

2m11.2846.9

Université de Montréal

Isolement de protéines apparentées aux protéines majeures du plasma séminal bovin
chez divers mammifères

par

Martin Ménard

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 1999

©Martin Ménard, 1999
Université de Montréal
Faculté des études supérieures



W
4
U58
1999
V.147



UNIVERSITY OF TORONTO
LIBRARIES

Ce mémoire intitulé:
"Isolement de protéines apparentées aux protéines majeures du plasma séminal
bovin chez divers mammifères"

présenté par:

Martin Ménard

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Réjean Morais : président-rapporteur

Puttaswamy Manjunath : directeur de recherche

Guy Boileau : membre du jury

Mémoire accepté le:

SOMMAIRE

Au moment de l'éjaculation, les spermatozoïdes de mammifères sont incapables de féconder l'ovule. Afin d'acquérir ce pouvoir fécondant, ils doivent séjourner dans le tractus génital femelle où ils subissent une série de modifications physiologiques et fonctionnelles nommée capacitation. Ce processus de maturation tardif est essentiel à l'enclenchement de la réaction de l'acrosome, dernière étape menant à la fécondation de l'ovule.

Diverses études ont démontré qu'une famille de protéines du plasma séminal bovin, les protéines BSP-A1/A2, BSP-A3 et BSP-30-kDa (collectivement nommées les protéines BSP, Bovine Seminal Plasma), seraient des facteurs responsables de la modulation de la capacitation des spermatozoïdes. Ces protéines liant la membrane plasmique du spermatozoïde au moment de l'éjaculation faciliteraient les interactions entre le spermatozoïde et certains facteurs capacitants du tractus génital femelle accélérant ainsi le processus de capacitation.

La découverte de protéines analogues aux protéines BSP chez le cheval et le porc, ainsi que la détection de protéines liant la phosphorylcholine immunologiquement apparentées à ces protéines chez divers mammifères semblent indiquer la possible ubiquité de cette famille de protéines. Les mécanismes menant à la capacitation demeurant méconnus chez la plupart des mammifères, il semblait intéressant de vérifier la présence de protéines analogues aux protéines BSP chez d'autres espèces.

Au cours de cette étude, nous avons démontré que le génome de certains mammifères (le rat, le hamster, le lapin et l'humain) contient des gènes possédant une forte analogie avec les ADNc codant pour la protéine BSP-30-kDa. Leurs détections par Southern blot semblent témoigner de la présence de régions fortement conservées de ces gènes au cours de l'évolution ce qui indique l'importance du rôle

que pourrait jouer cette protéine dans la reproduction. Par ailleurs, malgré la présence de protéines liant la phosphorylcholine immunologiquement apparentées aux protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3 chez ces mêmes espèces, nous avons été incapables de détecter des gènes codant pour ces protéines par Southern blot. L'absence de régions hautement conservées des gènes codant pour ces protéines ainsi que la dégénérescence du code génétique pourraient expliquer ce phénomène. Seul la purification de ces protéines immunologiquement apparentées aux protéines BSP permettra de s'assurer de l'expression d'analogues des protéines BSP chez ces mammifères.

Malheureusement, la faible concentration de ces protéines chez la plupart des espèces rend difficile leurs purifications. Afin de pallier à ce problème, nous avons dû développer un nouveau protocole de purification capable d'isoler rapidement et efficacement de faibles concentrations d'analogues aux protéines BSP à partir de très grandes quantités de protéines de plasma séminal.

Ce nouveau protocole permet l'isolement des protéines BSP et de ces analogues, en utilisant les interactions existant entre la fraction de faible densité du jaune d'oeuf (LDF, Low Density Fraction) de poule et les protéines BSP. En effet, suite à l'incubation des protéines du plasma séminal bovin précipitées à l'alcool et de la LDF, nous avons démontré qu'il était possible d'isoler par ultracentrifugation sur gradient de densité la presque totalité des protéines BSP (> 98%) présentes dans l'échantillon. Nous avons aussi prouvé que ces mêmes protéines, une fois délipidées, conservaient toutes leurs propriétés de liaisons et pouvaient être subséquemment totalement purifiées par des chromatographies sur colonnes de *p*-aminophényl phosphorylcholine-agarose (PPC-agarose) et gélatine-agarose.

La purification par cette même méthode de la protéine pB1, chez le porc, et des protéines HSP-1 et HSP-2, chez le cheval, a confirmé l'efficacité de ce protocole pour la purification des analogues des protéines BSP. De plus, cette nouvelle technique nous a aussi permis de purifier une toute nouvelle protéine du plasma séminal de cheval de 12 kDa confirmant ainsi l'efficacité de notre nouveau

protocole. Cette protéine HSP-12-kDa possède une région amino-terminale très similaire aux autres membres de la famille des protéines BSP tout particulièrement au niveau du premier domaine de type II. Étant donné son homologie de séquence et son affinité pour la LDF, la PPC-agarose et la gélatine-agarose, la protéine HSP-12-kDa peut être considérée comme un nouveau membre de la famille des protéines BSP. Un séquençage complet de cette protéine confirmera probablement nos conclusions.

Le nouveau protocole s'étant avéré efficace lors de la purification de tous les analogues connus des protéines BSP, nous l'avons appliqué chez l'humain. Ce protocole nous a permis d'isoler quatre protéines immunologiquement apparentées aux protéines BSP-A1/A2, BSP-A3 et BSP-30-kDa. Ces protéines, en plus d'interagir avec les anticorps anti-BSP et d'avoir une affinité pour la LDF, la PPC-agarose et la gélatine-agarose, possèdent des poids moléculaires et des profils de migration similaires à ceux des protéines BSP. Ces protéines pourraient donc être les analogues humains des protéines BSP. Toutefois, le plasma séminal humain étant malheureusement difficile à obtenir en grand volume et la quantité de protéines résultant de cette purification demeurant insuffisante, il nous est impossible présentement de procéder aux séquençages et à l'identification de ces protéines.

Des analogues étant déjà connus chez le porc et le cheval, ces résultats combinés à la présence de protéines immunologiquement apparentées aux protéines BSP chez plusieurs espèces confirment la possibilité que la famille des protéines BSP pourrait être largement répandue chez les mammifères. Malgré les différences observées dans la concentration de ces analogues chez ces diverses espèces, la présence de protéines ayant des propriétés similaires aux protéines BSP chez ces mammifères pourrait fournir de nouveaux éléments aidant à une meilleure compréhension du phénomène de la capacitation.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xvi
1. INTRODUCTION	1
1.1. La reproduction	1
1.2. La fécondation	2
1.3. Le spermatozoïde	3
1.4. Le système reproducteur mâle	6
1.4.1. Le rôle du testicule	9
1.4.2. Le rôle de l'épididyme	9
1.4.3. Le rôle des glandes accessoires	10
1.5. La capacitation	11
1.5.1. Rôles de la capacitation	11
1.5.2. Caractéristiques biochimiques	14
1.5.2.1. Modification de la composition protéique de la membrane	14
1.5.2.2. Modification de la composition lipidique de la membrane	15
1.5.2.3. Augmentation des ions	15
1.5.2.4. Phosphorylation des protéines	16
1.5.3. Facteurs capacitants et leurs actions	17
1.6. La réaction de l'acrosome	18

1.7. Le plasma séminal	21
1.7.1. Rôle du plasma séminal	21
1.7.2. Effet du plasma séminal sur la fécondation	24
1.7.3. Rôle du plasma séminal dans la capacitation du spermatozoïde	25
1.7.3.1. Effet décapacitant du plasma séminal	25
1.7.3.2. Effet capacitant du plasma séminal	26
1.8. Les protéines BSP	27
1.8.1. Propriétés structurelles des BSP	27
1.8.1.1. Structure primaire	27
1.8.1.2. Glycosylation	28
1.8.1.3. Structure secondaire	29
1.8.1.4. Agrégation des BSP	33
1.8.2. Rôle physiologique des protéines BSP	33
1.8.2.1. Liaison aux phospholipides contenant un groupement choline	34
1.8.2.2. Liaison aux lipoprotéines de haute densité (HDL)	35
1.8.2.3. Liaison aux glycoaminoglycane de type héparine	35
1.8.2.4. Liaison à la phospholipase A2	36
1.8.2.5. Liaison à la calmoduline	37
1.8.2.6. Liaison à la gélatine	38
1.8.2.7. Liaison au facteur de croissance IGF-II	38
1.9. Protéines analogues aux protéines BSP chez d'autres espèces	39
1.9.1. Les protéines analogues aux protéines BSP	39
1.9.1.1. Les protéines du plasma séminal équin	39
1.9.1.2. La protéine du plasma séminal porcine	40
1.9.2. Distribution de protéines immunologiquement apparentées chez d'autres espèces	41
1.10. Objectifs du projet de recherche	43

2. RÉSULTATS	45
2.1 Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: Phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. (1999) Salois, D., Ménard, M., Paquette, Y. and Manjunath, P. <i>Biology of reproduction</i> . 61,288-297	45
2.2 A Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins. (1999) Ménard, M., Nauc V. and Manjunath, P. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>	57
2.3 Purification of human seminal phospholipid-binding proteins closely related to the major proteins of bovine seminal plasma. (1999) Ménard, M., Lazure, C. and Manjunath, P. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>	88
3. DISCUSSION	115
3.1. Présence de gènes codant pour des protéines analogues aux protéines BSP chez d'autres espèces	115
3.2. Élaboration d'un nouveau protocole de purification des analogues aux protéines BSP	117
3.2.1. Évaluation du nouveau protocole en présence de protéines BSP	118
3.2.2. Évaluation de l'efficacité du nouveau protocole dans la purification de deux familles de protéines d'analogues connues aux protéines BSP	120
3.2.2.1. Purification de l'analogue porcin	120
3.2.2.2. Purification des analogues équins	120
3.2.2.2.1. Les protéines HSP-1 et HSP-2	121
3.2.2.2.2. La protéine HSP-12-kDa	122
3.2.3. Avantages et inconvénients du nouveau protocole de purification	123
3.3. Isolement de protéines analogues aux protéines BSP chez l'humain	124
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	127
5. BIBLIOGRAPHIE	129

LISTE DES TABLEAUX**1. Introduction**

Tableau I :	Composition du plasma séminal de diverses espèces	22
Tableau II :	Liste de protéines possédant des domaines de type II	32
Tableau III:	Détection de protéines séminales immunologiquement apparentées aux protéines BSP	42

Les tableaux inclus dans les articles ne sont pas cités dans cette liste.

LISTE DES FIGURES**1. Introduction**

Figure 1.1:	Représentation schématique d'un spermatozoïde mammalien	4
Figure 1.2:	Représentation schématique du système reproducteur mâle chez l'humain	7
Figure 1.3:	Représentation schématique du système reproducteur femelle chez l'humain	12
Figure 1.4:	Représentation schématique de la fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde	19
Figure 1.5:	Représentation schématique de la structure secondaire des protéines BSP	30

Les figures incluses dans les articles ne sont pas citées dans cette liste.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

° C:	degré Celsius
%:	pourcentage
ADN:	acide désoxyribonucléique
AMPc:	adénosine monophosphate cyclique
ADNc:	ADN complémentaire
anticorps anti-BSP:	anticorps polyclonaux contre les protéines BSP
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
ATP:	adénosine triphosphate
apoA-1:	apolipoprotéine A-1
bp	paire de bases (<i>base pair</i>)
BSA:	albumine sérique de boeuf (<i>bovine serum albumin</i>)
BSP:	plasma séminal bovin (<i>bovine seminal plasma</i>)
Ca ²⁺ :	ion calcium
cBSP:	précipitat de plasma séminal bovin (<i>crude bovine seminal plasma</i>)

Da:	dalton
DEPC:	diéthyl pyrocarbonate
DNase:	désoxyribonucléase
Domaine b:	second domaine de type II des protéines BSP
dTTP:	désoxythymidine triphosphate
EDTA:	acide éthylènediamine tétraacétique
FSH:	hormone follico-stimulante (<i>Follicle-stimulating hormone</i>)
g:	gramme
g:	force gravitationnelle
GAGs:	glycosaminoglycanes
HDL:	lipoprotéines de haute densité (<i>high density lipoproteins</i>)
h:	heure
HSP:	plasma séminal équin (<i>horse seminal plasma</i>)
IGF-I:	facteur de croissance de type I ressemblant à l'insuline (<i>insulin-like growth factor</i>)
IGF-II:	facteur de croissance de type II ressemblant à l'insuline (<i>insulin-like growth factor</i>)
IPTG:	isopropyl thio- β -galactoside
k:	kilo

kb:	kilobase
kDa:	kilodalton
KBr:	bromure de potassium
l:	litre
LDL:	lipoprotéines de faible densité (<i>low density lipoproteins</i>)
LDF:	fraction de faible densité du jaune d'oeuf (<i>low-density fraction</i>)
LH:	hormone lutéinisante (<i>Luteinizing hormone</i>)
μ:	micro
μg:	microgramme
μl:	microlitre
μM	micromolaire
M:	molaire
m:	milli
mA:	milliampère
min:	minute
Mg ²⁺ :	ion magnésium
ml:	millilitre
MOPS:	acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique

M_r :	masse moléculaire relative
n:	nano
NaCl:	chlorure de sodium
ng:	nanogramme
^{32}P :	isotope 32 du phosphore
PAGE:	électrophorèse en gel de polyacrylamide (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PB:	tampon phosphate (<i>phosphate buffer</i>)
PBS:	tampon phosphate salin (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR:	réaction de polymérase en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH:	potentiel hydroélectrique
pI:	point isoélectrique
PK-A:	protéine kinase A
PLA2:	phospholipase A2
PPC-agarose:	<i>p</i> -aminophényl phosphorylcholine immobilisée sur l'agarose
PVDF:	polyvinylidène difluoride
RA:	réaction de l'acrosome
RACE:	Amplification rapide des extrémités 3' et 5' des ADNc (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>)

RIA:	dosage radioimmunologique
RNase:	ribonucléase du plasma séminal bovin
SDS:	sodium dodecyl sulfate
spPLA2:	PLA2 du plasma séminal bovin
SSC	citrate de sodium salin (<i>sodium citrate/sodium chloride</i>)
TE:	tris-EDTA
Tris:	tris-(hydroxyméthyl) aminométhane
U:	unité d'activité
V:	volts
VLDL:	lipoprotéines de très faible densité (<i>very low density lipoprotein</i>)
X-gal:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de recherche, le docteur P.Manjunath, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mes études dans son laboratoire.

J'aimerais ensuite saluer tous mes collègues et amis du centre de recherche qui ont su créer un environnement agréable et motivant tant au niveau académique que social.

Un gros merci, plus spécifiquement aux membres du laboratoire, Isabelle, Marie-Ève, Veronica, Dominic, Sébastien et Robert qui m'ont permis par leurs conseils et par leur amitié de traverser les vicissitudes parsemant ces trois dernières années.

J'aimerais remercier aussi, mes parents et amis qui, grâce à leurs encouragements, m'ont permis de me dépasser au cours de ces longues années d'études.

Finalement, je tiens à témoigner mon amour à ma femme, Isabelle, et à mon "petit homme", Antoine, qui ont su m'endurer, m'écouter et m'aimer dans les moments les plus sombres de ma maîtrise. Ils ont été pour moi la source d'énergie, de bonheur et de motivation nécessaires à la réalisation de ces travaux.

1. INTRODUCTION

1.1 La reproduction

La vie n'est pas éternelle. Il s'agit d'un événement transitoire au cours duquel les fonctions d'auto-conservation régissant le vivant évoluent, se dégradent et deviennent plus ou moins rapidement incapables d'entretenir son fonctionnement. Tout être vivant finit par tomber dans un état de déséquilibre qui le conduit à la mort. Par ailleurs, à cause de leur propre action sur le milieu et sous l'influence de différents facteurs sociaux et environnementaux susceptibles de varier dans le temps, les êtres vivants doivent évoluer et s'adapter aux changements du milieu s'ils veulent se perpétuer. Il est donc nécessaire qu'un mécanisme intervienne pour assurer la perpétuation et l'adaptation des espèces. Cette continuité de la vie est réalisée par la reproduction. Grâce à cette capacité autonome de fabriquer son semblable, l'être vivant s'oppose à l'action détériorante du temps et compense la mortalité par la prolifération.

Tous les êtres vivants possèdent ce pouvoir de reproduction. Au sein du vivant, cette prolifération peut se faire selon des mécanismes de complexités variables mais, fondamentalement, tout processus reproducteur repose sur des mécanismes chimiques invariables qui consistent en la transmission du bagage génétique que constitue l'ADN (acide désoxyribonucléique).

La reproduction sexuée constitue le mode de procréation privilégié par les organismes supérieurs. Elle amène la formation d'un organisme génétiquement apparenté à deux organismes différents. Ce nouvel individu est créé à partir de la fusion de deux cellules haploïdes, les gamètes, contenant une partie des gènes parentaux recombinaison aléatoire au cours de la méiose. Ce type de reproduction ne repose donc pas sur la création de nouveaux gènes mais sur la création de nouvelles associations de gènes assurant ainsi une recombinaison et un remaniement permanent du matériel génétique. C'est à ce type de reproduction que nous nous attarderons au cours de ce mémoire.

1.2 La fécondation

La fécondation est l'élément essentiel de la reproduction sexuée. Elle consiste, chez le mammifère, en la fusion d'un spermatozoïde, le gamète mâle, et d'un ovule, le gamète femelle. Cette fusion entraîne la création d'une nouvelle cellule nommée le zygote. C'est le développement de cette nouvelle cellule diploïde qui amènera l'apparition d'un nouvel être ayant un bagage génétique différent, mais apparenté à celui de ses parents.

Pour ce faire, le spermatozoïde aura à subir une série d'évènements successifs et ordonnés qui le mènera à la fécondation de l'ovule. Ces étapes se décrivent ainsi:

- a) La spermatogénèse
- b) La maturation épидидymaire
- c) L'éjaculation
- d) Le transit vagin-oviducte
- e) La capacitation
- f) La réaction de l'acrosome
- g) La pénétration du spermatozoïde à travers la zone acellulaire entourant l'ovule
- h) La fusion spermatozoïde-ovule

Toutes ces étapes sont nécessaires à la fécondation *in vivo* de l'ovule par le spermatozoïde. Au cours de cette étude, nous nous intéresserons plus spécifiquement à la maturation du spermatozoïde durant les étapes menant à la capacitation et à la réaction de l'acrosome.

1.3 Le spermatozoïde

Morphologiquement, le spermatozoïde mature ne varie que très peu d'une espèce à l'autre, sinon au niveau de sa forme et de sa taille (Eddy et O'Brien, 1988). C'est une cellule haploïde mobile composée de deux parties: la tête et le flagelle (ou la queue) (figure 1.1a). La tête en forme de spatule contient le noyau, l'acrosome et le cytosquelette (Eddy et O'Brien, 1988). Le flagelle de forme allongée est constitué de mitochondries, génératrices de l'énergie nécessaire à l'action du flagelle, et de l'axonème, un complexe de microtubules entouré de fibres très denses (Eddy et O'Brien, 1988). La tête et le flagelle sont intimement entourés d'une faible quantité de cytoplasme et sont bordés de la membrane plasmique (Eddy et O'Brien, 1988).

Le noyau, de faible dimension, ne contient qu'une copie des chromosomes issus du père. La chromatine contenant ces gènes se retrouve sous une forme très condensée réduisant ainsi au minimum son activité.

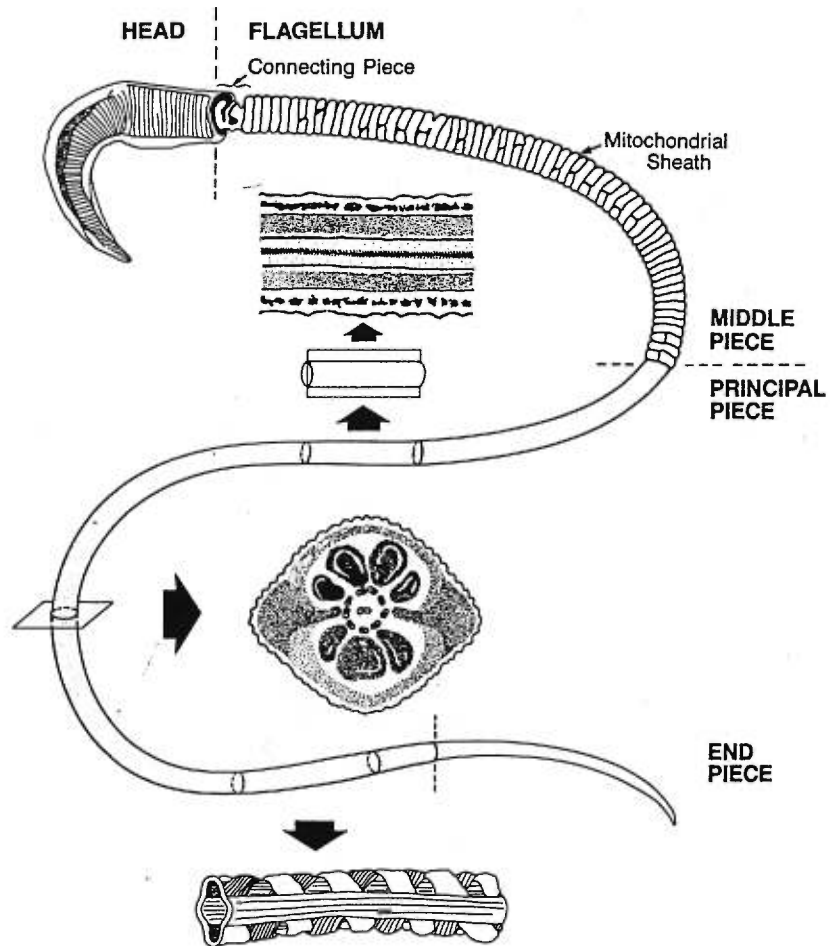
L'acrosome occupe une partie importante de la tête du spermatozoïde (figure 1.1b). Il s'agit d'un large granule de sécrétion se situant dans la partie antérieure de la tête du spermatozoïde où il y coiffe le noyau. Il est composé de deux membranes: la membrane acrosomiale interne qui vient s'appuyer sur le noyau; et la membrane acrosomiale externe qui longe la membrane plasmique. L'acrosome est considéré comme un lysosome spécialisé géant contenant de nombreuses enzymes lytiques (Allison et Hartree, 1970; Mann et Lutwak-Mann, 1981). Ces enzymes sont libérées au moment de la réaction de l'acrosome et viennent digérer la zone acellulaire entourant l'ovule permettant ainsi au spermatozoïde de féconder l'ovule (Eddy et O'Brien, 1988).

Figure 1.1 Représentation schématique d'un spermatozoïde mammalien

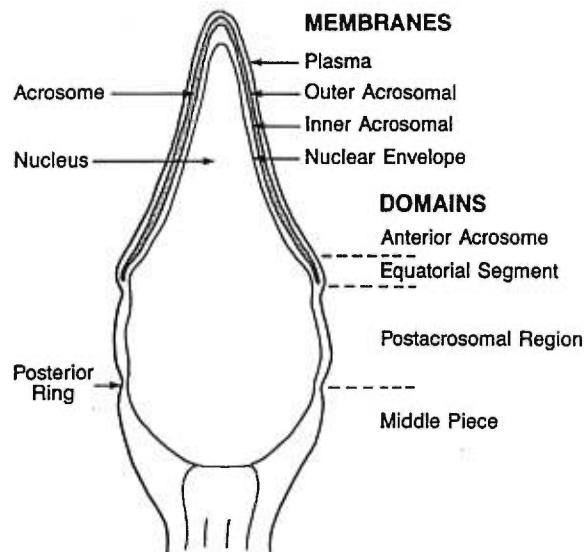
Les schémas ci-contre illustrent les caractéristiques générales des spermatozoïdes de mammifères. (a) Illustration des principales structures composant le spermatozoïde. Le spermatozoïde est essentiellement composé de deux parties: la tête et le flagelle. C'est deux structures sont rattachées l'une à l'autre via la pièce connectrice du flagelle. La pièce intermédiaire contenant les mitochondries, la pièce principale composée d'une gaine fibreuse, et la pièce terminale constituent les autres régions identifiables du flagelle. (b) Illustration des principales structures composant la tête du spermatozoïde. La membrane plasmique de la région acrosomiale recouvre la membrane acrosomiale externe. La membrane acrosomiale interne recouvre quant à elle l'enveloppe nucléaire. Finalement, on remarque un amincissement de l'acrosome au niveau du segment équatorial de la tête du spermatozoïde.

Tirée de Eddy et O'Brien, 1988

a)



b)



La membrane plasmique entourant le spermatozoïde est composée majoritairement de phospholipides (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, sphingomyéline, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, lysophosphatidylcholine), de stérol et d'une faible quantité de glycolipides (Parks et Hammerstedt, 1985; Mack et coll. 1987; Agrawal et coll., 1988). On y retrouve aussi une forte proportion de protéines (Nikolopoulou, 1985; Bellve et O'Brien, 1983; Dacheux, 1989; Romrell, 1982). La membrane étant de nature hétérogène, ces différentes composantes s'y retrouvent concentrées en certaines régions formant des domaines aux fonctions spécialisées et variant durant les différents stades de maturation du spermatozoïde (Eddy et O'Brien, 1988). Les interactions phospholipides-protéines et les changements dans le ratio cholestérol-phospholipide des membranes sont des éléments très importants dans tout le phénomène menant à la capacitation et à la réaction de l'acrosome (section 1.5).

1.4 Le système reproducteur mâle

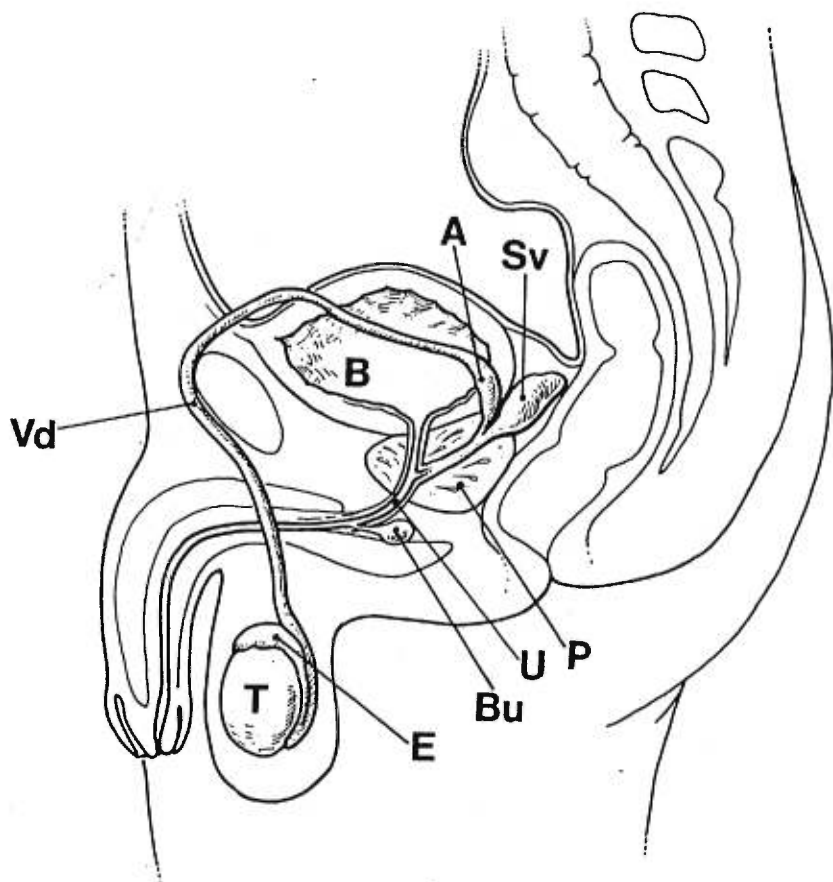
Chez la plupart des animaux terrestres la fécondation interne, c'est-à-dire à l'intérieur du corps de la femelle, est privilégiée puisqu'elle crée un environnement favorable à la survie des cellules sexuelles. Pour ce faire ces animaux ont su développer une série d'appareils complexes assurant: la production de cellules sexuelles dans des glandes spécialisées, la fécondation interne suite à la copulation et chez les mammifères, le développement du nouvel individu dans les voies génitales de la femelle. Vu leurs rôles spécifiques dans la reproduction, mâle et femelle ont su développer des organes reproducteurs complémentaires et fort différents permettant ainsi à chacun d'effectuer ses tâches.

Le rôle principal du système reproducteur mâle est de produire des spermatozoïdes, de les faire maturer, de les stocker pour ensuite les expulser à un temps déterminé à l'extérieur du système reproducteur mâle et les déposer dans le système reproducteur femelle. Pour ce faire, l'évolution a pourvu les mâles d'une série de glandes et d'organes spécialisés (figure 1.2). On y retrouve deux testicules,

Figure 1.2 Représentation schématique du système reproducteur mâle chez l'humain

Le schéma ci-contre illustre les principaux organes composant le système reproducteur mâle chez les mammifères. On y retrouve (A) l'ampoule, (E) les épидидymes, (P) la prostate, (Sv) les vésicules séminales, (Bu) les glandes de Cowper et (T) les testicules. Le *vas deferens* (Vd), l'urètre (U) et la vessie (B) apparaissent également sur le schéma.

Tirée de Harper, 1988



deux épидидymes et plusieurs glandes accessoires (les vésicules séminales, les ampoules, la prostate et les glandes bulbo-urétrales ou glandes de Cowper).

1.4.1 Le rôle du testicule

Le principal organe reproducteur mâle est le testicule. Les testicules sont deux glandes suspendues dans un sac protecteur, dont la double enveloppe externe constitue le scrotum. Ils sont responsables de la production des spermatozoïdes et de la sécrétion d'hormones stéroïdiennes initiatrices du développement des caractères secondaires mâles (de Kretser et Kerr, 1988; Plant, 1988). Les spermatozoïdes sont produits à partir de cellules souches à l'intérieur de chaque testicule par une série de mitose et de méiose dans de minuscules canaux, les tubules séminifères. Ces cellules souches, les spermatogonies, deviennent ainsi des spermatocytes, des spermatides, pour finalement se différencier et devenir des spermatozoïdes par un phénomène nommé la spermatogénèse (de Kretser et Kerr, 1988).

1.4.2 Le rôle de l'épididyme

Les spermatozoïdes produits par les testicules semblent mature du point de vue morphologique, mais il n'ont acquis ni la motilité, ni la capacité de féconder l'ovule. Pour ce faire, les spermatozoïdes migrent du testicule vers l'épididyme où ils subissent une partie de cette maturation (Yanagimachi, 1988).

L'épididyme est séparé en trois parties: la tête, le corps et la queue (Robaire et Hermo, 1988). C'est dans ce dernier tiers que le spermatozoïde subit diverses modifications membranaires par l'acquisition et la perte de nombreux facteurs de surface (Kohane et coll, 1980a, 1980b, Kopecny et coll, 1984; Vreeburg et coll, 1992). Ces facteurs seraient entre autres responsables de la stabilisation membranaire (ajout de cholestérol, altérations chimiques des lipides, ajout de glycoprotéines) (Yanagimachi, 1988; Seki et coll, 1992; Reynolds et coll., 1989; Thomas et coll, 1984), de la reconnaissance intercellulaire (ajout de glycoprotéines)

(Fournier-Delpech et Courot, 1987; Lakoski, 1988, Phelps et coll, 1990) et de la motilité du spermatozoïde (ajout de glycérophosphocholine et "Forward mobility proteins") (Yanagimachi, 1988). Suite à ces modifications, le spermatozoïde est stocké dans la queue de l'épididyme, où il y attend l'éjaculation (Yanagimachi, 1988).

1.4.3 Le rôle des glandes accessoires

Suite à une stimulation, les spermatozoïdes stockés dans l'épididyme sont expulsés via le *vas deferens* jusqu'à l'urètre, où ils sont mélangés avec les diverses sécrétions issues des glandes accessoires (Harper, 1988; Mann, 1964; Eliasson et Lindholmer, 1972). Le sperme, le mélange des spermatozoïdes et du plasma séminal, est alors déposé par le pénis en érection dans le tractus génital femelle au niveau du vagin, du col de l'utérus ou directement dans l'utérus dépendamment de l'espèce (Harper, 1988).

Les sécrétions issues du testicule et de l'épididyme ne forment qu'une faible proportion du plasma séminal, les glandes accessoires étant majoritairement responsables de sa production (Miller et Ax, 1988). Ces glandes situées le long du *vas deferens* bien que présentes chez la plupart des mammifères, ont une grande variabilité en ce qui concernent leur forme, leur taille, leur nombre et la composition de leur sécrétion selon les espèces (Miller et Ax, 1988).

En plus de servir comme diluant et transporteur pour les spermatozoïdes (Miller et Ax, 1988), ces sécrétions consistent en un mélange très complexe de molécules dont chacune joue un rôle important dans la fécondation du spermatozoïde. Elles nourrissent et protègent le spermatozoïde, stimulent sa motilité et induisent certaines modifications membranaires, phénomènes très importants dans la capacitation. La composition et le rôle du plasma séminal sera plus amplement décrit dans la section traitant du plasma séminal (section 1.7).

1.5. La capacitation

Les spermatozoïdes épидидymaires sont incapables de féconder l'ovule. Ils acquièrent cette habilité au cours du long voyage les menant de l'épididyme à l'ovule (Yanagimachi, 1988). Durant ce transit, les spermatozoïdes sont exposés à diverses sécrétions provenant des glandes accessoires du tractus génital mâle, du vagin, de l'utérus, de l'oviducte et du follicule dans le tractus génital femelle (Weinman et Williams, 1964; Hunter et Nornes, 1969; Schill et coll., 1975; Oliphant, 1976; Oliphant et Singhas, 1979; Esbenshade et Clegg, 1980; Davis, 1982; Iwamoto et coll., 1993). Certaines des molécules présentes dans ces sécrétions induisent une série de transformations moléculaires et physiologiques, nommée capacitation (Yanagimachi, 1988; Austin, 1951; Chang, 1951). Cette étape de maturation tardive du spermatozoïde est essentielle à l'enclenchement de la réaction de l'acrosome, dernière étape menant à la fécondation de l'ovule (Yanagimachi, 1988) (section 1.6).

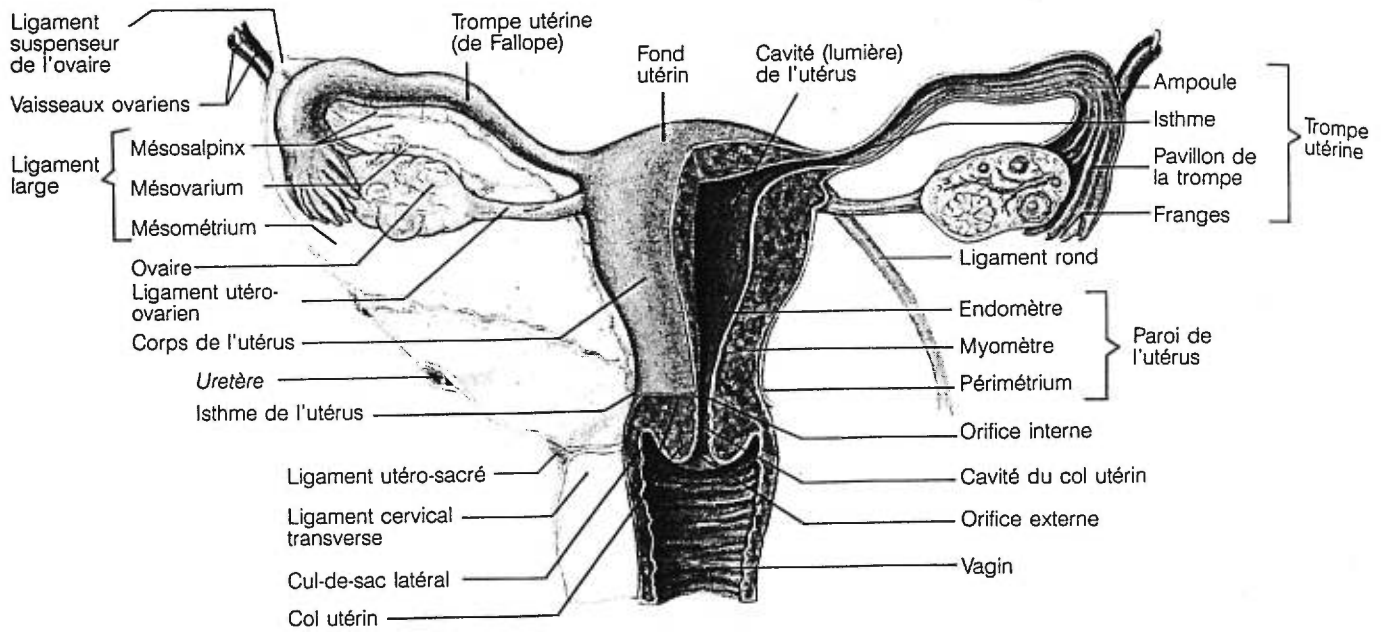
1.5.1 Rôles de la capacitation

Les spermatozoïdes mammaliens, contrairement à ceux des invertébrés, acquièrent leurs pleins pouvoirs fécondants au niveau du tractus génital femelle. Certains auteurs (Bedford, 1983) ont suggéré que l'objectif principal de la capacitation serait de prévenir que le spermatozoïde devienne fertile trop rapidement, étant donné le très long trajet existant entre le site d'insémination (le vagin, le col de utérus ou l'utérus dépendant de l'espèce) (Yanagimachi, 1988) et le site de fécondation (généralement la région de l'ampoule) (Suarez et coll., 1990). Ainsi, le spermatozoïde capacite généralement à proximité du site de fécondation, au niveau de l'isthme de l'oviducte (Lefebvre et Suarez, 1996; Yanagimachi, 1988). (figure 1.3)

Figure 1.3 Représentation schématique du système reproducteur femelle chez l'humain

Le schéma ci-contre illustre les principaux organes composant le système reproducteur femelle chez les mammifères. On y retrouve les principaux sites d'insémination chez les mammifères soient: le vagin, le col de l'utérus et l'utérus. On y retrouve aussi l'isthme, site habituel de la capacitation, et l'ampoule, site de la fécondation.

Tirée de Marieb, 1993



1.5.2 Caractéristiques biochimiques

Bien que la capacitation soit étudiée depuis presque cinquante ans (Austin, 1951 et Chang, 1951), l'ensemble des événements biochimiques régissant ce phénomène demeure peu connu. Lors de la capacitation, le spermatozoïde doit subir diverses modifications de sa composition membranaire et de ses activités biochimiques intracellulaires (Yanagimachi, 1988; Bedford, 1970; Farooqui, 1983; Langlais et Roberts, 1985). Il exprime aussi de nouveaux récepteurs lui permettant d'interagir avec les diverses composantes entourant l'ovule et ainsi de subir la réaction de l'acrosome (Saling, 1989). De plus le spermatozoïde se retrouve dans un état d'hypermotilité (mouvement rapide et très vigoureux du flagelle) essentiel à sa pénétration des différentes couches entourant l'ovule (Flemming et Yanagimachi, 1982; Fraser et Quinn, 1981; Jinno et coll, 1981).

1.5.2.1 Modification de la composition protéique de la membrane

Durant la maturation épидидymaire et au contact du plasma séminal, diverses protéines se lient ou s'intègrent à la membrane plasmique du spermatozoïde. Ces protéines recouvrant la membrane viendraient protéger celle-ci, au cours du long parcours les menant au lieu de fécondation. Le retrait ou l'altération de certains de ces facteurs (Weinman et Williams, 1964; Hunter et Normes, 1969; Schill et coll., 1975; Oliphant, 1976; Oliphant et Singhas, 1979; Esbenshade et Clegg, 1980; Davis, 1982; Iwamoto et coll., 1993), dits décapacitants, l'ajout de certaines molécules provenant du liquide folliculaire et utérin (Voglmayr et Sawyer, 1986), ainsi que la redistribution intramembranaire de certaines protéines seraient des phases essentielles de la capacitation (Suzuki, 1990 et Suzuki et Yanagimachi, 1989). Toutes ces modifications viendraient sensibiliser le spermatozoïde en dévoilant certains récepteurs jusqu' alors cachés qui pourraient dès lors interagir avec certains facteurs présents dans le milieu utérin et oviductal en plus de permettre le ciblage de l'ovule (Yanagimachi, 1988).

1.5.2.2 Modification de la composition lipidique de la membrane

D'autres modifications s'opèrent au niveau de la composition lipidique de la membrane. On remarque, en effet, un changement dans le ratio cholestérol/phospholipides de la membrane. Ce ratio diminuerait lors de la capacitation. Le cholestérol étant reconnu comme stabilisateur membranaire (Yeagle, 1985), la perte de ce dernier augmenterait par le fait même la fluidité membranaire (Wolf et coll., 1986). Cet événement semble essentiel à la capacitation puisqu'il a été démontré que la présence d'une forte concentration de cholestérol dans le plasma séminal humain aurait un effet inhibiteur sur la capacitation (Cross, 1998). Certains facteurs, la BSA (albumine sérique de boeuf) et les HDL (lipoprotéines de haute densité), présents dans le fluide oviductal faciliteraient l'efflux de cholestérol des membranes du spermatozoïde en agissant comme accepteur de cholestérol (Go et Wolf, 1985, Langlais et Roberts, 1985, Cross, 1998, Thérien, 1997) (section 1.5.3).

1.5.2.3 Augmentation des ions

Reconnus pour leurs rôles joués dans la réaction de l'acrosome, l'implication des ions calciques dans la régulation de la capacitation reste un sujet très controversé. Se retrouvant généralement à de faibles niveaux dans les spermatozoïdes non-capacités, sa concentration augmenterait modestement pendant la capacitation (Dasgupta, 1993, Visconti, 1995b). Cette augmentation du calcium intracellulaire pourrait être nécessaire à la capacitation puisque l'inhibition des pompes calciques (Ca^{2+} -ATPase), normalement responsable de la conservation des niveaux intracellulaires d'ions calciques, stimulerait la capacitation (Fraser, 1995; Dasgupta et coll., 1994; Fraser et Mcdermott, 1992; Adeoya-Osiguwa et Fraser, 1994). Ce calcium intracellulaire pourrait être important dans la transduction des signaux intracellulaires par son action sur l'adénylate cyclase et les phosphodiésterases (Visconti et coll., 1998).

Tout comme l'ion calcique, la concentration de l'ion bicarbonate semble augmenter lors de la capacitation et son implication dans ce phénomène a été démontré chez la souris (Lee et Storey, 1986; Neill et Olds-Clarke, 1987, Shi et Roldan, 1995, Visconti, 1995b) et le hamster (Boatman et Robbin, 1991). Il pourrait être impliqué dans la régulation du métabolisme de l'AMPc puisqu'il a été démontré qu'il stimulait lui aussi l'adénylate cyclase des spermatozoïdes (Okamura et coll., 1985; Garty and Salomon, 1987; Visconti et al 1990, 1995b). Sa présence pourrait expliquer l'augmentation du pH intracellulaire remarquée lors de la capacitation (Uguz et al, 1994, Zeng et al ,1996, Cross, 1998).

1.5.2.4 Phosphorylation sur tyrosine des protéines spermatiques.

La capacitation s'accompagne également d'une augmentation de la concentration d'AMPc (Parrish et coll., 1994) ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de protéines spécifiques du spermatozoïde (Visconti et coll., 1995a; Galantino-Homer, 1997). De plus, une augmentation de l'activité de la protéine kinase-A (PKA) a été observée lors de la capacitation chez la souris (Visconti et coll., 1997) indiquant une activité PKA dépendante de l'AMPc. Ce phénomène semble directement lié à la capacitation, étant donné que l'utilisation d'inhibiteurs de PKA empêche la phosphorylation et la capacitation.

Cette activité de phosphorylation observée lors de la capacitation semble témoigner d'une forme de communication intracellulaire spécifique au spermatozoïde. En effet, c'est la première fois que l'on observe dans une cellule de mammifère un lien entre l'activité des PKA et la phosphorylation sur tyrosines. L'hypothèse selon laquelle une cascade d'événements impliquant les protéines kinase-A viendrait activer les tyrosine kinases ou inhiber les tyrosine phosphatases reste encore à démontrer (Visconti et coll., 1998).

Toutefois, il semble qu'il existe certaines différences dans les mécanismes régissant la capacitation chez les espèces. En effet, certains auteurs ont démontré que la phosphorylation sur tyrosines était intimement liée au phénomène d'efflux

de cholestérol membranaire chez la souris (Visconti, 1995a, 1995b). Ce même phénomène n'a par contre pas été observé chez le taureau (Lane, 1999).

1.5.3 Facteurs capacitants et leurs actions

La capacitation est induite par des facteurs présents dans les fluides oviductal et folliculaire. Les lipoprotéines de haute densité (Ehrenwald et coll., 1990; Langlais et coll. 1988), l'albumine (Visconti et coll., 1998) et les glycoaminoglycanes de types héparine (Parrish et coll., 1989b; Lenz et coll., 1982), sont les principaux agents responsables de la capacitation. Plusieurs études ont démontré que les facteurs capacitants induisent la capacitation par des mécanismes différents (Visconti et coll., 1998; Lane et coll., 1999). De fait, la BSA (Davis, 1980; Go et Wolf, 1985) et les HDL (Ehrenwald et coll., 1990; Cross, 1998) induiraient l'efflux de cholestérol des membranes des spermatozoïdes en servant d'accepteur de cholestérol. La diminution du ratio cholestérol/phospholipides causerait une augmentation de la fluidité membranaire et par le fait même une augmentation de la perméabilité aux ions, ce qui induirait finalement la capacitation (Cross, 1998, Davis, 1981, Langlais et coll., 1988). Toutefois, les doses de BSA nécessaires à la capacitation étant nettement supérieures aux concentrations généralement rencontrées *in vivo*, l'implication de l'albumine dans la capacitation du spermatozoïde peut être mise en doute (Visconti et coll., 1995a).

L'héparine, quant à elle, interagirait avec des sites de liaison à la surface des spermatozoïdes (Handrow et coll., 1984) et générerait une série de réactions moléculaires qui se caractérise par une augmentation du calcium intracellulaire (Parrish et coll., 1989b). Les mécanismes régissant ce phénomène demeurent inconnus. On observe toutefois par la suite une augmentation de la synthèse de l'AMPc et de la phosphorylation des protéines du spermatozoïde (Visconti et coll., 1998; Lane et coll., 1999).

La phosphorylation a aussi été observée dans le cas de la capacitation médiée par les accepteurs de cholestérol dans le cas de spermatozoïdes murins

(Visconti et coll., 1995a). Toutefois, les doses de BSA utilisées étaient largement supérieures au niveau physiologique de ce facteur capacitant. Par ailleurs, il a été démontré, chez le bovin, que l'utilisation de doses physiologiques de HDL induisait la capacitation du spermatozoïde, mais ne provoquait pas la phosphorylation sur tyrosines (Lane et coll., 1999).

1.6 La réaction de l'acrosome

Les divers changements structuraux subis lors de la capacitation permettent au spermatozoïde de s'engager dans un dernier mécanisme de maturation, la réaction de l'acrosome. Chez la plupart des espèces, le spermatozoïde capacité vient lier la zone pellucide entourant l'ovule (Yanagimachi, 1988). Une des protéines contenues dans la zone pellucide, la protéine ZP3 chez la souris, interagirait avec des récepteurs à la surface du spermatozoïde (Liu et coll., 1996) et induirait l'entrée massive de calcium dans le milieu intracellulaire (Roldan et Harrison, 1990). C'est à ce moment que survient la réaction de l'acrosome qui consiste en la fusion de la membrane plasmique et de la membrane acrosomiale externe du spermatozoïde. Cette fusion entraîne la libération des enzymes hydrolytiques contenues dans l'acrosome ce qui engendre la digestion de la zone pellucide (Yanagimachi, 1988). Le spermatozoïde est maintenant libre de pénétrer à travers la zone pellucide et de se lier à l'oocyte par le biais de récepteurs situés sur la tête du spermatozoïde nouvellement exposés suite à la réaction de l'acrosome (Myles, 1993; Yanagimachi, 1988; Allen et Green, 1995). Cette interaction entre l'oocyte et le spermatozoïde résulte ultimement en la fusion des gamètes (figure 1.4).

Figure 1.4 Représentation schématique de la fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde

Le schéma ci-contre illustre les diverses étapes menant à la pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde capacité. Dans un premier temps, les spermatozoïdes capités traversent la couche de cellules granuleuses que constitue la *corona radiata*. Ils subissent ensuite la réaction de l'acrosome au contact de la zone pellucide ce qui entraîne la libération d'enzymes hydrolytiques et la digestion de celle-ci. Le spermatozoïde peut maintenant traverser la zone pellucide et se fusionner à l'ovocyte.

Tirée de Marieb, 1993

-

e

s

s

s

s

s

s

s

s

s

s

1.7 Le plasma séminal

Le plasma séminal, le sperme sans les spermatozoïdes, est constitué des sécrétions des glandes accessoires, des testicules et des épидидymes (section 1.4). La majeure partie du volume du plasma séminal est issue de la sécrétion des vésicules séminales (environ 60 %) et de la prostate (environ 30 %), la contribution de ces glandes variant selon les espèces. La contribution des autres glandes demeure mineure (environ 10%) (Lundquist, 1949).

Le volume et la composition du plasma séminal varient grandement selon les espèces (Miller et Ax, 1988) tout comme la concentration de spermatozoïdes qui y baignent (tableau I). Composé principalement d'eau, et le pH oscillant entre 7,2 et 7,8, le plasma séminal contient des ions, des molécules organiques, des protéines que l'on retrouve également dans le plasma sanguin mais à des concentrations différentes (Harper, 1988).

Les nombreuses protéines qui le composent sont généralement issues du milieu intracellulaire des cellules épithéliales tapissant les glandes accessoires. Elle sont sécrétées par voie apocrine et sont expulsées lors de l'éjaculation avec de nombreux débris cellulaires tels les phospholipides et le cholestérol (Aumuller et Seitz, 1990a; Miller et Ax, 1988).

1.7.1 Rôle du plasma séminal

On a longtemps cru que le seul rôle du plasma séminal était de servir de véhicule aux spermatozoïdes (Coffey, 1988; Mann, 1975). Étant donné la grande quantité d'eau qui le compose, le plasma séminal permet en effet aux spermatozoïdes de progresser plus efficacement lors de l'éjaculation de l'épididyme au tractus génital femelle (Williams-Ashman, 1988).

Tableau I

Composition du plasma séminal de diverses espèces

	Porc	Taureau	Étalon	Humain
Volume (ml)	150-500	2-10	30-300	2-6
Concentration de spermatozoïdes (10^6 / ml)	25-300	300-2000	30-800	50-150
Sodium	125-252	65-161	112	43-112
Potassium	17-46	13-97	26	14-28
Calcium	1.5-4.6	6-15	6.5	5-7
Magnésium	2.5-24	3.3	3.7	1.2-5
Chlorure	85-105	42-110	23-113	28-56
Phosphate	0.4	2.8	0.6	-
Bicarbonate	-	7	11	8
Fructose	0.5	17-56	<0.06	2-33
Glucose	0.06	-	0.7	0.4
Sorbitol	0.4	0.6-7.5	1.1-3.3	0.6
Inositol	28	1.3-2.6	1.1-2.6	3-3.5
Acide lactique	2.2	2.2-5.6	1-2.8	2.2-5.6
Acide pyruvique	-	0.6	0.3	3.4
Acide citrique	2.6-10.4	18-52	0.5-2.6	5.2-73
Acide glutamique	2	1-8	-	6.5
Acide ascorbique	-	0.3	0.3	0.6
Carnitine	-	-	-	0.2-1.3
Acétylcarnitine	-	-	-	0.06-0.28
Glycérophosphocholine	4	4-18	1.4-4	2.0-3.3
Phosphocholine	0	0	0	14-21
Glycérophosphoinositol	0.26	1.4	0.25	-
Spermine	-	0.1	0.25	-
Spermidine	-	-	-	0.1
Putrescine	-	-	-	0.2
Créatine	-	0.9	0.4	1.5
Arginine	0.01	0.2	-	5.2
Ergothionine	0.7	trace	0.2-0.7	trace
Acide urique	-	-	-	0.1-0.4
Protéines (mg/ml)	30	55	-	35-50
Cholestérol (mg/ml)	-	-	-	1.03

Les valeurs sont en mM si unité non-indiquée.

Adapté de Setchell et Brooks, 1988

En plus d'agir comme transporteur, il sert de milieu nourricier et protecteur au spermatozoïde. En effet, divers produits tels le fructose et le sorbitol lui servent de source d'énergie (Miller et Ax, 1988). L'inositol aussi présent dans le plasma séminal préserverait l'isotonicité du sperme alors que l'ergothinéine lui servirait d'anti-oxydant (Miller et Axe, 1988; Shivaji et Bhargava, 1987). Le plasma séminal constituerait aussi un excellent tampon capable de maintenir le spermatozoïde à pH neutre malgré la forte acidité du fluide vaginal (pH 3) (Fox et coll., 1973). De plus, de par sa capacité à inhiber la division mitotique des lymphocytes et l'activation du système de compléments (Bischoff et coll., Price et coll, Tarter et Alexander, 1984), par sa capacité à détruire les leucocytes (Matousek et Stanek, 1993) et par la présence de prostaglandines dans sa composition (Bratanov et coll, 1986), on croit que le plasma séminal pourrait agir comme immunosuppresseur du tractus génital femelle protégeant ainsi le spermatozoïde de la destruction par le système immunitaire de la femelle. (Bouvet et coll. 1987; James et Hargreave, 1984; Metafora et coll, 1989; Fahmi et coll, 1985)

De plus, chez certains rongeurs, sous l'action d'une enzyme appelée vésiculase, le plasma séminal se coagule en une masse gélatineuse très solide qui forme un bouchon dans les voies génitales femelles (Williams-Ashman, 1984). On croit que ce bouchon préviendrait la perte du sperme et bloquerait toutes tentatives de fécondation par d'autres mâles (Aumuller et Seitz, 1990a). Un phénomène similaire de gélification est aussi observé chez l'humain. En effet, on observe une coagulation semi-solide dans les 5 minutes suivant l'éjaculation suivit, contrairement aux rongeurs, d'une liquéfaction dans les 5 à 20 minutes suivant la coagulation sous l'effet des diverses protéases présentes dans le sperme humain (Mann et Lutwak-Mann, 1981; Huggins et Neil, 1942; Tauber et Zaneveld, 1976). La fonction exacte de ce processus demeure inexplicée chez l'humain (Coffey, 1988) bien que certains cas d'infertilité semblent y être rattachés (Amelar et Dublin, 1977; Bunge, RG, 1970).

Plusieurs autres fonctions ont aussi été attribuées au plasma séminal tels la modulation du métabolisme du spermatozoïde (Mann et Lutwak, 1981, Inskeep et

al, 1985), la modulation de la motilité (Aumuller et coll, 1990b), la stimulation de la contraction des muscles lisses du tractus reproducteur femelle (Clavert et coll, 1990) et le contrôle de la capacitation (section 1.7.3). Tous ces facteurs réunis semblent prouver l'importance du plasma séminal dans l'efficacité de la fécondation de l'ovule par le spermatozoïde.

1.7.2 Effet du plasma séminal sur la fécondation

Le rôle joué par le plasma séminal lors de la fécondation a toujours été sous-estimé. Ce phénomène s'explique probablement par la possibilité du moins *in vitro* de féconder un ovule avec des spermatozoïdes épидидymaires (Eliasson and Johnsen, 1986; Miller et Axe, 1988). Rien n'indique toutefois que ce phénomène soit reproductible *in vivo* étant donné le long parcours que les spermatozoïdes ont à accomplir dans le tractus génital femelle.

Comme nous l'avons décrit précédemment, le plasma séminal est un mélange des sécrétions issues des diverses glandes composant le tractus génital mâle. L'importance sur la fécondation des sécrétions de chacune de ces glandes n'a pas encore été clairement établie et amène plusieurs rapports contradictoires. L'ablation d'une ou plusieurs de celles-ci produit des résultats variés d'aucun effet, à une diminution partielle de la fertilité, à une infertilité totale (Davis, 1975; Pang et coll., 1979; Peitz et Olds-Clarke, 1986; Queen et coll, 1981). Chez la souris et le rat, certaines études ont démontré que l'ablation des vésicules séminales les rendait infertiles (Pang et coll., 1979; Queen et coll. 1981). Toutefois, d'autres études effectuées chez la souris et le taureau ne témoignent que d'une réduction du nombre moyen de femelles fécondées d'environ 20% (Peitz et Olds-Clarke, 1986, Miller et Ax, 1988). Les résultats obtenus chez le taureau pourrait s'expliquer, du moins partiellement, par une diminution d'environ 40% du nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat (Alexander et coll., 1971).

L'ablation de la prostate chez la souris diminue significativement son taux de fécondité (Pang et coll., 1979). La même opération chez le rat au niveau de la

portion dorsale de la prostate le rend infertile (Queen et coll. 1981). L'ablation de l'ampoule et de la portion ventrale de la prostate du hamster ne semble pas affecter son taux de fécondité, mais entraîne la mort prématurée des embryons ce qui suggèrent un rôle des sécrétions issues de ces glandes dans le développement embryonnaire (Chow et O, 1988). Les conséquences de l'ablation des autres glandes accessoires demeurent inconnues.

Jusqu'à présent, les résultats obtenus semblent démontrer que les sécrétions issues des glandes accessoires ont des impacts divers sur le taux de fécondité et que leur importance varierait selon l'espèce étudiée. Mais une chose est certaine, le plasma séminal joue un rôle prépondérant dans le niveau de fécondité du spermatozoïde.

De fait, des différences observées dans la composition protéique du plasma séminal de taureaux fertiles et moins fertiles (Killian et coll., 1993), ainsi que l'importance de la présence à la surface des spermatozoïdes de protéines provenant du plasma séminal ayant une affinité pour l'héparine sur le taux de fertilité (Bellin et coll., 1994, 1996 et 1998) viennent confirmer que certains facteurs présents dans le plasma séminal ont un impact majeur sur le potentiel fécondant du sperme.

1.7.3 Rôle du plasma séminal dans la capacitation du spermatozoïde

1.7.3.1 Effet décapacitant du plasma séminal

Un des rôles les plus étudié du plasma séminal est celui qu'il joue lors de la capacitation. Il a été démontré que les spermatozoïdes fraîchement éjaculés ne peuvent répondre immédiatement aux facteurs induisant la réaction de l'acrosome. Les spermatozoïdes doivent tout d'abord être retirés du plasma séminal par leur passage au niveau du cervix, puis être incubés en milieu capacitant, pour ensuite subir la réaction de l'acrosome en présence de protéines de la zone pellucide. Cette fonction de protection du spermatozoïde contre une réaction de l'acrosome hâtive

serait causée par la présence de certains facteurs dit "décapacitants" dans le plasma séminal (Miller et coll., 1990).

Certaines protéines du plasma séminal, membres de la famille des spermadhésines interagissant aussi avec les glycosaminoglycanes (GAGs) sont soupçonnées d'être de ces facteurs (Calvete et coll., 1995b). Ces protéines lieraient la surface du spermatozoïde lors de l'éjaculation, stabilisant par le fait même la membrane plasmique pendant que d'autres viendraient masquer les sites d'interaction avec la zone pellucide (Calvete et coll., 1996b). Suite à leurs migrations vers le site de fécondation au cours duquel les spermatozoïdes sont séparés du plasma séminal, les spermadhésines toujours liées à la surface du spermatozoïde seraient libérées sous l'action des GAGs présentes dans le tractus génital femelle ce qui provoquerait ultimement la capacitation. Plusieurs membres de cette famille de protéines ont été identifiés chez le porc, le cheval et le bovin (Calvete et coll., 1996b). Beaucoup d'études restent toutefois à compléter afin de vérifier cette théorie.

D'autres facteurs, tels le cholestérol et les phospholipides présents dans le plasma séminal, préviendraient une capacitation hâtive en stabilisant la membrane plasmique et en limitant les efflux de cholestérol et de phospholipides.

1.7.3.2 Effet capacitant du plasma séminal

Parallèlement, diverses études ont démontrées *in vitro* que les spermatozoïdes épидидymaires incubés en présence de GAG prenaient 22 h à capaciter et à subir la réaction de l'acrosome (RA). Les mêmes études réalisées sur des spermatozoïdes éjaculés ont montré des périodes de capacitation et de RA beaucoup plus courtes (9 h) (Handrow et coll., 1982; Lenz et coll., 1982; Lenz et coll., 1983, Parrish et coll., 1985). Par contre, une expérience similaire utilisant des spermatozoïdes épидидymaires incubés préalablement 20 min en présence de plasma séminal a montré une diminution de 22 h à 9 h du temps nécessaire à la capacitation (Lee et coll., 1985).

Ces résultats viennent démontrer la complexité du rôle joué par le plasma séminal dans la capacitation du spermatozoïde. En plus de protéger le spermatozoïde d'une capacitation hâtive à l'extérieur du site de fécondation, il accélère la vitesse de la capacitation une fois rendu à destination permettant ainsi aux spermatozoïdes d'être prêts à la fécondation au moment opportun.

Il a été démontré qu'une famille de protéines du plasma séminal bovin serait responsable de l'augmentation du pouvoir capacitant des spermatozoïdes (Thérien, 1995, 1998).

1.8 Les protéines BSP

Les protéines BSP (bovine seminal plasma) forment la fraction protéique majeure du plasma séminal bovin. Ces protéines acides sécrétées par les vésicules séminales bovines représentent environ 60% de toutes les protéines contenues dans le plasma séminal chez cette espèce (Manjunath et coll., 1987). Cette famille de protéines est composée de quatre membres: les protéines BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 et BSP-30-kDa (Manjunath et coll., 1988; Manjunath et Sairam, 1987; Calvete et coll., 1996a; Desnoyers et coll., 1994). Chacune de ces protéines possède des propriétés structurelles et de liaisons communes.

1.8.1 Propriétés structurelles des BSP

1.8.1.1 Structure primaire

De masses moléculaires différentes, respectivement 16.5 et 16 kDa, les protéines BSP-A1 et BSP-A2 ont des séquences d'acides aminés identiques (Manjunath et Sairam, 1987), leur différence de masse moléculaire s'expliquant par leur niveau de glycosylation (Manjunath et Sairam, 1987; Manjunath et coll., 1988). Ils sont d'ailleurs fréquemment considérés comme une seule et même entité biochimique, la protéine BSP-A1/A2 ou PDC-109 (P: pour protéine, D pour l'acide aspartique à l'extrémité amino-terminale, C pour la cystéine de l'extrémité carboxy-terminale et 109 pour le nombre d'acides aminés) (Manjunath et coll., 1988; Esch et

coll., 1983). Bien qu'étant composée d'une plus longue chaîne d'acides aminés (115 aa vs 109 aa), la protéine BSP-A3 possède une masse moléculaire légèrement inférieure à BSP-A1/A2 (15 kDa) (Seidah et coll., 1987). La séquence primaire de cette protéine non-glycosylée démontre 66% d'identité avec la protéine BSP-A1/A2 (Seidah et coll., 1987). Pour ce qui est de la protéine BSP-30-kDa, qui contrairement à son nom, a une masse moléculaire de 28 kDa, on remarque chez elle aussi une forte similitude avec les autres protéines BSP. Elle se distingue généralement par une longue queue N-terminale fortement glycosylée (Calvete, 1996a).

1.8.1.2 Glycosylation

La protéine BSP-30-kDa est la plus glycosylée de la famille des protéines BSP (Manjunath et coll., 1988). Elle est composée de sucres neutres, de galactosamines et d'acides sialiques (Manjunath et coll., 1998). L'absence de glucosamines ainsi que la présence de nombreux résidus non-identifiables par séquençage (probablement des thréonines) seraient un indice que les divers sucres présents à la surface de la protéine seraient O-liés (Manjunath et coll., 1988). Le niveau de glycosylation pouvant varier légèrement d'une protéine à l'autre, on croit que les sucres fourniraient entre 7,2 et 7,8 kDa de la masse moléculaire totale des protéines BSP-30-kDa (Manjunath et coll., 1988).

La protéine BSP-A1 possède les mêmes types de sucres mais en quantité plus faible (Manjunath et coll., 1988). L'absence de sucre neutre à la surface de la protéine BSP-A2 constitue sa principale différence avec la protéine BSP-A1 dont la composition en acides aminés est identique (Manjunath et coll., 1988). La glycosylation de la protéine BSP-A1/A2 se ferait via un lien O-glycosylé entre la thréonine 11 et un trisaccharide composé d'acide sialique $\alpha(2-3)$ -galactose $\beta(1-3)$ -N-acétyl-galactosamine (Gerwig et coll, 1996). La protéine BSP-A3 demeure la seule protéine de cette famille non-glycosylée (Manjunath et coll., 1988).

La protéine BSP-A1 (pI 4,7-5,0) possède un point isoélectrique plus bas que la protéine BSP-A2 (pI 4,9-5,2) (Desnoyers et coll, 1994). Cette différence pourrait

s'expliquer par la présence d'une plus grande quantité d'acides sialiques dans sa composition rendant ainsi la protéine plus acide (Desnoyers et coll., 1994). Par contre, l'hétérogénéité des charges observée chez ces protéines ne peut s'expliquer par la quantité variable d'acides sialiques présente dans ces protéines puisque la protéine BSP-A3 (pI 4,8-5,2) possède elle aussi cette hétérogénéité de charges (Desnoyers et coll., 1994). La protéine BSP-30-kDa demeure la protéine la plus acide du plasma sérial bovin (pI 3.9-4,6) (Desnoyers et coll., 1994).

1.8.1.3 Structure secondaire

Les protéines BSP possèdent une forte homologie structurale (figure 1.5). Chacune contient quatre ponts disulfures formant deux domaines de types II analogues à ceux retrouvés dans la fibronectine (Constantine et coll. 1992, Banyai et coll., 1990). Ces domaines en forme de boucle sont présents dans un grand nombre de protéines sans que leur fonction n'ait toutefois été encore élucidée, leurs seules fonctions reconnues étant de lier le collagène chez les collagénases et la fibronectine (Banyai, 1990) (Tableau II). Le même type d'interaction a par ailleurs été observé entre les protéines BSP et la gélatine (collagène dénaturé) (Manjunath et coll., 1987). De plus, les domaines de type II semblent partager plusieurs ressemblances structurelles avec les domaines "Kringlé" présents dans l'apolipoprotéine a (McLean et coll., 1987) et chez plusieurs protéases impliquées dans la cascade de coagulation (Patthy et coll., 1984; Holland, 1987; Banyai et coll., 1990). Ces domaines sont reconnus pour agir comme médiateurs des interactions protéine-protéine dans la régulation de l'activité des protéases (Trexler et Patthy, 1983; Cleary et coll., 1989).

Figure 1.5 Représentation schématique des protéines BSP

Le schéma ci-contre montre la séquence en acides aminés des protéines (A) BSP-A1/A2, (B) BSP-A3 et (C) BSP-30-kDa. Chaque protéine possède deux domaines de type II en forme de boucle formés par la présence de deux ponts disulfures. Le premier domaine est nommé domaine a, le second, domaine b.

Adaptée de Esch et coll., 1983; Seidha et coll., 1987; Calvete et coll., 1996a.

Tableau II

Liste des protéines possédant des domaines de type II *

Protéines ¹	Nombre de domaines de type II	Fonctions
Facteur XII ²	1	-
IGF-IIR/CIMan6PR ³	1	-
Récepteur de la PLA ₂ ⁴	1	-
Récepteur du mannose ⁵	1	-
HGFA ⁶	1	-
DEC-205R ⁷	1	-
Fibronectine ⁸	2	liaison au collagène
HSP-1, HSP-2 ⁹	2	-
pB1/LAR ¹⁰	2	-
BSP-A1/-A2 ¹¹	2	liaison à la choline
BSP-A3 ¹²	2	liaison à la choline
BSP-30-kDa ¹³	2	liaison à la choline
Gélatinase A ¹⁴	3	liaison au collagène
Gélatinase B ¹⁴	3	liaison au collagène

(-) Rôle indéterminé

* Adapté de Moreau et coll., 1998.

¹ Abréviations: Facteur XII, facteur XII de la coagulation humaine; IGF-II, facteur II de croissance semblable à l'insuline; CIMan6PR, récepteur du mannose-6-phosphate indépendant aux cations; PLA₂, phospholipase A₂; HGFA, activateur du facteur de croissance des hépatocytes; DEC-205R, récepteur des cellules dendritiques; HSP, plasma séminal équin; pB1, protéine porcine liant l'héparine; LAR, régulateur de l'adhésion des leucocytes; BSP, plasma séminal bovin.

² Adapté de McMullen et Fujikawa, 1985

³ Adapté de Morgan et coll., 1987; Oshima et coll., 1988; Lobel et coll., 1988

⁴ Adapté de Ishizaki et coll., 1994

⁵ Adapté de Taylor et coll., 1990

⁶ Adapté de Miyazawa et coll., 1993

⁷ Adapté de Jiang et coll., 1995

⁸ Adapté de Kornbliht et coll., 1985; Baker, 1985; Banyai et coll., 1990

⁹ Adapté de Calvete et coll., 1995

¹⁰ Adapté de Sanz et coll., 1993; Calvete et coll., 1997

¹¹ Adapté de Esch et coll., 1983

¹² Adapté de Seidha et coll., 1987

¹³ Adapté de Calvete et coll., 1996a

¹⁴ Adapté de Banyai et coll., 1996

Similairement, des analyses par résonance magnétique effectuées sur le deuxième domaine de type II (le domaine b) de la protéine BSP-A1/A2 ont démontré la présence d'une dépression peu profonde à caractère hydrophobe à la surface de la protéine (Constantine et coll., 1991). Cette dépression serait responsable de l'agrégation des protéines BSP-A1/A2 et constituerait le site de la liaison du collagène (Constantine, 1992). Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a pu confirmer un rôle similaire pour le domaine a, le premier domaine de type II.

1.8.1.4 Agrégation des BSP

Certaines études réalisées par Manjunath et Sairam (1987) sur BSP-A1/A2 ont démontré que cette protéine serait présente sous forme d'homo-oligomères, dans le plasma séminal bovin. Ces homo-oligomères auraient des masses moléculaires oscillant de 60 à 120 kDa et pourraient être dissociés à pH acide ou en présence de fortes concentrations d'urée (Manjunath et Sairam, 1987). Cette même protéine s'associerait aussi de façon stœchiométrique avec la protéine BSP-30-kDa pour former des complexes multimériques de haut poids moléculaire (Calvete, 1996). La protéine BSP-A3 serait la seule protéine à se retrouver sous forme monomérique dans le plasma séminal (Manjunath et Sairam, 1987).

Diverses études sur l'implication de l'agrégation des protéines BSP dans leurs propriétés de liaison ainsi que dans leur capacité à générer des efflux de cholestérol, semblent confirmer l'importance de ce phénomène dans les fonctions physiologiques des protéines BSP (Moreau, 1998). Des agrégations ont aussi été observées chez des protéines de la même famille chez d'autres espèces (section 1.9).

1.8.2 Rôle physiologique des protéines BSP

D'abord étudiées pour leur pouvoir à stimuler le relâchement de gonadotrophines (hormone lutéinisante, LH et de l'hormone folliculo-stimulante,

FSH) chez des cellules hypophysaires en culture (Manjunath, 1984), les protéines BSP ont été par la suite plus amplement caractérisées pour leur capacité à interagir avec la membrane plasmique du spermatozoïde et avec diverses molécules dont la plupart sont présentes dans les tractus génitaux mâle et femelle. Ce sont ces études qui ont permis d'établir le rôle des protéines BSP dans la capacitation des spermatozoïdes.

1.8.2.1 Liaison aux phospholipides contenant un groupement choline

Diverses études réalisées par Manjunath et coll (1988) ont démontrées que les protéines BSP liaient la membrane plasmique du spermatozoïde suite à l'éjaculation. Des études d'immunohistochimie ont prouvé que ces protéines liaient l'ensemble du spermatozoïde, bien qu'une plus forte concentration de ces protéines semble se retrouver au niveau de la tête du spermatozoïde (Manjunath et coll., 1994).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les phospholipides à groupements cholines composent une forte proportion des phospholipides contenus dans le feuillet externe de la membrane du spermatozoïde (section 1.3). C'est par le biais d'une liaison directe avec les phospholipides contenant des groupements choline que les BSP se lient à la membrane (Desnoyers et Manjunath.,1992). Il est d'ailleurs possible de purifier les protéines BSP en utilisant une colonne d'affinité imitant ce type de phospholipides (*p*-aminophényl phosphorylcholine-agarose, PPC-agarose) (Desnoyers et Manjunath, 1993).

Cette propriété de liaison semble une fonction majeure des protéines BSP puisqu'elle leur permettrait de jouer un rôle direct dans les diverses modifications membranaires observées lors de la capacitation en facilitant les interactions entre la membrane et les facteurs capacitants.

1.8.2.2 Liaison aux lipoprotéines de haute densité (HDL)

Après avoir remarqué que l'ajout de sérum de veau au milieu contenant des cellules hypophysaires inhibait l'effet de relâchement de la gonadotrophine par celles-ci, Manjunath (1984) s'est intéressé à déterminer quels facteurs présents dans le sérum pouvaient interagir avec les protéines BSP et inhiber leur action. Par une purification sur une colonne d'affinité de protéines BSP, ils ont déterminé que les protéines BSP liaient l'apolipoprotéine A-1 (Manjunath et coll., 1989). Cette apolipoprotéine est la composante protéique majeure (70%) des HDL. Ces lipoprotéines, jouant un rôle primordial dans le transport inverse du cholestérol, sont présentes à de fortes concentrations dans le fluide oviductal bovin (Brantmeier et coll., 1987; Ehrenwald et coll., 1990; Jaspard et coll., 1996).

Des travaux ont par ailleurs prouvé que ces lipoprotéines contenues dans le tractus génital femelle agiraient comme facteur capacitant en stimulant l'efflux de cholestérol des membranes des spermatozoïdes (Ehrenwald et coll., 1990; Langlais et coll., 1988, Thérien et coll. 1997, 1998) (section 1.5.3). De récentes études réalisées par Thérien et coll. (1997) ont démontré que la présence de BSP dans le milieu d'incubation accélère la capacitation induite par les HDL. Bien que les BSP et les HDL individuellement génèrent des efflux de cholestérol, des travaux ont démontré que l'effet combiné des BSP et de HDL augmentait la cinétique d'efflux du cholestérol membranaire ce qui explique leur pouvoir capacitant (Thérien et coll., 1998). Le mécanisme par lequel les HDL et les BSP stimulerait l'efflux de cholestérol et la capacitation demeure toutefois inconnu.

1.8.2.3 Liaison aux glycosaminoglycanes de type héparine

Les glycosaminoglycanes (GAG) de type héparine agissent comme facteur capacitant chez de nombreux mammifères (Parrish et coll., 1989b). Ces GAG présents dans le fluide oviductal sont sécrétés en fortes concentrations durant l'oestrus par les cellules épithéliales du tractus génital femelle. Il a été remarqué que l'effet capacitant de ces GAG serait médié par la présence de certaines protéines du

plasma séminal à la surface du spermatozoïde (voir section. 1.5.3). Ces protéines semblent correspondre aux protéines BSP.

Chandonnet et coll. (1990) ont prouvé que les protéines BSP pouvaient lier l'héparine. Ces protéines se lieraient à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation, interagiraient avec l'héparine et moduleraient la capacitation. Des études réalisées sur des spermatozoïdes épидидymaires démontrent que les protéines BSP stimulent la capacitation médiée par l'héparine en diminuant substantiellement le temps nécessaire à cette maturation (Thérien et coll., 1995). Ces études font des protéines BSP les seules protéines connues du plasma séminal capable d'induire positivement la capacitation. Le mécanisme par lequel les protéines BSP modulent la capacitation médiée par l'héparine demeure inconnu. Il est toutefois possible que les protéines BSP liées à la membrane du spermatozoïde facilitent les interactions entre les GAG et certains récepteurs membranaires diminuant ainsi le temps nécessaire à la capacitation.

1.8.2.4 Liaison à la phospholipase A2

Les phospholipases A2 (PLA2) font parties d'une grande famille d'enzymes calcium-dépendante qui a pour fonction l'hydrolyse des chaînes d'acides gras des phospholipides en position sn-2 (Dennis, 1983; Waite, 1987; Hazen et coll., 1991). L'activité de ces enzymes est largement répandue chez les mammifères (Thakkar et coll., 1983,1984; Ono et coll., 1982; Llanos et coll.,1982; Riffo et coll., 1992; Hinkovska et coll., 1987; Roldan et Mollinedo, 1991). Diverses études ont démontré que ces phospholipases seraient présentes dans le plasma séminal de diverses espèces (Weinman et coll., 1986; Kunze et coll., 1974,1981; Wurl et Kunze, 1985; Scott et Davidson, 1968; Rönkkö et coll, 1991) et qu'elles lieraient la membrane plasmique du spermatozoïde au moment de l'éjaculation (Weinman et coll., 1986; Rönkkö, 1992). De par sa capacité à hydrolyser les phospholipides composant la membrane plasmique du spermatozoïde et par la génération suite à son action de lysophospholipides et d'acides gras libres, deux produits à pouvoir détergent facilitant la fusion membranaire, la phospholipase A2 est considérée comme un

élément essentiel de l'exocytose menant à la réaction de l'acrosome (Meizel, 1984; Langlais et Roberts, 1985; Yanagimachi, 1988).

En 1994, Manjunath et coll. (1994b) ont démontré que l'activité PLA2 pouvait être inhibée par la présence de protéines BSP dans le plasma séminal bovin. Une étude plus approfondie de ce phénomène sur la spPLA2 (seminal plasma PLA2) a montré que l'inhibition se faisait par deux mécanismes conjugués (Soubeyrand et Manjunath, 1997). Dans un premier temps, l'activité PLA2 est inhibée par une liaison directe avec les protéines BSP et dans un second temps, par la séquestration des phospholipides à groupements cholines, principal substrat de la spPLA2 sur la membrane plasmique, par les protéines BSP.

En liant les PLA2 libres du plasma séminal et en limitant les sites de liaisons à la surface du spermatozoïde, les protéines BSP protégeraient ainsi l'intégrité de la membrane plasmique et préviendraient une réaction de l'acrosome trop hâtive (Soubeyrand et Manjunath, 1997). Ce mécanisme demeure toutefois fortement hypothétique, de nombreuses études devant être effectuées afin de mieux comprendre ce phénomène.

1.8.2.5 Liaison à la calmoduline

La calmoduline est une protéine acide de faible poids moléculaire bien connue pour sa capacité à moduler divers processus cellulaires calcium-dépendants (Cheung, 1980; Means et coll., 1982), dont l'exocytose (Jones et coll., 1980). Cette protéine associée à la membrane plasmique du spermatozoïde chez de nombreuses espèces, serait transloquée vers le milieu extracellulaire lors de la capacitation induite par l'héparine (Leclerc et coll., 1992). Cette translocation amènerait probablement une diminution de l'activité Ca^{2+} -ATPase et par le fait même une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire nécessaire à la capacitation.

Manjunath et coll. (1993) ont démontré que les protéines BSP pouvaient se lier à la calmoduline. De plus, il semble que certains fragments des protéines BSP auraient une plus grande affinité pour la calmoduline. L'hypothèse de la modulation de l'activité de la calmoduline par les protéines BSP a été postulée sans toutefois avoir été confirmée (Manjunath et coll., 1993).

1.8.2.6 Liaison à la gélatine

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'analyse de la structure secondaire des protéines BSP a dévoilé la présence de deux domaines de type-II. Ces structures, que l'on retrouve chez la fibronectine et certaines collagénases, seraient responsables de l'interaction protéine-collagène (Petersen et coll., 1983; Skorstengaard et coll., 1984; Kornblihtt et coll., 1985). Des études menées par Manjunath et coll. (1987) ont démontré que les protéines BSP liaient plusieurs types de collagènes (types I, II, IV et V). De plus, ils ont observé une plus forte affinité pour la forme dénaturée que constitue la gélatine, cette dernière exposant possiblement des résidus hydrophobes normalement enfouis chez la protéine de forme native.

Cette propriété de liaison a été largement utilisée pour la purification des protéines BSP. Pourtant, aucun rôle physiologique n'a encore été attribué à cette propriété. Il est toutefois à noter que plusieurs protéines ayant des ressemblances antigéniques avec la fibronectine ont été détectées à de très fortes concentrations dans le plasma sérial de diverses espèces. Leurs rôles demeurent toutefois inconnus.

1.8.2.7 Liaison au facteur de croissance IGF-II

Bien qu'il partage de nombreuses similarités structurelles avec l'insuline et le facteur de croissance de type I (IGF-I), le rôle du facteur de croissance de type II (IGF-II) demeure inconnu.

Desnoyers et Manjunath (1994) ont démontré que les protéines BSP pouvaient lier IGF-II. Aucune homologie n'a été observée entre les protéines BSP et les autres protéines liant les IGF. Etant donnée que la présence de protéines immunologiquement apparentées au BSP semble ubiquitaire, il a été proposé que cette liaison pourrait moduler l'activité d'IGF-II (Desnoyers et Manjunath, 1994).

1.9 Protéines analogues aux protéines BSP chez d'autres espèces

1.9.1 Les protéines analogues aux protéines BSP

1.9.1.1 Les protéines du plasma séminal équin

Récemment, Calvete et coll. (1995a, 1997) ont purifié et caractérisé deux protéines du plasma séminal équin structurellement analogues aux protéines BSP. Ces protéines, HSP-1 (Horse Seminal Plasma-1) et HSP-2, partagent plusieurs caractéristiques habituellement retrouvées chez les protéines BSP. Premièrement, leurs séquences primaires est identique à environ 65% avec les protéines BSP. Elles sont elles aussi constituées de deux domaines de type-II. De plus, elles démontrent une affinité de liaison à la gélatine, l'héparine et la phosphocholine (Calvete, 1995a, 1997).

Tout comme la protéine BSP-A1/A2, la protéine HSP-1 possède deux niveaux de glycosylation bien que sa migration sur gel de polyacrylamide n'en semble pas affectée (28 kDa) (Calvete, 1995a). Cette différence dans le niveau de glycosylation semble toutefois modifier leurs interactions. En effet, Calvete et coll. (1995a) ont démontré que la forme de HSP-1 contenant quatre chaînes de carbohydrates NacNeu-Gal-GalNAc formait un complexe oligomérique de 90 kDa avec la protéine HSP-2 lui permettant ainsi de lier l'héparine. Alors que la forme HSP-1 contenant un groupement Gal-GalNAc et trois groupements GalNAc ne peut former d'oligomères avec HSP-2 et ne peut lier l'héparine. Cette caractéristique d'agrégation se retrouve aussi chez les protéines BSP-A1/A2 et BSP-30-kDa (section 1.8.1.4). La protéine BSP-A3 ne possède toutefois pas cette capacité. Les

deux formes de HSP-1 peuvent toutefois lier la phosphocholine et la gélatine, l'oligomérisation n'étant pas requise (Calvete, 1997).

Selon les résultats de Calvete et coll. (1995a, 1997), la protéine HSP-2 doit elle aussi s'agréger pour lier l'héparine alors que cette oligomérisation n'est pas requise pour la liaison de la phosphocholine et de la gélatine.

Aucune fonction physiologique n'a encore été étudiée en ce qui concerne ces protéines, on peut toutefois penser qu'étant donné leurs ressemblances structurelles et fonctionnelles, ces protéines possèdent le même pouvoir capacitant que les protéines BSP.

1.9.1.2 La protéine du plasma séminal porcin

Calvete et coll. (1997) ont récemment purifier l'analogue aux protéines BSP du plasma séminal porcin. Cette protéine, pB1, possède elle aussi toutes les caractéristiques structurelles (haut niveau d'homologie, domaines de type-II) et fonctionnelles (liaison à l'héparine, à la phosphocholine et à la gélatine) que l'on retrouve chez les protéines BSP et HSP.

Bien que peu de choses ne soient encore connues sur cette protéine de 15 kDa, Calvete et coll. (1997) ont démontré qu'elle devait former un complexe oligomérique avec la spermadhésine AQN-1 pour pouvoir lier la phosphocholine. Cependant, cette protéine peut lier la gélatine sous sa forme monomérique.

Il est intéressant de constater que cette protéine possède une région amino-terminale identique (32 premiers acides aminés) à la protéine pAIF, une protéine du plasma séminal porcin que l'on croit impliquée dans la médiation de l'activation des leucocytes au site d'inflammation suite à l'accouplement (Hadjisavas et coll., 1994). Ces résultats suggèrent l'existence de rôles multiples pour la protéine pB1 dans le processus menant à la fécondation.

1.9.2 Distribution de protéines immunologiquement apparentées chez d'autres espèces

Étant donné le rôle prépondérant que semble jouer les protéines BSP dans le processus de capacitation bovin, il était important de déterminer si la présence de cette famille de protéines était unique au bovidé ou si elle était plus largement répandue chez les mammifères.

Par des études de dosage radioimmunologique (RIA) utilisant des anticorps polyclonaux développés contre les trois formes de protéines BSP, Manjunath et coll. (1988) ont démontré la présence dans le plasma séminal humain et dans les sécrétions des vésicules séminales de rats d'une faible concentration de protéines interagissant avec les anticorps anti-BSP. Ces protéines immunologiquement apparentées seraient, en effet, présentes en concentrations inférieures (plus de 20 000 fois moins) dans ces fluides que le plasma séminal bovin (tableau III).

Parallèlement, Leblond et coll.(1993) ont démontré par immunodétection la présence dans le plasma séminal humain, porcin, murin, de rat et de hamster de protéines liant la phosphocholine immunologiquement apparentées aux protéines BSP. La liaison à la phosphocholine étant une propriété majeure des protéines BSP, ces résultats confèrent un élément de preuve supplémentaire quant à l'existence de protéines de mêmes familles apparentées aux protéines BSP chez d'autres espèces. Toutefois, les résultats obtenus par Leblond et coll (1993) semblent confirmer que ces protéines sont en concentration beaucoup plus faible chez ces mammifères que dans le plasma séminal bovin et que leur poids moléculaire varie selon les espèces.

Tableau III

Détection de protéines séminales immunologiquement apparentées aux protéines BSP.

Source	/ml ou /g de tissu humide		
	BSP-A1/A2	BSP-A3	BSP-30-kDa
BOVIN			
sécrétion des vésicules séminales	16-24 mg	3.55-5.55 mg	4.55-6.55 mg ¹
plasma séminal	28-36 mg	6.20-8.20 mg	6.85- 9.55 mg ¹
PORCIN			
plasma séminal	Détectée	Détectée	Détectée
HUMAIN			
plasma séminal	1.00-4.00 µg	0.20-0.80 µg	Détectée
RAT			
vésicules séminales	0.10-0.51 µg	0.06-0.31 µg	Détectée
MURIN			
sécrétion des vésicules séminales	Détectée	Détectée	Détectée
HAMSTER			
sécrétion des vésicules séminales	Détectée	Détectée	Détectée

Toutes les immunodétections et les dosages radioimmunologiques ont été réalisées avec des anticorps anti-BSP.

Détectée: Protéines liant la phosphocholine ayant été immunodétectées par les anticorps anti-BSP.

¹ Résultats non-publiés.

Adapté de Manjunath et coll., 1988 et Leblond et coll.,1993

1.10 Objectifs du projet de recherche

La découverte des protéines HSP-1 et HSP-2, dans le plasma séminal de cheval, ainsi que la présence de la protéine pB1 chez le porc viennent confirmer l'existence de protéines apparentées aux protéines BSP chez d'autres mammifères. Les dosages radioimmunologiques et l'immunodétection de protéines du plasma séminal liant la phosphocholine chez d'autres espèces viennent ajouter à cette liste un certain nombre de protéines candidates fonctionnellement et immunologiquement apparentées aux protéines BSP.

En se basant sur ces faits, nous avons émis l'hypothèse que les protéines BSP forment une famille de protéines du plasma séminal ubiquitaire chez les mammifères et qu'elles joueraient un rôle primordial dans le phénomène de capacitation du spermatozoïde.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tenté sommairement par biologie moléculaire de confirmer la présence de gènes codant pour des protéines analogues aux protéines BSP chez diverses espèces. Parallèlement, nous avons tenté de purifier des protéines apparentées aux protéines BSP du plasma séminal de diverses espèces en utilisant l'affinité que possède cette famille de protéines pour la PPC-agarose, la gélatine-agarose et l'héparine-Sépharose. Toutefois, comme nous l'avons déjà mentionné, ces protéines sont présentes en très faible concentration chez la plupart des espèces, ce qui rend impossible une purification efficace en utilisant ces colonnes d'affinité. Afin d'enrichir la fraction qui sera appliquée sur colonne et de travailler avec une plus grande quantité de matériel de départ, nous avons développé une nouvelle méthode de purification des protéines analogues aux protéines BSP.

Cette technique fait appel aux interactions observées lors d'études préliminaires en cryopréservation entre la fraction de faible densité du jaune d'oeuf (LDF, Low-density fraction) de poule et les protéines BSP. Partant du principe que la LDF peut être isolée d'une solution de KBr (1,21 g/ml) par ultracentrifugation,

nous avons prouvé au cours de cette étude qu'il est possible de purifier les protéines BSP liées à la LDF en se servant de cette propriété sans affecter les propriétés de liaisons de celles-ci. Nous avons aussi démontré que cette méthode de purification peut être appliquée à tous les analogues connus des protéines BSP (porc et cheval). Finalement, nous avons montré la présence dans le plasma séminal humain de protéines fortement apparentées aux protéines BSP.

2. RÉSULTATS

- 2.1 **Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: Phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma.** Salois, D., Ménard, M., Paquette, Y. and Manjunath, P. *Biology of reproduction.* 60, 288-297 (1999).

Préambule:

BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 et BSP-30-kDa sont quatre membres des protéines majeures du plasma séminal bovin (la famille des protéines BSP) impliquées dans la potentialisation de la capacitation des spermatozoïdes. Des analogues de ces protéines ayant déjà été isolés chez le porc et le cheval et vu la présence de protéines immunologiquement apparentées aux protéines chez d'autres espèces, il nous paraissait important de vérifier la présence de gènes codant pour ces protéines chez ces mammifères. Parallèlement, étant donné que nous ne connaissions que très peu de choses sur l'expression tissulaire des protéines BSP, il nous semblait intéressant d'analyser leur expression dans divers organes bovins. Afin d'obtenir ces informations il nous fallait dans un premier temps amplifier et cloner les deux ADNc codant pour les protéines BSP-A3 et BSP-30-kDa. En utilisant des oligonucléotides dégénérés élaborés en se basant sur les séquences primaires de ces protéines (amorces) et des préparations d'ADNc total issues de vésicules séminales bovines, nous avons amplifié par RT-PCR les fragments internes des ADNc codant de chacune de ces protéines. Les extrémités 5' et 3' des ADNc furent par la suite clonées en utilisant la technique de RACE 3' et de RACE 5'. En se servant de ces résultats, nous avons pu élaborer les sondes moléculaires nécessaires aux analyses de l'expression tissulaire par la méthode de protection à la RNase ainsi qu'à la vérification de la présence de gènes analogues par Southern blot. Les résultats obtenus nous indiquent que les protéines BSP ne sont exprimées que dans les vésicules séminales et dans l'ampoule. De plus, nos résultats semblent confirmer la présence de gènes analogues à celui codant pour la protéine BSP-30-kDa dans l'ADN génomique humain, de rat, de hamster et de lapin.

Contribution des auteurs:

Dominic Salois (rédaction de l'article et toutes les manipulations, sauf celles indiquées ci-dessous), **Martin Ménard** (amplification et clonage des fragments internes de l'ADNc de BSP-A1/A2 et BSP-30-kDa ayant servi à élaboration des sondes moléculaires), **Yves Paquette** (conseiller en biologie moléculaire). **Puttaswamy Manjunath** (supervision).

Complementary Deoxyribonucleic Acid Cloning and Tissue Expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: Phosphatidylcholine and Heparin-Binding Proteins of Bovine Seminal Plasma¹

Dominic Salois, Martin Ménard, Yves Paquette, and Puttaswamy Manjunath²

Departments of Medicine and of Biochemistry, University of Montreal, Guy-Bernier Research Centre, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

ABSTRACT

BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa are four major proteins of bovine seminal plasma (BSP protein family). These heparin- and phosphatidylcholine-binding proteins potentiate the capacitation of spermatozoa. Here we determined the complete sequences of the two cDNAs coding for the BSP-A3 and BSP-30-kDa proteins. Degenerate oligonucleotides designed on the basis of the primary sequences of the proteins were used as primers in reverse transcription-polymerase chain reaction, with cDNA preparations of bovine seminal vesicles as templates, to amplify an internal fragment of each BSP cDNA. Specific oligonucleotides designed on the basis of these partial cDNA sequences were used to clone the two complete cDNAs by using the 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) and 5' RACE methods. We also verified the expression of all members of the bovine BSP protein family in several adult bovine tissues by RNase protection assays. The results indicated that each BSP protein mRNA is expressed only in seminal vesicles and in the ampullae. Homologous genes were detected in human, rat, hamster, and rabbit genomic DNA, using high-stringency Southern hybridization with a specific BSP-30-kDa cDNA probe.

INTRODUCTION

BSP-30-kDa and BSP-A3 proteins belong to the same protein family as BSP-A1 and BSP-A2 [1–5]. These four closely related proteins (collectively called BSP proteins) are found in bovine seminal plasma (BSP) and are secretory products of the seminal vesicles [3, 6]. BSPs A1, A2, and A3 have molecular masses of 15–16 kDa, while BSP-30-kDa has a molecular mass of 28–30-kDa [2, 5, 7]. Since BSP-A1 and BSP-A2 have an identical amino acid sequence, with their difference residing only in the degree of glycosylation, they are considered a single chemical entity called BSP-A1/A2 (also called PDC-109 [8]). These proteins constitute the major protein fraction of bovine seminal plasma (> 60%). With the exception of BSP-A3, all members of this family are glycoproteins. All members of the BSP protein family display a mosaic structure composed of two tandemly arranged and largely conserved type II domains and unique N-terminal extensions of variable length that are O-glycosylated to different extents [4, 6, 8–10]. The amino-terminal sequence of BSP-30-kDa does not display discernible similarity with any known protein sequence, which makes BSP-30-kDa unique among this family [6].

Accepted February 26, 1999.

Received December 7, 1998.

¹This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada. GenBank accession numbers: BSP-A3 cDNA, AF055981 and BSP-30-kDa cDNA, AF057133.

²Correspondence: P. Manjunath, Guy-Bernier Research Centre, 5415 Boul. de l'Assomption, Montreal, PQ, Canada H1T 2M4. FAX: 514 252 3430; e-mail: manjunap@ere.umontreal.ca

The BSP proteins exhibit multiple binding and functional properties. They bind to choline phospholipids of cauda epididymal spermatozoa at ejaculation [11, 12]. Also, these BSP proteins bind to sperm capacitation factors, namely, heparin [13] and high-density lipoproteins (HDL) [14]. Recently it has been shown that BSP proteins potentiate the capacitation of bovine epididymal sperm induced by heparin [15] and HDL [16]. The mechanism underlying the heparin-induced capacitation is unknown, but the binding of BSP proteins to the sperm membrane appears to increase the number of heparin-binding sites on the sperm surface [15–17]. Recent results suggest that the mechanism by which HDL and BSP proteins stimulate sperm capacitation involves cholesterol efflux [17].

Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of various mammalian species (including humans, hamsters, mice, rats, and pigs) share antigenic determinants with bovine BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa [18]. More recently, proteins that display heparin- and phosphorylcholine-binding properties have been characterized from stallion (HSP-1 and HSP-2; [19]) and boar seminal plasma (pB1; [20, 21]). These proteins are structurally related and belong to the same protein family as the bovine BSP proteins and therefore seem to be important in reproduction [22, 23]. However, only the cDNA coding for BSP-A1/A2 has been sequenced [24, 25]. Also, little is known about their tissue specificity of expression, since testis, epididymis, and other accessory sex glands as well as other organs have never been investigated for the production of these proteins. In the present study, we report the cloning of the cDNAs coding for the BSP-A3 and BSP-30-kDa proteins, as well as the expression of all BSP proteins mRNAs in several bovine tissues. We also investigated the presence of BSP protein homologous genes in human, rat, hamster, and rabbit genomic DNA.

MATERIALS AND METHODS

Tissues

Seminal vesicles and tissues from two bulls were collected immediately after slaughter from Abattoir Les cèdres (St-Lazare, PQ, Canada). Rabbit kidney and rat spleen were removed and processed as indicated later. Human prostate was obtained from Québec Transplant (Montréal, PQ, Canada). All the tissues were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C.

RNA Isolation and cDNA Synthesis

Total RNA from seminal vesicles and tissues was isolated following the acid guanidinium-phenol-chloroform method [26]. Ten micrograms of total RNA from seminal vesicles was reverse transcribed using a poly(T) primer (RACE-dT [5'-GCTAAGCTAGCGCTAAGAGCGGCCG-

TABLE 1. Oligonucleotide sequences used for PCR amplifications, RACE experiments, and sequencing.*

Origin	Name	Sequence	
BSP-A3	A3deg.for	5'-CCNAARARAARAARGAYCCRCG-3'	
	A3deg.rev	5'-TAYTTCCTNACRCCRTCYTCRTC-3'	
	A3-Apos115	5'-CTAGCAATACTCCAAACTCCATCCTC-3'	
	A3-Apos102	5'-GTGAGCACCATAGTTCATAAATG-3'	
	A3-Apos30	5'-CACACATTTATTATCTTTGGTTTCTGCAC-3'	
	A3-pos34	5'-TCCCTCGATGCAGACTATAC-3'	
	A3-pos57	5'-CCTTTATCTATGAAGGCAAGTC-3'	
	BSP-30-kDa	30kdeg.for.	5'-GAYATHCCNGAYCCNGG-3'
		30kdeg.rev.	5'-CARTAYTCCANGCYTTRTC-3'
		30k-Apos146	5'-AGTGAGTGAGCACCATCTCC-3'
30k-Apos77		5'-GTGAATGGGAAAGCACATGCAGG-3'	
30k-pos109		5'-GTACTGAGAGAGACGAACCCG-3'	
30k-pos143		5'-CACTCACTTCAAACATGACCG-3'	
BSP-A1/A2		A1/A2for.	5'-GAGAGCAAGCTACCATGGCAC-3'
	A1/A2rev.	5'-GCACCAAGACATCCACATACTC-3'	
RACE	RACE-dt	5'-GCTAAGCTAGCGCTAAGAGCGGCCGAAGC(T) ₁₅ -3'	
	RACE-2A	5'-GCTAAGAGCGGCCGCAAG-3'	
	AAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGG-3'	
Sequencing	AUAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	
	T7	5'-TGAATACGACTACTATAG-3'	
	SP6	5'-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3'	

* Oligonucleotide primers were synthesized at Gibco BRL; sequences were the following: N = A, C, G, T; H = A, C, T; R = A, G; Y = C, T.

CAAGC(T)₁₅-3')

 and the Superscript II enzyme (GibcoBRL, Burlington, ON, Canada). Reverse-transcribed samples were purified using the GeneClean Kit II (BIO 101, La Jolla, CA) and kept at -20°C before the amplification reactions. One tenth of each reaction was used in the polymerase chain reaction (PCR) amplifications.

Amplification of Partial cDNA Sequences Encoding BSP Proteins

Degenerate PCR primers (Table 1) for BSP-A3 and BSP-30-kDa were designed on the basis of the primary sequence of the protein [4, 6], in regions where the amino acids showed less degeneracy in their genetic codons. For BSP-A3, primers A3deg.for. and A3deg.rev. were based on amino acid regions 12-19 and 106-114, respectively [4]; the predicted length of the amplified fragment was 308 nucleotides (nt). For BSP-30-kDa, primers 30Kdeg.for and 30Kdeg.rev were based on amino acid regions 2-7 and 152-158, respectively [6]; the predicted length of the amplified fragment was 471 nt. PCR primers for BSP-A1/A2 were designed on the basis of the published cDNA sequence [24]. The sequence of the forward primer (A1/A2for.) corresponds to the beginning of the 5' untranslated region, and the reverse primer (A1/A2rev.) is located 328 nt downstream of the 5' untranslated region primer. The predicted length of the amplified fragment was 371 nt.

Using these primers, 35 PCR cycles were performed on reverse-transcribed RNA from bovine seminal vesicles. Cycling conditions consisted of 1-min denaturation at 94°C, 1-min annealing (40°C for BSP-A3, 51°C for BSP-30-kDa, and 50°C for BSP-A1/A2), and 1-min primer extension at 72°C. A 3-min denaturation step at 94°C preceded cycling; and at the end, a final 20-min primer extension at 72°C was performed, followed by a 4°C soak. The "hot start" procedure was accomplished by adding 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Boehringer Mannheim, Laval, PQ, Canada) to each reaction tube only after the block temperature had risen above 80°C during the initial denaturation step.

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) Experiments

To perform 3' RACE, we used cDNA synthesized from total seminal vesicle RNA with the RACE-dT primer. Subsequently, for BSP-A3, a touchdown PCR [27] was performed using the RACE-2A primer and the gene-specific primer A3-pos34. The beginning annealing temperature was 55°C (minus 1°C per cycle for 8 cycles); there were then 30 cycles at 47°C. A DNA fragment at about 450 base pairs (bp) was isolated from a 1% agarose gel and melted at 95°C in 300 µl of water. Then, 2 µl of this dilution was used to perform a nested PCR with the primer pair RACE-2A + A3-pos57 with the same cycling conditions. For BSP-30-kDa, PCR was performed using the RACE-2A primer and the gene-specific primer 30k-pos109 with the cycling conditions described for the BSP-A3 3' RACE experiment. A small piece of agarose gel containing a DNA fragment at about 400 bp was isolated and melted at 95°C in 300 µl of water. Then, 2 µl of this dilution was used to perform a nested PCR with the primer pair RACE-2A and 30k-pos143 with the same cycling conditions.

For 5' RACE experiments, the 5' RACE System (GibcoBRL) was used. Ten micrograms of total bovine seminal vesicle RNA was reverse transcribed using the specific primer A3-Apos115 or 30k-Apos146 (for BSP-A3 and BSP-30-kDa, respectively). The RNA was degraded with RNase H, and the cDNA was purified using the GlassMax DNA Isolation Spin Cartridge (GibcoBRL). Subsequently, a poly(C)⁺ tail was added at the 3' end of the cDNA using terminal transferase and dCTP. For BSP-A3, the dC-tailed cDNA was amplified using the Abridged Anchor Primer and primer A3-Apos102. The annealing temperature began at 60°C (minus 1°C per cycle for 8 cycles); there were then 27 cycles at 52°C. A small piece of agarose gel containing a DNA fragment at about 450 bp was isolated and melted at 95°C in 500 µl of water. Then 2 µl of this dilution was used to perform a nested PCR with the primer pair A3-Apos30 and the Abridged Universal Amplification Primer. The annealing temperature began at 60°C (minus 1°C per cycle for 9 cycles), followed by 26 cycles at 51°C.

FIG. 1. Aligned sequences of the cDNA encoding for the various BSP proteins and the sequences of each probe used in Southern blots or in RNase protection assays. Numbers represent the nucleotide positions. Nucleotides identical between the three BSP cDNAs are indicated by an asterisk. The sequences of probes used in Southern blots are underlined. Both BSP-A1/A2 and BSP-A3 cDNA fragments amplified for the RNase protection assays are the same as the Southern blot probes. The cDNA region used for the BSP-30-kDa RNase protection assay extends from nt 224 to 571. The alignment was performed using the CLUSTALW (1.7) program.

```

5'non-coding region / signal peptide region
BSP-A1/A2 1 -----GAGAGCAAGCTACCATGGCACTGCGAGTTGGGCTCTTTCTCATTTGGGCTG 51
BSP-A3 1 -----ACAGGAGAGCAAGCTACCATGGCACTGCGAGTTGGGCTCTTTCTCATTTGGGCTG 55
BSP-30K 1 CAGCCACAGGAGAGCAAGCTACCATGGCACTGCGAGTTGGGCTCTTTCTCATTTGGGCTG 60
          *****

/ N-terminal tail region
BSP-A1/A2 52 CGGTGTCTGTGTTTCTACAACCTGGACCCCTGTGAATGGAG----- 90
BSP-A3 56 CGGTGTCTATGTTTCTACAACCTGGACCCCTGTGAATGGAG----- 94
BSP-30K 61 GTGCGTCTGTGTTTCAACAACCTACACCCTGTGAATGGAGGATATTCGCCAGCCAGGGA 120
          * * * * *

BSP-A1/A2 91 -----ATCAG-----GAGC----- 99
BSP-A3 95 -----ATGAGCAGCTGTCT-----GAG----- 112
BSP-30K 121 GCAAACCCAGCCCTCTTGAATGGCAGATGAGCTGCCACAGAGCTATGACCTTCCTC 180
          * * * * *

BSP-A1/A2 100 -----A--AGGTGTTT--CT-----AC-TGAACCT----- 119
BSP-A3 113 -----ACAACGTCATT--CT-----TCCTAAGAA----- 135
BSP-30K 181 CCGAAATTTACACTACTACATTTTTCCTCGCACCAATTTATTCCTCAAGAGGAGATGCCGT 240
          * * * * *

BSP-A1/A2 120 -----ACCCAAGAC---GGTCTGCTGAATTACCTG 147
BSP-A3 136 -----AAGAAAGACCCCTGCTTCTGCTGAGAAACCA 166
BSP-30K 241 ATGACGACAAACCCTTTCCTAGCTTGTGAGCAAGCCACAGATCTTAATGAGTTTTCG 300
          * * * * *

/ type II domains region
BSP-A1/A2 148 AAGCGAAGAATGCGTTTCCCATTCGCTCTATAGAAACAGAAAGCATTTTGACTGCACAG 207
BSP-A3 167 AAGATAATAAATGTTTTCCTTTCATCTATGGAACCAAAAGTATTTTGACTGCACAT 226
BSP-30K 301 AAGTCTCTGACTGTCTTTCCTTTCACCTATAAAGGCAAAAGTATTATATGCTGCAG-G 359
          * * * * *

BSP-A1/A2 208 TGCATGG-TTCCCTTATTCCTGCTGTTCCCTCGATGCAGACTATGTAGGAAGATGGAAA 266
BSP-A3 227 TGCATGG-TTCCCTTATTCCTGCTGTTCCCTCGATGCAGACTATGCAGGAAGATGGAAA 285
BSP-30K 360 CGCAAAAATTCCTGATTTACTATGCTGTTCCCTCGATGAGATATCAAGGAACCTGGAAA 419
          * * * * *

BSP-A1/A2 267 TACTGTGCTCAGAGAGACTATGCTAATGTGCTTCCCTTTTATCTATGGAGGCAAGAAA 326
BSP-A3 286 TACTGTACTAAGAATGACTATGCCAATGTGCTTTCCTTTTATCTATGAAGGCAAGTCA 345
BSP-30K 420 TTCTGTACTGAGAGAGCGAACCAGATGTGCTTCCCTTTTATCTAT---CGCAAGAAA 476
          * * * * *

BSP-A1/A2 327 T---ATGAGACTTGCACAAAAATGGGAGTATGTTGGATG---TCT-----TGTTGCT 372
BSP-A3 346 T---ATGAGACTTGCATAAATAATGGGAGTACATTTATGAACATAT-----TGTTGCT 394
BSP-30K 477 TCTTATGAAAGTTGCACAC---GGGTGCATAGTTT---TCTGGAGGAGATGGTCT 528
          * * * * *

/3'non-coding region
BSP-A1/A2 373 CACTCTCTCCAACTACGACAAGGACAGAGCTTGGAAATTTGCTAGCCATAAAAAGAG- 431
BSP-A3 395 CACTCTCTTCCAACTATGATGAGGATGGAGTTTGGAAATTTGCTAGCAGTAAAAAGA-- 452
BSP-30K 529 CACTCACTTCAAACATGACCGGATAAAGCTTGGAAATTTGCTAGCAAAAAAAGAAA 588
          *****

BSP-A1/A2 432 --CTATGTTTCAGTCACTGTCCAGTGCATCCACCCTTGCCATGGATGCAATCCAGCCTTT 489
BSP-A3 453 -----GTTACTGTCCAGTACATCCACCCTTGCCATGGATGCAATCCAGCCTTC 501
BSP-30K 589 AGCTATGTTTCAGTCACTGTCCAGTGCATCCACCCTTGCCATGGATGCAATCCAGCCTTT 648
          * * * * *

BSP-A1/A2 490 GAAACCTCAGTGAAGAAAATCAAGAATCTCAAGCATGAAGATGATGCTCTGAAAGCCAG 549
BSP-A3 502 AAAACTTCAGTGGAGAAAATCAAGAATCTCAAGCA--AAGGTGATGCTCTGAGCGACAG 559
BSP-30K 649 GAAACCTCAGTGAAGAAAATCAAGAATCTTAAGCATGAAGGTGATGCTCTGAAATGACAG 708
          * * * * *

BSP-A1/A2 550 AGGTGAAATCCTTTCCCTACATCTCCACCATGTTCCCTTATGCGTGGATCCAAATCAATA 609
BSP-A3 560 AGGTGAAATCCTTTCCCTACATCTCTGCTGCTGCTGGGATGGGATCCAAATCAATA 619
BSP-30K 709 AGGTGAAATCCTTTCTCAGCATCTCCACCATGTTCCCT---CTGGCATAGTCCAAATCAATA 767
          *****

BSP-A1/A2 610 AACCACTTTCTCAGCpoly(A) 624
BSP-A3 620 AAC-ACFTTCTCTGCPoly(A) 633
BSP-30K 768 AACCACTTTCTCAGCpoly(A) 782
          * * * * *

```

For BSP-30-kDa, the dC-tailed cDNA was amplified using the Abridged Anchor Primer and primer 30k-Apos146. The annealing temperature began at 60°C (minus 1°C per cycle for 9 cycles), followed by 28 cycles at 51°C. As no product was visible on an ethidium bromide-stained gel, 1 µl of the first PCR was diluted 100-fold with water and 5 µl of this dilution was reamplified using Abridged Univer-

sal Amplification Primer and the nested primer 30k-Apos77. The annealing temperature began at 60°C (minus 1°C per cycle for 8 cycles); 30 cycles at 52°C followed. In both RACE 3' and RACE 5' experiments, control reactions without reverse transcriptase or without RNA were performed. For 5' RACE, additional control reactions without terminal transferase were performed.

Cloning and Sequencing

All PCR products were cloned into the *Sma*I site of the pGEM3zf vector (Promega, Madison, WI) via the T-A overhang method [28]. The sequencing was performed on both strands with the Fidelity DNA Sequencing kit (Oncor, Gaithersburg, MD) and [α - 35 S]dATP (Amersham, Oakville, ON, Canada) using either SP6 or T7 primers (Table 1).

RNase Protection Assays

The pGEM3zf vectors containing the partial cDNA encoding for each BSP protein as described earlier were linearized separately and then transcribed using the MAXIScript SP6/T7 kit (Ambion, Austin, TX) in the presence of [α - 32 P]UTP (Amersham) to obtain uniformly labeled antisense strands. The BSP-A3 and the BSP-A1/A2 clones were linearized by the *Eco*RI enzyme, giving an antisense RNA transcript of 375 bp for BSP-A3 and of 438 bp for BSP-A1/A2 with the SP6 RNA polymerase. The BSP-30-kDa clone was linearized by the *Sma*II enzyme, generating a BSP-30-kDa antisense RNA transcript of 392 bp with the T7 RNA polymerase. The sequence of each BSP protein cDNA transcribed for the RNase protection assays is shown in Figure 1. Full-length RNA probes were recovered from 6% 8 M urea acrylamide gels by submerging gel slices in elution buffer containing 500 mM ammonium acetate, 1 mM EDTA, and 0.2% SDS overnight at room temperature. The diluted RNA probes were precipitated by adding 10 μ g of yeast RNA and 2.5 volumes of cold absolute ethanol. RNase protection assays were performed with the RPA II RNase protection kit (Ambion). Briefly, 10 μ g of total RNA from adult bovine tissues (the amount and quality of the RNA used for the protection assays had been previously checked on formaldehyde agarose gel to ensure equal loading of RNA in all samples) was hybridized for 20 h at 45°C with one of the radiolabeled RNA probes using 1.8×10^5 cpm of the BSP-A3 RNA probe, or 1.5×10^5 cpm of the BSP-30-kDa RNA probe, or 3.4×10^5 cpm of the BSP-A1/A2 RNA probe. The specific activity of the probes was greater than 7.5×10^8 cpm/ μ g. RNase digestion of the unhybridized RNA was performed at 37°C for 2 h with 0.1 U of RNase A and 20 U of RNase T1. The protected RNA fragments were separated on 6% polyacrylamide 8 M urea gels. The gels were exposed to Biomax MS x-ray film (Eastman Kodak, Rochester, NY) with the Biomax MS intensifying screen at -80°C overnight and for 1 wk. For each experiment, two control tubes containing the same amount of labeled probe and 10 μ g of yeast RNA were incubated with or without RNases. RNA markers were 32 P-labeled transcripts from the century marker templates from Ambion.

Southern Analysis

High molecular weight genomic DNA from various species was prepared as described previously [28]. For rabbits, rats, humans, hamsters, and cattle, the DNA was extracted, respectively, from kidney, spleen, prostate, CHO cells (Chinese hamster ovary cells), and lung. Twenty-five micrograms of genomic DNA from each species was digested with the *Eco*RI restriction enzyme (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada). The fragments were separated on a 1% agarose gel, transferred to Duralon-UV nylon membranes (Stratagene, La Jolla, CA), and hybridized as described below. The BSP-A1/A2 and BSP-A3 DNA probes were, respectively, the 371-bp and the 308-bp PCR

TABLE 2. Percentage of nucleotide homologies between the complete sequences of the cDNA encoding for the different BSP proteins and between the BSP cDNA probes used in Southern blots and the different BSP cDNAs.

Comparison	Residues overlap	Identical residues	% of homologies	Gap frequency
cDNA vs. cDNA				
A1/A2 vs. A3	633 ^c	521	82%	6.0%
A1/A2 vs. 30k	782 ^c	502	64%	23%
A3 vs. 30k	782 ^c	492	63%	22%
Southern probe vs. cDNA				
A1/A2 vs. A3	95 ^a	92	97%	0.0%
	294 ^b	224	76%	6.0%
A1/A2 vs. 30k	90 ^a	80	89%	0.0%
	427 ^b	197	46%	36%
A3 vs. A1/A2	308 ^c	246	80%	2.0%
A3 vs. 30k	347 ^c	218	63%	18%
30k vs. A1/A2	435 ^c	205	47%	37%
30k vs. A3	435 ^c	215	49%	35%

^a The residues overlap included only the first (95 or 90) nucleotides of the A1/A2 cDNA Southern probe.

^b The residues overlap included the remaining sequence of the A1/A2 cDNA Southern probe.

^c The residues overlap included the complete sequence of the cDNA or the complete sequence of the Southern probe.

products obtained as described above. The BSP-30-kDa DNA probe was a 435-bp PCR product amplified using primers 30Kdeg.for. and 30k-Apos146. The sequence of each probe is shown in Figure 1. Each of these fragments was labeled using [α - 32 P]dCTP (Amersham) and the Ready-to-Go DNA labeling kit (Pharmacia, Baie d'Urfé, PQ, Canada). Membranes were prehybridized in 4-strength saline-sodium phosphate-EDTA buffer, 0.1% sodium pyrophosphate, 5% SDS, and 100 μ g/ml heparin for 5 h at 68°C. Hybridization was carried out overnight at 68°C; the membrane was washed three times at room temperature for 5 min in double-strength sodium chloride/sodium citrate (SSC; single-strength SSC is 0.15 M sodium chloride and 0.015 M sodium citrate) with 0.1% SDS, followed by a 60-min wash at 65°C in 0.1-strength SSC/0.1% SDS (high-stringency washing) and three final washes at room temperature in 0.1-strength SSC. The membranes were exposed to Biomax MS x-ray film (Kodak) at -80°C with the Biomax MS intensifying screen overnight or up to 10 days. Size markers were λ -DNA digested with *Hind*III. The percentages of nucleotide homologies between the probes and the various BSP cDNAs are given in Table 2. The BSP-30-kDa probe contains the region coding for the unique amino-terminal sequence, and this DNA region has no homology with the other BSP DNA probes (Fig. 1).

RESULTS

BSP-A3 and BSP-30-kDa cDNA Sequences

PCR fragments covering the complete BSP-A3 and BSP-30-kDa cDNAs were cloned and sequenced. First, a specific fragment of each cDNA was amplified by PCR using degenerate primers designed on the basis of the primary sequence of the proteins. The nature of the fragments obtained was verified by comparing their deduced amino acid sequences with the published protein sequences. Then, specific primers were designed on the basis of these sequences. These primers were used to amplify the 3' and 5' untranslated cDNA regions by the 3' and 5' RACE techniques, and the fragments were cloned and sequenced (Figs. 2 and

ACAGGAGAGCAAGCTACCATGGCACTGCGTTGGGGCTCTTCTGATTGGGGCTGGCGTG 60
 M A L R L G L F L I W A G V
 -25 -20
 TCTATGTTTACAACTGGACCTGTGAATGGAGATGAGCAGCTGTCTGAGGACAACGTC 120
 S M F L Q L D P V N G D R Q L S E D N V
 -1 +1
 ATTCTTCCTAAAGAAAAGAACCCCTGCTTCTGGTGCAGAAACCAAGATAATAAATGT 180
 I L P K E K K D P A S G A E T K D N K C
 20
 GTTTCCCATTCATCTATGGAAACAAAAGTATTTGACTGCACATTGCATGGTTCCTTA 240
 V F P F I Y G N K K Y F D C T L H G S L
 40
 TTCCTGTGGTGTCCCTCGATGACAGACTATACAGGAAGATGAAATACTGTAAGAAT 300
 F L W C S L D A D Y T G R W K Y C T K N
 60
 GACTATGCCAAATGTGTCTTCCCTTATCTATGAAGCAAGTCATATGACACTGCATA 360
 D Y A K C V F P F I Y E G K S Y D T C I
 80
 ATAATGGAGTACATTTATGAACATTTGGTGTCTCTTCAAATATGATGAGGAT 420
 I I G S T F M N Y W C S L S S N Y D E D
 100
 GGAGTTTGAAGTATGTCTAGCAGTAAAAGAGTTACTGTCCAGTACATCCACCCATGGC 480
 G V W K Y C *

CACGGATGCAATCAAGCCTTCAAACCTTCAGTGGAGAAAATCAAGAATCTCAAGCAAAG 540
 GTGATGCTCTGAGCGACAGAGGTGAAATCTTTCCTACATCTCTGCTTGTGCTGCTG 600
 GGCATGGTCCAATCAATAAACACTTCTCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 650

FIG. 2. Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of BSP-A3 cDNA (GenBank accession no. AF055981). Numbers on the right represent the nucleotide sequence. The amino acid sequence numbering starts with +1 for the mature BSP-A3. Deduced amino acids differing from the primary sequence previously obtained [4] are bolded and underlined. The consensus nucleotide sequences for the initiation site and the polyadenylation signal are underlined.

3). For both cDNAs, the initiation methionine occurred within the sequence CTACCATGG, highly homologous to the Kozak consensus sequence CCA(G)CCATGG that controls translational efficiency of mammalian mRNAs [29–31]. Furthermore, both possessed the consensus polyadenylation signal AATAAAA, 13 or 12 nt upstream of the poly(A) tail, respectively, for the BSP-30-kDa cDNA and the BSP-A3 cDNA.

The complete cDNA of BSP-A3, excluding the poly(A) tail, was 633 nt long (Fig. 2). The cDNA coding for BSP-A3 contained an open reading frame of 420 nt starting at position 19. The deduced amino acid sequence, excluding the signal peptide, was identical to the primary sequence previously reported [4] except at position 2, where a glutamate (E) was found instead of a glutamine (Q), and at position 90, which was an isoleucine (I) rather than a lysine (K). The cleavage site for the precursor peptide occurred between amino acid –1 and +1 as determined by the primary sequence previously reported [4] (Fig. 2). The theoretical molecular weight of the 140-amino acid residue precursor polypeptide of BSP-A3 is 16 584.

The complete cDNA of BSP-30-kDa, excluding the poly(A) tail, was 782 nt long (Fig. 3). The cDNA coding for BSP-30-kDa had an open reading frame of 549 bp starting at position 24. The deduced amino acid sequence, excluding the signal peptide, was the same as the primary sequence obtained earlier [6], but we found at position 13 a proline (P) rather than a serine (S). The six unidentified residues in the reported peptide sequence were found to be threonine, as suggested by the previous authors. The cleav-

CAGCCACAGGAGAGCAAGCTACCATGGCACCGCTAGTGGGGCTCTTCTGATTGGGGCTG 60
 M A P L V G L F L I W A G
 -25 -20
 GTGCGTCTGTGTTCAACAACACTACACCCTGTGAATGGAGGGATATCCCGACCCAGGGA 120
 A S V F Q Q L H F V N G G D I P D P G S
 -1 +1
 GCAAAACCCACGCCCTCTGGAATGGCAGATGAGCTGCCGACAGACGATGACCTTCCTC 180
 K P T P E G M A D E L P T E T Y D L P P
 20
 CCGAAATTTACACTACTACATTTTTGCCTCGCACCATTATCTCTCAAGAGGAGATGCCGT 240
 E I Y T T T F L P R T I Y P Q E E M P Y
 40
 ATGACGACAAACCTTTTCCTAGCTTGTGAGCAAGCAACGATCTTATGACAGTTTTTTG 300
 D D K P F P S L L S K A N D L N A V F E
 60
 AAGTCTCTGATGTCTTCCCATTCACCTATAAAGGCAAAAGTATTTATGTCACGCG 360
 G P A C A F P F T Y K G K K Y Y M C T R
 80
 GCAAAAATCCGTATTACTATGGTGTCTCCCTCGATACAGAAATCAAGAAATCGAAAT 420
 K N S V L L W C S L D T E Y Q G N W K F
 100
 TCTGTACTGAGAGAGCAACCGAATGTGTCTTCCCTTATCTATCGCAAGAAATCCT 480
 C T E R D E P E C V F P F I Y R K K S Y
 120
 ATGAAAGTTGCACACGGGTGCATAGTTTTTCTGGAGGAGATGGTGTCTCACTCACTCAA 540
 E S C T R V H S F F W R R W C S L T S N
 140
 ACTATGACCCGGATAAAGCTTGGAAATATGCTAGCAAAAAAAAAAAAAAGCTATGTTTCA 600
 Y D R D K A W K Y C *

TCAGTGTCCAGTGCATCCACCTTGGCCATGGATGCAATCCAGCCTTTGAAACCTCAGTG 660
 ATGAAATCAAGAATCTTAAGCATGAAGTGTGCTCTGAATGACAGAGGTGAAATCCT 720
 TTCTCAGATCTCCACCATGTTCCCTGGGATAGTCCAAATCAATAAACACTTTCTCT 780
 GCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 800

FIG. 3. Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of BSP-30-kDa cDNA (GenBank accession no. AF057133). Numbers on the right represent the nucleotide sequence. The amino acid sequence numbering starts with +1 for the mature BSP-30-kDa. The deduced amino acid differing from the primary sequence previously obtained [6] is bolded and underlined. The consensus nucleotide sequences for the initiation site and the polyadenylation signal are underlined.

age site for the precursor peptide occurred between amino acid –1 and +1 as determined by the primary sequence previously reported [6] (Fig. 3). The theoretical molecular weight of the 183-amino acid residue precursor polypeptide of BSP-30-kDa is 21 721. The aligned sequences of the cDNA encoding for the various BSP proteins are presented in Figure 1, and the degrees of residue homologies between these cDNAs are presented in Table 2. The sequence region between the three BSP cDNAs that had the most identical nucleotides was the one encoding the putative signal peptide (88% homology), and the sequence region that had the highest nucleotide variations and gap frequencies was the one encoding the N-terminal extension.

The first 25 amino acid residues of the BSP-A3 and BSP-30-kDa precursor proteins had a hydrophobic char-

BSP-A3	:	MALRLGLFLIWAGVSMFLQLDFVNG
BSP-30kDa	:	MAPLVGLFLIWAGASVFQQLHFPVNG
BSP-A1/A2	:	MALQLGLFLIWAGVSVFLQLDFVNG
pB1	:	MAPRLGIFFLLWAGVSVFLPLDFVNG

FIG. 4. Alignment of the putative signal peptide amino acid sequences of bovine BSP-A3 and BSP-30-kDa with those of BSP-A1/A2 and boar pB1. Identical amino acids present in all four proteins are underlined. Identical amino acids present in bovine BSP proteins but different from those of pB1 are indicated by a plus (+).

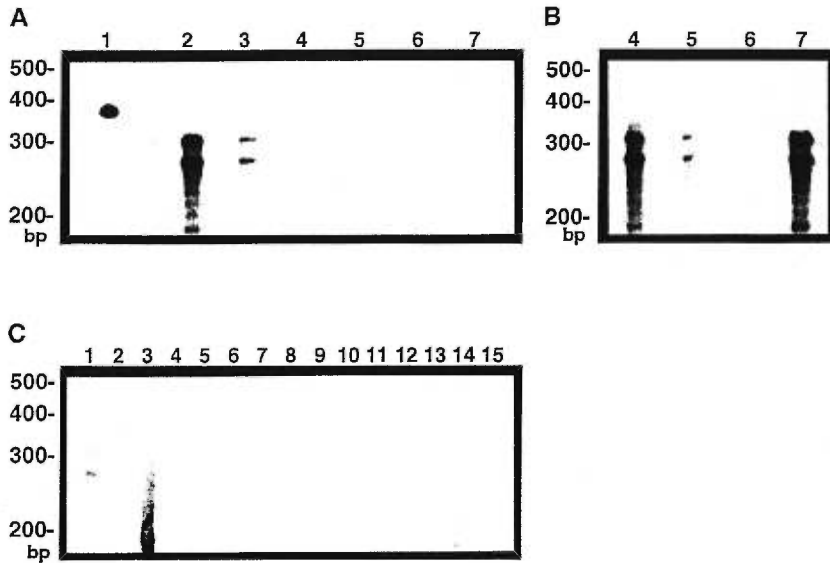


FIG. 5. Expression of BSP-A3 mRNA by RNase protection assay using 10 μ g of RNA from each bovine tissue, except where indicated. A) Results obtained with a 16-h exposure only. Lane 1, undigested RNA probe; lanes 2, 3, 4, 5, and 6 contain, respectively, 10 μ g, 1 μ g, 0.1 μ g, 0.01 μ g, and 0.001 μ g of seminal vesicle RNA; lane 7, ampulla-vas deferens RNA. B) Same gel as in A (lanes 4, 5, 6, and 7 only), exposed for 1 wk. C) A gel run in parallel to gel A, with a 1-wk exposure. Lane 1, 0.001 μ g of seminal vesicle RNA; lane 2, empty; lane 3, artery RNA; lane 4, small intestine RNA; lane 5, adipose tissue RNA; lane 6, brain RNA; lane 7, kidney RNA; lane 8, heart RNA; lane 9, lung RNA; lane 10, large intestine RNA; lane 11, liver RNA; lane 12, epididymis RNA; lane 13, testis RNA; lane 14, prostate RNA; lane 15, probe only, digested with RNases. Numbers indicate the size of RNA transcripts from the century marker templates from Ambion.

acter; they displayed, respectively, 92% and 76% similarity with those residues of the BSP-A1/A2 precursor polypeptide (Fig. 4). They also displayed a significant similarity (80% for BSP-A1/A2, 80% for BSP-A3, and 68% for BSP-30-kDa) with the first 25 amino acid residues of the precursor polypeptide of boar pB1 recently sequenced by Plucienniczak and coworkers (GenBank #AF047026).

Tissue-Specific Expression of BSP Proteins

The results of the RNase protection assay for BSP-A3 mRNA are depicted in Figure 5. In seminal vesicle tissue and ampullae, strong expression of BSP-A3 mRNA was observed, since the expected 308-bp RNA fragment was detected in these tissues (Fig. 5A, lanes 2-7; Fig. 5B, lanes 4-7). Also a second major RNA fragment at approximately

270 bp was protected. No BSP-A3 mRNA expression was revealed in artery, small intestine, adipose tissue, brain, kidney, heart, lung, large intestine, liver, epididymis, testis, or prostate (Fig. 5C). The results of the RNase protection assays for BSP-30-kDa and BSP-A1/A2 mRNAs are depicted, respectively, in Figures 6 and 7. These BSP protein mRNAs showed strong expression only in seminal vesicle tissue and in the ampullae (Figs. 6A and 7A, lanes 2-7; Figs. 6B and 7B, lanes 4-6), since the expected major RNA fragments (344 bp for BSP-30-kDa mRNA or 371 bp for BSP-A1/A2 mRNA) were detected only in these two tissues (Figs. 6C and 7C).

Southern Analysis of Genomic DNA in Various Species

A comparative genomic analysis employing a BSP-30-kDa-specific DNA probe and high-stringency washing con-

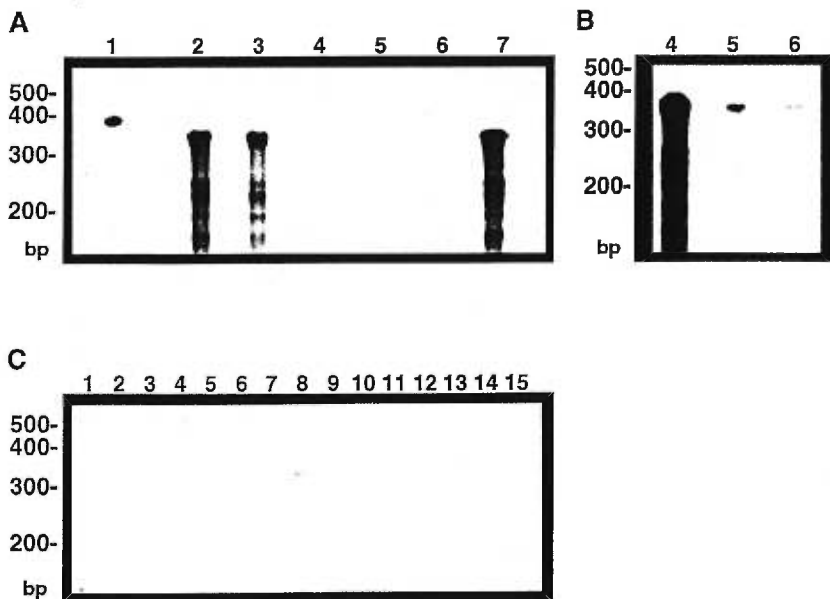
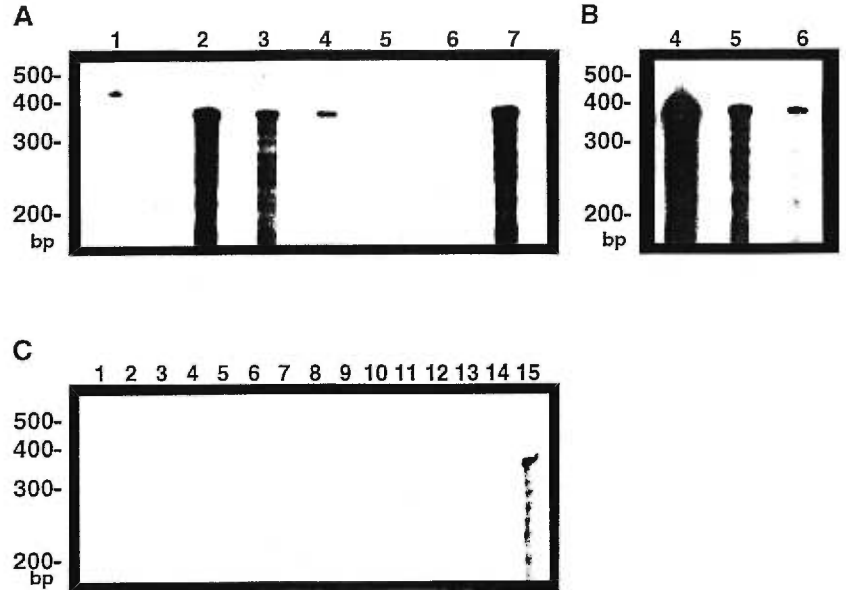


FIG. 6. Expression of BSP-30-kDa mRNA by RNase protection assay using 10 μ g of RNA from each bovine tissue, except where indicated. A) Results obtained with a 16-h exposure only. Lane 1, undigested RNA probe; lanes 2, 3, 4, 5, and 6 contain, respectively, 10 μ g, 1 μ g, 0.1 μ g, 0.01 μ g, and 0.001 μ g of seminal vesicle RNA; lane 7, ampulla-vas deferens RNA. B) Same gel as in A (lanes 4, 5, and 6 only), exposed for 1 wk. C) A gel run in parallel to gel A, with a 1-wk exposure. Lane 1, probe only, digested with RNases; lane 2, prostate RNA; lane 3, testis RNA; lane 4, epididymis RNA; lane 5, liver RNA; lane 6, large intestine RNA; lane 7, lung RNA; lane 8, 0.001 μ g of seminal vesicle RNA; lane 9, heart RNA; lane 10, kidney RNA; lane 11, brain RNA; lane 12, adipose tissue RNA; lane 13, small intestine RNA; lane 14, artery RNA. Numbers indicate the size of RNA transcripts from the century marker templates from Ambion.

FIG. 7. Expression of BSP-A1/A2 mRNA by RNase protection assay using 10 μ g of RNA from each bovine tissue, except where indicated. **A**) Results obtained with a 16-h exposure only. Lane 1, undigested RNA probe; lanes 2, 3, 4, 5, and 6 contain, respectively, 10 μ g, 1 μ g, 0.1 μ g, 0.01 μ g, and 0.001 μ g of seminal vesicle RNA; lane 7, ampulla-vas deferens RNA. **B**) Same gel as in **A** (lanes 4, 5, and 6 only), exposed for 1 wk. **C**) A gel run in parallel to gel **A**, with a 1-wk exposure. Lane 1, probe only, digested with RNases; lane 2, prostate RNA; lane 3, testis RNA; lane 4, epididymis RNA; lane 5, liver RNA; lane 6, large intestine RNA; lane 7, lung RNA; lane 8, heart RNA; lane 9, kidney RNA; lane 10, brain RNA; lane 11, adipose tissue RNA; lane 12, small intestine RNA; lane 13, artery RNA; lane 14, empty; lane 15, 0.001 μ g of seminal vesicle RNA. Numbers indicate the size of RNA transcripts from the century marker templates from Ambion.



ditions yielded a band at 3.7 kilobases (kb) in human, rabbit, rat, and hamster DNA (Fig. 8A). In the same conditions, bands at 3.7 and 9.8 kb were seen in male and female bovine DNA. The use of a BSP-A1/A2- or a BSP-A3-specific DNA probe with low-stringency washing conditions yielded no signal with human, rabbit, rat, and hamster DNA (data not shown). Using high-stringency conditions with male and female bovine DNA, bands at 4.2 and 3.9 were detected with the BSP-A3 probe (Fig. 8B), while bands at 10.5, 1.6, and 1.0 kb were detected with the BSP-A1/A2 probe (Fig. 8C). The bands at 4.2 and 3.9 kb (detected with the BSP-A3 probe) were also detected faintly in male and female DNA in medium-stringency conditions by the BSP-A1/A2 probe (data not shown).

DISCUSSION

We have sequenced the two complete cDNAs coding for the BSP-A3 and the BSP-30-kDa proteins (Figs. 2 and 3). The two cDNAs possess the same consensus sequence for the initiation methionine (CTACCATGG) and the polyadenylation signal (AATAAA) as the BSP-A1/A2 cDNA [24]. The BSP-A3 and BSP-30-kDa cDNA code, respectively, for a 140- or a 183-amino acid precursor protein of estimated polypeptide molecular weights of 16 584 and 21 721. The first 25 amino acid residues are highly similar among the bovine BSP precursor proteins and also to the boar pB1 precursor protein (Plucienniczak and coworkers, GenBank #AF047026) (Fig. 4). These sequences probably constitute signal peptides, since they are absent from the secreted (mature) BSP proteins [4, 6, 8]. Also, these first 25 amino acid residues display typical features of signal peptides of eukaryotic secretory pre-proteins. In fact, they have a hydrophobic character, and in the case of BSP-A3 and pB1 the hydrophobic cores are preceded by a basic residue (R) [32]. Thus these amino acid residues are probably responsible for the secretion of the BSP proteins.

The deduced amino acid sequences indicate one (for BSP-30-kDa) or two (for BSP-A3) amino acid differences from the primary sequences previously reported [4, 6].

These differences have been found consistently in several clones from different PCR reactions, excluding the possibility that these differences arise from amplification or sequencing errors. Also, the presence in RNase protection assays of a fragment at the expected size for the full-length BSP-A3 mRNA protected probe (308 bp) confirms that the base change (position 362 on the cDNA sequence) detected in the sequencing is present in the mRNA (Fig. 5). Polypeptide sequencing errors are unlikely for BSP-A3, since among known members of the BSP protein family in cattle and other species, at the position of the first difference, the amino acid seems to be a conserved glutamine (Q), and at the second different position a conserved basic amino acid, lysine (K) or arginine (R), except for a threonine (T) for HSP-1 (Fig. 9). No such comparison can be made concerning the proline (P) at position 13 in BSP-30-kDa, since this region does not show any homology to known protein sequences [6, 21].

These differences could be due to polymorphism in the genes coding for the BSP proteins. Several arguments converge in this direction. The presence of a smaller RNA fragment (at approximately 270 bp) with the same intensity as the full-length fragment in the BSP-A3 RNase protection assay (Fig. 5) suggests the possibility that this bull is heterozygous for the gene coding for BSP-A3. The total RNA used in these experiments was extracted from tissues of a bull different from the one used for the cloning of the BSP cDNAs. This smaller RNA fragment is not the result of cross-binding between the BSP-A3 probe and the BSP-A1/A2 or BSP-30-kDa RNA, since there are many nucleotide differences between them (Fig. 1). Also, some amino acid differences are seen between the published primary sequence of boar pB1 [21] and the deduced amino acid sequence of its cDNA recently cloned by Plucienniczak and coworkers (Genbank #AF047026). Further studies are required in order to determine whether these differences are due to polymorphism in the BSP genes or in homologous genes in other species.

The amino acid difference in BSP-30-kDa and the first

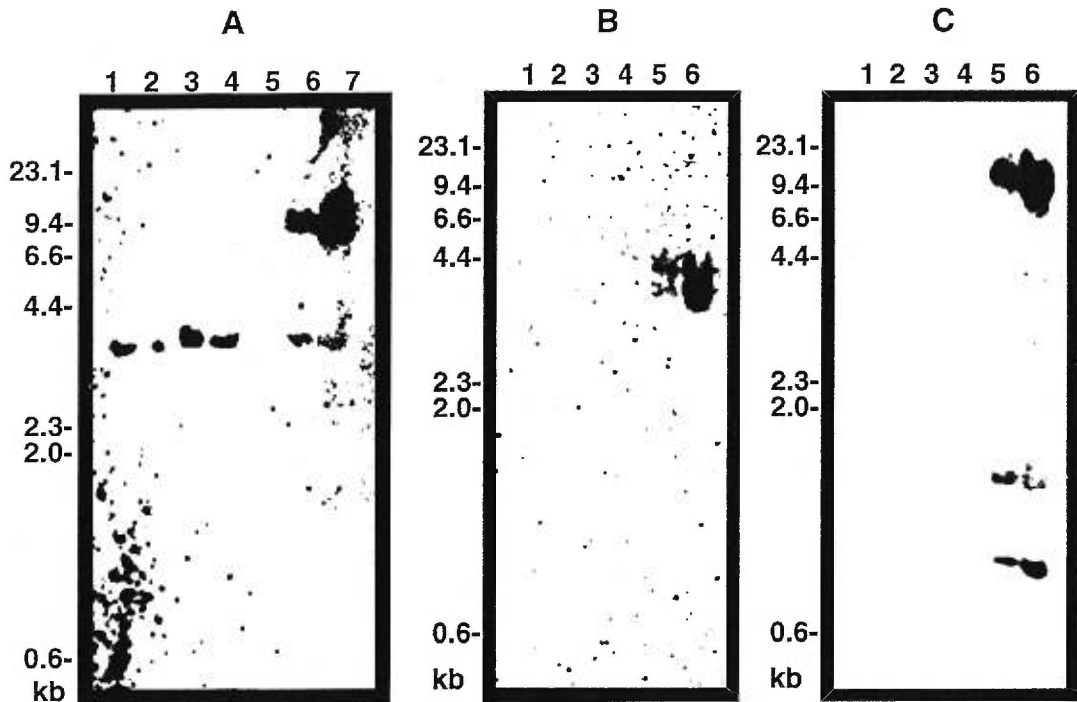


FIG. 8. Southern blot analysis of the BSP protein genes. Aliquots (25 μ g) of high molecular weight genomic DNA from various species were digested with *Eco*RI, fractionated through 1% agarose gel, and transferred to nylon membrane. A) The membrane was hybridized with the BSP-30-kDa probe. Lane 1, rabbit DNA; lane 2, human DNA; lane 3, rat DNA; lane 4, hamster DNA; lane 5, empty; lane 6, female bovine DNA; lane 7, male bovine DNA. A different membrane was hybridized with B) the BSP-A3 probe or C) the BSP-A1/A2 probe. Lane 1, rabbit DNA; lane 2, human DNA; lane 3, rat DNA; lane 4, hamster DNA; lane 5, female bovine DNA; lane 6, male bovine DNA.

one in BSP-A3 occur in the amino-terminal region. The effect of this substitution is unknown since the role of the amino-terminal region in each BSP protein is unknown. The second substitution in BSP-A3 occurs in the second type II domain of the protein (domain b). These type II domains are important for the biological function of the BSP proteins [9]. In fact, in BSP-A1/A2, they constitute binding units for sperm membrane choline phospholipids and heparin, and the presence of both type II domains is essential for the expression of functional properties, namely lipid efflux and sperm capacitation [9]. So, if an amino acid substitution in domain b affects its binding properties, the stimulation of sperm cholesterol efflux and sperm capacitation by the BSP protein will be affected. These amino acid substitutions could modify the affinity of the BSP proteins for sperm membrane choline phospholipids and thus affect sperm capacitation induced by heparin or HDL. Conversely, they could influence their affinity toward heparin or HDL and thus change the sperm capacitation rate.

As seen in the RNase protection assays, all the BSP proteins mRNAs are synthesized in the seminal vesicles and the ampullae (Figs. 5A, 6A, and 7A, lanes 2–6; Fig. 5B, lanes 4–7; Figs. 6B and 7B, lanes 4–6). The expression is very strong in these tissues, since a very intense radioactive signal appears on the autoradiogram after only one night of exposure. Each BSP protein mRNA is detected in only one nanogram of total seminal vesicle RNA (Figs. 5B, 6B, and 7B, lane 6; Fig. 5C, lane 1; Fig. 6C, lane 8; and Fig. 7C, lane 15). No signal was detected in 10 μ g RNA from testis, epididymis, and other male accessory sex glands or other tissues (Figs. 5C, 6C, and 7C). This suggests that the BSP

protein mRNA expression in these tissues is at least 10 000 times less than in the seminal vesicles. However, even a very low expression of BSP proteins in other tissues could have a physiological significance, since the large mass of other tissues, even with a very low level of expression, could produce large enough quantities of BSP proteins in the bloodstream to influence some physiological processes, such as cholesterol efflux, for example [33]. Only more sensitive techniques, such as RNase protection on isolated mRNA or nested reverse transcription-PCR, could determine whether expression of BSP genes in other tissues is totally abolished. The presence of BSP proteins in female bovine tissues is unknown.

Comparison of the signal obtained with RNA from ampullae and seminal vesicles suggests that BSP-A1/A2 and BSP-30-kDa mRNAs are expressed at about the same level

BSP protein family members	Region 1				Region 2				
BSP-A3 (cloned):	01	D	E	Q	03	89	I	I	91
BSP-A3 (published):	01	D	Q	Q	03	89	I	K	91
BSP-30K:		-	-	-		132	T	R	134
BSP-A1/A2:	01	D	Q	D	03	84	T	K	86
HSP-1:	16	D	Q	Q	18	89	T	T	91
pB1:	01	D	Q	H	03	79	I	K	81

FIG. 9. Alignment of the two BSP-A3 peptide regions containing the amino acid differences (arrows) with the corresponding homologous peptide regions from the previously reported BSP-A3 and other members of the BSP protein family (BSP-A3 [4], BSP-A1/A2 [5, 8], BSP-30-kDa [6], HSP-1 [19], and pB1 [21]).

in the ampullae and seminal vesicles. This is not the case for BSP-A3 mRNA, which is about 50 times less expressed in the ampullae than in seminal vesicles. This difference in the level of expression in the ampullae was confirmed by Northern blot analysis (data not shown). Using probes of approximately the same specific radioactivity, comparison of the signal strength suggests that the amount of BSP-A1/A2 mRNA is higher than that of the BSP-30-kDa mRNA, and the amount of BSP-30-kDa mRNA is slightly higher than that of BSP-A3 mRNA in the seminal vesicles (Figs. 5B, 6B, and 7B). This correlates with the proportion of each protein in the seminal fluid (BSP-A1/A2, ~65%; BSP-A3, ~15%; BSP-30-kDa, ~20% as determined by respective RIAs [5]). These results suggest that BSP protein expression is controlled at the transcriptional level.

Using a BSP-30-kDa-specific cDNA probe and high-stringency Southern hybridization, a homologous sequence at 3.7 kb was detected in genomic DNA from the human, rat, hamster, and rabbit (Fig. 8A), suggesting that the genomic DNA of these species possess a gene with a significant homology to the bovine BSP-30-kDa gene. This is in agreement with the fact that in human, hamster, and rat seminal plasma, phosphorylcholine-binding proteins immunologically related to the bovine BSP-30-kDa protein have been detected [18]. Southern analysis with a BSP-A1/A2- or a BSP-A3-specific cDNA probe at high-stringency conditions of hybridization yielded no signal with the human and other mammalian species (Fig. 8, B and C). Even using low-stringency conditions of hybridization, these two probes yielded no signal with the human or other mammalian species (data not shown). The BSP-30-kDa probe contains the sequence coding for the amino-terminal region without homology to known protein sequences (Fig. 1). The detection of homologous genes in different species using this probe suggests that this unique region has been well conserved in mammals, while genes homologous to BSP-A1/A2 and BSP-A3, if present, seem to have diverged rapidly during evolution. It is unlikely that they are absent in other species, since in human, hamster, and rat seminal plasma, phosphorylcholine-binding proteins immunologically related to the bovine BSP-A1/A2 and BSP-A3 proteins have been detected [18]. Furthermore, analogous proteins have been purified from stallion [19] and boar seminal plasma [20, 21]. Analysis of genes homologous to the BSP-A1/A2 and BSP-A3 genes in other species will be necessary to confirm this supposed high mutation rate; such a high rate could suggest that these proteins have an important role in reproduction. On the other hand, as mentioned above, one or two amino acid changes could influence bull fertility; then, several differences between species could, for example, contribute to a cross-species barrier in reproduction.

In contrast, the fact that the BSP-30-kDa unique region is more conserved among species could suggest a common role for this domain in the reproduction processes in several species. Among the bovine BSP proteins, BSP-30-kDa is the best mediator of sperm capacitation induced by heparin [15] or HDL [16] on epididymal spermatozoa, and its presence on the sperm membranes corresponds to increased fertility of bulls [34–36]. The common role of this protein in different species could be to accelerate capacitation by increasing lipid modifications in the sperm membrane.

In summary, we have determined the complete sequences of the two cDNAs coding for BSP-A3 and BSP-30-kDa proteins. Two amino acid changes for BSP-A3 and one for BSP-30-kDa were found in the deduced amino acid se-

quences as compared with the previously reported primary sequences. We propose that the amino acid substitutions in BSP-A3 may be due to genetic polymorphism. All BSP proteins are not only synthesized by the seminal vesicles but also produced by the ampullae. We suggest that these proteins are important mostly in reproduction, since their mRNAs are expressed at a high level only by these two accessory sex glands. Finally, we propose that the BSP-analogous proteins in the human, rat, hamster, and rabbit may have numerous amino acid differences, since no homologous genes were detected with the BSP-A1/A2 and BSP-A3 cDNA probes using either high- or low-stringency Southern hybridization conditions. These differences may be important in blocking cross-species fertilization.

REFERENCES

- Manjunath P. Gonadotropin release and 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.
- Manjunath P, Sairam MR. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 1987; 241:685–692.
- Manjunath P, Sairam MR, Uma J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci Rep* 1987; 7:231–238.
- Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, 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.
- 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.
- Calvete JJ, Mann K, Sanz L, Raida M, Töpfer-Petersen E. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett* 1996; 399: 147–152.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gerwig GJ, Calvete JJ, Töpfer-Petersen E, Vliegthart JFG. The structure of the O-linked carbohydrate chain of bovine seminal plasma protein PDC-109 revised by H-NMR spectroscopy. A correction. *FEBS Lett* 1996; 387:99–100.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50:27–37 (Erratum: *Biol Reprod* 1994; 50:977).
- Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids. *J Biol Chem* 1992; 267: 10149–10155.
- Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26:313–318.
- 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.
- 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.
- Thérien I, Soubeyrand S, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod* 1997; 57:1080–1088.
- Thérien 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.

18. 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. *Mol Reprod Dev* 1993; 34:443-449.
19. Calvete JJ, Mann K, Schäfer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Töpfer-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.
20. Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Gabius HJ, Töpfer-Petersen E. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol Reprod Dev* 1993; 35:37-43.
21. Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Töpfer-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.
22. Calvete JJ, Sanz L, Enßlin M, Töpfer-Petersen E. Sperm surface proteins. *Reprod Domest Anim* 1996; 31:101-106.
23. Calvete JJ, Sanz L, Reinert M, Dostálová Z, Töpfer-Petersen E. Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. In: Jamieson BGM, Ausio J, Justine J-L (eds.), *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. *Mem Mus Natl Hist Nat* 1995; 166:515-524.
24. Kemme M, Scheit KH. Cloning and sequence analysis of a cDNA clone from seminal vesicle tissue encoding the precursor of the major protein of bull semen. *DNA* 1988; 7:595-599.
25. Bräuer C, Scheit KH. Characterization of the gene for the bovine seminal vesicle secretory protein SVSP109. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1090:259-260.
26. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.
27. Hecker KH, Roux KH. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques* 1996; 20:478-485.
28. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1991: Chapter 2 pp. 2.2.1-2.2.3 and Chapter 15 pp. 15.7.1-15.7.2.
29. Kozak M. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin *in vivo*. *Nature* 1984; 308:241-246.
30. Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1984; 12:857-872.
31. Lütcke NA, Chow KC, Mickel FS, Moss KA, Kern HF, Scheele GA. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J* 1987; 6:43-48.
32. Watson ME. Compilation of published signal sequences. *Nucleic Acids Res* 1984; 12:5145-5164.
33. Moreau R, Frank PG, Perreault C, Marcel YL, Manjunath P. Seminal plasma choline phospholipid-binding proteins stimulate cellular cholesterol and phospholipid efflux. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1438:38-46.
34. Bellin ME, Hawkins HE, Ax RL. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J Anim Sci* 1994; 72:2441-2448.
35. Bellin ME, Hawkins HE, Oyarzo JN, Vanderboom RJ, Ax RL. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. *J Anim Sci* 1996; 74:173-182.
36. Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Greg Smith R, Forrest DW, Spratt LR, Ax RL. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci* 1998; 76:2032-2039.

- 2.2. **A Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins.** (1999) Ménard, M., Nauc V. and Manjunath, P. Biochemical and Biophysical Research Communications. (sera soumis prochainement)

Préambule:

Une famille de protéines du plasma séminal bovin, les protéines BSP, potentialise la capacitation médiée par l'héparine et les HDL. Des analogues de ces protéines ont été purifiés chez le cheval et le porc, et ont été détectés en faibles concentrations chez d'autres espèces. Afin de confirmer la nature de ces analogues, nous étions intéressés à les purifier. Toutefois, la faible concentration de ces analogues rendant très difficile leur purification, nous avons dû développer une nouvelle méthode de purification utilisant les interactions existant entre la fraction de faible densité du jaune d'oeuf (LDF) et cette famille de protéines. Afin de démontrer la faisabilité de la méthode, nous avons, dans un premier temps, incubé la LDF avec des protéines précipitées à l'alcool issue du plasma séminal de taureau, de porc et de cheval. La LDF et les protéines liées ont par la suite été isolées à nouveau par ultracentrifugation en gradient de KBr avant d'être dialysées, délipidées et lyophilisées. Les protéines BSP et leurs analogues ont finalement été purifiés par chromatographies sur *p*-aminophényl phosphocholine-agarose et gélatine-agarose et analysés sur SDS-PAGE. Ce nouveau protocole nous a permis d'isoler la presque totalité des protéines analogues de taureau, de porc et de cheval. Il nous a aussi permis d'isoler une nouvelle protéine de 12 kDa du plasma séminal de cheval. Son séquençage bien que partiel nous permet d'affirmer qu'il s'agit bien d'un analogue des protéines BSP. Parallèlement, des dosages radioimmunologiques ont montré que 10 mg de la LDF peut lier toutes les protéines BSP présentes dans 120 mg de protéines de plasma séminal bovin. Ces résultats confirment l'efficacité de la méthode et démontrent que ce nouveau protocole peut être utilisé pour la purification de tous les analogues des protéines BSP.

**A NOVEL PURIFICATION METHOD FOR MAMMALIAN SEMINAL
PLASMA PHOSPHOLIPID-BINDING PROTEINS**

Martin Ménard*†, Veronica Nauc†, Claude Lazure§ and Puttaswamy
Manjunath*†‡

*Departments of Medicine and of Biochemistry, Université de Montréal, †Guy-
Bernier Research Center, 5415 boul. de l'Assomption, Montréal, Québec,
Canada, H1T 2M4 and §Neuropeptide Structure and Metabolism Laboratory,
Clinical Research Institute of Montréal, 110 Pine Avenue West, Montreal,
Quebec, Canada, H2W 1R7

Key words: capacitation, egg yolk, seminal plasma phospholipid-binding
proteins, purification, bull, boar, stallion.

‡To whom correspondence should be addressed:

P. Manjunath, Ph.D.
Guy-Bernier Research Center
5415 boul. de l'Assomption
Montréal, Québec, Canada H1T 2M4

Tel.: (514) 252-3562
Fax: (514) 252-3430
Email: manjunap@ere.umontreal.ca

Short title: A novel purification method for seminal phospholipid-binding proteins

ABSTRACT

A family of bull seminal plasma (BSP) phospholipids-binding proteins (BSP proteins), potentiate heparin- and HDL-induced capacitation. The analogous proteins have been purified from stallion and boar seminal plasma, and detected in low concentrations in other mammalian seminal plasma. In this study, we developed a new isolation method for mammalian seminal plasma phospholipids-binding proteins wherein they are present in low concentrations. The method is based on the interaction of this family of proteins with egg yolk low-density fraction (LDF). In order to demonstrate the feasibility of the method, we incubated LDF with alcohol precipitates of bull, boar and stallion seminal plasma. LDF were re-isolated by ultracentrifugation on KBr along with bound proteins. LDF with associated proteins were dialyzed, lyophilized and delipidated. BSP analogous proteins were finally purified by *p*-aminophenyl phosphorylcholine-Agarose and gelatin-Agarose chromatographies, and analyzed by SDS-PAGE. With this new protocol, phospholipid-binding proteins of bull, boar and stallion seminal plasma were recovered almost 100%. A new 12 kDa stallion seminal plasma protein of the same family was also isolated and partially sequenced. The radio-immunoassay data showed that 10 mg of LDF can bind all BSP proteins present in 120 mg of alcohol precipitated bull seminal plasma proteins. These results confirm the efficiency of the method and that the LDF step could be used for the purification of all BSP proteins analogs from different mammalian species.

INTRODUCTION

Freshly ejaculated mammalian spermatozoa are not able to fertilize the egg. To acquire this ability, the spermatozoa have to undergo a series of physiological and functional modifications designated capacitation [1-4]. This process is characterized biochemically by a decrease in the membrane cholesterol/phospholipid ratio, by an increase in Ca^{++} ions membrane permeability and by a change in internal pH, and physiologically, by an hyperactivation of the spermatozoa motility and an increase in spermatozoa responsiveness to acrosome reaction inducers, namely, zona pellucida or progesterone [4-14]. This phenomenon prepares the spermatozoa to the acrosome reaction that involves the fusion of the external acrosomal membrane with the plasma membrane and in the liberation of lytic enzymes [4, 15, 16]. These enzymes hydrolyze the egg surrounding matrix and permit the penetration and the fusion of the spermatozoa with the egg [4, 17, 18].

The capacitation occurs in the female genital tract and is induced by factors present in follicular and oviductal fluids. These factors, the high-density lipoproteins (HDL) and the heparin-like glycoaminoglycans (GAGs), are the principal factors that influence capacitation in bull spermatozoa [19-21]. Our studies show that these capacitating factors induce capacitation by different mechanism [22]. In fact, the HDL induces cholesterol efflux from spermatozoa membrane causing membrane destabilization that results in capacitation [23, 24]. Whereas, heparin interacts with binding sites on the spermatozoa surface and generate a series of molecular reactions that are characterized by an augmentation of intracellular Ca^{++} , an higher cAMP synthesis and the phosphorylation of spermatozoa proteins [10, 22, 25-28]. In each case, incubation with seminal plasma prior to addition of capacitating factors accelerates the capacitation [29, 30]. A family of proteins present in bull seminal plasma plays an important role in this phenomenon [22-25].

A family of four phospholipid-binding proteins designated BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 and BSP-30-kDa; collectively called BSP proteins constitute the major protein fraction in the bull seminal plasma [31-35]. These BSP proteins bind to choline

phospholipids on spermatozoa surface [36]. The BSP proteins interact with heparin [37] and HDL [34, 38]. Our studies also show that the BSP proteins potentiate heparin- and HDL-induced capacitation and indicate that these proteins facilitate the interaction between these capacitating factors and the spermatozoa membrane components [22-25].

The radioimmunoassay and immunoblotting experiments using polyclonal antibodies against BSP proteins show that analogs of these proteins are present in hamster, rat, mouse, boar and human seminal vesicles fluid or seminal plasma [33, 39]. Recently, HSP-1 and HSP-2, two BSP protein analogs from the stallion seminal plasma, and pB1, the boar analog, have been purified [40, 41]. HSP-1, HSP-2 and pB1 show phosphorylcholine, heparin and gelatin binding properties [40, 41], that were first reported with BSP proteins [32, 36, 37]. All the members of this family of proteins contain type II domains that seem to be responsible for these binding properties and their primary structure show 50-65 % homology [33, 40-43].

The role of BSP analogs or BSP-like proteins in other mammalian species in capacitation has not been documented, because sufficient quantities of these proteins are not available. In order to purify large quantities of these proteins we attempted in preliminary studies to use affinity matrices such as *p*-aminophenylphosphorylcholine-, gelatin- and/or heparin-Agarose. These methods did not give us enough material to continue the purification. Since these proteins are in very low concentration in some mammalian seminal fluids we attempted in this study to develop a new method to enrich the initial amount of seminal phospholipid-binding protein for further purification.

Our previous studies have shown that the BSP proteins bind to egg yolk low-density fraction (LDF) and BSP-LDF complex could be isolated by ultracentrifugation on KBr gradient [unpublished results]. We took advantage of this and developed a new isolation method for BSP proteins. We also used this method to isolate BSP analogs in boar and stallion seminal plasma to establish the feasibility of the technique.

MATERIALS AND METHODS

Materials

p-aminophenyl phosphorylcholine-Agarose matrix was purchased from Pierce Chemical Co. (Oakville, Ontario, Canada). Gelatin (purified from calf skin) was obtained from Eastman Kodak Company (Rochester, NY, USA). Affi-Gel 15 (N-hydroxysuccinimide of a derivatized crosslinked Agarose gel bead support) was from Bio-Rad Laboratories Ltd (Mississauga, Ontario, Canada). The coupling of gelatin to Agarose was carried out as previously described [32]. Bovine serum albumin (BSA, fraction V) and lactoperoxidase were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Na¹²⁵I was from Amersham Corp. (Oakville, Ontario, Canada). PVDF membranes (Immobilon P) were obtained from Millipore (Mississauga, Ontario, Canada). Choline phospholipids assay kit was purchased from Boehringer Mannheim (Laval, PQ, Canada). Antibodies against BSP proteins were raised and characterized as previously described [31, 37]. All other chemicals used were of analytical grade and were obtained from commercial suppliers.

Freshly ejaculated Holstein bull semen collected with an artificial vagina was obtained from the Centre d'Insémination Artificielle du Québec (St-Hyacinthe, PQ, Canada). Boar semen was obtained from F. Ménard Inc (St-Pie-de-Bagotte, PQ, Canada). Stallion semen was obtained from Cooperative des Inséminateurs du Québec (St-Hyacinthe, PQ, Canada). The semen samples were centrifuged at 1,000 x g for 10 minutes to remove spermatozoa from the seminal plasma. The supernatant was centrifuged at 10,000 x g for 10 minutes to remove any particles from the seminal plasma. The seminal plasma proteins were precipitated by adding 9 volumes of 95% cold ethanol with gently stirring for 2 hours at 4°C. The protein precipitates were centrifuged at 10,000 x g for 10 minutes and washed three times with ethanol. The proteins were finally resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized. These fractions are designated crude seminal fractions.

Egg yolk low-density fraction isolation

The egg yolk was diluted in 9 volumes of Tris-HCl, pH 7.2. The solution density was adjusted to 1.21 g/ml with potassium bromide (KBr). The solution was subjected to ultracentrifugation at 400,000 x g, 20 hours at 18°C. The upper phase containing the Low-density fraction (LDF) was retrieved and dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS; 50 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.2).

Crude seminal fractions and LDF incubation

The alcohol precipitates of seminal plasma were solubilized in PBS, centrifuged to separate any insoluble material and incubated with 10 mg of LDF for 30 min at room temperature. LDF along with bound proteins was reisolated on KBr gradient (1.21 g/ml) as described before. The upper fraction was retrieved and dialyzed against 50 mM phosphate buffer. These proteins were then delipidated with 2 volumes of n-butanol/isopropylether (15:85) [44]. The upper phase was discarded. The lower phase was dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized. This fraction was delipidated second time using cold methanol-chloroform method [44]. The precipitated proteins were collected by centrifugation, dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized. The choline phospholipid content was determined using the colorimetric enzymatic kit to follow the efficiency of the delipidation.

PPC-Agarose chromatography

The delipidated proteins were solubilized in PBS and centrifuged at 10,000 x g for 10 min to remove any precipitate. The supernatants were then applied on a PPC-Agarose column equilibrated with PBS buffer. The protein solution was recirculated on the column for 2 h to maximize the interaction between the proteins and the affinity matrix. The unbound material was washed out with PBS, and the adsorbed proteins were eluted with 50 mM phosphate buffer containing 150 mM choline and 7 M urea.

The adsorbed and unadsorbed fractions were dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized.

Gelatin-Agarose chromatography

The lyophilized PPC-Agarose adsorbed proteins were solubilized in PBS buffer and centrifuged at 10,000 x g for 10 min to remove any insoluble material. The protein preparations were then applied on a gelatin-Agarose column previously equilibrated with PBS. The protein solution was recirculated on the column for 2 h to maximize the interaction between the proteins and the affinity matrix. The unbound material was washed with PBS, and the adsorbed proteins were eluted with 50 mM phosphate buffer containing 7 M urea. The adsorbed and unadsorbed fractions were dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized.

Radio-Immunoassay

The radio-immunoassay (RIA) for each BSP protein was performed as described previously [33]. All reagents for RIA were diluted in the immunoassay buffer (50 mM PB pH 7.4, containing 5 mM EDTA, 0.45% NaCl, 0.25 mg/ml sodium azide, 0.5 ml/l Tween-20 and 0.1% BSA). The primary antibodies were used in following dilution; 1:1,000 for anti-BSP-A1/-A2 and anti-BSP-30 kDa, and 1:10,000 for anti-BSP-A3. After overnight incubation (~20 h), 50 µl of secondary antibodies (10% Goat anti-RGG) was added, followed by another incubation for 12-16 h. All tubes except total counts were centrifuged at 2,200 x g for 15 min. The supernatant was aspirated and the radioactivity associated with the pellet was determined in a gamma-ray scintillation counter (1272 CliniGamma, Pharmacia Wallac, Finland).

Protein sequencing

For sequencing, the purified proteins were subjected to SDS-PAGE and electrotransferred to PVDF. After staining with Ponceau Red, the protein bands were cut out and sliced in small pieces and then introduced into the sequenator carriage underneath a TFA-treated glass fiber filter to which 30 µl of Polybrene solution (1.5

mg/ml in 50 mM NaCl) was added. Sequencing was initiated by carrying out a double coupling step and performed using an Applied Biosystems gas-phase sequencer (Model 470A updated to 475A specifications) directly coupled to an Applied Biosystems PTH-analyser (Model 120A) as previously reported using N-methylpiperidine as coupling base [45].

Electrophoresis

SDS-PAGE in 15% gel was performed according to Laemmli (1970) using a Bio-Rad Protein II vertical slab gel electrophoresis apparatus [46]. After electrophoresis, gels were stained in Coomassie brilliant blue R-250. The apparent molecular weights (M_r) were determined with the low-molecular-weight calibration kit of Pharmacia (Dorval, Quebec).

Protein determination

The protein content of each purification step was measured by Lowry method [47] or by weighing on a Cahn microbalance (Model C-31, Fisher Scientific, Fairlawn, NJ).

RESULTS

In order to prove that the BSP proteins and the BSP analogs can be isolated using LDF affinity for these proteins, we proceeded in two steps. In the first step, we isolated BSP proteins using ultracentrifugation and quantified the recovered proteins by RIA. In the second step, we verified whether or not it is possible to purify these proteins and their analogs on chromatography columns without losing any binding affinity for the matrices.

Purification of bull seminal phospholipid-binding proteins

As described in the Materials and Methods section, alcohol precipitated proteins of bull seminal plasma were incubated with 10 mg of LDF and subjected to ultracentrifugation in KBr solution (density, 1.21 g/ml). This manipulation resulted in the appearance of two phases. The upper phase contained all the LDF. After the delipidation, we determined by radioimmunoassay the quantity of BSP proteins present in each phases.

For a small quantity of alcohol precipitated proteins (1.6 mg), most of the BSP proteins (>98 %) were recovered in the upper phase or LDF fraction (Table I). On the other hand control experiments without LDF showed that all the BSP proteins were in the lower phase (data not shown). In order to find out how much BSP proteins can be isolated using 10 mg of LDF, we used a huge quantity of alcohol precipitated proteins (200 mg). As shown in Table I, almost 60% of BSP proteins were recovered in the upper phase. The LDF binding sites being probably saturated, the BSP proteins present in the lower phase may be considered as proteins that have not been able to bind LDF. It is also interesting to note that each BSP proteins seem to have the same affinity for LDF fraction since they have almost the same percentage of separation.

SDS-PAGE (Fig. 1C) confirmed the presence of a large amount of BSP proteins in the upper phase (lane 4). This fraction contained a mixture of LDF proteins (lane 3) and some alcohol precipitated seminal plasma components (lane 2).

1 mg of delipidated upper phase proteins were dissolved in PBS and loaded on a PPC-Agarose column. A very small proportion of these proteins did not bind to the matrix (Fig. 1A, first peak). The adsorbed proteins were eluted with a 150 mM choline-7 M urea buffer (second peak), were dialyzed and lyophilized. SDS-PAGE analysis (Fig. 1C) of the PPC-Agarose adsorbed fraction shows the presence of BSP proteins. Some BSP proteins were also recovered in the unadsorbed fraction.

The PPC-Agarose-adsorbed proteins were then loaded on a gelatin-Agarose column (Fig. 1B). Once again, a very small amount of these proteins remains unadsorbed (first peak) and the majority of proteins bound to the gelatin-Agarose matrix (second peak). Figure 1C shows that these adsorbed proteins are the BSP proteins and all the other contaminated proteins were eliminated by this chromatography.

Purification of Boar phospholipid-binding proteins

The same method used for BSP protein purification was applied on boar seminal plasma proteins. 500 mg of alcohol precipitated proteins of boar seminal plasma were incubated with 1 mg of LDF. This ratio was used based on preliminary studies that indicated that boar seminal plasma contains very small quantities of BSP analogs. The upper phase containing LDF was recovered, delipidated and was loaded on PPC-Agarose column. Figure 2A shows that unlike the BSP purification, the majority of boar seminal proteins present in the upper phase did not bind to the PPC-Agarose (peak 1). The analysis of the adsorbed fraction by SDS-PAGE indicated that only three major seminal plasma proteins bind to the affinity column. The gelatin-Agarose chromatography of these PPC-adsorbed proteins (Fig. 2B) gave us only one 15 kDa band (Fig. 2C). The N-terminal sequencing confirmed that this band is the pB1 protein (Table II).

Purification of stallion phospholipid binding proteins

We used 15 mg of alcohol precipitated proteins. After isolation of LDF by ultracentrifugation in KBr solution (density, 1.21 g/ml), the upper phase was delipidated and analyzed by SDS-PAGE. Figure 3C shows in this fraction (lane 4) the presence of

22 kDa, 17 kDa, 16 kDa and 12 kDa proteins of stallion seminal plasma and some LDF protein components. It is interesting to note that some proteins present in the alcohol precipitate fraction are completely absent in the upper phase.

This upper phase was loaded on PPC-Agarose column. As shown in Fig. 3A, most of the proteins loaded on the column were adsorbed (peak 2). On SDS-PAGE, five proteins remain in this fraction. We also observe an increase in 28 kDa protein concentration and a decrease in the other proteins. Finally, these adsorbed proteins were applied on a gelatin-Agarose column. The elution pattern shows a large proportion of the proteins was adsorbed on the column (Fig. 3B). When we analyzed the adsorbed fraction by SDS-PAGE, four proteins remain (22 kDa, 17 kDa, 16 kDa and 12 kDa proteins). The N-terminal sequencing of these bands confirm that the 22 kDa and the 17 kDa proteins are HSP-1 and the 16 kDa is HSP-2 (Table II). N-terminal sequence analysis of the 12 kDa protein indicated that it is a new sequence but belongs to the same BSP family phospholipid-binding proteins (Table II). This new protein contained three unidentified residues (X at positions 8, 19, 33) that probably corresponds to cystein residues (positions 19 and 33) or to glycosilated serine/threonine residues (position 8). This new protein confirms the efficiency of the method.

DISCUSSION

BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 and BSP-30-kDa (BSP proteins) represent a family of closely related phospholipid-binding proteins of the bull seminal fluid. These proteins originate from seminal vesicles bind to spermatozoa surface at ejaculation and play an important role in bull spermatozoa capacitation. Analogs of these proteins have been purified from stallion (HSP-1 and HSP-2) and boar (pB1) seminal plasma but their role in capacitation remains unknown. Radioimmunoassays and immunodetection analysis using antibodies against BSP proteins showed that these proteins could be present in hamster, rat, mouse, boar and human [39]. As capacitation process is not well characterized in these species it would be interesting to isolate these proteins and characterize them. These proteins are present in a much lower concentration in stallion or boar seminal fluids than in bull seminal fluid. Our preliminary studies with boar seminal plasma using affinity columns such as PPC-Agarose, gelatin-Agarose, heparine-Sepharose or diethyl-aminoethyl (DEAE)-Sepharose did not give us enough material to continue the purification. DEAE moiety is a pseudocholine group and BSP proteins bind to this group by affinity rather than by ionic interaction [48]. Furthermore, several proteins other than phospholipid-binding proteins also bound to affinity columns. Moreover, BSP family proteins form aggregates by self-association [31, 33] or by interacting with other proteins [40, 41]. They also bind to phospholipids present in the seminal fluids [36]. In view of this, purification by affinity columns gives variable results. In addition, covalently bound carbohydrate in some BSP proteins/analogs also appears to influence interaction with affinity columns [40, 41]. Therefore, in this study, we developed a new isolation method with which we were able to enrich the initial amount of BSP analogs using their binding affinity for the egg yolk lipoproteins.

Our previous studies showed that the BSP proteins bind to lipoprotein components of hen egg yolk [unpublished results]. Egg yolk contains only low-density lipoprotein and is generally called low-density fraction or LDF. Since LDF can be easily isolated by ultracentrifugation on KBr solution, we developed a novel isolation

method taking advantage of BSP protein binding to LDF. The principal advantage of this new method is larger amounts of starting material could be used to enrich more efficiently low concentration BSP analogs in seminal plasma.

The first step of this study was to prove that BSP proteins could be efficiently isolated by this new method. If the isolation works well, all the BSP proteins, after ultracentrifugation, must be associated with the LDF in the upper phase. With moderate quantity of alcohol precipitated proteins, radioimmunoassay of each phases showed that > 98% of all BSP proteins were recovered in the upper phase (LDF). A small amount (< 2%) of BSP proteins that we found in the lower phase is probably due to the difficulty to recover all the LDF. Interestingly, each BSP protein seems to have the same affinity for the LDF since we do not find any significant differences between their percent separation. These results indicate that it is possible to use this new method with a moderate quantity of alcohol precipitated proteins without loosing any BSP proteins. Furthermore, even if other seminal plasma proteins bind LDF (Fig.1C) they do not seem to interfere with the BSP proteins binding.

By using an excess amount of alcohol precipitated proteins we showed that LDF could bind a very large quantity of BSP proteins. In fact, with 10 mg of LDF we were able to isolate almost 60% of all BSP proteins present in 200 mg of alcohol precipitated proteins (Table I). This means, 10 mg of LDF can bind efficiently all the BSP proteins present in 120 mg of alcohol precipitated bull seminal proteins. Since 60-65% of the total protein in alcohol precipitated seminal plasma constitute BSP proteins [33], 10 mg of LDF binds approximately 75 mg of BSP proteins. Furthermore, all BSP proteins have the same affinity for the LDF since even at saturated condition all BSP proteins bind in the same ratio (~60%). This property is important for further purification because it will permit us to isolate all the BSP proteins.

After establishing that BSP proteins could be efficiently isolated by the LDF method, we proceeded to verify whether or not these proteins conserved their binding properties. For this purpose we used two affinity matrices, PPC-Agarose and gelatin-Agarose. SDS-PAGE analysis of various fractions of purification confirmed that the

BSP proteins isolated by LDF method followed by delipidation still bound to affinity matrices (Fig. 1C). Therefore, BSP proteins conserve their binding properties and the proteins purified by this method could be used for physiological studies. It is important to note that the upper phase proteins have to be completely delipidated. In preliminary studies, we have found that even a small amount of choline phospholipids can inhibit the interaction between the BSP proteins and PPC-Agarose. Despite two delipidation methods a small amount of choline phospholipid still remained associated with proteins. This may explain the presence of some BSP proteins in the PPC-unadsorbed fractions (Fig. 1C).

After confirming that BSP proteins could be purified using this new protocol, this method was applied for the purification of all BSP protein analogs from boar and the stallion that are known to express these proteins. The pB1 protein (BSP analog of boar) was successfully purified using this new method (Fig. 2C). Some interesting observations were noted. Contrary to BSP proteins, a large amount of boar seminal proteins that are not BSP analogs were also isolated by the LDF method (Fig. 2C). Apparently these proteins have affinities for LDF but not for PPC-Agarose, since only three seminal plasma proteins bound to this matrix (Fig. 2A and 2C). These proteins do not seem to compete with pB1 for the same binding sites on LDF. Finally, the sequence of the affinity columns permit us to eliminate spermadhesin (AQN-1) that normally form an oligomeric complex with pB1 that bind PPC-Agarose column [41], but do not seem to be necessary for the binding with the gelatin-Agarose matrix.

The stallion analogs, HSP-1 and HSP-2, were also isolated by the current method (Fig. 3C). HSP-1 protein that we isolated has M_r 22 kDa and 17 kDa. Calvete et al [40] have reported an apparent M_r of 28 kDa and 22 kDa for this protein. The 28 kDa and 22 kDa proteins are the same HSP-1 protein with different degree of glycosylation. HSP-2 was also purified by our method and its M_r evaluated by SDS-PAGE (16 kDa) also differs from that reported (25 kDa) by Calvete et al. [40]. Calvete et al, [40] reported that aggregation and/or degree of glycosylation of HSP-1 influence heparin binding. However, neither aggregation nor glycosylation of HSP-1/HSP-2 has

any effect on LDF binding as all HSP-1/HSP-2 protein could be isolated from our method.

In addition, to isolating two known stallion phospholipid-binding proteins (HSP-1 and HSP-2), we isolated a new 12 kDa (HSP-12 kDa) protein that belongs to BSP family of proteins. The isolation of this new BSP analog of stallion seminal plasma using LDF method confirms the efficiency of this technique. HSP-12 kDa protein not only binds to LDF but also to PPC-Agarose and gelatin-Agarose. The HSP-12-kDa N-terminal amino acid sequence shares high similarity with the other seminal plasma phospholipid-binding proteins, notably in CVFPF and FDCT regions (Table II). These sequences are highly conserved regions among this family of protein since they take an important part in the formation of type-II domains of these proteins. The type-II domains found in pairs in these proteins may be responsible for the binding to LDF, gelatin, heparin, and phospholipids.

The new method is efficient since we could isolate all BSP family proteins from bull (BSP-A1/-A2, BSP-A3 and BSP-30-kDa), stallion (HSP-1, HSP-2 and HSP-12 kDa), and boar (pB1) seminal plasma. The method is applicable to sources that contain large concentrations of BSP family proteins such as in bull seminal plasma or sources that contain very small concentrations such as in boar seminal fluid. LDF affinity seems to be a general property of the BSP family proteins. Furthermore, BSP family proteins that are isolated by LDF method still retained binding affinity for PPC-Agarose and gelatin-Agarose. Since LDF has high capacity for BSP proteins binding, inclusion of the LDF step will permit us to use a larger quantity of seminal plasma proteins and aid to enrich BSP analogs at the beginning of the purification, and will reduce substantially the quantity of proteins applied on affinity columns. This new method will permit us to verify the presence of BSP analogs in other species and help us to determine the role of these proteins in capacitation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funds from the Medical Research of Canada (MT-13194 to P.M. and MT-14766 to C.L.).

REFERENCES

1. Chang MC. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in Fallopian tubes. *Nature* **68**, 997-998.
2. Austin CR. (1951) Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res.* **4**, 581-596.
3. Austin CR. (1952) The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* **170**, 326.
4. Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. New York: Raven Press. 189-317.
5. Go KJ Wolf DP. (1983) The role of sterols in sperm capacitation. *Adv Lipid Res.* **20**, 317-330.
6. Meizel S. (1985) Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat.* **174**, 285-302.
7. Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. (1985) Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat.* **174**, 269-283.
8. Langlais J, Roberts KD. (1985) A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* **12**, 183-224.
9. Handrow RR, First NL, Parrish JJ. (1989) Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool.* **252**, 174-182.

10. Parrish JJ, Vrendenburgh WL, Lavin CA. (1993) Increases in bovine sperm intracellular calcium (Cai) and pH (pHi) during capacitation. *Biol Reprod.* **48** (suppl 1), 106.
11. Parks JE, Ehrenwald E. (1990) Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. In: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS (eds.), *Fertilization in Mammals*. Norwell, MA. 155-167.
12. Florman HM, Babcock DF. (1991) Progress toward understanding the molecular basis of capacitation. In: Wassarman PM (eds.), *Elements of Mammalian Fertilization*. Boca Raton, FL: CRC Press. 105-132.
13. Kopf GS, Gerton GL. (1991) The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: Wassarman PM (eds.), *Element of Mammalian Fertilization*. Boca Raton, FL: CRC Press. 153-203.
14. Ward CR, Storey BT. (1984) Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol.* **104**, 287-296.
15. Wassarman PM. (1987) Early events in mammalian fertilization. *Ann Rev Cell Biol.* **3**, 109-142.
16. Zaneveld LJD, DeJonge CJ. (1991) Mammalian sperm acrosomal enzymes and the acrosome reaction. In: Dunbar BS, O'Rand MG eds. *A comparative Overview of Mammalian fertilization*, New York: Plenum Press. 63-79.
17. Yanagimachi R. (1981) Mechanisms of fertilization in mammals. In Mastroianni L, Biggers JD, (eds). *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. New York: Plenum Press. 81-187.
18. Yanagimachi R. (1988) Sperm-egg fusion. In Duzgunes N, Bronner F, eds. *Current Topics in Membranes and Transport*, Vol. 32. San Diego: Academic Press. 3-43.

19. Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL. (1982) Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* **106:4**, 1092-1098.
20. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. (1989) Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod.* **40**, 1020-1025.
21. Langlais J, Kan FWK, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD. (1988) Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res.* **20**, 185-201.
22. Lane ME, Thérien I, Moreau R, Manjunath P. (1999) Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol Reprod.* **60**, 169-175.
23. Thérien I, Soubeyrand S, Manjunath P. (1997) Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod.* **57**, 1080-1088.
24. Thérien I, Moreau R, Manjunath P. (1998) Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* **59**, 768-776.
25. Thérien I, Bleau G, Manjunath P. (1995) Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of by heparin. *Biol Reprod.* **52**, 1372-1379.
26. Handrow RR, First NL, Parrish JJ. (1989) Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J. Exp. Zool.* **252**, 174-182.
27. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Uguz C, First NL. (1994) Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid *Biol Reprod.* **51**, 1099-1108.

28. Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. (1997) Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod.* **56**, 707-719.
29. Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. (1985) Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reaction in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res* **12**, 345-355.
30. Miller DJ, Winer MA, Ax RL (1990) Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* **42**, 899-915.
31. Manjunath P, Sairam MR (1987) Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* **241**, 685-692.
32. Manjunath P, Sairam MR, Uma J (1987) Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci Rep.* **7**, 231-238.
33. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chrétien M and Chapdelaine A (1988). Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems* (McKerns, K.W. and Chrétien, M., eds) pp. 259-273, Plenum Publishing Corp., New York.
34. Manjunath P. (1984) 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. 49-61.

35. Desnoyers L, Therien I, Manjunath P. (1994) Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* **37**, 425-435.
36. Desnoyers L, Manjunath P. (1992) Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* **267**, 10149-10155.
37. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. (1990) Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* **26**, 313-318.
38. Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A. (1989) Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem.* **264**, 16853-16857.
39. Leblond E, Desnoyers L, Manjunath P. (1993) Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* **34**, 443-449.
40. Calvete JJ, Mann K, Schäfer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Töpfer-Petersen E. (1995) 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.* **310**, 615-622.
41. Calvete JJ, Raida M, Grentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E. (1997) Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS.* **407**, 201-206.
42. Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, Chrétien M. (1987) Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. *Biochem J.* **243**, 195-203.

43. Salois D, Ménard M, Paquette Y, Manjunath, P. (1999) Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and 30-kDa: phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. *Biol Reprod.* 61, 288-297.
44. Mills G.L, Lane PA, Weech PK. (1984) A guidebook to lipoprotein technique. Burdon, R.H. and Knippenberg, P.H. eds. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology.* vol. 14. Elsevier. New York. 460-471.
- 45 Basak A, Boudreault A, Chen A, Chrétien M, Seidah NG, Lazure C (1995) Application of the multiple antigenic peptides (MAP) strategy to the production of prohormone convertases antibodies: synthesis, characterization and use of 8-branched immunogenic peptides. *J Peptide Sci.* 1, 385-395.
- 46 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 47 Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87, 206-210.
- 48 Desnoyers L, Manjunath P (1993) Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices. *Arch Biochem Biophys.* 305, 341-349

Table I. Distribution (%) of BSP proteins between upper (LDF) and lower phase as determined by radioimmunoassay

Quantity of alcohol precipitated proteins incubated with LDF		BSP-A1/A2	BSP-A3	BSP-30-kDa
1.6 mg	upper phase	98.9	99.5	97.4
	lower phase	1.1	0.5	2.6
200 mg	upper phase	59.6	58.7	54.1
	lower phase	40.4	41.3	45.9

Table II : Comparison of amino-terminal sequences of the purified proteins with various seminal plasma proteins.

Boar seminal plasma proteins	
15 kDa protein pB1	DQHLPGRFLTPAITSDDKXVF DQHLPGRFLXPAITSDDKCVFFFIY
Stallion seminal plasma proteins	
22 kDa protein HSP-1	DLQTTGADHSATVNP DLQTTGADHSATVNP
17 kDa protein HSP-1	DLQTTGADHSATVNP DLQTTGADHSATVNP
16 kDa protein HSP-2	DQQPIATDHSPXRKPDNKXVFPFNY DXQPIAXDXSPXXKPDXKCFPFXY
12 kDa protein HSP-1 HSP-2 pB1 (boar) BSP-A1/A2 (bull) BSP-A3 (bull) BSP-30-kDa (bull)	VRHLIETXHFAEMKTDNQXVFPFDYSGKRYFDXTK DQQLIMTKHSATVTPENKCVFPFNRYRGYRYDCTR DQQPIATDHSPXRKPDNKXVFPFNY DQHLPGRFLXPAITSDDKCVFFFIYKGNLYFDCTL VSTEPTQDGAELPEDEECVFPFVYRNRKHFDCV PKEKKDPASGAETK-DNKCVFFFIYGNKKYFDCTL PSLLSKANDLNAVFE GPACAFPFITYKGKKY YMCT

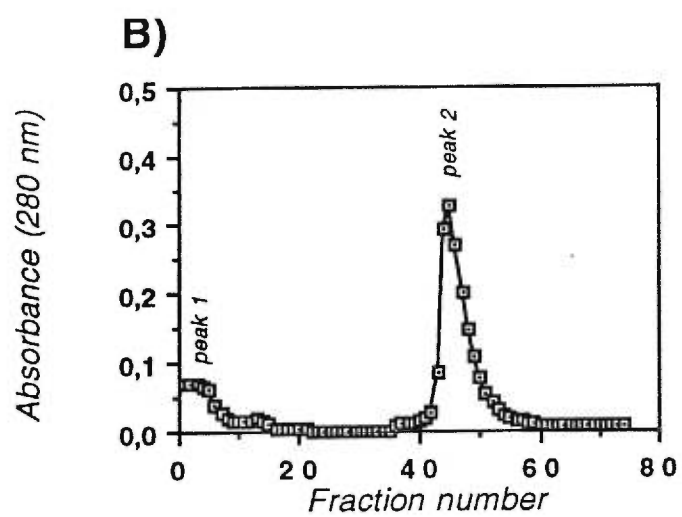
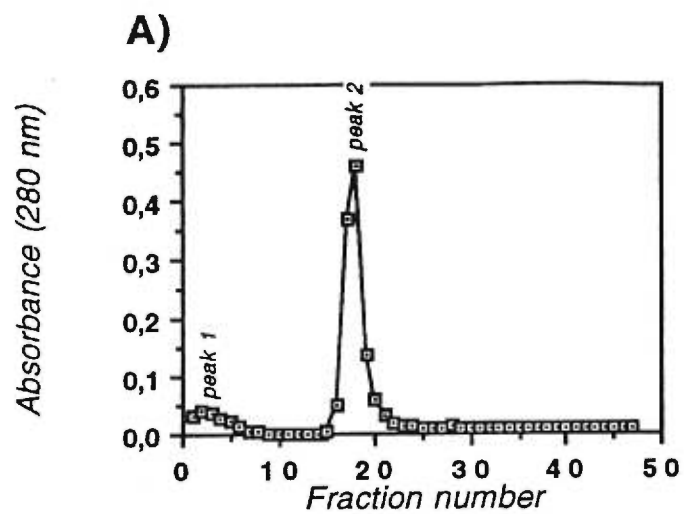
FIGURES

Figure 1. Purification patterns of bull seminal proteins purified by affinity chromatographies and SDS-PAGE analysis. (A) One mg of delipidated upper phase proteins were solubilized in PBS and applied on PPC-Agarose column. After washing, the elution of adsorbed proteins was achieved with 50 mM phosphate buffer containing 150 mM choline and 7 M urea. (B) PPC-Agarose adsorbed proteins solubilized in PBS were loaded on gelatin-Agarose column. After washing, the adsorbed proteins were eluted with 50 mM phosphate buffer containing 7 M urea. One ml fractions were collected at a flow of 30ml/h. (C) Each sample recovered during the purification were analyzed by SDS-PAGE. Low molecular weight standards (lane 1; they are from the top to the bottom, phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor and α -lactalbumin), alcohol precipitated bull seminal proteins (lane 2), LDF proteins (lane 3), upper phase proteins (lane 4), PPC-Agarose adsorbed proteins (lane 5), PPC-Agarose unadsorbed proteins (lane 6), gelatin-Agarose adsorbed proteins (lane 7), and gelatin-Agarose unadsorbed proteins (lane 8).

Figure 2. Purification patterns of boar seminal proteins purified by affinity chromatographies and SDS-PAGE analysis. (A) Delipidated upper phase proteins were solubilized in PBS and applied on PPC-Agarose column. After washing, the elution of adsorbed proteins was achieved with 50 mM phosphate buffer containing 150 mM choline and 7 M urea. (B) PPC-Agarose adsorbed proteins solubilized in PBS were loaded on gelatin-Agarose column. After washing, the adsorbed proteins were eluted with 50 mM phosphate buffer containing 7 M urea. One ml fractions were collected at a flow of 30 ml/h. (C) Each sample recovered during the purification was analyzed by SDS-PAGE. Low molecular weight standards (lane 1; they are from the top to the bottom, phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor and α -lactalbumin), LDF proteins (lane 2), alcohol precipitated boar seminal plasma proteins (lane 3), upper phase

proteins (lane 4), PPC-Agarose adsorbed proteins (lane 5) and gelatin-Agarose adsorbed proteins (lane 6).

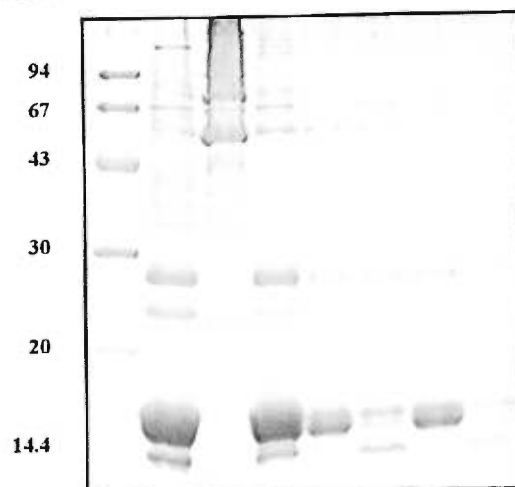
Figure 3. Purification patterns of stallion seminal proteins purified by affinity chromatographies and SDS-PAGE analysis. (A) Delipidated upper phase proteins were solubilized in PBS and applied on PPC-Agarose column. After washing, the elution of adsorbed proteins was achieved with 50 mM phosphate buffer containing 150 mM choline and 7 M urea. (B) PPC-Agarose adsorbed proteins solubilized in saline buffer were loaded on gelatin-Agarose column. After washing, the adsorbed proteins were eluted with 50 mM phosphate buffer containing 7 M urea. One ml fractions were collected at a flow of 30 ml/h. (C) Each sample recovered during the purification was analyzed by SDS-PAGE. Low molecular weight standards (lane 1; they are from the top to the bottom, phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor and α -lactalbumin), LDF proteins (lane 2), alcohol precipitated proteins (lane 3), upper phase proteins (lane 4), PPC-Agarose adsorbed proteins (lane 5) and gelatin-Agarose adsorbed proteins (lane 6).

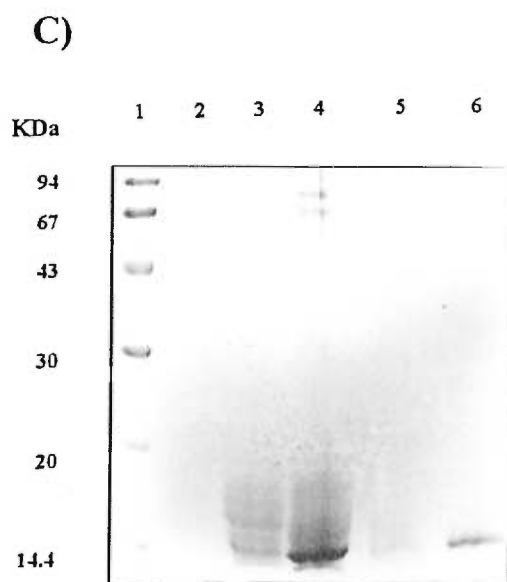
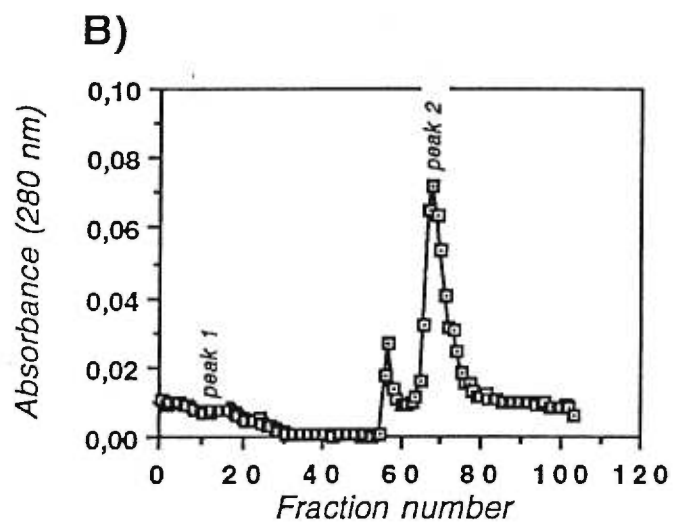
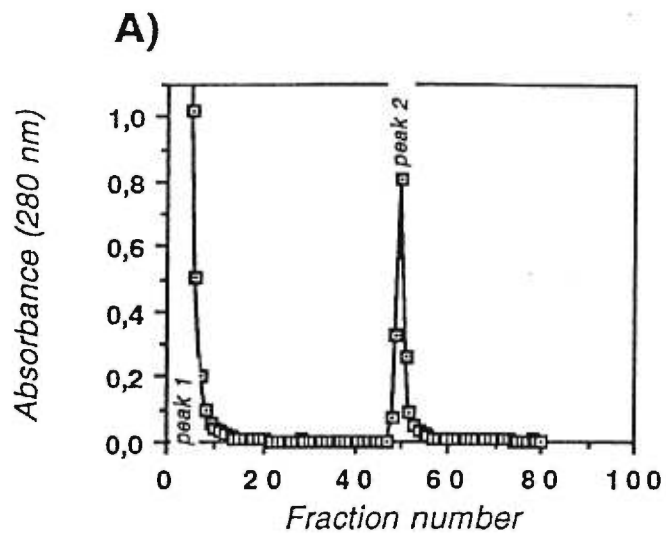


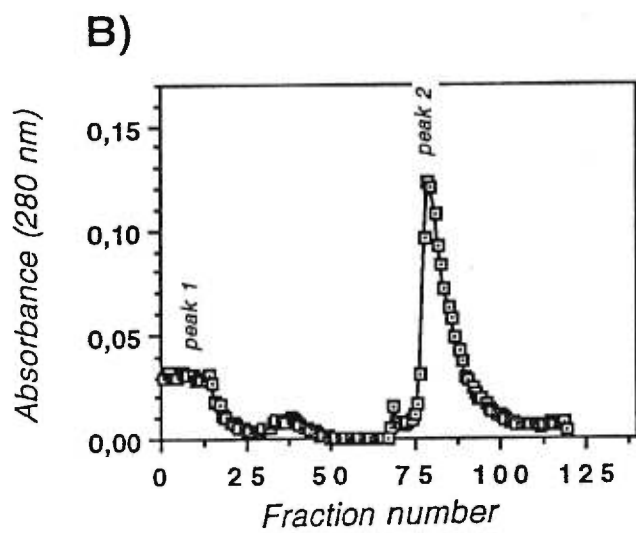
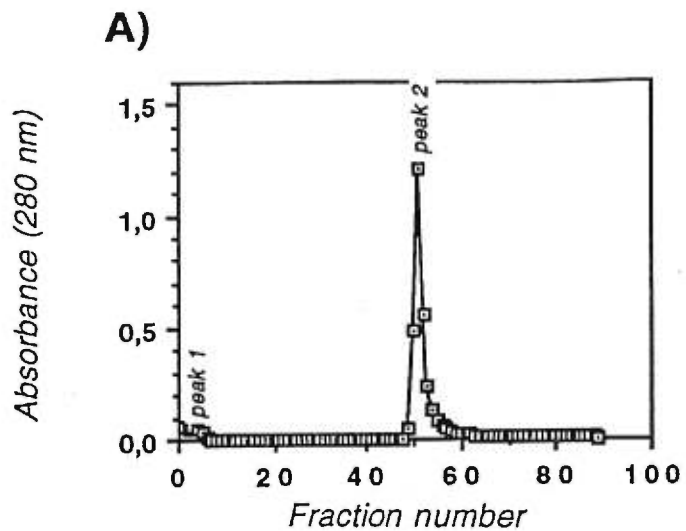
C)

KDa

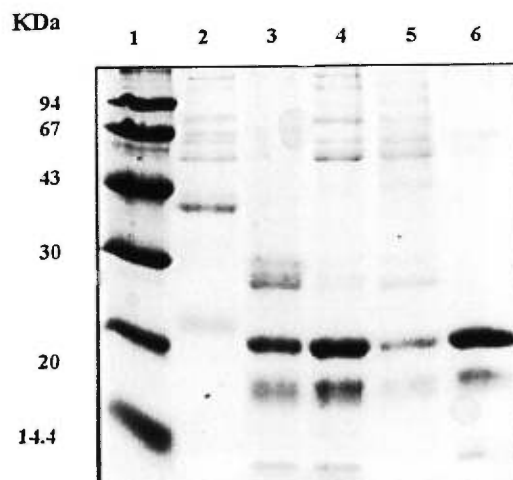
1 2 3 4 5 6 7 8







C)



- 2.3 **Purification of human seminal phospholipid-binding proteins closely related to the major proteins of bovine seminal plasma.** (1999) Ménard, M. and Manjunath, P. Biochemical and Biophysical Research Communications. (sera soumis prochainement)

Préambule:

Les protéines BSP forment une famille de protéines liant la phosphocholine bien connue pour leurs aptitudes à moduler la capacitation. Plusieurs analogues de cette famille ont été isolés et caractérisés chez le porc et le cheval. Des protéines immunologiquement apparentées aux protéines BSP ayant été détectées dans le plasma séminal humain, nous avons tenté dans cette étude de purifier et de caractériser ces analogues humains. Pour ce faire, nous avons incubé les protéines du plasma séminal humain avec la LDF. Les protéines liées ont été réisolées par ultracentrifugation sur gradient de KBr et délipidées. Les protéines analogues ont finalement été purifiées par des chromatographies sur colonne de PPC-agarose et de gélatine-agarose, et analysées par immunodétection en utilisant des anticorps polyclonaux développés contre les protéines BSP-A1/A2, BSP-A3 et BSP-30-kDa. Ces résultats nous ont montré la présence de protéines humaines ayant le même poids moléculaire que les protéines BSP. Le dosage radioimmunologique a révélé que ces protéines immunologiquement apparentées aux protéines BSP étaient présentes en très faibles concentrations dans le plasma séminal humain (0,1 µg/g pour les protéines apparentées aux protéines BSP-A1/A2) mais que leur concentration était grandement augmentée par la purification (jusqu'à 20 341 fois). En résumé, les protéines humaines isolées par cette purification possèdent les mêmes: 1) propriétés de liaison, 2) poids moléculaires, et 3) propriétés antigéniques que les protéines BSP. Il pourrait donc s'agir des analogues humains des protéines BSP.

**PURIFICATION OF HUMAN SEMINAL PHOSPHOLIPID-BINDING
PROTEINS CLOSELY RELATED TO THE MAJOR PROTEINS OF
BOVINE SEMINAL PLASMA**

Martin Ménard*†, Claude Lazure§ and Puttaswamy Manjunath*†‡

*Departments of Medicine and of Biochemistry, Université de Montréal, †Guy-Bernier Research Center, 5415 boul. de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada, H1T 2M4 and §Neuropeptide Structure and Metabolism Laboratory, Clinical Research Institute of Montréal, 110 Pine Avenue West, Montréal, Québec, Canada, H2W 1R7.

Key words: capacitation, seminal phospholipid-binding proteins, type-II structures, purification, human.

‡To whom correspondence should be addressed:

P. Manjunath, Ph.D.
Guy-Bernier Research Center
5415 Boul. De l'Assomption
Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

Tel.: (514) 252-3562
Fax: (514) 252-3430

Email: manjunap@ere.umontreal.ca

Short title: Purification of human seminal phospholipid-binding proteins

ABSTRACT

The major proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3 and BSP-30-kDa) of bovine seminal plasma (BSP) are a family of phospholipid-binding proteins that play an important role in sperm capacitation. Analogous proteins of this family have been isolated from boar and stallion seminal plasma and characterized. Our previous study has shown that this family of proteins specifically interacts with the low-density fraction (LDF) of hen's egg yolk and that these proteins could be isolated along with LDF by ultracentrifugation. In this study, we provide the evidence for the existence of analogous phospholipid-binding proteins in human seminal plasma. The alcohol precipitates of human seminal plasma were incubated with LDF and the bound proteins were reisolated by ultracentrifugation. Analogous proteins were finally purified by *p*-aminophyl phosphorylcholine-Agarose and gelatin-Agarose chromatographies. The purified proteins were analyzed following SDS-PAGE and immuno-blotting using polyclonal antibodies against BSP-A1/A2, -A3 and -30-kDa proteins. These results showed in the adsorbed fractions, the presence of BSP protein analogs in human seminal plasma. The radio-immunoassay data indicated that BSP proteins analogs are present in very low concentration in human seminal plasma (0.1 $\mu\text{g/g}$ for BSP-A1/A2 cross-reacting proteins) but can be largely enriched by purification (up to 20,341 fold). The human proteins isolated by this procedure exhibits: binding properties, molecular weights and immunological properties similar to those of BSP proteins.

INTRODUCTION

Epididymal sperm are not able to fertilize the egg. They acquire this ability during their long travel in the female genital tract. During this travel they are mixed with different secretions coming from accessory glands of the male genital tract, and vaginal, uterine, oviductal and follicular secretions in the female genital tract. Some of the molecules present in these secretions induce a series of biochemical and functional modifications designated capacitation [1-14]. This maturation step permits spermatozoa to be ready for the final step of maturation namely, the acrosome reaction. The acrosome reaction consists of the fusion of the external acrosomal membrane with the plasma membrane and the liberation of lytic enzymes [4, 15, 16] that hydrolyze the egg's surrounding matrix. This results ultimately in the fusion of the spermatozoa with the egg [4, 17, 18].

The capacitation occurs in the female genital tract and is induced by factors present in follicular and oviductal fluids. Some factors, the high-density lipoproteins (HDL) and the heparin-like glycosaminoglycans (GAGs), are the principal factors of follicular and oviductal fluids that influence capacitation in bovine spermatozoa [19-21]. Progesterone is also considered as one of these factors in human [22, 23]. Our studies on bovine sperm show that these factors induce capacitation by different mechanism [24]. But in each case, incubations with seminal plasma prior to the exposure with the capacitating factors accelerate the capacitation process [25, 26]. A family of proteins present in bovine seminal plasma plays an important role in this phenomenon [24, 27-29].

Four proteins designated BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 and BSP-30-kDa (collectively named BSP proteins) produced by the seminal vesicles and constituting the major protein fraction in the bovine seminal plasma have been shown to potentiate heparin- and HDL- induced capacitation [24, 27-34]. These BSP proteins bind to choline phospholipids on spermatozoa surface [35] and interact with heparin [36] and HDL [32, 37].

Human analogs of these proteins have been detected by immunoblotting in the adsorbed fraction after *p*-aminophenylphosphorylcholine-Agarose (PPC-Agarose) chromatography of human seminal plasma proteins [38]. The radioimmunoassay experiments using antibodies against BSP proteins show that analogs to these proteins are present in a very small concentration in human seminal plasma [32]. Experiments also show that the similar analogs are present in hamster, rat, mouse and boar seminal vesicles fluid or seminal plasma [32, 38]. Recently, HSP-1 and HSP-2, two BSP protein analogs from the stallion seminal plasma, and pB1, the boar analog, have been purified. HSP-1, HSP-2 and pB1 show phosphorylcholine, heparin and gelatin binding properties that were first reported with BSP proteins [39, 40]. All the members of this family of proteins contain type II domains that seem to be responsible for these binding properties and their primary structure show 50-65% homology [32, 39-42]. The role of BSP analogs or BSP-like proteins in other mammalian species in capacitation has not been documented.

In this study, we attempted to isolate and characterize BSP analogs in human seminal plasma. To achieve this goal we used a new isolation method that is able to purify small concentration of mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins. This method involves specific interaction of BSP family of proteins with the egg yolk low-density fraction (LDF) [43].

MATERIALS AND METHODS

Materials

p-aminophenyl phosphorylcholine-Agarose matrix was purchased from Pierce Chemical Co. (Oakville, Ontario, Canada). Gelatin (purified from calf-skin) was obtained from Eastman Kodak Company (Rochester, NY, USA). Affi-Gel 15 (N-hydroxysuccinimide ester of a derivatized cross-linked agarose gel bead support) was from Bio-Rad Laboratories Ltd (Mississauga, Ontario, Canada). The coupling of gelatin to agarose was carried out as previously described [31]. Bovine serum albumin (BSA, fraction V) and lactoperoxidase were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Na¹²⁵I was from Amersham Corp. (Oakville, Ontario, Canada). PVDF membranes (Immobilon P) were obtained from Millipore (Mississauga, Ontario, Canada). Antibodies against BSP proteins were raised and characterized as previously described [30, 34]. Enhanced Chemiluminescence (ECL) reagent was from Dupont (Boston, MA, USA). All other chemicals used were of analytical grade and were obtained from commercial suppliers.

Preparation of crude human seminal plasma (cHSP)

Human semen was obtained from fertility centers in Montreal area hospitals. The samples were frozen at -20°C until use. The samples were then thawed, pooled and centrifuged at 1,000 x *g* for 10 min to remove spermatozoa from the seminal plasma. The supernatant was recentrifuged at 10,000 x *g* for 10 min to remove any particles from the seminal plasma. The seminal plasma proteins were precipitated by adding 9 volumes of 95% cold ethanol with gently stirring for 2 h at 4°C. The protein precipitates were centrifuged at 10,000 x *g* for 10 min and washed three times with cold ethanol. The proteins were finally resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized. These fractions were designated crude human seminal plasma (cHSP).

Isolation of egg-yolk low-density fraction

The egg yolk was diluted to 9 volumes with Tris-HCl, pH 7.2 and density was adjusted to 1.21 g/ml with potassium bromide (KBr). The solution was subjected to ultracentrifugation at 400,000 x g for 20 h at 18°C. The upper phase containing the low-density fraction (LDF) was retrieved and dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS; 50 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.2).

Crude human seminal plasma and LDF incubation

Ten g of cHSP was solubilized in 100 ml of PBS and incubated with 10 mg of LDF for 30 min at room temperature. LDF along with bound proteins was reisolated as described before on KBr gradient (1.21 g/ml). The upper fraction was retrieved and dialyzed against 50 mM phosphate buffer. These proteins were then delipidated with 2 volumes of n-butanol/isopropylether (15:85) [44]. The upper phase was discarded. The lower phase was dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized. This fraction was delipidated second time using cold methanol-chloroform method [44]. The precipitated proteins were collected by centrifugation, dialyzed against ammonium bicarbonate buffer (50 mM) and lyophilized. Choline phospholipid content was determined using Boehringer Mannheim kit (Catalog number, 691844) for phospholipids determination to follow the efficiency of the delipidation.

PPC-Agarose chromatography

The delipidated proteins were solubilized in PBS and centrifuged at 10,000 x g for 10 min to remove any precipitates. The supernatant was applied on a PPC-Agarose column equilibrated with PBS. The protein solution was recirculated on the column for 2-3 h to maximize the interaction between the proteins and the affinity matrix. The unbound material was washed out with PBS, and the adsorbed proteins were eluted with 50 mM phosphate buffer containing 150 mM cholin and 7 M urea. The adsorbed and unadsorbed fractions were pooled separately and were dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized.

Gelatin-Agarose chromatography

The lyophilized PPC-Agarose adsorbed proteins were solubilized in PBS buffer and centrifuged at 10,000 x g for 10 min to remove any insoluble material. The protein preparations were then applied on a gelatin-Agarose column previously equilibrated with PBS. The protein solution was recirculated on the column for 120 min to maximize the interaction between the proteins and the affinity matrix. The unbound material was washed out with PBS, and the adsorbed proteins were eluted with 50 mM phosphate buffer containing 7 M urea. The adsorbed and unadsorbed fractions were dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized.

Radio-Immunoassay (RIA)

The iodination of the BSP proteins was performed by lactoperoxidase method as described previously [32]. All reagents for RIA were diluted in the immunoassay buffer (50 mM phosphate buffer pH 7.4, containing 5 mM EDTA, 0.45% NaCl, 0.25 mg/ml sodium azide, 0.05% Tween-20 and 0.1% BSA). The primary antibodies were used in following dilution; 1:1,000 for anti-BSP-A1/-A2 and anti-BSP-30 kDa, and 1:10,000 for anti-BSP-A3. After overnight incubation (~20 h), 50 µl of secondary antibody (10% Goat anti-RGG) was added, followed by another incubation for 12-16 h. All tubes except total counts were centrifuged at 2,200 x g for 15 min. The supernatant was aspirated and the radioactivity associated with the pellet was determined in gamma-ray scintillation counter (1272 CliniGamma, Pharmacia Wallac, Finland).

SDS-PAGE analysis and Immunoblotting

SDS-PAGE in 15% gel was performed according to Laemmli [46] using a Bio-Rad Protein II vertical slab gel electrophoresis apparatus. After electrophoresis, gels were stained in Coomassie brilliant blue R-250. The apparent molecular weights (M_r) were determined with the low-molecular-weight calibration kit of Pharmacia (Dorval, Quebec). For immuno-detection of proteins separated by SDS-PAGE were transferred to PVDF membrane [43]. PVDF membranes were then

saturated in PBS containing 1% BSA and 0.05% Tween-20 for 2 h at room temperature and then probed with the appropriate polyclonal anti-BSP antibodies diluted in PBS containing 0.1% BSA and 0.05% Tween-20 (washing buffer) for 1.5 h at room temperature. The membranes were washed (4 X 5 min) in washing buffer and incubated with lactoperoxidase-coupled anti-rabbit antibodies (1:10,000) for 1 h. The membranes were then washed and developed using the ECL kit as described by the supplier.

Protein determination

The protein content of each purification step was measured by Lowry method [47] or by weighing dialyzed and lyophilized powder on a Cahn microbalance (Model C-31, Fisher Scientific, Fairlawn, NJ).

RESULTS

In order to prove that BSP analogs are present in human seminal plasma, we attempted in this study to purify these proteins using their binding affinities for LDF, PPC-Agarose and gelatin-Agarose. This method was previously used with success for the purification of phospholipid-binding proteins from bovine, boar and stallion seminal plasma [43].

Isolation of LDF binding proteins

As described in the Materials and Methods section, 10 g of alcohol precipitated proteins were incubated with 10 mg of LDF and subjected to ultracentrifugation in KBr solution. This manipulation resulted in the appearance of two phases. The upper phase contained all the LDF and the LDF-binding proteins. We determined by radioimmunoassay using antibodies raised against BSP proteins, the quantity of BSP analogs present in the delipidated upper phase. All three proteins were detected in cHSP and in the LDF fraction (Table I). In all cases we noted a substantial increase of BSP analogs concentrations in the LDF fractions compared to those found in crude fraction. This increase was higher for BSP-A1/-A2 analogs (809-fold) but it is the BSP-30-kDa analog that was found in the highest concentration in cHSP. Interestingly, we found a yield superior to 100% for BSP-A1/-A2 analogs (335%). This means that we have detected a larger quantity of analogous proteins in the LDF fraction than in cHSP. This may be explained by the elimination, during the purification, of some molecules present in alcohol precipitated fraction that prevented the antibodies to bind all the proteins. The recovery was respectively of 86% and 51% for BSP-A3 and BSP-30-kDa analogs for LDF step. The control experiments show that delipidated LDF did not interfere with the radioimmunoassay (data not shown).

The delipidated upper phase was also analysed by immunoblotting using antibodies raised against BSP-A1/-A2, BSP-A3 and BSP-30-kDa proteins to determine the molecular weights of the proteins that cross-reacted with these antibodies. The delipidated upper phase fraction with anti-BSP-A1/A2 revealed the

presence of a doublet having the same molecular weights and the same electrophoresis pattern than BSP-A1/A2 (15.5 and 16.5 kDa). Three proteins cross-reacted with anti-BSP-A3 antibodies (Fig. 1b). Two bands having a molecular weights around 30-33 kDa and one band having the same molecular weight as BSP-A3 (15 kDa) were detected. The antibodies raised against BSP-30-kDa cross-reacted with several proteins present in the sample (Fig. 1B). But it is interesting to note that one 28 kDa band appeared at the same molecular weight region as BSP-30-kDa. The anti-BSP cross-reacting proteins were not detected by immunodetection in 100 µg of cHSP (data not shown) and were not visible on SDS-PAGE (Fig. 1a). However, we could detect them by immunoblotting following LDF step.

Purification by affinity chromatographies

The delipidated upper phase proteins (40 mg) were dissolved in PBS and loaded on PPC-Agarose column. Figure 2A shows that a large quantity of proteins did not bind to the matrix (first peak). The adsorbed proteins were eluted with 150 mM choline-7 M urea buffer (second peak), dialyzed and lyophilized.

Immunoblot analysis (Fig. 2C) of the PPC-Agarose adsorbed fraction using anti-BSP-A1/-A2 showed the same doublet that we found after LDF-step and having the same molecular weight than BSP-A1/A2. This chromatography step eliminated most of the proteins that were cross-reacting with anti-BSP-A3 and anti-BSP-30-kDa. Surprisingly, the only cross-reacting proteins remaining are a 15 kDa protein detected by anti-BSP-A3 and a 28 kDa protein detected by anti-BSP-30kDa. So, the purified proteins on PPC-Agarose column were composed of proteins having the same molecular weight and cross-reacting affinity than the BSP proteins.

The PPC-Agarose-adsorbed proteins were then loaded on a gelatin-Agarose column (Fig. 2B). Once again a large proportion of proteins remained unadsorbed (first peak). The adsorbed proteins were eluted with a 7 M urea buffer, dialyzed and lyophilized (second peak). The Figure 2C shows that the same anti-BSP-cross-

reacting proteins that bound to PPC-Agarose column, also bound to gelatin-Agarose matrix.

Radioimmunoassay using anti-BSP-A1/-A2 antibodies confirmed the enrichment of the protein fractions (from 809- to 20,341 for -A1/-A2) using the PPC-Agarose and gelatin-Agarose chromatographies. Although, there was considerable decrease in fold purification from LDF-step to PPC-Agarose step for BSP-A3 and BSP-30-kDa, there was a significant increase in fold purification from PPC-Agarose step to gelatin-Agarose step. The decrease in the fold purification observed with BSP-A3 and 30kDa from LDF step to PPC-Agarose step is due to the removal of other cross-reacting proteins present in seminal fluid and is discussed in the next section.

DISCUSSION

The capacitation phenomenon was observed almost 50 years ago independently by Chang [1] and Austin [2]. The molecular mechanism implicated in this phenomenon is still not well defined. It involves number of biochemical and physiological modifications in spermatozoa. It occurs in the female genital tract and is influenced by some capacitating factors (HDL and heparin-like GAGs) present in the follicular and the oviductal fluids.

Seminal plasma also plays an important role in this phenomenon. More than just serving as diluent and carrier for the spermatozoa [48], it consists of a very complex mixture of molecules each playing an important role in the fertilization of spermatozoa. It provides metabolic substrates [48], it protects against oxidation and some infection [49], stimulates the sperm motility [50], it also interacts directly with the spermatozoa and induces some membrane modifications. Certain seminal plasma proteins appear to play an important role in induction of capacitation, because studies have shown that bovine epididymal sperm take a longer period (22 h) to capacitate than ejaculated sperm (7 h) [51]. Several studies show that a family of phospholipid-binding proteins (BSP proteins) of bovine seminal plasma, are the factors responsible for this induction [26-29].

In this study, we report the isolation of BSP analogous proteins from human seminal plasma. In the first step, we took advantage of the binding affinity that this family of proteins has for the egg yolk LDF. We have previously shown that stallion, boar and bovine phospholipid-binding proteins (BSP proteins/BSP analogs) can be efficiently isolated from seminal plasma using this LDF affinity [43]. Immunodetection and RIA results proved that this method also works for human seminal plasma proteins. In fact, RIA results show an increase in concentration following this purification up to 809-fold for the human analog of BSP-A1/A2. The immuno-detection using anti-BSP-A1/A2 attests these results since we observed the appearance of a doublet having the same molecular weight than the BSP-A1/A2. Similar results were observed using the antibodies against BSP-A3 and BSP-30-kDa

proteins. This study shows for the first time the presence of BSP analogous proteins in human seminal plasma with the same molecular weights than BSP proteins.

The results of RIA for human BSP analogs should be interpreted with caution, since the antibodies used were raised against bovine proteins. Furthermore, human seminal fluid contains other proteins (29-kDa, 33-kDa and 66-kDa) that bind to BSP antibodies. This is particularly evident on immunoblots probed with anti-BSP-A3 and anti-BSP-30-kDa. This would explain the overestimation of -A3 and -30-kDa analogous proteins detected by RIA in crude fraction and in upper phase (LDF step). On the other hand, the increase in the yield using anti-BSP-A1/A2 can be explained by the elimination of some components present in the alcohol precipitated fraction that were interfering with the antibodies that would result in an underestimation of human BSP-A1/A2 analogous proteins. Despite variations in the RIA data of the human protein analogs, we observed for the first time by immunoblotting, the appearance of cross-reacting bands having the same molecular weights. These results prove that the human seminal phospholipid binding-proteins that are analogous to the BSP family proteins also bind to egg yolk LDF and can be isolated with it.

After LDF step, human BSP analogous proteins contained several other proteins coming from the LDF and/or from seminal plasma. To eliminate some of these contaminants we used PPC-Agarose and gelatin-Agarose matrices. The affinity for these two ligands is characteristic of this family of proteins. A number of proteins were eliminated by these chromatographies. This purification enriched the human BSP-A1/A2 analogous protein by 20,341-fold. This result shows the efficiency of the technique of purification for the human BSP-A1/A2 analogs. The decrease observed in the RIA using anti-BSP-A3 and anti-BSP-30-kDa results can be explained once again by the disappearance of the cross-reacting proteins during the purification. The immunodetection results show that our purification permits to isolate only the human seminal plasma proteins having the same molecular weights as BSP-A1/A2, BSP-A3 and BSP-30-kDa and cross-reacting with respective antibodies.

Human analogous proteins are the first analogs having the same specificity as BSP proteins. In stallion only two analogs, HSP-1 and HSP-2 have been purified but these proteins do not have the same molecular weight as BSP analogs [39, 40]. Similarly pB1 is the only known BSP analog of the boar and it has a different molecular weight [40]. Moreover, human analogs appear to have great amino sequence similarity with bovine proteins since the bovine antibodies can recognize them but not stallion and boar analogs. These similarities could reveal that these proteins play the same role in human. Despite this structural similarity with the bovine proteins, one big difference should be noted. The concentration of BSP proteins in bovine seminal plasma represents almost 60% (~50 mg/ml) of the total proteins; whereas, in human seminal plasma the amount seems much lower (around 0.1 µg/g). This difference could have a big influence on the function that these proteins play in the human spermatozoa capacitation. But this lack of quantity can be compensated by a better efficiency of human proteins. Since spermatozoa have binding sites on their surface for these proteins most of the BSP analogs may be bound to spermatozoa and therefore, very little is found in the seminal plasma. Alternatively, a large amount of BSP analogous proteins may have been rapidly degraded since the human seminal plasma contains a lot of protease activity. On the other hand, they may play synergetic role with other proteins present in the human spermatozoa or seminal plasma. For example, boar spermadhesin, AQN-1 binds to pB1, the boar BSP analog, forming hetero-oligomers that have binding affinities for heparin-Agarose [40]. However, spermadhesions are present in a larger quantity in seminal plasma of species having less BSP analogs [52]. But until now, no study has shown any implication of spermadhesin in sperm capacitation and neither any human spermadhesins have been isolated.

Despite differences discussed above, the presence of a family of proteins having the same properties than BSP proteins, could be of a major importance in comprehension of the human sperm capacitation, in mammalian fertility evolution and in a more general way in the comprehension of all the human fertilization

process. Our laboratory is currently investigating whether these proteins are responsible for some kind infertility problems in human.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funds from the Medical Research of Canada (MT-13194 to P.M. and MT-14766 to C.L.).

REFERENCES

1. Chang MC. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in Fallopian tubes. *Nature*. **68**, 997-998.
2. Austin CR. (1951) Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res*. **4**, 581-596.
3. Austin CR. (1952) The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* **170**, 326.
4. Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. New York: Raven Press. 189-317.
5. Go KJ, Wolf DP. (1983) The role of sterols in sperm capacitation. *Adv Lipid Res*. **20**, 317-330.
6. Meizel S. (1985) Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat*. **174**, 285-302.
7. Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. (1985) Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat*. **174**, 269-283.
8. Langlais J, Roberts KD. (1985) A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res*. **12**, 183-224.
9. Handrow RR, First NL, Parrish JJ. (1989) Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool*. **252**, 174-182.

10. Parrish JJ, Vrendenburgh WL, Lavin CA. (1993) Increases in bovine sperm intracellular calcium (Cai) and pH (pHi) during capacitation. *Biol Reprod*, **48** (suppl 1):106.
11. Parks JE, Ehrenwald E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. (1990) In: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS (eds.), *Fertilization in Mammals*. Norwell, MA. 155-167.
12. Florman HM, Babcock DF. (1991) Progress toward understanding the molecular basis of capacitation In: Wassarman PM (eds.), *Element of Mammalian Fertilization*. Boca Raton, FL: CRC Press. 105-132.
13. Kopf GS, Gerton GL. (1991) The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: Wassarman PM (eds.), *Element of Mammalian Fertilization*. Boca Raton, FL: CRC Press. 153-203.
14. Ward CR, Storey BT. (1984) Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol*. **104**, 287-296.
15. Wassarman PM. (1987) Early events in mammalian fertilization. *Ann Rev Cell Biol*. **3**, 109-142.
16. Zaneveld LJD, DeJonge CJ. (1991) Mammalian sperm acrosomal enzymes and the acrosome reaction. In: Dunbar BS, O'Rand MG eds. *A comparative Overview of Mammalian fertilization*, New York: Plenum Press. 63-79.
17. Yanagimachi R. (1981) Mechanisms of fertilization in mammals. In Mastroianni L, Biggers JD, eds. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. New York: Plenum Press. 81-187.
18. Yanagimachi R. (1988) Sperm-egg fusion. In Duzgunes N, Bronner F, eds. *Current Topics in Membranes and Transport*, Vol. 32. San Diego: Academic Press. 3-43.

19. Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL. (1982) Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* **106:4**, 1092-1098.
20. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. (1989) Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod.* **40**, 1020-1025.
21. Langlais, J., Kan, F.W.K., Granger, L., Raymond, L., Bleau, G., Roberts, K.D. (1988) Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Gamete Res.* **20**, 185-201.
22. Foresta, C, Rossato, M, Mioni, R and Zorzi, M. (1992) Progesterone induces capacitation in human spermatozoa. *Andrologia* **24**, 33-35.
23. Emiliozzi, C, Cordonier, H, Guérin, JF and al. (1996). Effect of progesterone on human spermatozoa prepared for *in vitro* fertilization. *Int. J. Androl.* **19**, 39-47.
24. Lane ME, Thérien I, Moreau R, Manjunath P. (1999) Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol Reprod.* **60**, 169-175.
25. Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. (1985) Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reaction in bovine spermatozoa *in vitro*. *Gamete Res* **12**, 345-355.
26. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. (1990) Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* **42**, 899-915.
27. Thérien I, Soubeyrand S, Manjunath P. (1997) Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod.* **57**, 1080-1088.

28. Thérien, I., Moreau, R., and Manjunath, P. (1998) Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* **59**, 768-776.
29. Thérien I, Bleau G, Manjunath P. (1995) Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of by heparin. *Biol Reprod.* **52**, 1372- 1379.
30. Manjunath, P., and Sairam, M.R. (1987) Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem. J.* **241**, 685-692.
31. Manjunath, P., Sairam, M.R., and Uma, J. (1987) Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci. Rep.* **7**, 231-238.
32. Manjunath, P., Baillargeon, L., Marcel, Y.L., Seidah, N.G., Chrétien, M. and Chapdelaine, A. (1988). Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems* (McKerns, K.W. and Chrétien, M., eds) pp. 259-273, Plenum Publishing Corp., New York.
33. Manjunath P. (1984) 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. 49-61.
34. Desnoyers L, Therien I, Manjunath P. (1994) Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* **37**, 425-435.
35. Desnoyers, L. and Manjunath, P. (1992) Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem.* **267**, 10149-10155.

36. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P (1990) Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* **26**, 313-318.
37. Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A (1989) Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J. Biol. Chem.* **264**, 16853-16857.
38. Leblond E, Desnoyers L, Manjunath P (1993) Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* **34**, 4430449.
39. Calvete JJ, Mann K, Schäfer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Töpfer-Petersen E. (1995) 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.* **310**, 615-622.
40. Calvete JJ, Raida M, Grentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E. (1997) Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS.* **407**, 201-206.
41. Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, Chrétien, M. (1987) Complet amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. *Biochem J.* **243**, 195-203.
42. Salois D, Ménard M, Paquette Y, Manjunath P. (1999) cDNA cloning and tissue expression of BSP-A3 nad 30-kDa: prosphotidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. *Biol Reprod.* **61**, 288-297.
43. Ménard M, Nauc V, Lazure C, Manjunath, P. (1999) Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-bindig proteins. *Biochem Biophys Res Comm.* (submitted).

44. Mills GL, Lane PA, Weech, PK. (1984) A guidebook to lipoprotein technique. Burdon, R.H. and Knippenberg, P.H. eds. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. vol. 14. Elsevier. New York. 460-471.
45. Basak A., Boudreault A, Chen A, Chrétien M, Seidah NG, Lazure C.(1995) J. Peptide Sci. **1**, 385-395.
46. Laemmli UK (1970). Nature **227**, 680-685.
47. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal Biochem **87**, 206-210.
48. Miller DJ, Ax, RL. (1988).Seminal plasma: What is it and why it is important. Proceedings of 12th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, 97-107.
49. Shivaji S, Bhargava PM (1987) Antifertility factors of mammalian seminal fluids. BioEssays **7**, 13-17.
50. Peitz B, Olds-Clarke P. (1986) Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. Biol reprod. **35**, 608-617.
51. Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. (1985) Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. Gamete Res. **12**, 345-355.
52. Calvete JJ, Sanz L, Ensslin M, Topferpetersen E. (1996) Sperm surface proteins. Reprod. Dom. Anim. **31(1)**:101-105.

Table I. Purification summary. Aliquots of the various fractions of the purification were analysed by RIA for BSP analogs content as described under "Material and Methods".

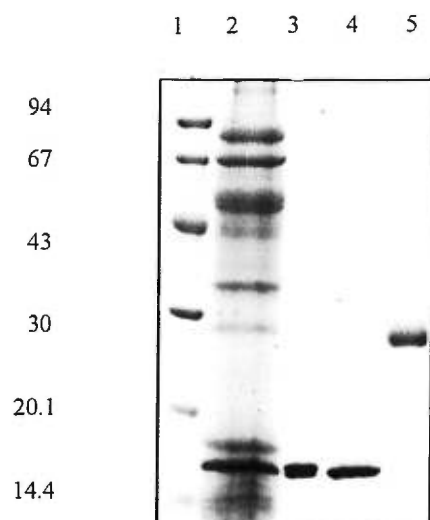
Step	BSP-A1/-A2			BSP-A3			BSP-30-kDa		
	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	Yield (%)	Purification (fold)	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	Yield (%)	Purification (fold)	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	Yield (%)	Purification (fold)
cHSP	0.13	100	1	0.10	100	1	5.1	100	1
LDF isolation	105.2	335	809	20.8	86	208	631	51	123
PPC-agarose	1,587	441	12,207	9.62	3.4	96	90.8	0.64	18
Gelatin-agarose	2,644	617	20,341	16.28	4.9	163	225.6	1.3	44

LEGEND TO FIGURES

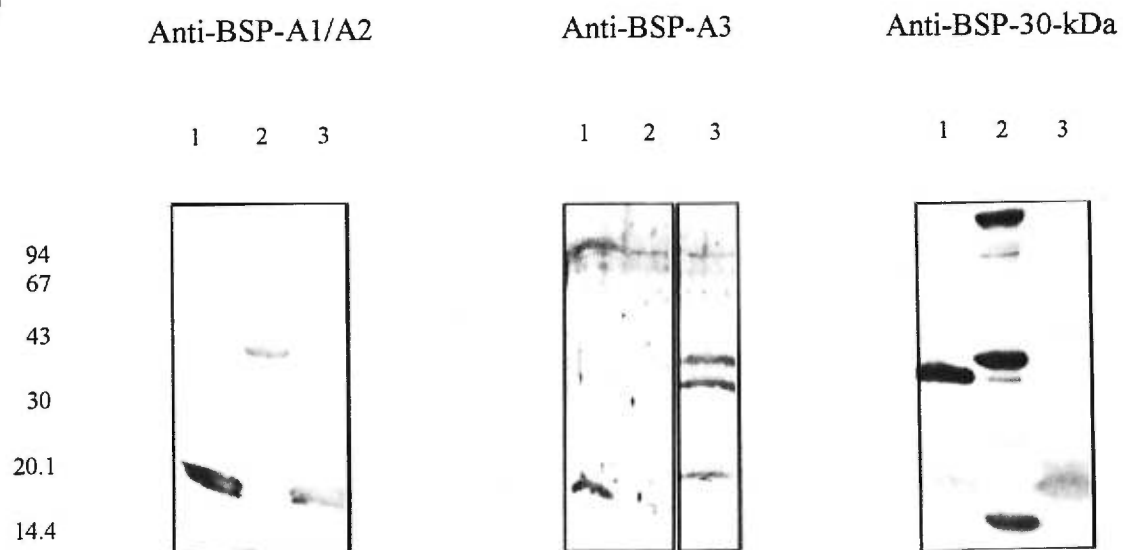
Figure 1. Immunoblotting analysis of the delipidated upper phase recovered after the use of the LDF isolation method. (A) Alcohol precipitated human seminal plasma proteins was analyzed by SDS-PAGE on 15% gel. Alcohol precipitated human seminal plasma proteins (lane 2), BSP-A1/A2 (lane 3), BSP-A3 (lane 4), BSP-30-kDa (lane 5). Low molecular weight standards (lane 1; they are from the top to the bottom, phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor and α -lactalbumin). (B) The delipidated upper phase fractions recovered after the LDF isolation method was subjected to SDS-PAGE, electrotransferred to a PVDF membrane and probed with anti-BSP-A1/A2, anti-BSP-A3 and anti-30-kDa antibodies. Alcohol precipitated bovine seminal plasma proteins (lane 1), low molecular weight standards (lane 2) and upper phase delipidated fraction (lane 3).

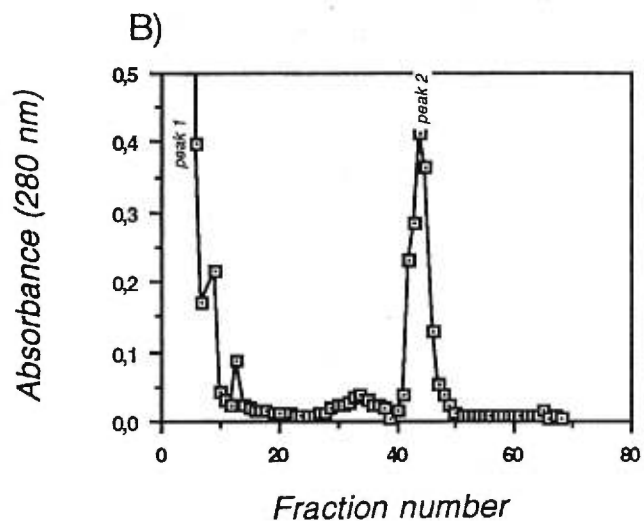
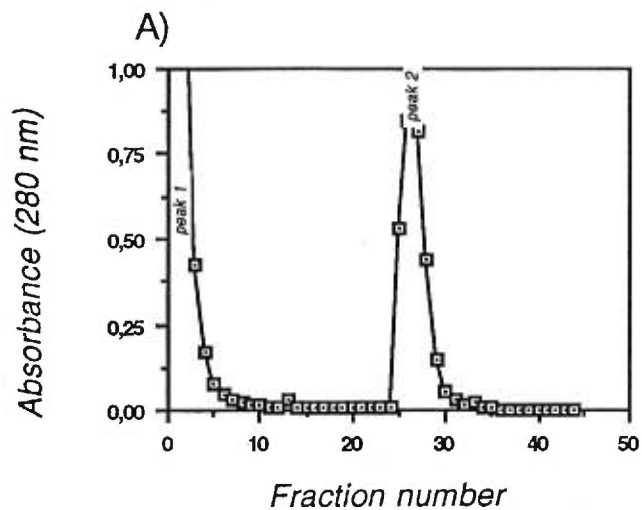
Figure 2. Purification patterns of human proteins purified by affinity chromatographies and immunodetection analysis. (A) 40 mg of delipidated upper phase proteins was solubilized in PBS and applied on PPC-Agarose column. After washing, the elution of adsorbed proteins was achieved with 50 mM phosphate buffer containing 150 mM choline and 7 M urea. (B) PPC-Agarose adsorbed proteins solubilized in PBS were loaded on gelatin-Agarose column. After washing the column, the adsorbed proteins were eluted with 50 mM phosphate buffer containing 7 M urea. One ml fractions were collected at a flow of 30 ml/h. (C) Each sample recovered during the purification were subjected to SDS-PAGE, proteins were electrotransferred to a PVDF membrane and probed with anti-BSP-A1/A2, anti-BSP-A3 and anti-30-kDa antibodies. Alcohol precipitated bovine seminal plasma proteins (lane 1), PPC adsorbed proteins (lane 3), gelatin-adsorbed proteins (lane 4), unadsorbed proteins (lane 5). Low molecular weight standards (lane 2; they are from the top to the bottom, phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor and α -lactalbumin).

A)

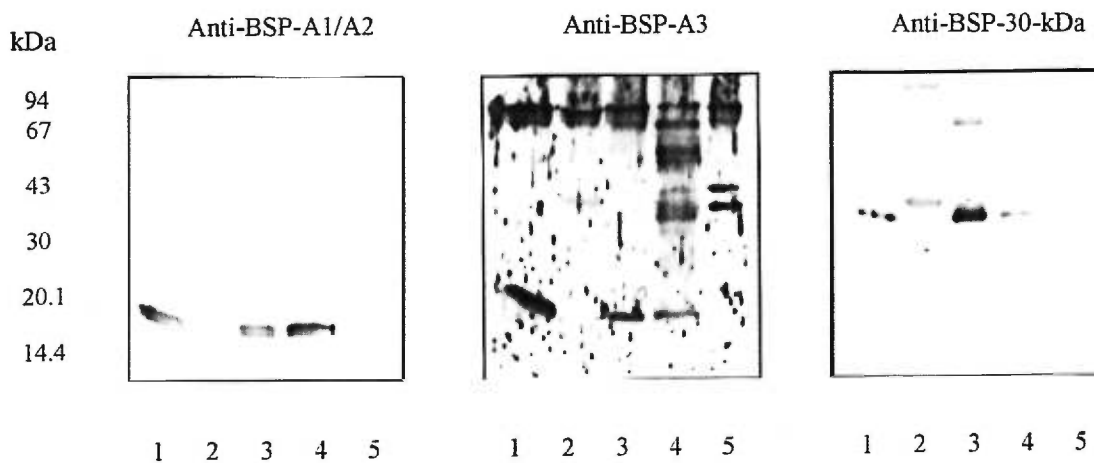


B)





C)



3. DISCUSSION

Les protéines BSP semblent jouer un rôle majeur dans le phénomène de la capacitation chez le bovin. Présentes en fortes concentrations dans le plasma séminal de cette espèce, elles interagissent avec plusieurs molécules connues pour leur rôle de modulateur de la fertilité. Plusieurs études ont confirmé que les protéines BSP contribuent à la capacitation du spermatozoïde en diminuant de plus de la moitié le temps nécessaire à cette maturation par les facteurs capacitants (section 1.8.2).

La présence des protéines HSP-1 et HSP-2 dans le plasma séminal équin, de la protéine pB1 chez le porc, ainsi que de protéines immunologiquement apparentées aux protéines BSP dans le plasma séminal de diverses espèces semblent indiquer la possible ubiquité de cette famille de protéines (section 1.9). Les mécanismes menant à la capacitation demeurant méconnus chez la plupart des mammifères, il semblait intéressant de vérifier la présence de protéines analogues aux protéines BSP chez d'autres espèces.

3.1 Présence de gènes codant pour des protéines analogues aux protéines BSP chez d'autres espèces

Avant le début de cette étude, seules les séquences en acides aminés des protéines BSP ainsi que la séquence de l'ADNc codant pour la protéine BSP-A1/A2 étaient connues (Kempe et Sheit, 1988a, 1988b). Afin de vérifier par Southern blot la présence de gènes codant pour des protéines analogues aux protéines BSP chez d'autres espèces, il nous fallait procéder dans un premier temps au clonage et au séquençage des ADNc codant pour chacune des protéines BSP. Par la suite, les sondes moléculaires élaborées à partir de ces séquences nous ont servi à la détection de gènes codant pour les protéines BSP chez d'autres espèces (Article 2.1).

L'analyse de ces nouvelles séquences nous a permis de constater une forte analogie entre les protéines BSP tant au niveau des séquences consensus de la

méthionine initiatrice et du signal de polyadénylation de leur ADNc que de la séquence codant pour ce que nous croyons être leur peptide signal. Les différences observées entre les séquences déduites en acides aminés à partir des ADNc des protéines BSP-A3 et BSP-30-kDa et les séquences protéiques publiées pour ces mêmes protéines semblent témoigner d'un certain polymorphisme des gènes codant pour les protéines BSP. Bien que l'effet de ce polymorphisme reste à élucider, il pourrait être responsable des variations de fertilité intra-espèces observées chez le taureau (Bellin et coll., 1994, 1998).

L'analyse de l'expression tissulaire des protéines BSP par des protections à la RNase a confirmé que ces protéines sont synthétisées dans les vésicules séminales et les ampoules chez le taureau. Aucune expression de l'ARNm codant pour ces protéines n'a par ailleurs été décelée au niveau des autres organes du tractus génital mâle et des autres tissus analysés.

Afin de vérifier la présence de gènes codant pour les protéines BSP chez divers mammifères, nous avons procédé à une analyse par Southern Blot en utilisant des sondes moléculaires élaborées à partir de l'ADNc des protéines BSP-A1/A2, BSP-A3 et BSP-30-kDa. Des analyses effectuées avec la sonde d'ADNc de BSP-30-kDa dans des conditions de fortes stringences nous a permis de détecter la présence d'une séquence similaire de 3,7 kb dans l'ADN génomique de l'humain, du rat, du hamster et du lapin. Ces résultats suggèrent la présence d'un gène fortement apparenté au gène codant pour la protéine BSP-30-kDa chez ces espèces. Ces résultats concordent parfaitement avec ceux témoignant de la présence de protéines immunologiquement apparentées à la protéine BSP-30-kDa chez ces espèces. Toutefois, ces mêmes analyses utilisant les sondes de BSP-A1/A2 et de BSP-A3 ne nous ont pas permis de découvrir des gènes analogues chez ces espèces et ce, même à une faible stringence.

La détection de gènes similaires aux protéines BSP-30-kDa chez d'autres espèces semblent témoigner de la présence de régions fortement conservées lors de l'évolution dans les gènes codant pour cette protéine. La protéine BSP-30-kDa étant

considérée comme le meilleur médiateur de la capacitation chez le bovin (Thérien et coll., 1995, 1997, 1998), et sa présence à la surface de la membrane du spermatozoïde concordant avec l'augmentation du taux de fécondité (Bellin, 1994, 1998), il n'est pas étonnant d'un point de vue évolutionniste que cette protéine soit la mieux conservée.

Toutefois, l'absence de détection de gènes codant pour les protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3 chez d'autres mammifères ne témoigne que de l'absence de régions hautement conservées chez ces espèces. Il est important de rappeler qu'étant donné la dégénérescence du code génétique, des mutations n'engendrent pas nécessairement de forts changements dans la séquence primaire d'une protéine et encore moins une modification de ses propriétés de liaison. L'existence d'analogues fonctionnellement et structurellement apparentés aux protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3 chez le porc et le cheval semble d'ailleurs en témoigner. De la même façon, la présence de protéines liant la phosphocholine immunologiquement apparentées aux protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3 chez l'humain, le rat et le hamster témoigne peut être de la présence de régions fortement conservées au niveau de la séquence primaire tout en étant hautement mutées au niveau génomique.

Néanmoins, la possibilité que ces mutations aient affecté le rôle joué par ces protéines dans la reproduction demeure. Il est d'ailleurs possible que ces protéines jouent un rôle totalement différent chez d'autres espèces. Seule la purification de ces protéines et leur caractérisation nous permettront de connaître leur implication dans la capacitation chez ces espèces.

3.2 Élaboration d'un nouveau protocole de purification des analogues aux protéines BSP

Lors d'études préliminaires, nous avons tenté de purifier des protéines apparentées aux protéines BSP du plasma séminal chez plusieurs mammifères en utilisant diverses colonnes d'affinité. Cependant, comme nous l'avons mentionné précédemment ces protéines ne sont présentes qu'en très faibles concentrations chez

la plupart des espèces ce qui rend impossible une purification efficace en utilisant ces colonnes d'affinité. Afin d'enrichir la fraction qui sera déposée sur la colonne et de travailler avec une plus grande quantité de matériel de départ, nous avons dû développer une nouvelle méthode de purification des protéines analogues aux protéines BSP (Article 2.2).

Cette technique fait appel aux interactions observées lors d'études préliminaires en cryopréservation entre la LDF et les protéines BSP (les composants de la LDF interagissant avec les protéines BSP demeurent inconnus). En partant du principe que la LDF peut être isolée d'une solution de KBr (1.21 g/ml) par ultracentrifugation, nous avons tenté de séparer les protéines BSP et leurs analogues liés au LDF des autres protéines du plasma séminal. Leur purification serait complétée par la suite par des chromatographies sur colonnes de PPC-agarose et de gélatine-agarose (voir matériel et méthodes section 2.2).

Afin de démontrer l'efficacité de ce nouveau protocole, nous avons procédé à la purification des protéines BSP du plasma séminal bovin et de leurs analogues porcins et équin.

3.2.1 Évaluation du nouveau protocole en présence de protéines BSP

Dans un premier temps, il fallait prouver que les protéines BSP pouvaient être isolées efficacement en présence de LDF. Nous estimions que si tout fonctionnait bien, que suite à l'ultracentrifugation toutes les protéines BSP se retrouveraient dans la phase supérieure avec la LDF. La phase inférieure ne devait contenir que les protéines incapables de lier la LDF.

En utilisant qu'une faible quantité (condition non-saturante) de protéines du plasma séminal bovin précipitées à l'alcool (cBSP), nous avons démontré qu'il était possible d'isoler la presque totalité des protéines BSP (98%). Les traces de ces protéines retrouvées dans la phase inférieure étant probablement causées par la difficulté de récupérer l'ensemble de la solution composant la phase supérieure. Il

est intéressant de constater que malgré la liaison d'autres protéines du plasma séminal à la LDF, il ne semble exister aucune interférence entre celles-ci et les protéines BSP. Ces résultats semblent démontrer la forte affinité existant entre des composantes de la LDF et les protéines BSP.

Par extrapolation nous avons déterminé, en condition saturante, que la LDF peut purifier efficacement jusqu'à 12 fois sa masse en cBSP et isoler approximativement 7 fois sa masse en protéines BSP (les protéines BSP représentant environ 60% de toutes les protéines du plasma séminal). De plus, il semble que même en condition saturante, toutes les protéines BSP (BSP-A1/A2, BSP-A3, BSP-30-kDa) conservent la même répartition, ce qui témoigne d'un niveau d'affinité similaire chez toutes ces protéines. Cette propriété est très intéressante pour la poursuite de la purification puisqu'elle nous permettra d'isoler toutes les protéines BSP au cours d'un même processus.

Des purifications ultérieures sur des colonnes de PPC-agarose et gélatine-agarose ont confirmé que les protéines BSP conservaient toutes leurs propriétés de liaison suite à leur isolement utilisant leur affinité pour la LDF. Toutefois, il est important de noter que les protéines isolées par cette technique doivent être complètement délipidées avant d'être appliquées sur les colonnes d'affinité. En effet, nous avons remarqué lors d'études préliminaires que la présence d'une quantité de lipides, même très faible, pouvait inhiber la liaison entre les protéines BSP et la PPC-agarose, les sites de liaison de la protéine étant probablement saturés par des phospholipides provenant de la LDF.

L'isolement par LDF, suivi par les chromatographies sur PPC-agarose et sur gélatine-agarose nous ont permis d'obtenir une fraction pure ne contenant que les protéines BSP, tout en minimisant les pertes normales inhérentes aux processus de purification.

3.2.2 Évaluation de l'efficacité du nouveau protocole dans la purification de deux familles de protéines d'analogues connues aux protéines BSP

Ce protocole de purification s'étant avéré efficace pour les protéines BSP, il semblait intéressant de vérifier s'il pouvait être utilisé pour la purification de tous les analogues des protéines BSP. Afin de vérifier cette possibilité, nous avons utilisé le plasma sérial de deux espèces contenant des analogues connus aux protéines BSP, le porc et le cheval.

3.2.2.1 Purification de l'analogue porcin

La protéine pB1 a été purifiée du plasma sérial de porc en utilisant ce protocole. L'interaction entre les analogues des BSP et la LDF n'ayant jamais été étudiée auparavant, l'isolement de pB1 par cette méthode constitue la première preuve de l'existence possible d'une telle propriété chez l'ensemble des membres de la famille des BSP.

Contrairement à la purification des protéines BSP, une grande quantité de protéines du plasma sérial outre pB1 a été isolée avec la LDF. La majorité de ces protéines a toutefois été éliminée lors de la chromatographie sur PPC-agarose. La séquence des colonnes d'affinité utilisée nous a permis d'éliminer la protéine AQN-1, une spermadhésine reconnue pour former un complexe oligomérique avec pB1 qui lui permet de lier la PPC-agarose, mais qui ne semble pas nécessaire à sa liaison à la gélatine-agarose (section 1.9.1.2). La protéine se lie probablement à la gélatine-agarose sous forme monomérique par le biais de ses domaines de type II.

3.2.2.2 Purification des analogues équins

Les protéines HSP-1 et HSP-2, deux analogues bien connus des protéines BSP ainsi qu'une nouvelle protéine de 12 kDa ont été purifiées du plasma sérial de cheval en utilisant le nouveau protocole de purification. Cette purification témoigne de nouveau de l'interaction existant entre des protéines analogues aux protéines BSP et la LDF. Bien que ces résultats témoignent une fois de plus de

l'efficacité de la méthode, il semble important de discuter plus amplement des différences existant entre les résultats que nous avons obtenus et les données généralement rapportées dans la littérature.

3.2.2.2.1 Les protéines HSP-1 et HSP-2

En 1995, Calvete et coll. ont démontré qu'il existe deux formes de HSP-1, une forme qui s'oligomériser avec HSP-2 et peut lier l'héparine-Sepharose, et une forme monomérique qui ne peut lier l'héparine-Sepharose, mais peut lier la gélatine-agarose. Selon Calvete et coll., la seule différence qui existait entre ces protéines était leur type de glycosylation, leur poids moléculaire étant exactement le même sur SDS-PAGE, 28kDa. Contrairement à ces résultats, nous avons été en mesure d'isoler deux formes de HSP-1, l'une de 22 kDa et l'autre de 17 kDa. Il est intéressant de noter que nos résultats semblent se rapprocher davantage des poids moléculaires évalués théoriquement en tenant compte de la séquence en acides aminés et des quatre chaînes de carbohydrate de HSP-1 (environ 16,6 kDa) ou par tamis moléculaire et spectroscopie de masse (14 kDa et 16 kDa) (Calvete et coll., 1995). La protéine HSP-1 de 22 kDa que nous avons isolée est probablement la forme liant l'héparine (contenant quatre chaînes de carbohydrates NacNeu-Gal-GalNac) alors que la protéine HSP-1 de 17 kDa pourrait être la forme ne pouvant lier l'héparine (contenant un résidu Gal-GalNac et trois résidus GalNac). Ces résultats semblent mieux concorder avec les estimations théoriques du poids moléculaire de la protéine et les différences existant entre leur niveau de glycosylation. Étant donné que nous avons retrouvé les deux formes de la protéine HSP-1 suite à la purification, ces résultats impliquent que même la forme monomérique de HSP-1 peut lier la LDF et la PPC-agarose.

La protéine HSP-2 a aussi été purifiée selon notre nouveau protocole. Son poids moléculaire de 16 kDa diffère de celui obtenu par Calvete et coll (1995a). sur SDS-PAGE (25 kDa). Mais il semble se rapprocher du poids moléculaire évalué par spectroscopie de masse (14,0-14,7 kDa). En interprétant les résultats de Calvete et coll., HSP-2 a probablement été isolée en formant un complexe oligomérique

avec la protéine HSP-1-22-kDa alors que sa forme monomérique a pu directement interagir avec la matrice de gélatine-agarose.

3.2.2.2 La protéine HSP-12-kDa

Plus que la purification des deux formes de la protéine HSP-1 et de la protéine HSP-2, la découverte d'une nouvelle protéine du plasma séminal équin de 12 kDa confirme l'efficacité de notre nouveau protocole. Cette protéine HSP-12-kDa possède une région amino-terminale très similaire aux autres membres de la famille des protéines BSP, tout particulièrement au niveau des éléments de séquence CVFPPF et FDCT. Ces séquences constituent des régions très conservées dans cette famille de protéines puisqu'elles sont responsables de la formation du premier domaine de type II. Ces domaines que l'on retrouve au nombre de deux chez les protéines de la famille des BSP seraient responsables de la liaison à la gélatine, à la phosphocholine et probablement à l'héparine. Étant donné son homologie de séquence et son affinité pour la LDF, la PPC-agarose et la gélatine-agarose, HSP-12-kDa peut être considéré comme un nouveau membre de la famille des BSP. Un séquençage complet de cette protéine confirmera probablement nos conclusions.

Avec cette nouvelle protéine HSP-12-kDa, nous retrouvons exactement le même nombre de protéines dans le plasma séminal équin que dans le plasma séminal bovin. Comme la protéine BSP-A1/A2, HSP-1 compte deux formes glycosylées. Et comme les protéines BSP, les protéines HSP forment des oligomères. Il sera donc intéressant d'évaluer la capacité d'agrégation de HSP-12-kDa avec les protéines HSP-1 et HSP-2 afin de vérifier son implication dans l'affinité de liaison et son rôle dans le processus de fécondation. À première vue, étant donné que cette protéine semble absente des études de Calvete et coll. (1995a, 1998) sur la liaison de protéines du plasma équin à l'héparine, il est possible que la protéine HSP-12-kDa ne puisse lier l'héparine. Les analogues des protéines BSP étant reconnus pour leur rôle de modulateurs de la capacitation induite par l'héparine, il serait intéressant de vérifier l'implication de cette protéine dans la capacitation du spermatozoïde.

3.2.3 Avantages et inconvénients du nouveau protocole de purification

Ce nouveau protocole de purification a démontré son efficacité puisqu'il nous a permis d'isoler toutes les protéines BSP et leurs analogues chez d'autres espèces, et ce peu importe la concentration de l'analogue. Même si la plupart de ces protéines pourraient être purifiées selon un protocole plus habituel, nous avons su démontré que l'affinité pour la LDF est une propriété intrinsèque des protéines de la famille des BSP.

Toutefois, il est évident que cette nouvelle procédure est une version allongée des protocoles généralement rencontrés dans la littérature. L'ajout de l'étape d'isolation au LDF menant à de nombreuses manipulations (dialyse, délipidation, lyophilisation), elle ne devrait être utilisée qu'en présence de très faibles concentrations de protéines analogues aux BSP puisqu'elle engendre une augmentation du temps nécessaire à la purification et la perte possible d'une certaine quantité de matériel. Par contre, elle nous permet de traiter en peu de temps une grande quantité de protéines, en plus d'enrichir et de réduire très efficacement la fraction protéique qui sera déposée sur les colonnes d'affinité et ainsi maximiser la qualité de la purification.

Utilisant à la fois les caractéristiques physiologiques (liaison aux phospholipides) et structurelles (domaine de type II) des protéines BSP, la combinaison des colonnes de PPC-agarose et de gélatine-agarose s'est avérée un choix judicieux puisqu'elle nous a permis d'isoler de façon très spécifique les protéines de la famille des BSP. De plus, elle nous a permis d'éviter les pièges causés par l'agrégation que nécessite la liaison à l'héparine-Sepharose. L'utilisation simple de cette combinaison de matrices d'affinité demeure d'ailleurs recommandée lors de la purification d'analogues aux BSP présents en forte concentration dans le plasma séminal.

Nous espérons donc que ce nouveau protocole pourra être appliqué à d'autres espèces avec la même efficacité. Les analogues des protéines BSP se

retrouvant en très faibles concentrations chez de nombreuses espèces, beaucoup de purification reste à faire. Cette nouvelle méthode nous permettra de vérifier la présence d'analogues chez d'autres espèces et nous aidera à déterminer le rôle de ces protéines dans la capacitation.

3.3 Isolement de protéines analogues aux protéines BSP chez l'humain

Comme nous l'avons démontré précédemment, le génome humain contient des gènes offrant une forte similitude avec le gène codant pour la protéine BSP-30-kDa chez le taureau. D'autres études réalisées par dosages radioimmunologiques et par immunodétections ont par ailleurs démontré la présence dans le plasma séminal humain de faibles quantités de protéines immunologiquement apparentées aux protéines BSP. Suite à de nombreuses tentatives de purification de ces analogues humains par les membres de notre laboratoire, ces protéines n'ayant toujours pas été isolées, nous avons donc tenté de les purifier en utilisant notre nouveau protocole (Article 2.3).

L'isolement au LDF et les chromatographies sur PPC-agarose et gélatine-agarose ont été très efficaces. Ce protocole nous a permis d'éliminer une grande quantité de protéines, tout en nous permettant de conserver quatre protéines immunologiquement apparentées aux protéines BSP-A1/A2, BSP-A3 et BSP-30-kDa. En plus d'être immunologiquement apparentées, ces protéines possèdent le même profil de migration en SDS-PAGE et des poids moléculaires similaires aux protéines bovines. Au total, cette purification nous a permis d'enrichir jusqu'à 20 341 fois la protéine immunologiquement apparentée à la BSP-A1/A2 dans la fraction protéique et d'atteindre une concentration finale de 2 644 µg/g de protéines. Ces résultats témoignent de l'efficacité de notre protocole dans la purification des analogues des protéines BSP chez l'humain.

Le plasma séminal humain étant malheureusement difficile à obtenir en grand volume et la quantité de protéines résultant de cette purification demeurant insuffisante, il nous est impossible présentement de procéder aux séquençages et à

l'identification de ces protéines. Toutefois, ces protéines possèdent la même affinité de liaison pour la LDF, la PPC-agarose et la gélatine-agarose que les protéines membres de la famille des protéines BSP. Ces protéines sont aussi immunologiquement apparentées aux protéines BSP et possèdent des poids moléculaires similaires. Ces protéines pourraient donc être les analogues humains des protéines BSP.

Il est intéressant de noter que nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Leblond et coll. (1993) en ce qui concerne les protéines immunologiquement apparentées aux protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3. Toutefois, nos résultats suggèrent pour la première fois la présence d'une protéine de 28 kDa immunologiquement apparentée à la protéine BSP-30-kDa.

Malgré les grandes similitudes existant entre les protéines bovines et les protéines humaines, une importante différence demeure, leur quantité. La proportion de protéines BSP dans le plasma séminal bovin est d'environ 60% alors que les analogues que nous avons purifiés ne semblent qu'une composante mineure du plasma séminal humain. Cette différence peut avoir une grande influence quant au rôle que peut jouer ces protéines dans la capacitation du spermatozoïde humain. Toutefois, ce niveau réduit de protéines pourrait être compensé par un potentiel capacitant plus élevé chez l'humain.

Il est par ailleurs possible que ces protéines agissent en synergie avec d'autres protéines du plasma séminal humain. En effet, certaines protéines du plasma séminal, les spermadhésines, possèdent des caractéristiques communes avec les protéines BSP. Elles lient les phospholipides de la membrane du spermatozoïde au niveau de l'acrosome, interagissent avec l'héparine et certaines jouent un rôle actif lors de la capacitation (section 1.7.3.1). Il a d'ailleurs été démontré qu'une forme de spermadhésine porcine lie directement la protéine pB1 formant ainsi un oligomère capable de lier l'héparine. De plus, certaines études tendent à prouver que cette famille de protéines serait présente en plus grande quantité dans le plasma séminal des espèces contenant de faibles quantités d'analogues aux protéines BSP.

Toutefois, jusqu'à présent, aucune étude n'a démontré directement l'implication des spermadhésines dans la potentialisation de la capacitation du spermatozoïde, ni même la présence de spermadhésines chez l'humain.

Malgré ces quelques différences physiologiques, la découverte d'une famille de protéines ayant les mêmes propriétés biochimiques que les protéines BSP pourrait contribuer à une meilleure compréhension du phénomène de la capacitation chez l'humain, en plus de nous donner de nombreux indices sur l'évolution du processus menant à la fécondation chez les mammifères.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos travaux de biologie moléculaire nous ont permis de démontrer pour la première fois l'existence de gènes analogues aux gènes codant pour les protéines BSP chez le rat, le hamster, le lapin et l'humain. Parallèlement, nos études de purification nous ont permis de confirmer de nouvelles propriétés de liaison des protéines BSP en plus de permettre de découvrir la présence de nouvelles protéines analogues chez le cheval et l'humain.

Des analogues étant déjà connus chez le porc et le cheval, ces résultats combinés à la présence de protéines immunologiquement apparentées aux protéines BSP chez plusieurs espèces confirment la possibilité que la famille des protéines BSP serait largement répandue chez les mammifères.

Malgré les différences observées dans la concentration de ces analogues chez ces diverses espèces, la présence de protéines ayant des propriétés similaires aux protéines BSP chez ces mammifères pourrait fournir de nouveaux éléments aidant à une meilleure compréhension du phénomène de la capacitation. Des études physiologiques chez ces espèces combinées à une analyse des différences observées dans les séquences primaires et dans les niveaux d'expression de ces analogues, nous permettront sans doute de mieux comprendre l'évolution des mécanismes régissant la fertilité chez les mammifères.

Plus spécifiquement, chez le cheval, il sera intéressant d'étudier les propriétés d'interaction existant entre la protéine HSP-12-kDa et les autres analogues équins et de vérifier son rôle dans le processus de fécondation. La possibilité que cette protéine puisse lier l'héparine étant mise en doute, il sera intéressant de vérifier l'absence de cette interaction et son impact sur son pouvoir capacitant. Finalement, la séquence en acides aminés étant presque complétée, il sera possible de la comparer avec les autres séquences des analogues des protéines BSP et ainsi mieux identifier les régions nécessaires aux interactions des protéines BSP avec leurs ligands.

Il sera aussi important d'identifier clairement le ou les composants de la fraction de faible densité du jaune d'oeuf interagissant avec les protéines BSP et ses analogues. Certains éléments tel la grande quantité de lipoprotéines (surtout des LDL) contenue dans le jaune d'oeuf (Kuksis, 1992) ainsi que les interactions déjà observées entre cette famille de protéines et les lipoprotéines semblent militer pour une interaction directe entre les protéines BSP et cette fraction lipoprotéique du jaune d'oeuf. Des études plus approfondies, nous permettraient sans doute de raffiner et de rendre plus performant le protocole de purification que nous avons élaboré, rendant ainsi possible la purification d'analogues aux BSP chez d'autres espèces. De plus, le jaune d'oeuf étant largement utilisé dans l'industrie comme diluant du sperme lors de la cryopréservation, il sera important d'évaluer l'impact de cette interaction sur la préservation de l'intégrité membranaire et sur la conservation du pouvoir fécondant du spermatozoïde.

Finalement, les protéines que nous avons purifiées chez l'humain ayant démontrées des propriétés fortement similaires avec les protéines BSP devront être séquencées afin de confirmer leur identité. Ces protéines se retrouvant en très faibles concentrations dans le plasma séminal et l'accessibilité des spermatozoïdes épидидymaires étant très limitée, les études de capacitation chez l'humain seront très difficiles à effectuer. Toutefois, il sera possible par des dosages radioimmunologiques de déterminer l'impact des variations de leur concentration sur la fertilité humaine. Ces études nous permettront peut être d'élucider certains cas d'infertilité jusqu'alors inexplicables.

5. BIBLIOGRAPHIE

Adeoya-Osiguwa, S.A., et Fraser, L.R. A biphasic pattern of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by mouse spermatozoa *in vitro* correlates with changing functional potential. J. Reprod. Fertil. 99: 187-194, 1993.

Agrawal, P., Magargee, S.F. et Hammarstedt, M.. Isolation and characterization of the plasma membrane of rat caudal epididymal spermatozoa. J. Androl. 9: 178-189, 1998.

Alexander, F.C.M., Zemjanis, R., Graham, E.F. et Schmehl, M.L. Semen characteristics and chemistry from bulls before and after seminal vesiculectomy and after vasectomy. J. Dairy Sci. 54: 1530-1535, 1971.

Allen, C.A. et Green, D.P.L. Monoclonal antibodies which recognize equatorial segment epitopes presented de novo following the A23187-induced acrosome reaction of guinea pig sperm. J. Cell Sci. 108: 767-777, 1995.

Allison, A.C., et Hartree, E. F. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. J. Reprod. Fertil. 21: 501-515, 1970.

Amelar, R.D. et Dublin, L. Male infertility. W.B. Saunder Co. Philadelphia. 1977.

Aumuller, G. et Seitz, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex gland. Int. Rev. Cytol. 121: 127-231, 1990a.

Aumuller, G., Seitz, J., Lilja, H., Abrahamsson, P.-A., von der Kammer, H. et Scheit, K.-H. Species- and organe-specificity of secretory proteins derived from human prostate and seminal vesicles. Prostate 17: 31-40, 1990b.

Austin, C.R. Observations on the penetration of sperm into mammalian egg. Aust. J. Sci. Res. 4: 581-596, 1951.

Baker, M.E. The PDC-109 protein from bovine seminal plasma is similar to the gelatin-binding domain of bovine fibronectin and as kringle domain of human tissue-type plasminogen activator. Biochem. Biophys. Res. Comm. 130:1010-1014, 1985.

Bányai, L., Trexler, M., Koncz, S., Gyenes, M., Sipos, G. et Patthy, L. The collagen-binding site of type II units of bovine seminal fluid protein PDC-109 and fibronectin. Eur. J. Biochem. 193: 801-806, 1990.

- Bányai, L., Tordai, H. et Patthy, L. Structure and domain-domain interactions of the gelatin binding site of human 72-kilodalton type IV collagenase (gelatinase A, matrix metalloproteinase 2). *J. Biol. Chem.* 271: 12003-12008, 1996.
- Bedford, J.M. Significance of the need for capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 28: 108-120, 1983.
- Bedford, J.M. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Adv. Biosc.* 4: 35-50, 1970.
- Bellin, M.E., Hawkins, H.E., Oyarzo, J.N., Vanderboom, R.J. et Ax, R.L. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. *J. Anim. Sci.* 74: 173-182, 1996.
- Bellin, M.E., Hawkins, H.E. et Ax, R.L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J. Anim. Sci.* 72: 2441-2448, 1994.
- Bellin, M.E., Oyarzo, J.N., Hawkins, H.E., Zhang, H., Greg Smith, R., Forrest, D.W., Sprott, L.R. et Ax, R.L. Fertility associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J. Anim. Sci.* 76: 2032-2039, 1998.
- Bellve, A.R. et O'Brien, D.A. The mammalian spermatozoa: structure and temporal assembly. dans: *Mechanism and control of animal fertilization.* (édit. Hanman, J.F.), Academic Press, New York. 55-137, 1983.
- Bischoff, P., Martin-Du-Pan, R., Lauber, K., Girard, J.P., Hermann, W.L. et Sizonenko, P.C. Human seminal plasma contains a protéin that share physicochemical, immunochemical and immunosuppressive properties with pregnancy-associated plasma protein A. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56: 359-362, 1983.
- Boatman, D.E. et Robbins, R.S. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol. Reprod.* 44: 806-813, 1991.
- Bouvet, J.P., Couderc, J. et Pillet, J. *In vivo* et *in vitro* immunosuppression in mice by a 100-110 kDa fraction from de boar seminal plasma. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 14: 135-140, 1987.
- Brantmeier, S.A., Grummer, R.R. et Ax, R.L. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J. Dairy Sci.* 70: 2145-2149, 1987.

Bratanov, K., Tornyov, A. et Somlev, B. Mudulatory effect of prostaglandin E2 on the immune response on mice, with special reference to anti-sperm immunity. *Int. J. Fertil.* 31: 305-310, 1986.

Calvete, J.J., Mann, K., Sanz, L., Raida, M. et Töpfer-Petersen, E. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett.* 399: 147-152, 1996a.

Calvete, J.J., Mann, K., Schäfer, W., Sanz, L., Reinert, M., Nessau, S., Raida, M. et 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.* 310: 615-22, 1995.

Calvete, J.J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L. et Töpfer-Petersen, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. *FEBS Lett.* 407: 201-206, 1997.

Calvete, J.J., Raida, M., Sanz, L., Wempe, F., Scheit, K.H., Romero, A. et Topfer-Petersen, E. Localization and structural characterization of an oligosaccharide O-linked to bovine PDC-109. Quantitation of the glycoprotein in seminal plasma and on the surface of ejaculated and capacitated spermatozoa. *FEBS Lett.* 350: 203-206, 1994.

Calvete, J.J., Sanz, L., Dostalova, Z. et Topfer-Petersen, E. Spermadhesins: Sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. *Fertilitat.* 11: 35-40, 1995.

Calvete, J.J., Sanz, L., Enblin, M. et Topfer-Petersen, E. Sperm surface proteins. *Reprod. Dom. Anim.* 31(1): 101-105, 1996b.

Calvete, J.J., Verela, P.F., Sanz, L., Romero, A., Mann, K. et Topfer-Petersen, E. A procedure for the large-scale isolation of major bovine seminal plasma proteins. *Protein Expr. Purif.* 8: 48-56, 1996c.

Chandonnet, L., Roberts, K.D., Chapdelaine, A. et Manjunath, P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 313-318, 1990.

Chang, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698, 1951.

Cheung, W.Y. Calmodulin plays a vital role in cellular regulation. *Science* 207: 19-27, 1980.

Chow, P.H. et O, W.S. Effects of male accessory sex glands on sperm transport, fertilization and embryonic loss in golden hamsters. *Int. J. Androl.* 12: 155-163, 1988.

Clavert, A., Cranz, C. et Bollack, C. Functions of the seminal vesicles. *Andrologia* 22, suppl. 1, 185-192, 1990.

Cleary, S., Mulkerin, M.G. et Kelley, R.F. Purification and characterization of tissue plasminogen activator kringle-2 domain expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 28: 1884-1891, 1989.

Coffey, D.S. Androgen action and the the sex accessory tissues. Dans: "Physiology of Reproduction" (2nd eds Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 1081-1119, 1988.

Constantine, K.L., Madrid, M., Banyai, L., Trexler, M., Patthy, L. et Llinas, M. Refined solution structure and ligand-binding properties of PDC-109 domain b. A collagen-binding type II domain. *J. Mol. Biol.* 223: 281-298, 1992.

Constantine, K.L., Ramesh, V., Banyai, L., Trexler, M., Patthy, L. et Llinas, M. Sequence-specific ¹H NMR assignments and structural characterization of bovine seminal fluid protein PDC-109 domain b. *Biochemistry* 30: 1663-1672, 1991.

Cross, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59(1): 7-11, 1998.

Dacheux, J.L., Dacheux, F. et Paquignon, M. Changes in sperm surface membrane and the luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *Biol. Reprod.* 40: 633-651, 1989.

DasGupta, S., Mills, C.L. et Fraser, L.R. A possible role for Ca²⁺-ATPase in human sperm capacitation. *J. Reprod. Fertil.* 102: 107-116, 1994.

Dasgupta, S., Mills, C.L. et Fraser, L.R. Ca²⁺-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. Reprod. Fertil.* 99: 135-143, 1993.

Davies, D.C., Hall, G., Hibbitt, K.G. et Moore, H.D. The removal of the seminal vesicles from the boar and the effects on the semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 43: 305-312, 1975.

Davis, B.K. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. The antifertilization action of cholesterol. *Arch. Androl.* 5: 249-254, 1980.

Davis, B.K. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 7560-7564, 1981.

Davis, B.K. Uterine fluid proteins bind sperm cholesterol during capacitation in the rabbit. *Experientia* 38: 1063-1064, 1982.

de Ketser, D.M. et Kerr, J.B. The cytology of the testis. Dans: "Physiology of Reproduction" (2^e eds Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 837-932, 1988.

Dennis, E.A. Dans *The enzymes* (ed. Boyer, P.D.), 3rd edn., Academic Press, vol. 16, 307-353, 1983.

Desnoyers, L. et Manjunath, P. Major proteins of bovine seminal fluid bind to insulin-like growth factor-II. *J. Biol. Chem.* 269: 5776-5780, 1994.

Desnoyers, L. et Manjunath, P. Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices. *Arch. Biochem. Biophys.* 305: 341-349, 1993.

Desnoyers, L. et Manjunath, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J. Biol. Chem.* 267: 10149-10155, 1992.

Desnoyers, L., Thérien, I. et Manjunath, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol. Reprod. Dev.* 37: 425-435, 1994.

Eddy, E.M. et O'Brien, D.A. The spermatozoon. Dans: "Physiology of Reproduction" (2nd eds Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 27-68, 1988.

Ehrenwald, E., Foote, R.H. et Parks, J.E. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol. Reprod. Dev.* 25: 195-204, 1990.

Eliasson, R. et Johnsen, O. Interaction between seminal plasma and spermatozoa. Dans: "Andrology: Male fertility and sterility", edit. Paulson, J.D., Negro-Villar, A., Lucena, E. et Martini. Academic Press. 1986.

Eliasson, R. et Lindholmer, C. Distribution and properties of spermatozoa in the different fractions of split ejaculates. *Fertil. Steril.* 23: 252-256, 1972.

Esbenshade, K.L. et Clegg, E.D. Surface proteins of ejaculated porcine sperm and sperm incubated in the uterus. *Biol. Reprod.* 23: 530-537, 1980.

Esch, F.S, Ling, N.C., Bohlen, P., Ying, S.Y. et Guillemin, R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113: 861-867, 1983.

Fahmi, H.A., Hunter, A.G., Markham, R.J.F. et Seguin, B.E. Immunospressive activity of bovine seminal plasma on bovine lymphocytes. *J.Dairy Sci.* 68: 2315-2321, 1985.

Farooqui, A.A. Biochemistry of sperm capacitation. *Int. J. Biochem.* 15: 463-468, 1983.

Flemming, A.D. et Yanagimachi, R. Fertile life of acrosome-reacted guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 220: 109-115, 1982.

Fournier-Delpech, S. et Courot, M. Sperm-zona pellucida binding activity. Dans: *Oxford reviews of reproductive biology.* JR Clarke (éditeur), Clarendon Press, Oxford. 294-320.

Fox, C.A., Meldrum, S.L.J. et Watson, B.W. Continuous measurement by radiotelemetry of vaginal pH during human coitus. *J. Reprod. Fertil.* 33:69-75, 1973.

Fraser, L.R. Ionic control of sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7(4): 905-925, 1995.

Fraser, L.R. et McDermott, C.A. Ca^{2+} -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca^{2+} -ATPase. *J. Reprod. Fertil.* 96: 363-377, 1992.

Fraser, L.R. et Quinn, P.J. A glycolytic product is obligatory for initiation of sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J. Reprod. Fertil.* 61: 25-35, 1981.

Galantino-Homer, H.L., Visconti, P.E. et Kopf, G.S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* 56: 707-719, 1997.

Garty, N.B. et Salomon, Y. Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Lett.* 218: 148-152, 1987.

Gerwig, G.J., Calvete, J.J., Topfer-Petersen, E. et Vliegthart, J.F.G. The structure of the O-linked carbohydrate chain of bovine seminal plasma protein PDC-109 revised by H-NMR spectroscopy. A correction. *FEBS Lett.* 387: 99-100, 1996.

Go, K. J. et Wolf, D. P. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.* 32: 145-153, 1985.

Hadjisavas, M., Armstrong, D.T. et Scamark, R.F. Purification of a cell-cell adhesion regulator from porcine seminal vesicle fluid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205: 1206-1216, 1994.

Handrow, R., Boehm, S.K., Lenz R.W., Robinson, J.A. et Ax, R.L. Specific binding of glycoaminoglycan ^3H -heparine to bull, monkey and rabbit spermatozoa *in vitro*. *J. Androl.* 5: 51-63, 1984.

Handrow, R., Lenz, R.W. et Ax, R.L. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 107: 1326-1332, 1982.

Harper, M.J.K. Gamete and zygote transport. Dans: "Physiology of Reproduction" (éds Knobil, E. et Neill, J., Raven Press, New York). 103-134, 1988.

Hazen, S.L., Ford, D.A. et Gross, R.W. Activation of a membrane-associated phospholipase A2 during rabbit myocardial ischemia which is highly selective for plasmalogen substrate. *J. Biol. Chem.* 266: 5629-5633, 1991.

Hinkovska, V.T. Momchilova, A.B., Petkova, D.H. et Koumanov, K.S. Phospholipase A2 activity in ram spermatozoa plasma membranes. *Int. J. Biochem.* 19: 569-572, 1987.

Holland, S.K., Harlos, K. et Blake. C^αC^βF^γ Deriving the generic structure of fibronectin type II from the prothrombin Kringle I crystal structure. *EMBO J.* 6: 1875-1880, 1987.

Huggins, C. et Neal, W. Coagulation and liquefaction of semen. Proteolytic enzymes and citrate in prostatic fluid. *J. Exp. Med.* 76: 527-541, 1942.

Hunter, A.G. et Nornes, H.O. Characterization and isolation of a sperm-coating antigen from rabbit seminal plasma with capacity to block fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 20: 419-427, 1969.

Inskeep, P.B., Magargee, S.F. et Hammerstedt, R.H. Alterations in motility and metabolism associated with sperm interaction with accessory sex gland fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 241: 1-9, 1985.

Ishizaki, J., Hanasaki, K., Higashino, K., Kishino, J., Kikuchi, N., Ohara, O. et Arita, H. Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A2 receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 5897-5904, 1994.

Iwamoto, T., de Lamirande, E., Luterman, M. et Gagnon, C. Influence of seminal plasma components on sperm motility. Dans: *Controls of sperm motility: Biological and Clinical Aspects*. C. Gagnon, edit. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1990.

Iwamoto, T., Tanaka, H., Osada, T., Shinagawa, T., Osamura, Y. et Gagnon, C. Origin of a sperm motility inhibitor from boar seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 475-481, 1993.

James, K. et Hargreave, T.B. Immunosuppression by seminal plasma and its clinical significance. *Immunol. Today*, 5: 357-363, 1984.

Jaspard, B., Collet, X., Barbaras, R., Manent, J., Vieu, C., Parinaud, J., Chap, H. et Perret, B. Biochemical characterization of pre- β_1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. *Biochemistry* 35: 1352-1357, 1996.

Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M. et Nussenzweig, M.C. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375: 151-155, 1995.

Jinno, M., Burkman, L.J. et Coddington, C.C. Human sperm hyperactivated motility and egg penetration. *Biol. Reprod.*, 36 (suppl. 1): 53 (abstract 20), 1981.

Jones, H.P., Lenz, R.W., Palevitz, B.A. et Cormier, M.J. Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 77: 2772-2776, 1980.

Kakoski, K.A., Carron, C.P., Cabot, C.L. et Saling, P.M. Epididymal maturation and the acrosomal reaction in the mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigens. *Biol. Reprod.* 38: 221-233, 1988.

Kemme, M. et Scheit, K.H. Cloning and sequence analysis of a cDNA clone from seminal plasma vesicle tissue encoding the precursor of the major protein of bull semen. *DNA* 7: 595-599, 1988a.

Kemme, M. et Scheit, K.H. Cloning and sequence analysis of a cDNA clone from seminal plasma vesicle tissue encoding the precursor of the major protein of bull semen. *Nucleosides Nucleotides* 7: 693-697, 1988b

Killian, G.J., Chapman, D.A. et Rogowski, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.* 49: 1202-1207, 1993.

Kohane, A.C., Gonzolez Echeverria, F.M.C., Pineiro, L. et Blaquier, J.A. Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol. Reprod.* 23: 737-742, 1980a.

Kohane, A.C., Cameo, M.S., Pineiro, L. et Blaquier, J.A. Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 23: 181-187, 1980b.

- Kopecny, V., Flechon, J.E. et Pivko, J. Binding of secreted glycoproteins to spermatozoa in the mammalian epididymis: a fine structure autoradiographic study. *Anat. Rec.* 208: 197-206, 1984.
- Kornblihtt, A.R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K. et Baralle, F.E. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J.* 4: 1755-1759, 1985.
- Kuksis, A. Yolk lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1124: 205-222, 1992.
- Kunze, H., Nahas, N. et Wurl, M. Phospholipases in human seminal plasma. *Biochim. Biophys. Acta.* 348: 35-44, 1974.
- Kunze, H. Phospholipase A in the semen. Occurrence, properties and possible physiological significance. *Fortschr Med.* 99: 1609-1611, 1981.
- Lane, M.E., Thérien, I. Moreau, R. et Manjunath, P. Heparin and High-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol. Reprod.* 60: 169-175, 1999.
- Langlais, J. et Roberts, K.D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12: 183-224, 1985.
- Langlais, J., Kan, F.W.K., Granger, L., Raymond, L., Bleau, G. et Roberts, K.D. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Gamete Res.* 20: 185-201, 1988.
- Leblond, E., Desnoyers, L. et Manjunath, P. Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 443-449, 1993.
- Leclerc, P., Sirard, M.A., Chafouleas, J.G. et Lambert, R.D. Decrease in calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 94: 23-32, 1992.
- Lee, C.N., Handrow, R.R., Lenz, R.W. et Ax, R.L. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa *in vitro*. *Gamete Res.* 12: 345-355, 1985.
- Lee, M.A. et Storey, B.T. Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs; mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 34: 349-356, 1986.

- Lefebvre, R. et Suarez, S.S. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol. Reprod.* 54: 575-582, 1996.
- Lenz, R.W., Ax, R.L., Grimek, H.J. et First, N.L. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 106: 1092-1098, 1982.
- Lenz, R.W., Bellin, M.E. et Ax, R.L. Rabbit spermatozoa undergo an acrosome reaction in the presence of glycosaminoglycans. *Gamete Res.* 8: 11-19, 1983.
- Liu, C., Listcher, E.S., Mortillo, S., Sakai, Y., Kinloch, R.A. Stewart, C.L. et Wassarman. Targeted disruption of the mZP3 gene results in the production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93: 5431-5436, 1996.
- Llanos, M.N., Lui, C.W. et Meizel, S. Studies of phospholipase A2 related to the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 221: 107-117, 1982.
- Lobel, P., Dahms, N.M. et Kornfeld, S. Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 2563-2570, 1988.
- Lundquist, F. Aspect of the biochemistry of the human semen. *Acta Physiol. Scand.* 19(suppl. 66): 108, 1949.
- Mack, S.R., Zaneveld, L.J., Peterson, R.N., Hunt, W. et Russell L.D. Characterization of human sperm plasma membrane: Glycolipids and polypeptides. *J. Exp. Zool.* 243: 339-346, 1987.
- Manjunath, P. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. Dans: "Gonadal Proteins and Peptides and their Biological Significance". 49-61, 1984.
- Manjunath, P., Chandonnet, L., Baillargeon, L. et Roberts, K.D. The calmodulin-binding proteins in bovine semen. *J. Reprod. Fertil.* , 97: 75-81, 1993.
- Manjunath, P., Baillargeon, L., Marcel, Y.L., Seidah, N.G., Chrétien, M. et Chapdelaine, A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. Dans: "Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems". 259-273, 1988.
- Manjunath, P., Chandonnet, L., Leblond, E. et Desnoyers, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa [erratum apparaît dans *Biol. Reprod.* 1994 Apr;50: 977]. *Biol. Reprod.* 50: 27-37, 1994a.

Manjunath, P. et Sairam, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem. J.* 241: 685-692, 1987.

Manjunath, P., Marcel, Y.L., Uma, J., Seidah, N.G., Chretien, M. et Chapdelaine, A. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J. Biol. Chem.* 264: 16853-16857, 1989.

Manjunath, P., Sairam, M.R. et Uma, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci. Rep.* 7: 231-238, 1987.

Manjunath, P., Soubeyrand, S., Chandonnet, L. et Roberts, K. Major proteins of bovine plasma inhibit phospholipase A2. *Biochem. J.* 303: 121-128, 1994b.

Mann, T. et Lutwak-Mann, C. Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Springer-Verlag, Berlin. 1981.

Mann, T. *Handb. Physiol. Sect. 7: Endocrinol.* 5: 461-471, 1975.

Mann, T. *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.* Methuen and co., London. 1964.

Marieb, E.N. *Anatomie et physiologie humaines.* (Ed. du Renouveau pédagogique Inc., Québec). 1993.

Matousek, J. et Stanek, R. Immunosuppressive and leucolytic effect of phospholipid binding protein in bull seminal plasma. *Anim. Reprod. Sci.* 31: 1-6, 1993.

McLean, J.W., Tomlison, J.E., Kuang, W.J., Eaton, D.L., Chen, E.Y., Fless, G.M., Scanu, A.M. et Lawn, R.M. cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature* 300: 132-137, 1987.

McMullen, B.A. et Fujikawa, K. Amino acid sequence of the heavy chain of human α -factor XIIa (activated Hageman factor) *J. Biol. Chem.* 260: 5328-5341, 1985.

Means, A.R., Tash, J.S. et Chafouleas, J.G. Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol. Rev.* 62: 1-38, 1982.

Meizel, S. The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *Biol. Rev. Camb. Soc.* 59: 125-157, 1984.

Metafora, S., Peluso, G., Persico, P., Ravagnan, G., Esposito, C. et Porta, R. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. *Biochem. Pharmacol.* 38: 121-131, 1989.

Miller, D.J., et Ax, R.L. Seminal plasma: what is it and why is it important. *Proceeding of the 12th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction.* 97-107, 1988.

Miller, D.J., Winer, M.A. et Ax, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulated capacitation by heparin. *Biol. Reprod.* 42: 899-915, 1990.

Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y. et Kitamura, N. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J. Biol. Chem.* 268: 10024-10028, 1993.

Moreau, R., Thérien, I., Lazure, C. et Manjunath, P. Type II Domains of BSP-A1/A2 proteins: Binding properties, lipid efflux, and sperm capacitation potential. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 246: 148-154, 1998.

Morgan, D.O., Edman, J.C., Standring, D.N., Fried, V.A., Smith, M.C., Roth, R.A. et Rutter, W.J. Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329: 301-307, 1987.

Myles, D.G. Molecular mechanisms of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Dev. Biol.* 158: 35-45, 1993.

Neill, J. et Olds-Clarke P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrated that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res.* 18: 121-140, 1987.

Nikolopoulau, M., Soucek, D.A. et Vary, J.C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochem. Biophys. Acta.* 815: 486-498, 1985.

Okamura, N., Tajima, Y., Soejimas, A., Masuda, I.L. et Sugita, Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 260: 9699-9705, 1985.

Oliphant, G. et Singhas, C.A. Idionation of rabbit sperm plasma membrane: relationship of specific surface proteins to epididymal function and sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 21: 937-944, 1979.

Oliphant, G. Removal of sperm seminal plasma components as a prerequisite to induction of the acrosomal reaction. *Fertil. Steril.* 27: 28-38, 1976.

Ono, K., Yanagimachi, R. et Huang Jr., T.T.F. Phospholipase A of guinea pig spermatozoa: its preliminary characterization and possible involvement in the acrosome reaction. *Dev. Growth Differ.* 24: 305-310, 1982.

Oshima, A., Nolan, C.M., Kyle, J.W., Grubb, J.H. et Sly, W.S. The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 2553-2562, 1988.

Pang, S.F., Chow, P.H. et Wong, T.R. The role of seminal vesicles, coagulating glands and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. *J. Reprod. Fertil.* 56: 129-132, 1979.

Parks J.E. et Hammerstedt, R.H. Developmental changes occurring in the lipids of epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol. Reprod.* 32: 653-668, 1985.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L. et First, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.* 41: 683-699, 1989a.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Uguz, C. et First, N.L. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 51: 1099-1108, 1994.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Handrow, R.R., Sims, M.M. et First, N.L. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 40: 1020-1025, 1989b.

Patthy, L., Trexler, M., Vali, Z., Bányai, L. et Varadi, A. Kringle: Module specialized for protein binding. Homology of the gelatin-binding region of fibronectin with the kringle structures of proteases. *FEBS Lett.* 171: 131-136, 1984.

Peitz, B. et Olds-Clarke, P. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol. Reprod.* 35: 608-617, 1986.

Petersen, T.E., Thogersen, H.C., Skorstengaar, K., Vibe-Pedersen, K., Sahl, P., Sottrup-Jensen, L. et Magnusson, S. Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 80: 137-141, 1983.

Phelps, B.M., Koppel, D.E., Primakoff, P. et Myles, D.G. Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of the formation of sperm cell surface domain. *J. Cell Biol.* 111: 1839-1847, 1990.

Plant, T.M. Puberty in primate. Dans: "Physiology of Reproduction" (2nd eds Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 1763-1788, 1988.

Price, R.J., Roberts, T.K., Green, D. et Boettcher, B. Anti-complementary activity in human semen and its possible importance in reproduction. *Am. J. reprod. immunol.* 6:92-98, 1984.

Queen, K., Dhabuwala, C.B. et Pierrepoint, C.G. The effect of removal of the various accessory sex glands on the fertility of male rats. *J. Reprod. Fertil.* 62: 423-426, 1981.

Reynolds, A.B., Thomas, T.S., Wilson, W.L. et Oliphant, G. Concentration of acrosome stabilizing factor (ASF) in rabbit epididymal fluid and species-specificity of anti-ASF antibodies. *Biol. Reprod.* 40: 673-680, 1989.

Riffo, M., Lahoz, G. et Esponda, P. Immunocytochemical localization of phospholipase A2 in hamster spermatozoa. *Histochemistry* 97: 25-31, 1992.

Robaire, B. et Hermo, L. Efferent ducts, epididymis and *vas deferens*: Structure, functions, and, their regulation. Dans: "Physiology of Reproduction" (2nd eds Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 999-1080, 1988.

Roldan, E.R.S. et Harrison, R.A.P. Molecular mechanisms leading to exocytosis during the sperm acrosome reaction. dans: *Fertilization in mammals*. (Edit. Bavister, B.D., Cummins, J., Roldan, E.R.S.) Serono Symposia USA, Norwell, Massachussets. 179-196, 1990.

Roldan, E.R.S. et Mollinedo, F. Diacylglycerol stimulates the Ca²⁺-dependent phospholipase A2 of Ram spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 176: 294-300, 1991.

Romrell, L.J., O'Rand, M.G., Sandow, P.S. et Porter, J.P. Identification of surface autoantigens which appears during spermatogenesis. *Gamete Res.* 5: 35-48, 1982.

Ronkko, S. Immunohistochemical localization of phospholipase A2 in the bovine seminal vesicle and on the surface of the ejaculated spermatozoa. *Int. J. Biochem.* 24: 869-876, 1992.

Ronkko, S., Lahtinen, R. et Vanha-Perttula, T. Phospholipase A2 in the reproductive system of the bull. *Int. J. Biochem.* 23: 595-603, 1991.

Saling, P.M. Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. dans: *Oxford review of reproductive biology*, vol. II. (edit, Milligan, S.R.) Oxford University Press, Oxford. 339-388, 1989.

Sanz, L., Calvete, J.J., Mann, K., Gabius, H. et Töpfer-Petersen, E. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 37-43, 1993.

Schill, W.B., Heimbirg, N., Schiessler, H., Stolla, R. et Fritz, H. Reversible attachment and localization of acid-stable seminal plasma acrosin-trypsin inhibitors on boar spermatozoa as revealed by the indirect immunofluorescent staining technique. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 356: 1473-1476, 1975.

Scott, T.W. et Dawson, R.M.C. Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. *Biochem. J.* 108: 457-463, 1968.

Setchell, B.P. et Brooks, D.E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. Dans: "Physiology of Reproduction" (eds Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 135-185, 1988.

Seidah, N.G., Manjunath, P., Rochemont, J., Sairam, M.R. et 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.* 243: 195-203, 1987.

Seki, N., Toyama, Y. et Nagano, T. Changes in the distribution of filipin-sterol complexes in the boar sperm head plasma membrane during epididymal maturation and in the uterus. *Anat. Rec.* 232: 221-230, 1992.

Shi, Q.-X., et Roldan, E.R.S. Bicarbonate/CO₂ is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biol. Reprod.* 52: 540-546, 1995.

Shivaji, S. et Bhargava. Antifertility factors of mammalian seminal fluid. *BioEssays* 7: 13-17, 1987.

Skorstengaard, K., Thøgersen, H.C. et Petersen, T.E. Complete primary structure of the collagen-binding domain of bovine fibronectin. *Eur. J. Biochem.* 140: 235-243, 1984.

Soubeyrand, S. et Manjunath, P. Novel seminal phospholipase A2 is inhibited by the major proteins of bovine seminal plasma. *Biochem. Biophys. Acta.* 1341: 183-188, 1997.

Suarez, S.S., Drost, M., Redfern, K. et Gottlieb, W. Sperm motility in the oviduct. dans: *Fertilization in mammals.* (edit. Bavister, B.D., Cummins, J. et Roldan, E.R.S.), Serono Symposia, Norwell, Massachusetts. 155-167, 1990.

Suzuki, F. et Yanagimachi, R. Changes in the distribution in intra membranous particles and Filipin-reactive membrane sterols during *in vitro* capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res.* 23: 335-347, 1989.

Suzuki, F. Morphological aspects of sperm maturation. dans: *Fertilization in mammals.* (edit. Bavister, B.D., Cummins, J. et Roldan, E.R.S.), Serono Symposia, Norwell, Massachussetts. 65-75, 1990.

Tarter, T.H. et Alexander, N.J. Complement-inhibiting activity of seminal plasma. *Am. J. Reprod. Immunol.* 6: 28-32, 1984.

Tauber, P.F. et Zaneveld, L.J.D. Coagulation and liquefaction of human semen. dans: *Human semen and fertility regulation in men*, edit. par E.S.E. Hafez. 153-166, 1976.

Taylor, M.E., Conary, J.T., Lennartz, M.R., Stahl, P.D. et Drickamer, K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J. Biol. Chem.* 265: 12156-12162, 1990.

Thakkar, J.K., East, J. et Franson, R.C. Modulation of phospholipase A2 activity associated with human sperm membranes by divalent cations and calcium antagonists. *Biol. Reprod.* 30: 679-686, 1984.

Thakkar, J.K., East, J., Seyler, D. et Franson, R.C. Surface-active phospholipase A2 in mouse spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* 754: 44-50, 1983.

Thérien, I., Bleau, G. et Manjunath, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.* 52: 1372-1379, 1995.

Thérien, I., Moreau, R. et Manjunath, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epidymal sperm. *Biol. Reprod.* 59: 768-776, 1998.

Thérien, I., Soubeyrand, S. et Manjunath, P. Major proteins of seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.* 1080-1088, 1997.

Thomas, T.S., Reynold, A.L. et Oliphant, G. Evaluation of the site of synthesis of rabbit sperm acrosome stabilizing factor using immunocytochemical and metabolic labeling techniques. *Biol. Reprod.* 30: 693-705, 1984.

Trexler, M. et Patthy, L. Folding autonomy of the kingle 4 fragment of human plasminogen. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 80: 2457-2461, 1983.

Uguz, C., Vrendenburgh, W.L. et Parrish, J.J. Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3',5'-cyclic monophosphothioate. *Biol. Reprod.* 51: 1031-1039, 1994.

Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P. et Kopf, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121: 1129-1137, 1995a.

Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P. et Kopf, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121: 1139-1150, 1995b.

Visconti, P., Galantino-Hormer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornés, M. et Kopf, G.S. The molecular basis of sperm capacitation. *J. Androl.* 19: 242-248, 1998.

Visconti, P., Johnson, L., Oyaski, M., Fornés, M., Moss, S.B., Gerton, G.L. et Kopf, G.S. Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.* 192: 351-363, 1997.

Visconti, P., Muschietti, J.P., Flawia, M.M. et Tezon, J.G. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* 1054: 231-236, 1990.

Voglmayr, J.K. et Sawyer, F.R. Surface transformation of ram spermatozoa in uterus, oviductal and cauda epididymal fluids *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 78: 315-325, 1986.

Vreeburg, J.T.M., Holland, M.K. et Orgebin-Crist, M.C. Binding of epididymal proteins to rat spermatozoa *in vivo*. *Biol. Reprod.* 40: 588-597, 1992.

Waite, M. Dans *The phospholipases* (ed. Hanahan, D.J.), Plenum Press, 111-133, 1987.

Weinman, D.F. et Williams, W.L. Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa. *Nature* 203: 423-424, 1964.

Weinman, S., Ores-Carton, C., Rainteau, D. et Puzkin, S. Immunoelectron microscopic localization of calmoduline and phospholipase A2 in spermatozoa. *J. Histochem. Cytochem.* 34: 1171-1179, 1986.

Williams-Ashman, H.G. Transglutaminases and the clotting of mammalian seminal fluids. *Mol. Cell Biochem.* 58: 51-61, 1984.

Williams-Ashman, H.G. Perspectives in the Male Sexual Physiology of eutherian mammals. Dans: "The physiology of reproduction". (eds Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 727-751, 1988.

Wolf, D.E., Hagopian S.S. et Isogima, S. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during *in vitro* capacitation in the mouse. J. Cell Biol. 102: 1372-137, 1986.

Wurl, M. et Kunze, H. Purification and properties of phospholipase A2 from human seminal plasma. Biochim. Biophys. Acta 834: 411-418, 1985.

Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. Dans: "Physiology of Reproduction" (2nd eds Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 135-185, 1988.

Yeagle, P.L. Cholesterol and the cell membrane. Biochim. Biophys. Acta. 822: 267-287, 1985.

Zeng, Y., Oberdorf, J.A. et Florman, H.M. pH regulation in mouse sperm. Identification of Na^+ , Cl^- and HCO_3^- dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their role in sperm capacitation. Dev. Biol. 173: 512-0-520, 1996