérifier la taille du fragment amplifié. À la figure 32, on peut voir qu'une bande est visible à la hauteur attendue d'environ 400 pb. Cette bande a été découpée et le cDNA a été purifié avant d'être cloné dans le vecteur pCR2,1. Comme le vecteur pCR2,1 n'est pas un vecteur d'expression le cDNA a été digéré à l'aide des enzymes de restriction BamH1 et Xba1 (figure 33) et cloné dans le vecteur pcDNA3,1-. Suite à ce deuxième clonage, le cDNA a été séquencé pour vérifier que la séquence clonée était bien celle codant pour la protéine pB1 entière (figure 34). Le cDNA cloné correspond au cDNA complet de la protéine pB1 (Plucienniczak 1999).

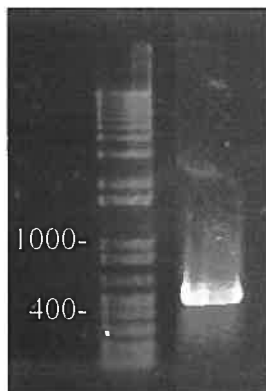


Figure 32 : Analyse des produits de la réaction de PCR mis sur gel d'agarose 1%. Le tampon de migration était du TAE 1X et la migration durait 30 min (100 V). Le marqueur de poids moléculaire utilisé était le 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen Life Technology).

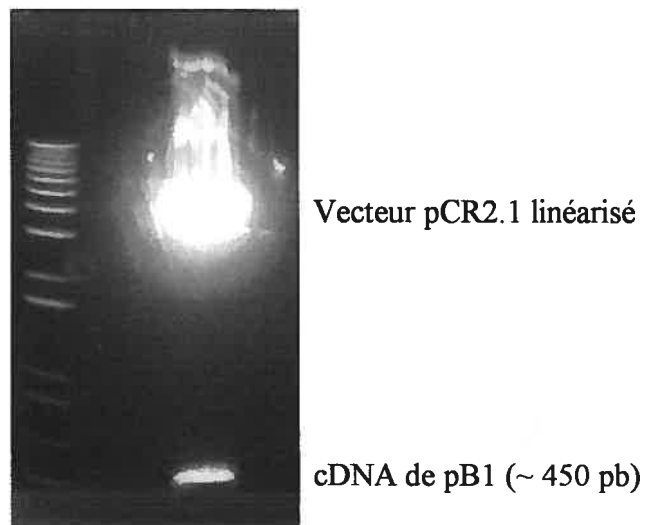


Figure 33 : Analyse des produits de la digestion du vecteur pCR2.1/pB1 par les enzymes de restriction Xba1/BamH1 placé sur gel d'agarose 1% (tampon TAE 1X, migration 30 min à 100 V). Le marqueur de poids moléculaire utilisé était le 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen Life Technology).

TGGGCTGGCGTATCTGTATTCTACCCCTGGACCCTGTGAATGGAGATC
 Peptide signal D
 AACATCTGCCTGGGCGCTTCCTTACTCCTGCCATTACCTCAGATGATAA
 Q H L P G R F L T P A I T S D D K
 ATGTGTTTTCCCATTCATCTATAAAGGCAACCTGTATTTGATTGCACT
 C V F P F I Y K G N L Y F D C T
 CTGCATGACTCCACATACTACTGGTGTTCGTAACCTACCTATTATATGA
 L H D S T Y Y W C S V T T Y Y M
 AAAGATGGAGATACTGCAGAAGCACAGACTATGCCAGGTGTGCTTTGC
 K R W R Y C R S T D Y A R C A L
 CCTTTATCTTTGAGGCAAAGAATATGACAGTTGCATAAAAGAAGGGA
 P F I F R G K E Y D S C I K E G
 GTGTTTTTTCAAAGTATTGGTGCCCGGTCACCCCAAATTATGACCAGGA
 S V F S K Y W C P V T P N Y D Q D
 TCGAGCTGGAGGTACTGCTAGCCTAGGGCAAGCCGAATTCCAGCACA
 R A W R Y C stop
 CTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGG

Figure 34 : Séquence du cDNA cloné dans le vecteur pcDNA3.1-.

Comme la protéine pB1 native a été purifiée par les techniques de chromatographie, le développement des techniques de biologie moléculaire s'est arrêté dans la mise au point de la transfection d'une lignée de cellules CHO par le vecteur pcDNA3,1-/pB1.

Annexe II : Exemple de données brutes obtenues par comptage au CTC

Tableau V: Données brutes obtenues par comptage, au microscope à fluorescence, des profils de CTC des spermatozoïdes porcins aux temps 1,5 h.

Profils de CTC	avec ionophore (%)			sans ionophore (%)		
	F	B	AR	F	B	AR
AQN-1 0 µg/ml	1,50	43,00	56,50	9,00	72,75	19,00
AQN-1 50 µg/ml	3,75	46,75	49,50	9,50	69,25	22,00

Ces résultats correspondent aux pourcentages de chacun des profils observés au microscope après avoir compté 400 cellules (200 cellules/lame). Puisque les profils de CTC sont difficiles à identifier, particulièrement les profils F par rapport au profil B, les analyses statistiques étaient effectuées en soustrayant le pourcentage de profils AR sans ionophore du pourcentage de profils AR avec ionophore, ce qui nous donnait le pourcentage de spermatozoïdes réellement capités. Il est important de noter que l'ionophore rend AR seulement les spermatozoïdes qui étaient déjà capités [117-118]. De plus, il faut noter que pour chacune des expériences, chacun des traitements sans ionophore présentaient approximativement le même pourcentage de profil AR pour un temps d'incubation donné.

Exemple de calcul de spermatozoïdes réellement capités :

Au temps 1,5 h.

$56,5\% - 19\% = 37,5\%$ de spermatozoïdes réellement capités pour 0 µg/ml

$49,5\% - 22\% = 27,5\%$ de spermatozoïdes réellement capités pour 50 µg/ml