

2411.2644.3

Université de Montréal

**L'héparine et les lipoprotéines de haute densité induisent la
capacitation des spermatozoïdes par des mécanismes différents**

Par
Marie-Eve Lane
Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Biochimie

Novembre 1998
©Marie-Eve Lane, 1998



Σ. 4426. 1116

W

4

U58

1998

V.095

L'opinion de l'auteur

L'opinion de l'auteur de la présente notice est la
résultat de son examen personnel par des méthodes différentes

Le présent document est
la propriété de l'auteur

Il est interdit de reproduire
ou de diffuser ce document
sans la permission écrite de
l'auteur



Le présent document est
la propriété de l'auteur

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
“L’héparine et les lipoprotéines de haute densité induisent la capacitation des
spermatozoïdes bovins par des mécanismes différents”

Présenté par :
Marie-Eve Lane

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Margaret Mamet-Bratley : président-rapporteur

Dr. Puttaswamy Manjunath : directeur de recherche

Dr. Michèle Brochu : membre du jury

Mémoire accepté le : *9 novembre*
~~27 novembre~~ 1998

SOMMAIRE

Suite à l'éjaculation, le spermatozoïde est inapte à féconder l'ovule. Il doit subir une série de modifications qui vont lui permettre de fusionner avec l'oeuf. Cette série de modifications se nomme la capacitation et a lieu dans le tractus génital femelle. Les étapes exactes de la capacitation sont encore peu connues, mais nous connaissons les agents du fluide folliculaire et oviductal qui agissent comme inducteur de la capacitation des spermatozoïdes. Chez le bovin, l'héparine et les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont connues comme étant de bons inducteurs. Chez le bovin, une famille de protéines majoritaires du plasma séminal bovin, les protéines BSP, seraient importantes dans la capacitation des spermatozoïdes induite par l'héparine et par les HDL. Le but de cette étude était de mieux connaître les mécanismes de capacitation induite par l'héparine et les HDL.

Dans la présente étude, nous avons utilisé des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines BSP, dans nos essais de capacitation *in vitro*, pour confirmer premièrement l'importance des protéines BSP dans la capacitation et deuxièmement pour mieux vérifier si les protéines BSP agissaient au même niveau dans la capacitation induite par l'héparine et celle induite par les HDL. De récentes études indiquaient qu'une des transformations observée suite à la capacitation induite par l'héparine est l'augmentation de la phosphorylation des tyrosines associées à l'augmentation du niveau de capacitation. Ainsi nous avons étudié ce type de phosphorylation suite à la capacitation induite par l'héparine et les HDL pour vérifier si ces deux agents capacitants entraînaient les mêmes modifications des niveaux de phosphorylation.

Nos résultats indiquent la présence de deux mécanismes indépendants de capacitation des spermatozoïdes. L'addition des anticorps contre les protéines BSP entraînait une inhibition de la capacitation lorsqu'elle était induite par l'héparine. Par contre, ces anticorps n'avaient aucun effet sur la capacitation induite par les HDL. Dans le cas de la capacitation induite par l'héparine, les protéines BSP agiraient en tant que site de liaison de l'héparine. La liaison de l'anticorps aux protéines BSP préviendrait la liaison subséquente de l'héparine ce qui expliquerait l'inhibition de la capacitation observée. Pour la capacitation avec les HDL, les protéines BSP agissent indépendamment des HDL. Comme il a été démontré dans notre laboratoire les BSP agiraient plutôt en stimulant un premier efflux de cholestérol qui aurait lieu dans les secondes suivant l'éjaculation. Les résultats de phosphorylation sont venus confirmer notre hypothèse voulant qu'il y ait deux mécanismes de capacitation. Les HDL n'entraînaient pas d'augmentation de la phosphorylation des tyrosines contrairement à l'héparine. Nos résultats nous permettent donc de conclure que les mécanismes de capacitation induite par l'héparine et les HDL sont différents.

Table des matières

	Pages
Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste de sigles et des abréviations	ix
Remerciements	xi
1. INTRODUCTION	1
1.1. La fécondation	1
1.2. Maturation épидидymaire	2
1.3. Capacitation des spermatozoïdes	5
1.3.1. Changements morphologiques durant la capacitation	6
1.3.2. Rôle de l'héparine dans la capacitation	8
1.3.2.1. Introduction	8
1.3.2.2. Caractérisation de l'héparine et des glycosaminoglycans	9
1.3.2.2.1. Les glycosaminoglycans	9
1.3.2.2.2. L'héparine	10
1.3.2.3. Interaction de l'héparine avec le spermatozoïde	10
1.3.2.3.1. Effet de l'héparine sur la capacitation	10
1.3.2.3.2. Liaison de l'héparine aux spermatozoïdes	11
1.3.2.3.3. Caractérisation biochimique de la capacitation et implication de l'héparine	12
1.3.3. Rôle des lipoprotéines de haute densité dans la capacitation	17

1.3.3.1. Introduction	17
1.3.3.2. Effet du cholestérol sur la capacitation	18
1.3.3.3. Mécanisme de la capacitation induite par les HDL	19
1.3.4. Rôle du plasma séminal sur la capacitation	19
1.3.4.1. Les protéines BSP	20
1.3.4.1.1. Historique	20
1.3.4.1.2. Propriétés biochimiques	21
1.3.4.1.3. Structure	22
1.3.4.1.4. Présence de protéines analogues aux protéines BSP chez différentes espèces animales	24
1.3.4.2. Rôle physiologique des protéines BSP	25
1.3.4.2.1. Introduction	25
1.3.4.2.2. Interaction avec les spermatozoïdes	25
1.3.4.2.3. Interaction avec les phospholipides	25
1.3.4.2.4. Interaction avec l'héparine	26
1.3.4.2.5. Interaction avec l'apolipoprotéine A-I	27
1.4. Réaction de l'acrosome	28
1.5. Description du projet de recherche	33
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	36
2.1. Produits chimiques	36
2.2. Matériel biologique	36
2.2.1. Plasma séminal bovin	36
2.3. Purification des protéines BSP	36
2.3.1. Chromatographie d'affinité sur colonne de gélatine-Agarose	36
2.3.2. Chromatographie sur tamis moléculaire Séphadex G-50	37

2.4. Génération d'anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines BSP	37
2.4.1. Purification des anticorps anti-protéines BSP	38
3. RÉSULTATS	39
3.1. Purification des protéines du plasma séminal bovin	39
3.1.1. Chromatographie sur gélatine-Agarose	39
3.1.2. Chromatographie sur Séphadex G-50 en milieu acide	39
3.1.3. Dernière étape de purification	43
3.1.3.1. Chromatographie sur G-50 en milieu basique	43
3.1.3.2. Chromatographie sur gélatine-Agarose	43
3.2. Génération des anticorps polyclonaux contre les protéines BSP	48
4. ARTICLE	
Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. <u>M-E. Lane</u> , I. Thérien, R. Moreau et P. Manjunath.	50
5. DISCUSSION	79
5.1. Purification des protéines BSP et génération des anticorps polyclonaux	80
5.2. Capacitation induite par l'héparine	81
5.3. Capacitation induite par les HDL	83
5.4. Analyse de la phosphorylation induite par l'héparine et les HDL	84
5.5. Conclusions et perspectives	85
6. BIBLIOGRAPHIE	88

Liste des figures

	Page
Figure 1-1. Vue générale d'un spermatozoïde de mammifère	3
Figure 1-2. Modèle montrant les voies de signalisation hypothétiques transmembranaires et intracellulaires qui jouent un rôle dans la régulation de la capacitation des spermatozoïdes	13
Figure 1-3. Représentation de la structure secondaire des protéines BSP-A1/A2, -A3 et 30 kDa	23
Figure 1-4. Structure de la tête du spermatozoïde chez les diverses espèces	29
Figure 1-5. Représentation de la réaction de l'acrosome et pénétration du spermatozoïde	31
Figure 1-6. Voies hypothétiques impliquées dans la réaction de l'acrosome induite par la zone pellucide	32
Figure 3-1. Purification des cBSP par chromatographie d'affinité sur gélatine-Agarose	40
Figure 3-2. Purification de la protéine BSP-A1/A2 sur un tamis moléculaire Séphadex G-50	41
Figure 3-3. Purification de la protéine BSP-30 kDa sur un tamis moléculaire Séphadex G-50	42
Figure 3-4. Purification de la protéine BSP-A3 sur un tamis moléculaire Séphadex G-50	44
Figure 3-5. Purification de la protéine BSP-A1/A2 sur un tamis moléculaire Séphadex G-50 basique	45
Figure 3-6. Purification de la protéine BSP-A3 sur un tamis moléculaire Séphadex G-50	46
Figure 3-7. Purification de la protéine BSP-30 kDa par chromatographie d'affinité sur gélatine-Agarose	47
Figure 3-8. Purification des anticorps contre la protéine BSP-A1/A2 sur protéine A-Sépharose	49

LISTE DE SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

°C:	degré Celsius
%:	pourcentage
A:	ampère
AFS:	facteur stabilisateur de l'acrosome
AMPc:	adénosine monophosphate cyclique
ApoA-I:	apolipoprotéine A-I
ATP:	adénosine triphosphate
BSA:	albumine sérique de boeuf (bovine serum albumin)
BSP:	plasma séminal bovin (bovine seminal plasma)
cBSP:	précipité protéique du plasma séminal bovin (Crude bovine seminal plasma proteins)
DAG:	diacylglycérol
db-AMPc:	dibutyryl adénosine monophosphate cyclique
EDTA:	acide (éthylènedinitrilo) tétraacétique ([Ethylenedinitrilo] tetraacetic acid)
g:	gramme
GAG:	glycosaminoglycan
h:	heure
HCO ₃ ⁻ :	bicarbonate
HCL:	acide chlorhydrique
HDL:	lipoprotéine de hautes densité (high-density lipoprotein)
HSP:	plasma séminal de cheval (horse seminal plasma)
IBMX:	3-isobutyl-1-méthylxanthine
kDa:	kilodalton

LDL:	lipoprotéine de faible densité (low density lipoprotein)
M:	molaire
mM:	millimolaire
ml:	millilitre
nm:	nanomètre
PAGE:	électrophorèse sur gel de polyacrylamide (polyacrylamide gel electrophoresis)
PAF:	facteur activateur de plaquette
PAF-AH:	acétylhydrolase du facteur activateur de plaquettes (platelet activating factor acetylhydrolase)
PBS:	tampon phosphate salin
PC:	phosphatidylcholine
PKA:	protéine kinase dépendante de l'AMPc
Rp-AMPSc:	Rp-adénosine-3',5'-monophosphorothioate cyclique
SDS:	dodécyl sulfate de sodium
TBS:	tampon tris salin (Tris-buffered saline)
TLC:	chromatographie sur couche mince (thin layer chromatography)
Tris:	tris - (hydroxyméthyl) aminométhane
μ M:	micromolaire
μ l:	microlitre
v:	volume
VLDL:	lipoprotéine de très faible densité (very low density lipoprotein)
ZP:	zone pellucide

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le docteur Manjunath pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour me permettre de faire ma maîtrise.

J'aimerais également remercier tous mes collègues de labo qui m'ont aidée tout au long de ces deux années. Plus particulièrement, j'aimerais remercier Robert et Isabelle pour leurs bonnes idées et leur grande connaissance du sujet. Merci aussi à Martin, Dominique (oups "c") avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à discuter et à travailler. Merci également à Sébastien pour ses nombreux trucs sans lesquels la vie aurait été beaucoup plus difficile. Merci aussi aux autres qui m'avez fait apprécier grandement mes deux années de maîtrise.

J'aimerais finalement remercier mes parents pour leur soutien constant et surtout Alexandre pour son aide et sa compréhension tout au long de ma maîtrise.

1. INTRODUCTION

1.1. La fécondation

Chez les mammifères, la fécondation est à la base de la vie. La fécondation est une suite d'évènements très précis qui mènent à la création d'un nouvel être. Des spermatogonies (cellules souches des spermatozoïdes retrouvées dans les testicules) aux spermatozoïdes prêts à féconder l'ovule, ces cellules subissent plusieurs transformations. La première étape est la transformation des spermatogonies en spermatozoïdes. Cette étape a lieu au niveau du testicule et s'appelle la spermatogenèse. Par la suite, il y a la maturation épидидymaire qui se fait tout au long de l'épididyme. Suite à l'éjaculation dans le tractus génital femelle, les spermatozoïdes subissent la capacitation, une maturation tardive leur permettant d'acquérir le pouvoir de subir la réaction de l'acrosome et ainsi de féconder l'ovule. Suite à ces transformations, les spermatozoïdes sont capables de pénétrer les différentes couches entourant l'ovule (i.e. *cumulus oophorus* et la zone pellucide) et de fusionner avec l'ovule. La fusion des gamètes (spermatozoïde et ovule) enclenche une série d'évènements: l'activation de l'ovule fécondé, l'exocytose des granules corticaux et le blocage de l'entrée des autres spermatozoïdes, la décondensation du noyau spermatique à l'intérieur du cytoplasme de l'ovule et le développement puis l'association des pronucléi de l'ovule et du spermatozoïde (Yanagimachi, 1994).

Pour les besoins du présent mémoire, seules les étapes de maturation du spermatozoïde seront présentées plus en détails. Plus spécifiquement, nous aborderons la maturation épидидymaire (section 1.2), la capacitation (section 1.3) et la réaction de

l'acrosome (section 1.4).

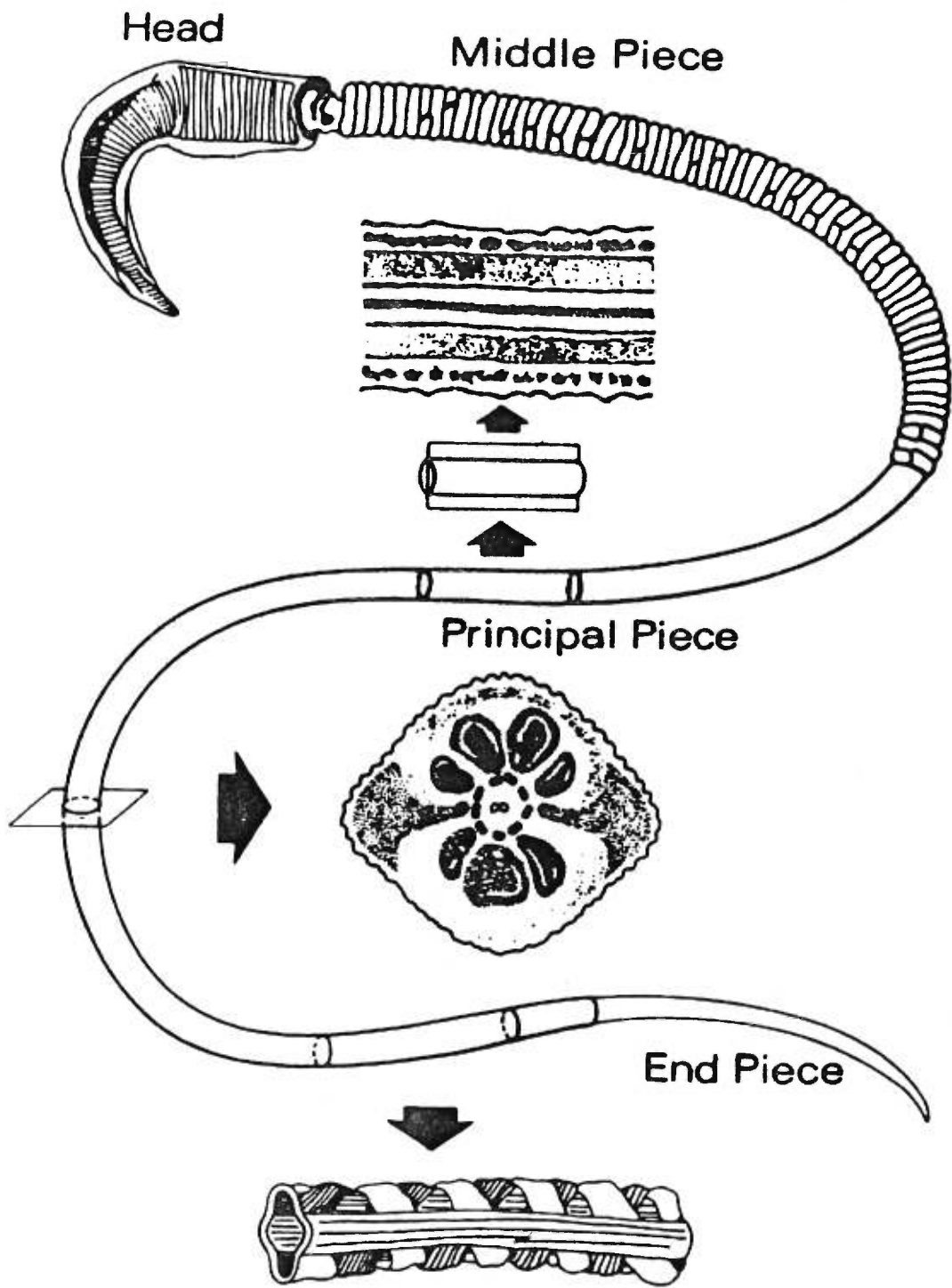
1.2. Maturation épидидymaire

Une des modifications les plus importantes durant la maturation épидидymaire est le développement de la motilité du spermatozoïde. Ce manque de motilité est associé à l'immaturité de la membrane plasmique du spermatozoïde (Figure 1-1). Si la membrane plasmique des spermatozoïdes de la tête de l'épididyme est enlevée et qu'ils sont incubés avec de l'adénosine triphosphate (ATP), de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et des ions magnésium, ils acquièrent une motilité semblable à celle des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme (Ishijima *et al.*, 1985; Mohri et Yanagimachi, 1980; White et Volglmayr, 1986; Ishijima et Mohri, 1985; Mohri et Ishijima, 1989). Lors du passage des spermatozoïdes dans l'épididyme, il y a une modification des macromolécules (antigènes) se trouvant sur la membrane plasmique et un apport de nouvelles macromolécules provenant des sécrétions de l'épididyme (Bellve et O'Brien, 1983; Eddy *et al.*, 1985). Certaines protéines du liquide épидидymaire, telle la protéine responsable de la motilité (forward motility protein) (Acott et Hoskins, 1981; Acott *et al.*, 1983; Hoskins *et al.*, 1979) et la glycérolphosphocholine (Infante et Huszagh, 1985) joueraient un rôle dans l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes. Aussi, il y aurait une altération d'un système de signalisation intracellulaire modulé par une protéine kinase dépendante de l'AMPc (Wooten *et al.*, 1987). De plus, il y aurait des mécanismes gardant un faible niveau d'ions calcium intracellulaires (Vijayaraghvan *et al.*, 1990) durant le transit du spermatozoïde dans l'épididyme. Ces mécanismes permettraient aux spermatozoïdes d'acquérir leur motilité.

Figure 1-1. Vue générale d'un spermatozoïde de mammifère

Vue générale d'un spermatozoïde montrant les différentes parties.

Tiré de: "The physiology of Reproduction, Second Edition" par Eddy et O'Brien, 1994.



Bien qu'essentielle, la quantité de protéines ajoutée à cette étape est très faible en comparaison à celles ajoutées au niveau du plasma séminal lors de l'éjaculation (Russell *et al.*, 1984).

Durant la maturation épидидymaire, des changements au niveau des protéines liées au spermatozoïde se produisent. Globalement, les plus grands changements ont lieu au niveau de la tête et du corps de l'épididyme (Dacheux *et al.*, 1989; Lakoski *et al.*, 1989; Phillips *et al.*, 1991).

La majeure partie des macromolécules que l'on retrouve associées à la membrane plasmique du spermatozoïde sont des glycoprotéines. Ce type de protéines est impliqué dans diverses fonctions cellulaires (structure, transport, récepteur, adhésion, etc.). Ces protéines peuvent donc être impliquées dans une ou plusieurs étapes de la fécondation. La modification des glycoprotéines déjà présentes ainsi que l'addition de nouvelles protéines provenant du liquide épидидymaire seraient réalisées par des enzymes tels la galactosyltransférase et la sialyltransférase (Bernal *et al.*, 1980; Hamilton, 1980; Hamilton et Gould, 1980; Tulsiani *et al.*, 1993) et une protéine semblable à l' α -lactalbumine (Hamilton, 1981; Jones et Brown, 1982). Lorsque le spermatozoïde est mature, les glycoprotéines se trouvent réparties sur la membrane de la tête et de l'acrosome du spermatozoïde (Phelps *et al.*, 1990; Phelps et Myles, 1987). Ces glycoprotéines ont plusieurs rôles. Entre autres, le facteur stabilisateur de l'acrosome (ASF) peut stabiliser la membrane plasmique et prévenir une réaction prématurée de l'acrosome (Reynolds *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 1984). L'antigène M42 et la protéine PH-20, sont impliqués dans l'interaction entre les spermatozoïdes et la zone pellucide

(Lakoski *et al.*, 1988; Phelps *et al.*, 1990; Phelps et Myles, 1987). La protéine PH-30 est impliquée dans l'interaction des spermatozoïdes avec la membrane plasmique de l'oeuf lors de la fécondation (Primakoff *et al.*, 1987).

La membrane plasmique du spermatozoïde subit une modification de sa composition lipidique au cours de la maturation épидидymaire (Nikolopoulou *et al.*, 1985; Parks et Hammerstedt, 1985; Schlegel *et al.*, 1986; Wolf *et al.*, 1988; Wolf et Volglmayer, 1984). Certaines régions de l'épididyme synthétisent beaucoup de cholestérol (Hamilton, 1971; Hamilton et Fawcett, 1970) et ce cholestérol est ajouté à la membrane plasmique des spermatozoïdes en maturation (Seki *et al.*, 1992; Suzuki, 1988; 1990). Ce processus suggère que le cholestérol est une molécule clé qui entraîne une modification des caractéristiques membranaires du spermatozoïde durant la maturation (Parks et Hammerstedt, 1985). La stabilisation de la membrane par le cholestérol lors de la maturation épидидymaire permettra aux spermatozoïdes de se rendre jusqu'à l'ovule.

La formation de ponts disulfures lors de la maturation épидидymaire empêcherait les spermatozoïdes de subir une capacitation prématurée et par le fait même empêcherait la réaction de l'acrosome, les gardant en parfait état pour se rendre à leurs site d'action. Ces ponts disulfures se formeraient au niveau des protéines de la queue du spermatozoïde (Bedford et Calvin, 1974a) ainsi que dans la chromatine du noyau (Bedford et Calvin, 1974b; Pellicciari *et al.*, 1983; Kosower *et al.*, 1992).

1.3. Capacitation des spermatozoïdes

Suite à l'éjaculation, les spermatozoïdes doivent subir une série de transformations pour leur permettre d'acquérir le pouvoir de féconder un ovule. Ces

transformations physiologiques et fonctionnelles ont lieu lors de leur séjour dans le tractus génital femelle. Ce processus s'appelle la capacitation et rend le spermatozoïde apte à subir la réaction de l'acrosome (voir section 1.4) (revue par Yanagimachi, 1994).

1.3.1. Changements morphologiques durant la capacitation

Selon les espèces, le temps et les conditions de capacitation varient (Austin, 1985). Par contre, les transformations qui se produisent au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde restent à peu près les mêmes. Il y a une redistribution des protéines ainsi qu'une redistribution des lipides de la surface des spermatozoïdes. Entre autres, l'addition et la disparition de protéines de surface ont été rapportées chez la souris (Okabe *et al.*, 1986a; 1986b), chez le bouc (Volglmayr et Sawyer, 1980) et chez l'humain (Focarelli R *et al.*, 1998). Ce va-et-vient de protéines peut être causé par l'interaction entre plusieurs composantes (protéines ou lipides). Plus spécifiquement, lors de la capacitation, la disparition d'une protéine ou d'un lipide, peut exposer à la surface une protéine membranaire. Cette protéine nouvellement démasquée pourrait prendre part à l'interaction du spermatozoïde avec l'ovule. Koehler *et al.* (1980) ont d'ailleurs suggéré un processus similaire où l'enlèvement d'une protéine semblable à la fibronectine entraînerait l'exposition de nouvelles protéines membranaires facilitant ainsi l'action de diverses protéines impliquées dans la capacitation ou la réaction de l'acrosome.

Des modifications de la composition lipidique de la membrane plasmique du spermatozoïde sont aussi associées à la capacitation. Le cholestérol jouerait un rôle important dans la régulation de l'orientation, de la fluidité et de l'épaisseur des

membranes lipidiques (Presti, 1985; Wolf et Cardullo, 1991). Plusieurs équipes rapportent qu'il y aurait une perte de cholestérol membranaire (efflux) durant la capacitation (Go et Wolf, 1985; Langlais et Roberts, 1985; Ehrenwald *et al.*, 1990; Thérien *et al.*, 1998). Il a été prouvé *in vitro*, que ce retrait de cholestérol serait dû en partie à l'albumine sérique (BSA), que l'on retrouve dans les milieux de capacitation des mammifères, qui agirait comme un accepteur de cholestérol de la membrane plasmique du spermatozoïde (Langlais et Roberts, 1985; Go et Wolf, 1985; Cross, 1998). Des études montrent que d'autres protéines liant le cholestérol pourraient remplacer l'albumine telles les HDL (voir section 1.3.) ou la protéine de transfert des lipides présente dans les fluides folliculaire et oviductal (deLamirande *et al.*, 1997; Thérien *et al.*, 1997). Des études ont montré que suite à l'ajout de cholestérol dans le milieu de capacitation, il y a arrêt de celle-ci (Ehrenwald *et al.*, 1988). Puisque, l'équipe de Cross (1996) a montré la présence de cholestérol dans le sperme humain. Ceci pourrait expliquer l'effet d'inhibition de la capacitation qu'a le plasma séminal sur les spermatozoïdes (Chang, 1951). Cette inhibition se ferait en empêchant l'efflux de cholestérol de la membrane plasmique du spermatozoïde (Cross, 1998; 1996; Zarintash et Cross, 1996; Cross et Razy-Faulfner, 1997). Des travaux effectués avec des spermatozoïdes de cobaye ont montré que, suite à la capacitation, il manquerait des particules intramembranaires dans des régions de la membrane plasmique du spermatozoïde. Ces zones contiendraient très peu ou pas de stérol (Friend, 1980; Bearer et Friend, 1982). D'autres équipes suggèrent plutôt que ce serait la relocalisation ou la redistribution des lipides qui seraient importantes dans la capacitation (Austin, 1951; Chang, 1951). Globalement, les changements observés dans la composition de la membrane plasmique des spermatozoïdes faciliteraient la capacitation en la déstabilisant

ou en la rendant fragile.

Des études ont identifié plusieurs inducteurs de la capacitation tels: la β -amylase et la β -glucuronidase (Gwatkin, 1977), la neuramidase et des protéinases (Johnson, 1975, Shinohara *et al.*, 1985), des hydrolases lysosomiales (Rahi et Srivastava, 1983; 1984), l'anhydrase carbonique (Collado *et al.*, 1979), la sulfatase stéroïdienne (Langlais et Roberts, 1985; Legault *et al.*, 1980); les glycosaminoglycans (Miller et Ax, 1989; Miller *et al.*, 1990; Parrish *et al.*, 1988a et b; 1989a et b), les catécholamines (Helm *et al.*, 1982), les accepteurs des stérols tels l'apolipoprotéine A-I (apoA-1) et les lipoprotéines de haute densité (HDL) (Langlais et Roberts, 1985), la taurine et l'hypotaurine (Meizel *et al.*, 1980). Mentionnons que la fécondation ne peut avoir lieu qu'entre deux gamètes de la même espèce. Toutefois, des études ont montré que les spermatozoïdes d'une espèce peuvent être capacités par des inducteurs provenant de plusieurs autres espèces (DeMayo *et al.*, 1980; Funaki *et al.*, 1983; Hirst *et al.*, 1981; Rao *et al.*, 1984; Saling et Bedford, 1981). Cependant les conditions nécessaires à la capacitation varient d'une espèce à l'autre (Miller et Ax, 1990).

Les trois prochaines sections vont présenter trois principaux facteurs de la capacitation des spermatozoïdes bovins: l'héparine, les HDL et les protéines du plasma séminal bovin (BSP).

1.3.2. Rôle de l'héparine dans la capacitation

1.3.2.1. Introduction

Plusieurs protéoglycans (glycoconjugués) sont impliqués dans les différentes

étapes de la fécondation: capacitation, réaction de l'acrosome et liaison du spermatozoïde à l'oeuf (Miller et Ax, 1990). Les protéines de type glycosaminoglycosylées (GAG) sont importantes dans la capacitation (Handrow *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1986; Parrish *et al.*, 1989a; 1989b) et la réaction de l'acrosome (Handrow *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1985). Plusieurs types de GAG sont utilisés pour induire la capacitation chez des espèces telles les bovins, les humains et les ovins (Lee et Ax, 1984; Lee *et al.*, 1986; Thérien *et al.*, 1995).

Le GAG ayant le plus de potentiel pour induire la capacitation et la réaction de l'acrosome est l'héparine (Florman et First, 1988). Des études ont montré que la réaction de l'acrosome n'était que le résultat final de l'induction et que l'héparine stimulait la capacitation. L'héparine cause des changements dans la membrane du spermatozoïde et dans la membrane recouvrant l'acrosome (Parrish *et al.*, 1988a).

1.3.2.2 Caractérisation de l'héparine et des glycosaminoglycans

1.3.2.2.1. Les glycosaminoglycans

Les glycosaminoglycans (GAG) sont de longues chaînes de polysaccharides composées d'unités de disaccharides répétitives qui sont attachées de façon covalente, à l'exception de l'acide hyaluronique, à un noyau protéique pour former les protéoglycans (Meizel, 1985). Les disaccharides formant les GAG sont composés d'un sucre et d'un sucre aminé (N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine) d'où leur nom. Les groupements carboxyls et sulfates retrouvés sur plusieurs résidus de sucre rendent les GAG fortement chargés négativement. Ce sont les sucres, leur nombre, le type de liaison entre les résidus et la localisation des groupements sulfates qui nous permettent

de classer les GAG en quatre groupes: les hyaluronanes, les sulfates de chondroïtine (dermatane), les sulfates d'héparane (héparine) et les sulfates de kératane (kératine). La plupart des protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène, etc.) possèdent des sites de liaison pour les GAG (Ruoslahti, 1988).

1.3.2.2. L'héparine

Comme l'héparine est le GAG le plus important pour la capacitation des spermatozoïdes bovins (Parrish *et al.*, 1988a), nous nous intéresserons plus particulièrement à ce composé. L'héparine a une masse moléculaire de 6 à 25 kDa. Son unité répétitive disaccharidique ([A-B]_n) est constituée de l'acide D-glucuronique ou de l'acide L-iduronique (A) et du *N*-acétyl-D-glucosamine (B). D'autres sucres peuvent aussi être retrouvés: le D-galactose ou le D-xylose. L'héparine est le GAG qui contient le plus de groupements sulfates (2.0 à 3.0 par unité de disaccharide), ce qui lui confère une plus grande densité de charge. En raison de cette charge plus élevée, l'héparine est le GAG qui interagit le plus avec les ligands.

1.3.2.3. Interaction de l'héparine avec les spermatozoïdes

1.3.2.3.1. Effet de l'héparine sur la capacitation et la réaction de l'acrosome

L'équipe de Lenz *et al.*, (1982; 1983a) ont montré que les protéoglycans du liquide folliculaire permettaient aux spermatozoïdes, prélevés de la queue de l'épididyme, de subir la réaction de l'acrosome après une incubation de 22 heures et après seulement 9 heures pour ceux éjaculés. Divers types de GAG ont ainsi été testés

afin d'induire la capacitation chez les spermatozoïdes épидидymaires bovins et il s'avère que plus un GAG est sulfaté, plus il favorise la capacitation du spermatozoïde, le meilleur inducteur étant l'héparine (Handrow *et al.*, 1982). Suite à la découverte de l'induction de la réaction de l'acrosome par la zone pellucide, le groupe de Parrish *et al.*, (1988a) a pu démontrer que l'effet de l'héparine agissait sur la capacitation et non sur la réaction de l'acrosome.

Également, des études ont montré la stimulation de spermatozoïdes de d'autres espèces par l'héparine telles: le lapin (Lenz *et al.*, 1983b) et le porc (Reyes *et al.*, 1984). L'addition de différents types de GAG chez certaines espèces entraînait aussi une augmentation du taux de réaction de l'acrosome, l'héparine étant toujours le meilleur inducteur chez ces espèces. Chez le bovin, la capacitation des spermatozoïdes éjaculés à l'aide d'héparine se fait en moins de 5 heures (Parrish *et al.*, 1988a; Thérien *et al.*, 1995).

1.3.2.3.2. Liaison de l'héparine aux spermatozoïdes

Des études de radioliasion ($[^3\text{H}]$ héparine) ont montré qu'il y avait une liaison spécifique entre l'héparine et les spermatozoïdes humains et que cette liaison était saturable, dépendante de la température, de la force ionique et du potentiel d'hydrogène (pH) du milieu d'incubation (Delgado *et al.*, 1982). Handrow *et al.* (1984) ont montré que l'héparine liait spécifiquement aussi les spermatozoïdes bovins, de singes et de lapins. Le marquage de l'héparine par la fluorescéine a permis de visualiser sa localisation au niveau de la membrane acrosomale, du flagelle et de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes de bovin et de singe (Handrow *et al.*, 1984).

La liaison entre l'héparine et le spermatozoïde a des caractéristiques semblables

à une liaison typique récepteur-ligand (Handrow *et al.*, 1984). Toutefois, aucune étude n'a pu démontrer si la capacitation par l'héparine était médiée par un récepteur.

1.3.2.3.3. Caractérisation biochimique de la capacitation et implication de l'héparine

Des changements intracellulaires importants sont observés lors de la capacitation: augmentation du pH, de la concentration d'AMPC et de la perméabilité ionique de la membrane plasmique des spermatozoïdes (Figure 1-2).

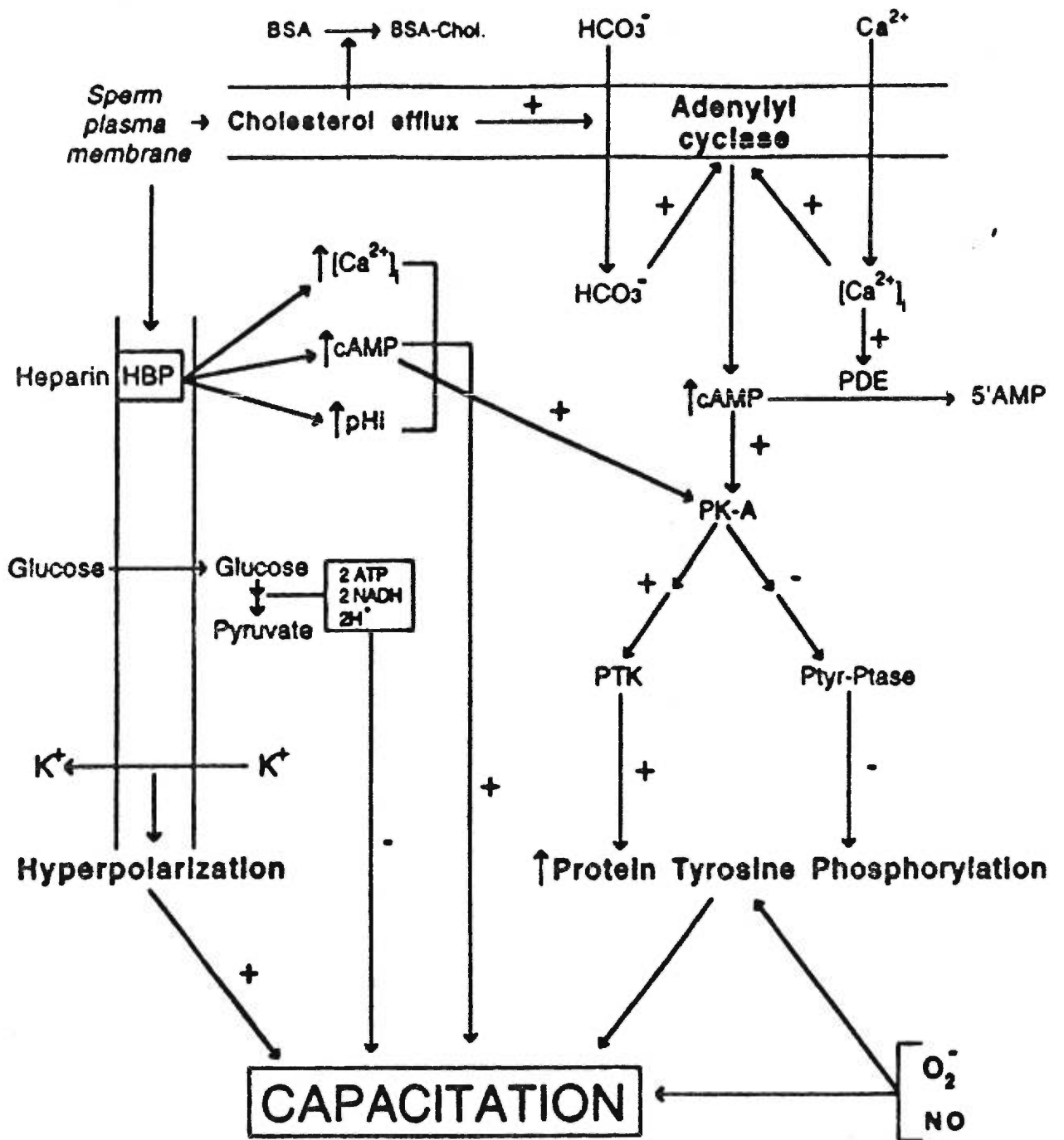
Selon l'espèce, durant la capacitation, les niveaux intracellulaires des ions augmentent ou diminuent. Lors de la capacitation chez le cobaye, il y a une augmentation intracellulaire des ions sodium (Na^+) ainsi qu'une diminution des ions potassium (K^+) (Hyne *et al.*, 1985). Par contre, chez le hamster, la capacitation entraîne l'activation des pompes Na^+/K^+ -ATPase, ce qui entraîne un effet contraire (Mrsny *et al.*, 1984). L'hyperpolarisation cellulaire ainsi produite par l'activation de la Na^+/K^+ -ATPase pourrait changer l'état de canaux calciques et les rendre activables. Ces canaux pourraient être ouverts par un agoniste, telle la zone pellucide, qui induirait une dépolarisation (Florman *et al.*, 1998; Arnoult *et al.*, 1996).

Le rôle du calcium (Ca^{2+}) dans la capacitation est plutôt controversé. Des études ont démontré son importance dans la capacitation chez la souris (DasGupta *et al.*, 1993; Visconti *et al.*, 1995). D'autres équipes affirment qu'il n'y a pas de changement de la concentration intracellulaire du calcium du spermatozoïde lors de la capacitation (Yanagimachi, 1994). Ces différents résultats pourraient être expliqués par le fait que le Ca^{2+} est nécessaire à la réaction de l'acrosome et qu'il est difficile de différencier

Figure 1-2 : Modèle montrant les voies de signalisation hypothétiques transmembranaires et intracellulaires qui jouent un rôle dans la régulation de la capacitation des spermatozoïdes

Ce modèle provient d'études faites dans plusieurs laboratoires. (-) indique la régulation négative, et (+) représente la régulation positive.

Tiré de: Visconti *et al.*, 1998.



cette étape de la capacitation. Le calcium est toutefois nécessaire dans le milieu externe pour la capacitation des spermatozoïdes éjaculés bovins (Handrow *et al.*, 1989). Une explication pour cette nécessité serait que la liaison de l'héparine au spermatozoïde est dépendante du Ca^{2+} (Handrow *et al.*, 1984). L'entrée (influx) de Ca^{2+} au cours de la capacitation serait en partie responsable de la stimulation de l'adénylate cyclase observée au cours de la capacitation (Stein et Fraser, 1984; Stein *et al.*, 1986).

Depuis plusieurs années, des études ont montré l'implication de l'AMPc dans la motilité des spermatozoïdes (Garbers *et al.*, 1973; Garbers et Kopf, 1980; Hoskins, 1973; Murofushi *et al.*, 1986). Les spermatozoïdes possèdent des enzymes générant des nucléotides cycliques tels l'AMPc. De plus, une grande quantité de protéines kinases dépendantes de l'AMPc sont présentes au niveau du spermatozoïde (Hoskins *et al.*, 1972; Garbers *et al.*, 1973). L'implication de l'AMPc dans la capacitation est venue un peu plus tard; Stein et Fraser (1984) ont montré une augmentation de l'activité adénylate cyclase et une diminution de l'activité phosphodiesterase durant la capacitation du spermatozoïde de souris. D'autres études ont montré une augmentation de la concentration d'AMPc intracellulaire précédant l'hyperactivation du spermatozoïde (White et Aitken, 1989; Parrish *et al.*, 1994). L'hyperactivation est la dernière étape de la capacitation des spermatozoïdes et a lieu avant la réaction de l'acrosome. C'est à ce moment que le spermatozoïde se met à bouger frénétiquement (revue par Yanagimachi, 1994). L'implication de l'AMPc dans la capacitation a aussi été montrée indirectement en utilisant des analogues d'AMPc tel le dibutyryl-AMPc (db-AMPc) (Fraser, 1981) et le 8-bromo-AMPc (Galantino-Homer *et al.*, 1997) et des inhibiteurs des enzymes impliqués dans le métabolisme de l'AMPc tels: la caféine (Fraser, 1979) et le 3-isobutyl-

la caféine (Fraser, 1979) et le 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) (Galantino-Homer *et al.*, 1997). Par contre, la présence seule d'AMPc ou d'un inhibiteur des phosphodiesterases ne permet pas l'induction de la capacitation. L'héparine est essentielle à cette induction (Handrow *et al.*, 1989; Parrish *et al.*, 1994). Comme le premier rôle de l'AMPc est d'activer la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), le groupe de Uguz *et al.*, (1994) a montré l'importance de l'AMPc dans la capacitation induite par l'héparine en utilisant des inhibiteurs de PKA, le Rp-adenosine-3',5'-monophosphorothioate cyclique (Rp-AMPSc), un antagoniste de l'AMPc. Cet inhibiteur empêche la capacitation. Par contre, l'addition de ces inhibiteurs n'affecte pas l'augmentation du pH intracellulaire durant la capacitation, suggérant que les deux phénomènes sont indépendants (voir plus bas) (Babcock *et al.*, 1983; Carr et Acott, 1984; Carr et Acott, 1989). Les spermatozoïdes des mammifères possèdent deux isozymes (type I et II) de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (Hoskins *et al.*, 1972) et des phosphatases pouvant déphosphoryler les protéines (Tang et Hoskins, 1975; Swarup et Garbers, 1982; Tash *et al.*, 1988). Carr et Acott (1990) ont identifié une phosphoprotéine de 225 kilodaltons (kDa) du spermatozoïde bovin (désignée protéine 2) associée aux microtubules du spermatozoïde (MAP2). La phosphorylation de cette protéine serait dépendante des facteurs connus comme régulateurs de la capacitation et de la réaction de l'acrosome. Leyton et Saling (1989) ont identifié une protéine de 95 kDa des spermatozoïdes de souris qui était phosphorylée sur ses résidus tyrosine. Sa phosphorylation augmente avec la capacitation et suite à l'exposition des spermatozoïdes à la zone pellucide solubilisée. Duncan et Fraser (1993) ont montré les mêmes résultats *in vitro*. Le Rp-AMPSc inhibe la phosphorylation des tyrosines et la capacitation. Il semblerait donc que c'est bien la PKA qui induit la phosphorylation des

tyrosines et que l'activation des protéines ainsi phosphorylées est importante pour la capacitation.

Il y aurait aussi une relation entre le calcium et l'AMPc. Handrow *et al.*, (1989) ont montré que l'héparine et le 8-bromo-AMPc, un analogue de l'AMPc, avait un effet de synergie sur l'influx de Ca^{2+} . Le mécanisme d'entrée du calcium pourrait être dépendant de la PKA (Uguz *et al.*, 1994). Une façon par laquelle l'héparine pourrait stimuler une augmentation d'AMPc serait en augmentant le calcium intracellulaire. Le calcium est connu comme étant un régulateur important de l'adénylate cyclase et des phosphodiésterases du spermatozoïde (Braun, 1975; Fraser et Monks, 1990; Goh et White, 1988; Gross *et al.*, 1987). Toutefois, l'adénylate cyclase du spermatozoïde n'est pas couplée à une protéine G comme dans les autres cellules (Fraser et Monks, 1990; Hildebronth *et al.*, 1985; Ward et Kopf, 1993): l'adénylate cyclase des spermatozoïdes est stimulée par des ions carbonates (HCO_3^-) (Garty et Salomon, 1987; Okamura *et al.*, 1985; Tajima *et al.*, 1987; Tajima et Okamura, 1990).

La capacitation est associée à l'inhibition d'un mécanisme d'acidification contrôlant le pH dans les spermatozoïdes bovins (Vredenburg et Parrish, 1995). Le mécanisme d'acidification le plus retrouvé dans les cellules est justement l'échangeur des ions carbonates et chlore (HCO_3^-/Cl^-) (Frelin *et al.*, 1988). Cet échangeur est inhibé par l'héparine (Tajima et Okamura, 1990). Il est aussi possible que l'augmentation intracellulaire du calcium qui a lieu dans le spermatozoïde durant la capacitation induite par l'héparine (Parrish *et al.*, 1993; 1994) puisse inhiber le mécanisme d'acidification directement ou par la voie des protéines kinases dépendantes du calcium, comme l'on retrouve dans plusieurs cellules (Owen et Villereal, 1982;

Huang *et al.*, 1987; Rigoni *et al.*, 1987; Frelin *et al.*, 1988). Ces résultats permettraient d'établir un lien entre le pH intracellulaire et le Ca^{2+} dans la capacitation des spermatozoïdes bovins (Handrow *et al.*, 1989; Parrish *et al.*, 1989a; 1993; 1994).

En résumé, l'héparine provenant du fluide folliculaire ou oviductal, se lierait à la membrane du spermatozoïde via un récepteur encore inconnu. Suite à la liaison, il y aurait blocage des canaux HCO_3^- et activation de l'adénylate cyclase entraînant une augmentation de la synthèse d'AMPc. L'AMPc va activer la PKA qui va amorcer la cascade de phosphorylation des tyrosines et permettre la capacitation. La relation entre l'héparine et l'augmentation de calcium intracellulaire demeure incertain. L'action exacte de la cascade de phosphorylation est aussi inconnue.

1.3.3. Rôle des lipoprotéines de haute densité dans la capacitation

1.3.3.1 Introduction

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) ont une densité de 1.063-1.210 g/ml et un diamètre de 50-120 Å. Elles contiennent principalement de l'ester de cholestérol, du cholestérol et les apoprotéines A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E (Brown et Goldstein, 1987). Les HDL sont impliquées principalement dans le transport du cholestérol des cellules périphériques vers le foie (Miller *et al.*, 1985). Le sérum et le fluide folliculaire sont tous deux de bons inducteurs de l'efflux de cholestérol. Pour ce qui est de l'agent actif du fluide folliculaire, ce serait les HDL et l'albumine (Langlais *et al.*, 1988; Ehrenwald *et al.*, 1990). L'efflux de cholestérol consiste en un retrait du cholestérol de la membrane d'une cellule vers un accepteur de cholestérol. L'efflux peut avoir lieu lorsqu'il y a un gradient de cholestérol entre l'accepteur et la membrane de la cellule.

Les HDL sont présents dans le fluide folliculaire bovin (Savion *et al.*, 1982), porcine (Chang *et al.*, 1976) et humaine (Simpson *et al.*, 1980; Langlais *et al.*, 1988). Une grande quantité de HDL est retrouvée dans le fluide oviductal au temps de l'ovulation (Parks et Ehrenwald, 1990). Cette augmentation des niveaux de HDL faciliterait la capacitation des spermatozoïdes et par le fait même, la réaction de l'acrosome (Schaefer *et al.*, 1983; Killian *et al.*, 1987). Contrairement au plasma sanguin qui contient des lipoprotéines de très faible densité (very low density lipoprotein, VLDL) et des lipoprotéines de faible densité (low density lipoprotein, LDL), le fluide folliculaire ne contient qu'une seule classe de lipoprotéine, les HDL (Perret *et al.*, 1985). Ces dernières sont homologues en structure et fonction aux HDL du plasma sanguin (Jaspard *et al.*, 1997).

1.3.3.2 Effet du cholestérol sur la capacitation

Depuis plusieurs années, des études suggèrent que l'efflux de cholestérol des spermatozoïdes de mammifère est une des premières étapes dans la capacitation des spermatozoïdes. L'implication de l'efflux de cholestérol dans la capacitation a été montrée chez le lapin (Davis, 1982), le rat (Davis *et al.*, 1980), la souris (Go et Wolf, 1985), l'humain (Langlais *et al.*, 1988) et plus récemment chez le bovin (Thérien *et al.*, 1998; Ehrenwald *et al.*, 1988). Il a aussi été montré que le retrait de cholestérol de la membrane plasmique entraîne un effet capacitant sur les spermatozoïdes bovins (Ehrenwald *et al.*, 1988), contrairement à un ajout de cholestérol qui inhibe la capacitation (Ehrenwald *et al.*, 1987). Des études ont montré que l'augmentation du rapport cholestérol/phospholipide de la membrane plasmique diminue le potentiel de fécondation, entraînant la décapacitation et inhibant la réaction de l'acrosome (Davis BK, 1974; 1978; 1981).

1.3.3.3. Mécanisme de la capacitation induite par les HDL

Le mécanisme de la capacitation des spermatozoïdes bovins induite par les HDL ou la BSA est très peu connu. Le cholestérol semble avoir un effet stabilisateur sur la membrane (Yeagle, 1985). Ainsi, son efflux pourrait entraîner une réorganisation de la membrane permettant l'apparition de récepteur pour la zone pellucide (Benoff *et al.*, 1993). L'adhésion du spermatozoïde à la zone pellucide entraînerait la réaction de l'acrosome.

1.3.4. Rôle du plasma séminal dans la capacitation

Le plasma séminal est le liquide riche en protéines qui transporte et maintient les spermatozoïdes en vie suite à l'éjaculation. Il est donc très important pour le spermatozoïde (Miller et Ax, 1988). Ce liquide est composé de sécrétions provenant des testicules, de l'épididyme et surtout des glandes accessoires, telles: les vésicules séminales (30 à 60 %) et la prostate (25 à 40 %) (Peitz et Olds-Clarke, 1986). Le plasma séminal aurait à la fois un effet activateur et un effet inhibiteur sur la fécondation. Il stimulerait la motilité des spermatozoïdes épидидymaires tandis qu'il inhiberait la capacitation (Miller et AX, 1988).

La capacitation des spermatozoïdes éjaculés bovins, ou épидидymaires de bovins incubés en présence de plasma séminal et d'héparine pour de longues périodes est faible. Ceci vient appuyer l'hypothèse que le plasma séminal aurait un effet négatif sur la fécondation (Chang, 1957; Dukelow *et al.*, 1967). Par contre, le plasma séminal peut aussi influencer la réponse des spermatozoïdes à l'héparine d'une façon positive (Lee *et al.*, 1986; Florman et First., 1988). En effet, les spermatozoïdes épидидymaires incubés

en présence d'héparine prennent 22 heures avant d'être capable de subir la réaction de l'acrosome contrairement aux spermatozoïdes éjaculés qui ont besoin de 9 heures (Lenz *et al.*, 1982, 1983a; Handrow *et al.*, 1984). Toutefois, les spermatozoïdes épидидymaires exposés durant 20 minutes au plasma séminal, puis lavés et incubés en présence d'héparine, subissent la réaction de l'acrosome en 9 heures (Lee *et al.*, 1985). Ainsi, certaines composantes du plasma séminal provoquent probablement des modifications de la membrane du spermatozoïde modifiant la cinétique de capacitation. Cette stimulation s'explique par la présence de protéines liant l'héparine qui sont présentes dans le plasma séminal (Miller *et Ax.*, 1989). Suite à l'ajout des protéines liant l'héparine, à la surface des spermatozoïdes, le temps nécessaire pour la capacitation est réduit et ils peuvent subir la réaction de l'acrosome induite par la zone pellucide (Miller *et Ax.*, 1990; Miller *et al.*, 1990).

1.3.4.1. Les protéines BSP

1.3.4.1.1. Historique

Manjunath (1984) et Manjunath et Sairam (1987) ont identifié un groupe de protéines acides similaires isolées du plasma séminal bovin qu'ils ont nommées BSP-A1, BSP-A2 et BSP-A3 (collectivement nommées protéines BSP). Les protéines BSP-A1 et BSP-A2 sont une seule et même protéine contenant des quantités différentes de sucres. Elles sont donc généralement considérées comme une seule entité biochimique nommée BSP-A1/A2. La protéine BSP-A1/A2 porte aussi le nom de PDC-109 (Esch *et al.*, 1983). La protéine PDC-109 a été clonée et identifiée comme étant la protéine majeure du plasma séminal bovin (Kempe et Scheit, 1988a; 1988b; Scheit *et al.*, 1988).

Cette protéine est synthétisée par les vésicules séminales (Kempe *et al.*, 1986), et l'ampoule (Aumüller *et al.*, 1988; Scheit *et al.*, 1988). En 1987, Manjunath *et al.* ont isolé une autre protéine du plasma séminal bovin, soit la protéine BSP-30 kDa. Elle présente des propriétés très similaires aux protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3. Ces trois protéines représentent plus de 65% du contenu protéique du plasma séminal bovin.

1.3.4.1.2. Propriétés biochimiques

Les protéines BSP-A1/A2, BSP-A3 et BSP-30 kDa ont des poids moléculaires de 16 000 à 16 500 Da (BSP-A1/A2, Esch *et al.*, 1983; Manjunath, 1984), 15 000 Da (BSP-A3, Manjunath *et al.*, 1987; 1988; Manjunath et Sairam, 1987) et 30 000 Da (Manjunath *et al.*, 1987) respectivement. Les protéines BSP-A1/A2 s'associent à pH neutre pour former des agrégats de poids moléculaires variant entre 20 000 et 120 000 Da; elles se dissocient toutefois à pH acide ou en présence d'urée 8 M (Manjunath, 1984; Manjunath et Sairam, 1987).

Les protéines BSP-A1/A2, et BSP-30 kDa sont des glycoprotéines contrairement à BSP-A3 qui n'est pas glycosylée (Manjunath *et al.*, 1988; Manjunath et Sairam, 1987; Desnoyers et Manjunath, 1992). Les protéines BSP contiennent des sucres neutres (sauf pour BSP-A2), de la galactosamine et de l'acide sialique. L'absence de glucosamine suggère que ces sucres seraient liés via des liens O-glycosylés entre la galactosamine (ou sucres neutres dans le cas de BSP-A1 et BSP-30 kDa) et les groupements hydroxyles de la thréonine ou de la sérine des protéines. La protéine BSP-30 kDa est la protéine la plus glycosylée.

Les protéines BSP interagissent avec un bon nombre de macromolécules incluant

divers types de collagène (type I, II, IV, V) et le collagène dénaturé (gélatine), l'acétylcholine estérase, le fibrinogène, l'héparine, les phospholipides, l'apolipoprotéine A-I (apoA-I) et les HDL (Manjunath *et al.*, 1988, 1989). De plus, les protéines BSP se lient aux spermatozoïdes au moment de l'éjaculation (Manjunath *et al.*, 1994).

1.3.4.1.3 Structure

Depuis quelque temps, nous connaissons la structure des protéines BSP (Figure 1-3). Ces protéines contiennent quatre ponts disulfures formant deux domaines en tandem (Esch *et al.*, 1983; Seidah *et al.*, 1987) similaires aux domaines de type II que l'on retrouve dans diverses protéines telles la fibronectine (Kornbliht *et al.*, 1985), le facteur de coagulation XII (McMullen et Fujikama, 1985) et le récepteur du facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF-II) (Morgan *et al.*, 1987). Le premier domaine se trouvant du côté N terminal se nomme "a" et le second se nomme le domaine "b". La protéine BSP-A1/A2 contient 109 acides aminés (Esch *et al.*, 1983). La protéine BSP-A3 est composée de 115 acides aminés et est identique à 66% avec BSP-A1/A2 (Seidah *et al.*, 1987). Tout récemment la structure de la protéine BSP-30 kDa a été déterminée. C'est une protéine de 158 acides aminés et elle est identique à 49% avec BSP-A1/A2 et à 57% avec BSP-A3. (Calvete *et al.*, 1996). Cette forte identité entre les protéines BSP suggère qu'elles origineraient de la duplication d'un gène ancestral commun (Seidah *et al.*, 1987).

La structure du domaine "b" de BSP-A1/A2 a été déterminée par résonance magnétique nucléaire en deux dimensions (Constantine *et al.*, 1991). Cette étude a révélé la présence de feuillets plissés β antiparallèles formés par les résidus Serine⁹² à

Figure 1-3. Représentation de la structure secondaire des protéines BSP- A1/A2, -A3 et -30 kDa

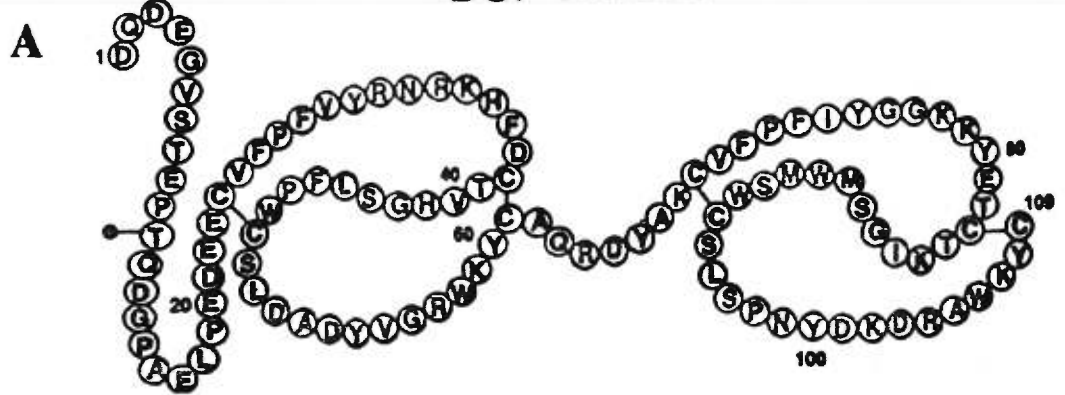
Cette figure représente la structure des protéines BSP déterminée à partir de leurs séquences primaire. A) BSP-A1/A2, B) BSP-A3 et C) BSP-30 kDa. Chacune de ces protéines contient deux ponts disulfures formant deux domaines similaires.

A) Tiré de: “Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma” par Esch *et al.* (1983)

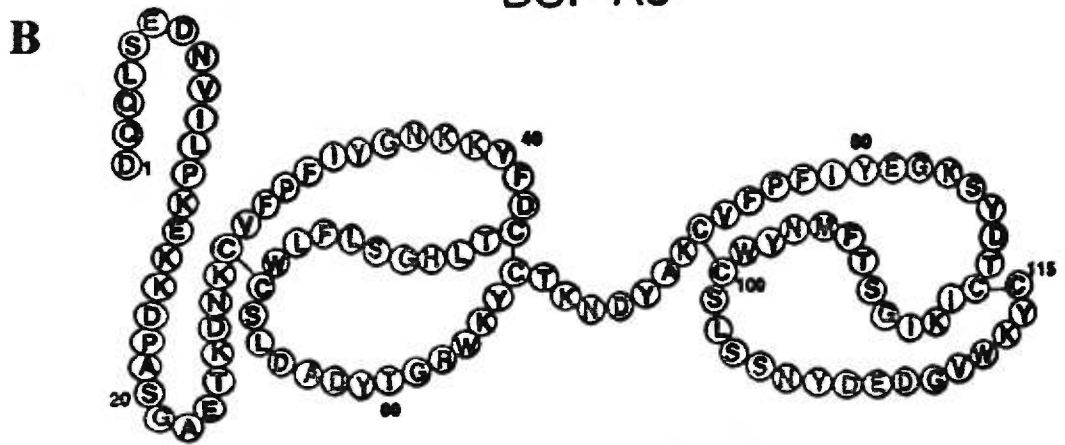
B) Tiré de : “Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma: homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin” par Seidah *et al.* (1987)

C) Tiré de: “ The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin- binding glycoprotein of bovine seminal plasma” par Calvete *et al.* (1996)

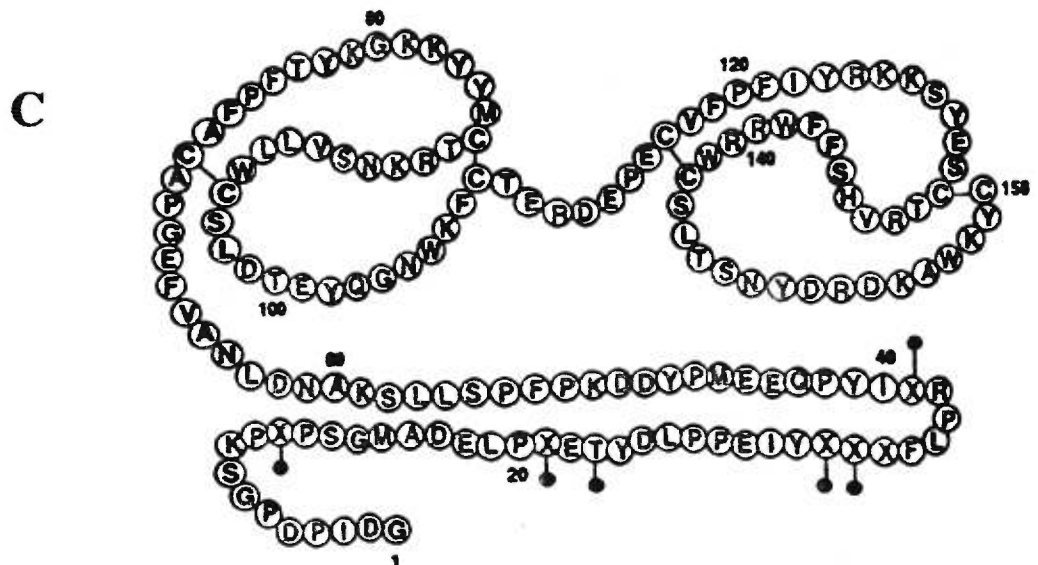
BSP-A1/-A2



BSP-A3



BSP-30-kDa



Serine⁹⁵ et Triptophane¹⁰⁶ à Cystéine¹⁰⁹. Une deuxième région de feuillets antiparallèles formés des résidus 69 à 71, 73 à 75 et 78 à 81 a aussi été identifiée. Cette protéine aurait tendance à adopter une conformation globulaire qui laisserait à sa surface une légère dépression à caractère hydrophobe formée par les chaînes latérales aromatiques des résidus Tyrosine⁷⁵, Triptophane⁹³ et Tyrosine¹⁰⁰. Cette région serait un site potentiel de liaison au collagène et serait responsable de la tendance de PDC-109 à s'agréger (Constantine *et al.*, 1991). La nature hydrophobe de ce site a d'ailleurs été confirmée récemment par la liaison du domaine "b" de PDC-109 aux groupements néopentyles d'une colonne d'alkyle-Superose (Bányai *et al.*, 1990).

1.3.4.1.4 Présence de protéines analogues aux protéines BSP chez différentes espèces animales

Les protéines BSP sont présentes en concentration élevée dans le plasma séminal des taureaux normaux et vasectomisés (20 à 40 mg/ml). Des études dans notre laboratoire ont indiqué la présence de protéines présentant des propriétés antigéniques similaires aux protéines BSP chez le hamster, la souris, le bovin, le porc et le rat (Leblond *et al.*, 1993). Des homologues des protéines BSP ont été aussi purifiés dans le plasma séminal du porc (la protéine pB1) et du cheval (deux formes, HSP1 et HSP2) (Calvete *et al.*, 1997). La structure secondaire pB1, HSP1 et HSP2 présentait, tout comme les protéines BSP, deux domaines de type II disposés en tandem. De présentes études dans notre laboratoire suggèrent la présence de ces protéines chez l'humain.

1.3.4.2. Rôle physiologique des protéines BSP

1.3.4.2.1. Introduction

Nous avons déjà souligné à la section 1.3.4 l'importance du plasma séminal pour la capacitation des spermatozoïdes. Une brève incubation des spermatozoïdes épидидymaires en présence du plasma séminal permet de réduire le temps nécessaire de capacitation avec l'héparine de 22 à 9 heures. De plus, les protéines BSP interagissent avec deux facteurs capacitants: l'héparine et les HDL (section 1.3.4.1.2). Ainsi, il est probable que les protéines BSP puissent être impliquées dans le processus de capacitation des spermatozoïdes. Les sections suivantes aborderont le rôle de cette famille de protéines dans la capacitation.

1.3.4.2.2. Interaction avec les spermatozoïdes

Afin de favoriser la capacitation des spermatozoïdes lors de leur transit dans le tractus génital femelle, les protéines BSP doivent accompagner le spermatozoïde. C'est par immunoprécipitation à l'aide de protéines BSP marquées et de marquage à l'aide d'anticorps reconnaissant ces protéines que Manjunath et al. (1994) ont démontré leurs liaisons avec les spermatozoïdes. Ils ont aussi montré que cette interaction avait lieu lors de l'éjaculation des spermatozoïdes bovins.

1.3.4.2.3. Interaction avec les phospholipides

Certaines études ont permis de caractériser davantage le site de liaison des protéines BSP à la surface du spermatozoïde. Ainsi, Desnoyers et Manjunath (1992) ont montré que ce site de liaison était résistant aux protéases (trypsine, pronase et protéinase

K), au traitement à l'acide et était résistant à la chaleur. Des extractions des membranes ont été faites au chloroforme-méthanol et les lipides obtenus ont été mis en présence de protéines BSP marquées (^{125}I). La liaison des protéines était proportionnelle aux concentrations de lipides extraits de la membrane du spermatozoïde. Les protéines BSP lient donc le spermatozoïde via les lipides. Ils ont ensuite étudié quels lipides étaient responsables de cette liaison. Ils ont donc testé la liaison des protéines BSP à plusieurs types de lipides incorporés à des liposomes et confirmé la liaison par la technique du "TLC-overlay" et par essai de liaison en phase solide. Toutes ces techniques ont montré que les protéines BSP liaient les phospholipides. Les protéines BSP-A1/A2 et -A3 liaient la phosphatidylcholine (PC), la lyso-PC, la sphingomyéline, le facteur activateur de plaquette (PAF), la lyso-PAF, la PC plasmogène et aussi la lyso-plasmogène en présence ou en absence de Ca^{2+} . La protéine BSP-30 kDa liait la PC, la lyso-PC, la sphingomyéline, la PAF et la lyso-PAF. Ces résultats montrent bien que les protéines BSP se lient aux phospholipides des membranes des spermatozoïdes. D'autres études ont montré que cette liaison était spécifique pour les phospholipides portant un groupement choline (Desnoyers et Manjunath, 1992).

1.3.4.2.4. Interaction avec l'héparine

Comme nous l'avons vu précédemment (section 1.3.1), l'héparine est importante dans la capacitation des spermatozoïdes bovins. En passant les protéines du plasma séminal bovin sur une colonne d'héparine-Sépharose, Chandonnet et al. (1990) ont montré que plusieurs protéines du plasma séminal liaient l'héparine, dont les protéines BSP-A1/A2, -A3 et -30kDa. Les sites de liaison des protéines BSP à l'héparine ne sont pas encore connus. Par contre, nous savons que pour d'autres protéines liant l'héparine,

ce site de liaison est caractérisé par une région riche en acides aminés basiques (Cardin et Weintraub, 1989). Ces régions sont des centres de haute densité de charges positives qui interagissent électrostatiquement avec les groupements acides des glycosaminoglycans, comme l'héparine. Ces sites sont caractérisés par la séquence consensus suivante: -B-B-X-B et -B-B-B-X-X-B- (B étant un acide aminé basique et X étant tout autres acides aminés) (Cardin et Weintraub, 1989). Les protéines BSP possèdent ces sites consensus (Manjunath et al., 1988). De plus, des études de notre laboratoire ont montré que les protéines BSP sont impliquées dans la capacitation induite par l'héparine des spermatozoïdes bovins (Thérien *et al.*, 1995). Tout comme le plasma sérial, chaque protéine BSP purifiée potentialise la capacitation induite par l'héparine des spermatozoïdes épiddymaires bovins.

1.3.4.2.5. Interaction avec l'apolipoprotéine A-I

L'apoA-I est l'apoprotéine majeure des HDL et est impliquée dans le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, site principal de la dégradation du cholestérol (Eisenberg, 1984). L'apoA-I est la partie des HDL qui interagit avec la surface cellulaire (Fidge et Nestel, 1985; Monaco *et al.*, 1987). Une interaction des protéines BSP avec l'apolipoprotéine A-I (apoA-I) et les HDL a été démontrée par Manjunath *et al.*, (1989). De plus, comme nous l'avons mentionné précédemment (section 1.3.3.1), les HDL sont présents dans le tractus génital femelle et sont impliqués dans la capacitation du spermatozoïde (Yanagimachi, 1994; Eddy et O'Brien, 1994; Thérien *et al.*, 1997). Par ailleurs, nos études récentes ont aussi montré que les protéines BSP sont importantes dans l'efflux de cholestérol et pour la capacitation induite par les HDL (Thérien *et al.*, 1997; 1998). Une hypothèse a été apportée récemment par Thérien

et al. (1998). Les protéines BSP, qui sont les protéines majeures du plasma séminal bovin, stimuleraient un efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes. Ce premier efflux de cholestérol induit par les protéines BSP pourrait déstabiliser la membrane du spermatozoïde et induire une réorganisation des protéines de surface entraînant l'apparition de nouveaux récepteurs à la surface de la membrane (pour héparine-like GAG ou HDL). Les HDL, lesquels entraîneraient un deuxième efflux de cholestérol dans le tractus génital femelle, pourraient réduire le ratio cholestérol/phospholipides entraînant la capacitation.

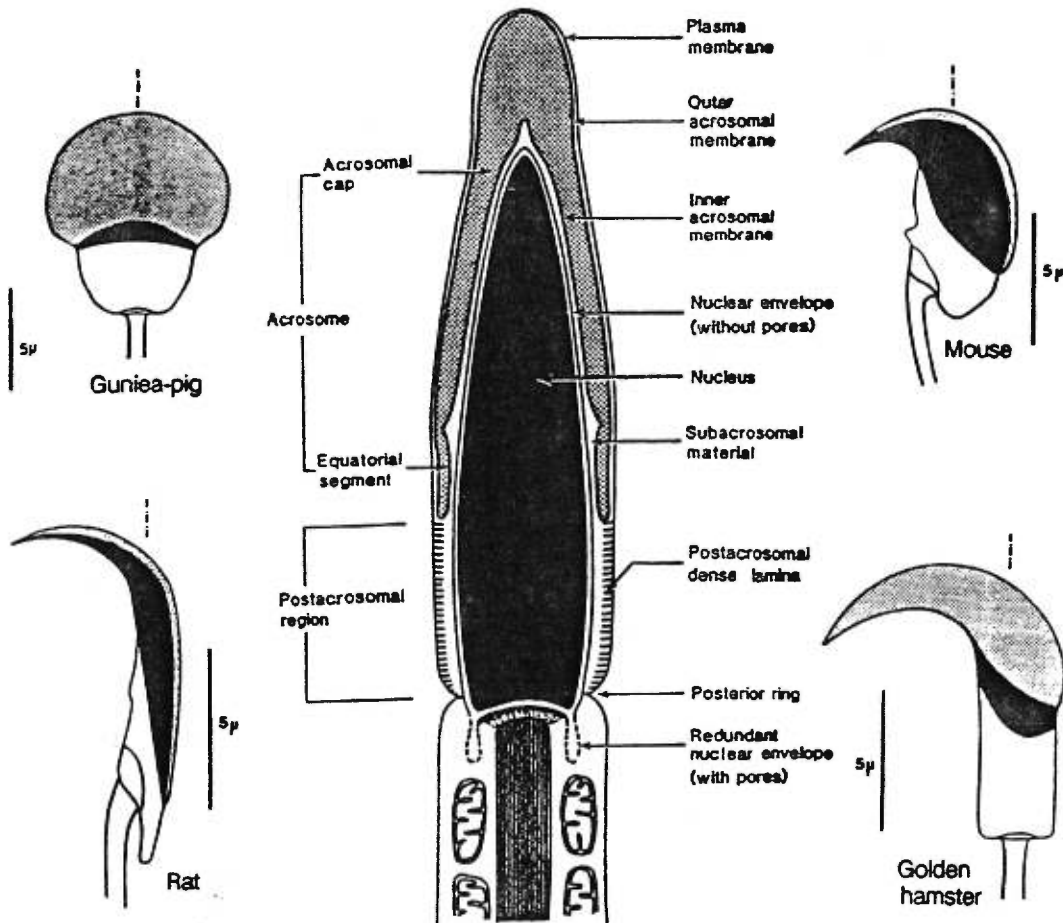
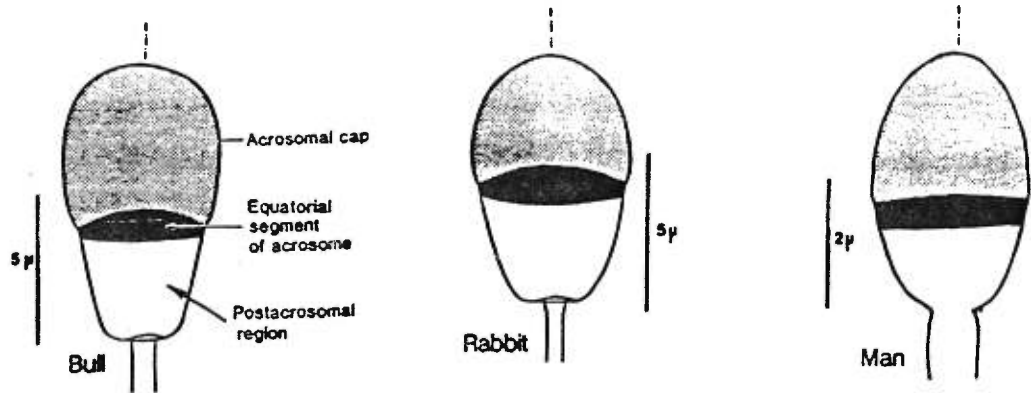
1.4 Réaction de l'acrosome

L'acrosome est la région comprise entre les membranes interne et plasmique, dans la partie supérieur du noyau du spermatozoïde. La taille et la dimension de l'acrosome varient beaucoup selon les espèces (Figure 1-4.) (Austin et Bishop, 1958; Fawcett, 1975), mais sa structure de base est la même chez les mammifères. Outre les lysosomes (Allison et Hartree, 1970), l'acrosome comprend plusieurs enzymes hydrolytiques (l'hyaluronidase et l'acrosine) permettant au spermatozoïde de franchir les couches acellulaires entourant l'oeuf (revue par Zaneveld et al., 1991). Lors de la réaction de l'acrosome, il y a premièrement une fusion des membranes acrosomiales externe et plasmique qui entraîne une vésiculation (fenestration) et empêche le contenu de l'acrosome de s'échapper. Par la suite, il y a un relâchement des enzymes lytiques contenus dans l'acrosome. Un influx de Ca^{2+} accompagne la réaction de l'acrosome et contribuerait à cette fusion des membranes. Les ions Ca^{2+} se lient premièrement aux phospholipides anioniques permettant la séparation de phase des phospholipides membranaires. Le Ca^{2+} stimulerait les phospholipases membranaires dont les produits

Figure 1-4. Structure générale de la tête du spermatozoïde dans les diverses espèces

Cette figure représente les parties de la tête du spermatozoïde et les différentes formes qu'elle peut prendre dans les diverses espèces mammifères.

Tiré de: " The Physiology of Reproduction, Second Edition" par Yanagimachi (1994).



de réaction sont fusogènes (Langlais et Roberts, 1985; Yanagimachi, 1994).

La réaction de l'acrosome permet au spermatozoïde de traverser les deux couches entourant l'ovule et de se fusionner avec la membrane plasmique de l'ovule (Yanagimachi 1994) (Figure 1-5). La réaction de l'acrosome servirait aussi à exposer des récepteurs/ligands impliqués dans l'interaction des gamètes. Des études ont montré qu'une glycoprotéine (PH-30), exposée suite à la réaction de l'acrosome, serait importante pour cette interaction (Blobel et al., 1992). Cette protéine serait impliquée dans l'induction de la fusion des gamètes.

Les ovules de tous les mammifères sont recouverts d'une couche épaisse de glycoprotéines, la zone pellucide. Lors de l'ovulation, la zone pellucide est entourée du *cumulus oophorus*, qui comprend des cellules cumulus et leurs matrices. La composante majeure de la matrice des cellules cumulus est de l'acide hyaluronique polymérisé. La zone pellucide est un bon inducteur de la réaction de l'acrosome. La glycoprotéine majeure de la zone pellucide, ZP-3, agit comme un ligand et sa liaison aux récepteurs du spermatozoïde entraîne une réaction en chaîne (Wassarman, 1987; 1988). Il y a beaucoup d'autres inducteurs de la réaction de l'acrosome tels la lyso-PC (Parrish et al., 1988b). Quelque soit l'inducteur, un influx de Ca^{2+} est essentiel à la réaction de l'acrosome (Garbers, 1989; Langlais et Roberts, 1985).

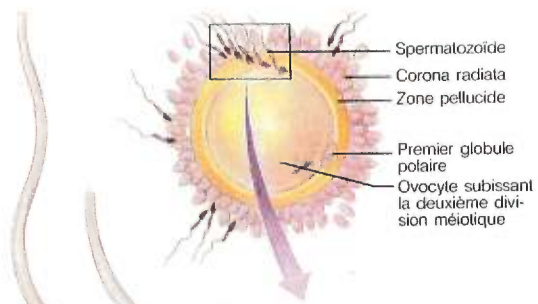
Suite à l'efflux de cholestérol durant la capacitation, la membrane plasmique devient plus fluide libérant les récepteurs au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde. La liaison de ZP3 à ces récepteurs entraînerait leur agrégation, et ainsi leur activation. À ce moment, la cascade de réaction s'amorce (Figure 1-6) (revue par

Figure 1-5. Représentation de la réaction de l'acrosome et pénétration du spermatozoïde

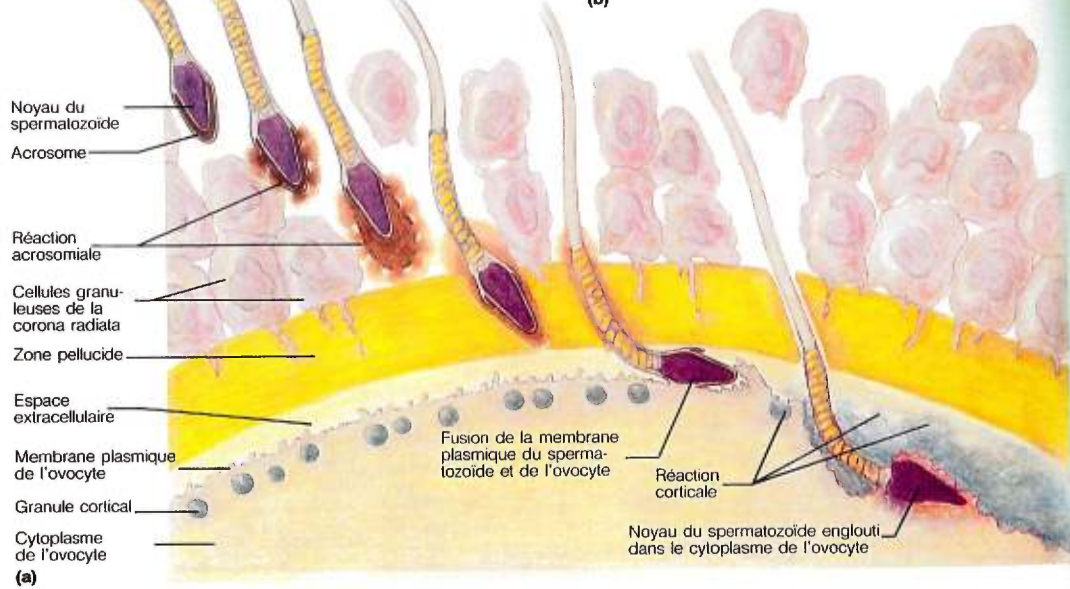
a) Cette figure représente les diverses étapes de la réaction de l'acrosome préparant le spermatozoïde à sa pénétration dans l'ovocyte. Les étapes de la réaction de l'acrosome et de la pénétration de l'ovule sont représentées de gauche à droite. La réaction de l'acrosome débute par une fenestration due à la fusion de la membrane plasmique et de la membrane acrosomiale externe (deuxième spermatozoïde). Cette fusion résulte en une libération des enzymes contenues dans l'acrosome (deuxième et troisième spermatozoïde). Suite à la réaction de l'acrosome, seule la membrane interne de l'acrosome est présente au niveau de la région apicale de la tête du spermatozoïde et il y a pénétration de la zone pellucide (quatrième spermatozoïde). La fusion entre la membrane plasmique du spermatozoïde et de l'ovocyte se produit (cinquième spermatozoïde). Le noyau du spermatozoïde est ensuite englouti dans le cytoplasme de l'ovocyte (sixième spermatozoïde).

b) Photomicrographie de spermatozoïdes humains entourant un ovocyte humain (X 750).

Tiré de: "Anatomie et Physiologie Humaines" par Marieb (1992)



(b)

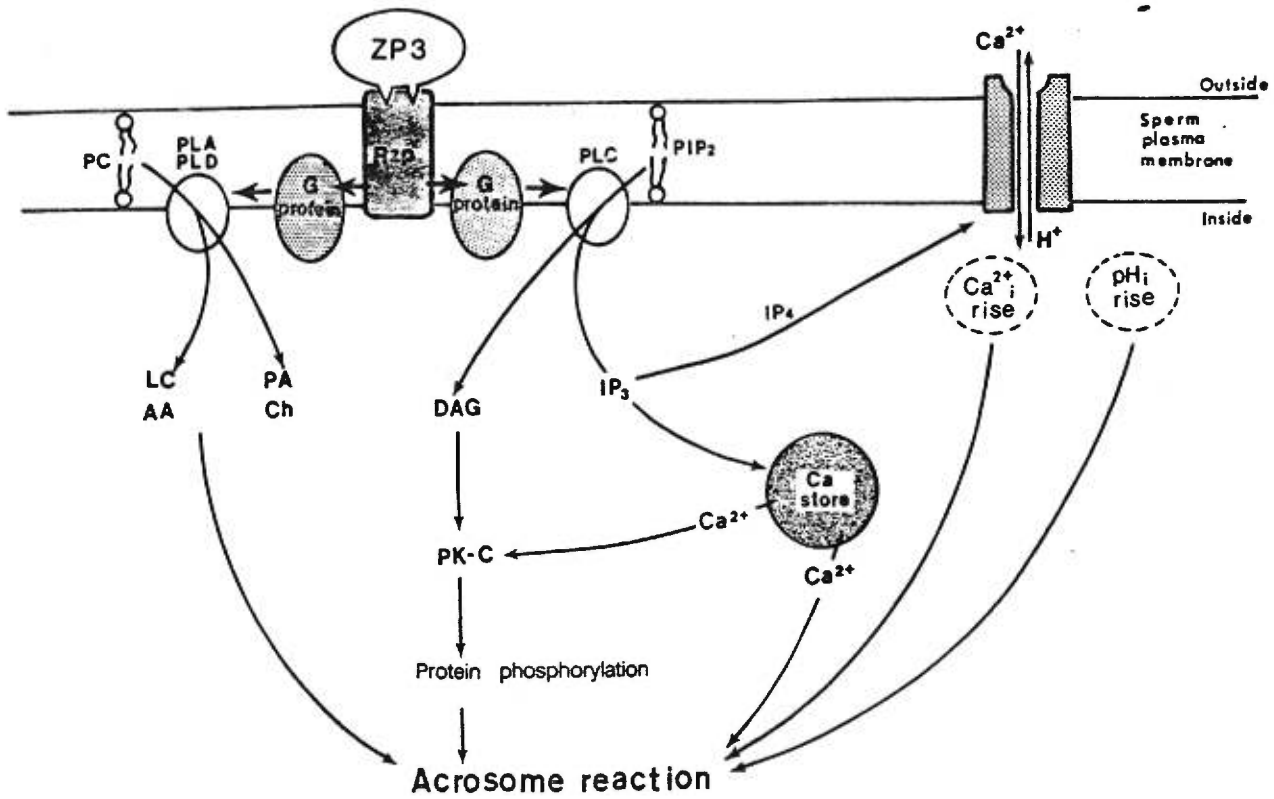


(a)

Figure 1-6: Voies hypothétiques impliquées dans la réaction de l'acrosome induite par la zone pellucide

Schéma représentant les diverses voies activées lors de la réaction de l'acrosome.

Tiré de: "The physiology of Reproduction, Second Edition" par Yanagimachi, 1994.



Yanagimachi, 1994). Il y a stimulation d'une protéine G qui active premièrement la phospholipase C dans la membrane plasmique du spermatozoïde. Cette phospholipase clive le phosphatidylinositol diphosphate en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate. Le DAG active les protéines kinases C dépendantes du Ca^{2+} . L'inositol triphosphate entraîne une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire en stimulant le relâchement de Ca^{2+} entreposé dans le cytoplasme et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants entraînant ainsi une entrée massive de Ca^{2+} extracellulaire (Florman et al., 1992). Une partie de ce Ca^{2+} agit directement sur les phospholipides de la membrane pour faciliter la fusion. La protéine G stimule deuxièmement, la phospholipase A_2 qui coupe la phosphatidylcholine (PC) en libérant de la lysophosphatidylcholine (lyso-PC) et de l'acide arachidonique, tous deux connus comme étant très fusogènes (Fleming et Yanagimachi, 1981; 1984). Elle stimule aussi la phospholipase D qui coupe la PC en choline et en acide phosphatidique qui sont aussi très fusogènes, et l'adénylate cyclase qui stimule la production d'AMPc. La protéine kinase A qui est dépendante de l'AMPc phosphoryle les protéines essentielles à la réaction de l'acrosome. Une partie de l'AMPc agit comme un canal à sodium (Na^+) qui permet l'influx de Na^+ et l'efflux d'hydrogène (H^+), ce qui augmente le pH intracellulaire (revue par Yanagimachi, 1994). L'influx de Ca^{2+} , l'augmentation du pH intracellulaire et la production de composés fusogènes sont tous essentiels à la réaction de l'acrosome.

1.5. Description du projet de recherche

Des études précédentes avaient démontré l'implication de l'héparine et des HDL

comme inducteurs de la capacitation des spermatozoïdes bovins (Parrish *et al.*, 1988b; Ehrenwald *et al.*, 1988). De plus, des études de notre laboratoire avaient indiqué que les protéines BSP étaient aussi importantes dans la capacitation des spermatozoïdes bovins induite par l'héparine et les HDL (Thérien *et al.*, 1995; 1997). Le but de mon projet de recherche de Maîtrise était d'utiliser des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines BSP pour étudier les mécanismes de capacitation induite par les HDL et l'héparine. Ainsi, nous avons purifié les protéines BSP pour générer des anticorps polyclonaux. Nous avons vérifié la pureté et la spécificité des anticorps par immunobuvardage. Par la suite, nous avons fait des études de capacitation *in vitro* en ajoutant les anticorps polyclonaux dans nos milieux. Ces milieux comprenaient les composés nécessaires à l'induction de la capacitation des spermatozoïdes éjaculés bovins, soit l'héparine ou les HDL. Suite à des incubations de 5 ou 8 h, selon le type d'inducteur, les spermatozoïdes ont été testés pour leur habileté à subir la réaction de l'acrosome. Comme aucune technique pour la détection directe de la capacitation n'est disponible, nous utilisons la réaction de l'acrosome comme marqueur de la capacitation. En effet, seuls les spermatozoïdes capités peuvent subir la réaction de l'acrosome *in vivo*. Ce test est fait à l'aide de la lyso-PC, un agent fusogène qui est produit *in vivo* lors de l'interaction de la zone pellucide avec le spermatozoïde. Cette substance induit donc la réaction de l'acrosome seulement chez les spermatozoïdes capités. Nous utilisons par la suite une technique de coloration de l'acrosome. L'acrosome des spermatozoïdes qui ont subi la réaction perd le colorant et devient blanc tandis que l'acrosome des spermatozoïdes intacts reste rouge. Les spermatozoïdes colorés sont alors comptés sous microscope photonique.

Des études de phosphorylation ont aussi été entreprises. Selon la technique décrite par Galantini-Homer *et al.* (1997), nous avons incubé des spermatozoïdes éjaculés en présence d'héparine ou d'HDL, en présence de db-AMPC, un analogue non-hydrolysable de l'AMPC, et de l'IBMX, un inhibiteur de phosphodiesterase. Ces produits nous permettent de mieux voir une augmentation de la phosphorylation sur tyrosines induite par la voie de signalisation dépendante de la PKA. Suite à l'incubation, un échantillon de spermatozoïdes est traité pour déterminer le pourcentage de réaction de l'acrosome comme précédemment et une autre partie sert à déterminer le niveau d'induction de phosphorylation des tyrosines qui serait lié à la capacitation. Pour ce faire, les spermatozoïdes sont traités à l'orthovanadate, un inhibiteur des phosphatases, ce qui nous permet de prévenir la déphosphorylation. Par la suite les protéines du spermatozoïde sont extraites et analysées sur gel SDS-PAGE pour nous permettre de faire une immunodétection à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre les tyrosines phosphorylées. Suite à l'analyse des résultats, nous avons pu conclure que la capacitation induite par l'héparine et les HDL impliquait des mécanismes différents. Les anticorps polyclonaux contre les protéines BSP inhibaient la capacitation induite par l'héparine sans avoir d'effet sur la capacitation induite par les HDL. De plus, il y avait une augmentation de la phosphorylation des tyrosines associée avec la capacitation induite par l'héparine mais aucune augmentation n'était observée avec les HDL.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Produits chimiques

L'adjuvant de Freund provient de Sigma (St-Louis, MO). Le gel Séphadex G-50 et la Protéine A couplée au Sépharose proviennent de la compagnie Pharmacia Biotech Inc (Baie d'Urfé, QC). Tous les autres produits sont de grade analytique et proviennent de fournisseurs locaux.

2.2. Matériel biologique

2.2.1. Plasma séminal bovin

Les éjaculats de taureaux adultes ont été obtenus grâce à la collaboration du Dr Yves Brindel (Centre d'insémination artificiel du Québec, CIAQ, St-Hyacinthe, Qc.).

Le plasma séminal a été séparé des spermatozoïdes par centrifugation. Huit volumes d'éthanol froid (-20°C) ont été ensuite ajoutés au liquide séminal avec agitation constante pendant deux heures. Cette solution a été par la suite centrifugée (10 000 X g pendant 10 min). Le précipité a été lavé avec deux volumes d'éthanol froid et recentrifugé. Cette étape est répétée deux autres fois pour éliminer tous les stéroïdes et les lipides qui pourraient être encore présents dans le plasma séminal. Le précipité est ensuite dissous dans de l'eau distillée et lyophilisé. La fraction protéique totale du plasma séminal bovin est désignée cBSP ("Crude Bovine Seminal Plasma").

2.3. Purification des protéines BSP

2.3.1. Chromatographie d'affinité sur colonne de gélatine-Agarose

Un échantillon de cBSP (500 mg dans 5 ml de tampon phosphate salin (PB; 150 mM et NaCl; 50 mM) est déposé sur une colonne de gélatine-agarose (120 ml) à 4°C préalablement équilibrée avec un tampon PBS. Les protéines adsorbées sont éluées à l'aide d'un gradient d'urée (0 à 8 M). Des fractions de 5 mL sont recueillies (à un débit de 30 mL/h). Le profil protéique d'éluion est déterminé en mesurant l'absorbance à 280 nm. Par la suite, la colonne est lavée avec du tampon PBS. Les fractions contenant les protéines d'intérêt ont été par la suite rassemblées et dialysées contre un tampon bicarbonate (150 mM) avant d'être lyophilisées.

2.3.2. Chromatographie sur tamis moléculaire Séphadex G-50

L'échantillon préalablement concentré obtenu lors de la purification précédente est déposé sur la colonne Séphadex G-50 (670 mL) équilibrée avec, soit un tampon ammonium bicarbonate 150 M (pH 10) pour une chromatographie en condition basique ou de l'acide acétique 50 mM (pH 2) pour une chromatographie en condition acide. Des fractions de 5 mL ont été recueillies à un débit de 30 mL/h. Le profil protéique d'éluion a ensuite été déterminé en mesurant l'absorbance à 280 nm. Par la suite, la colonne a été lavée avec du tampon PBS. Les fractions contenant les protéines d'intérêt ont été par la suite rassemblées et dialysées contre un tampon ammonium bicarbonate avant d'être lyophilisées.

2.4. Génération d'anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines BSP

Suite à leur purification, chaque protéine BSP est injectée, en présence d'Adjuvant de Freund (1:1; v:v), à des lapins de Nouvelle-Zélande. Un mois plus tard, les lapins sont injectés à nouveau. Deux semaines après la deuxième immunisation, 20

mL de sang a été prélevé et centrifugé à 3 000 X g pour séparer le sérum. Le sérum a ensuite été utilisé pour un immunobuvardage. Les lapins ont ensuite été réimmunisés quatre fois et le sang a été prélevé deux semaines après chaque immunisation. Suite à la dernière immunisation, la totalité du sang a été recueillie par ponction cardiaque. A chaque prise de sang, le sérum a été testé pour la présence d'anticorps reconnaissant les protéines BSP.

2.4.1. Purification des anticorps anti-protéines BSP

Le sérum a ensuite été passé sur une colonne protéine A-Sépharose équilibrée avec un tampon Tris, pH 7.4. Cette colonne nous permet de garder seulement les immunoglobulines G. La colonne a été par la suite éluée avec un tampon glycine-HCl pH 2. La densité optique des fractions recueillies a été ensuite prise et les fractions contenant l'anticorps ont été combinées et le pH, ajusté à 7. Ces anticorps ont ensuite été testés pour leur spécificité par immunobuvardage.

3. RÉSULTATS

3.1. Purification des protéines du plasma séminal bovin

3.1.1. Chromatographie sur gélatine-Agarose

La première étape de purification des protéines du plasma séminal consistait en une séparation des protéines selon leur affinité pour la gélatine (Manjunath et al., 1988; 1994). Cette étape nous permet de bien séparer BSP-A3 et de séparer grossièrement BSP-A1/A2 et BSP-30 kDa. Sur le profil d'élution des protéines cBSP (Figure 3-1A), les protéines non-adsorbées n'ont pas été recueillies tandis que les pics suivants représentent les protéines adsorbées qui ont été éluées avec le gradient d'urée de 0 à 8 M et recueillies en fractions de 5 mL. Le pic A représente la protéines BSP-A3, le pic B, la protéine BSP-30 kDa et le pic E la protéine BSP-A1/A2.

Par la suite, un échantillon des différents pics a été mis sur un gel d'électrophorèse sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) pour vérifier la pureté des protéines (Figure 3-1B). De fines bandes de contamination ont pu être observées dans les puits des protéines BSP-A1/A2 au niveau de 30 kDa (piste 3), et pour BSP-30 kDa au niveau de 15 kDa (piste 8) et pour BSP-A3, ces bandes se trouvaient en dessous de 10 kDa (piste 6). Une autre étape de purification est donc nécessaire.

3.1.2. Chromatographie sur Séphadex G-50 en milieu acide

La deuxième étape de purification consistait en une séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. Comme BSP-A1/A2 (Figure 3-2.) et BSP-30 kDa (Figure 3-3.) ont un poids moléculaire différent, nous avons utilisé une colonne Séphadex G-50 en milieu acide pour les séparer. La protéine BSP-A3 est aussi passée

Figure 3-1. Purification des cBSP par chromatographie d'affinité sur gélatine-Agarose

A) Profil d'élution des cBSP sur gélatine-Agarose. Les fractions ont été rassemblées de la façon suivante:

Portion de pic A, fractions 46 à 60; Portion de pic B, fractions 69 à 77; Portion de pic C, fractions 78 à 79; Portion de pic D, fractions 80 à 88; Portion de pic E, fractions 89 à 90; Portion de pic F, fractions 91 à 92.

B) Électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de Coomassie des protéines recueillies lors de la purification. Piste 1, marqueur de poids moléculaires; piste 2, cBSP; piste 3, Portion de Pic D; piste 4, Portion de Pic E (BSP-A1/A2); piste 5, Portion de Pic F; piste 6, Portion de Pic A (BSP-A3); piste 7, Portion de Pic B (BSP-30 kDa); piste 8, Portion de Pic C.

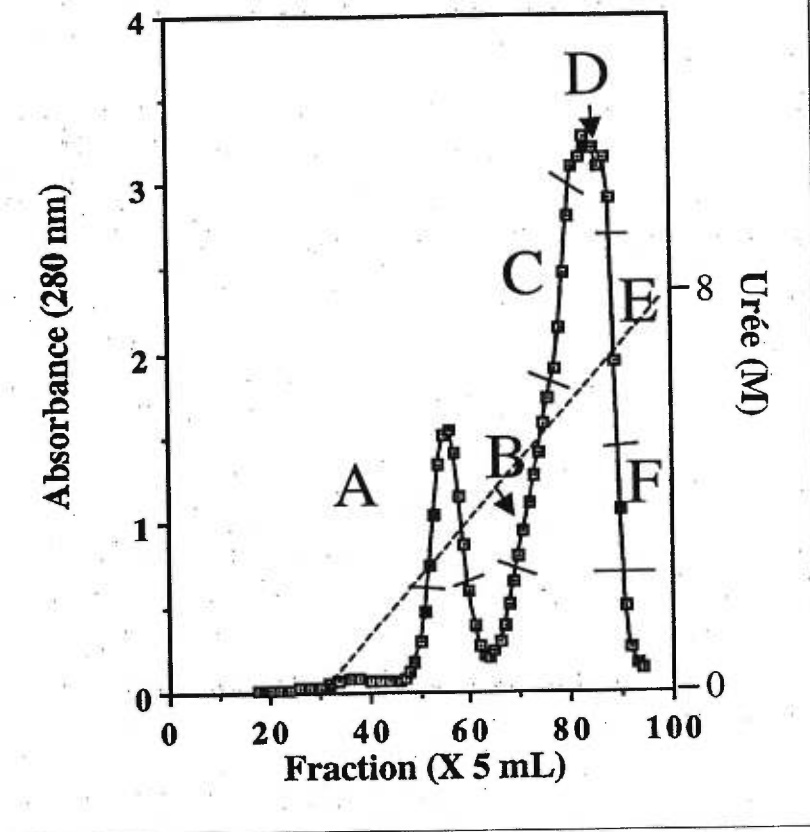
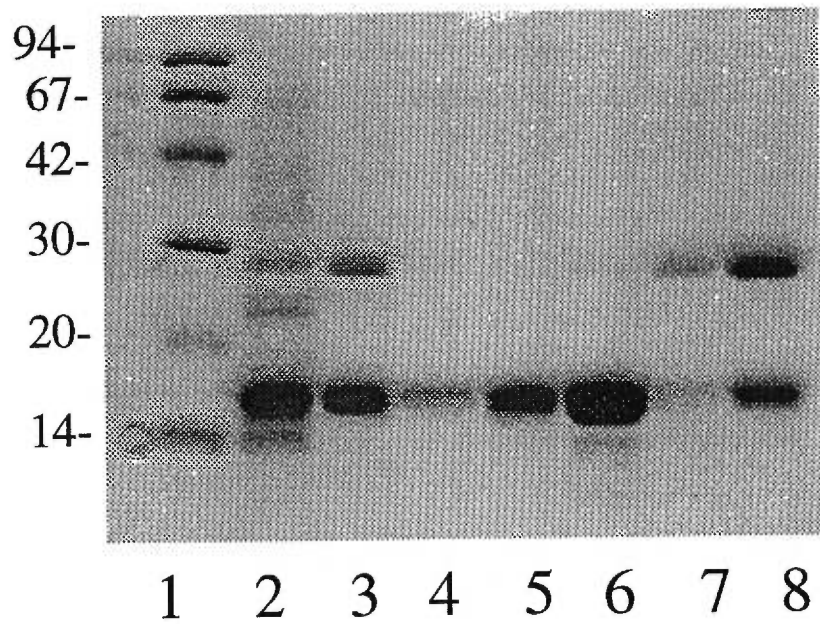
A**B**

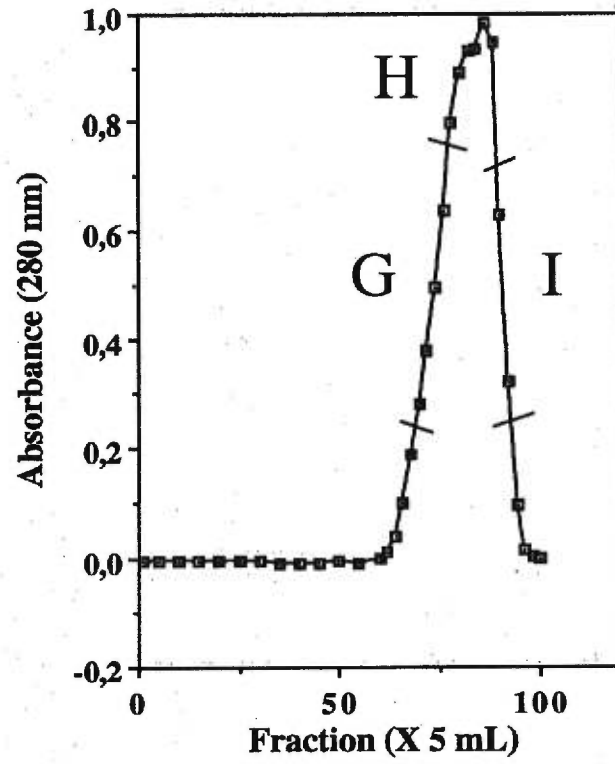
Figure 3-2. Purification de la protéines BSP-A1/A2 sur un tamis moléculaire Séphadex G-50

A) Profil d'élution de la protéine BSP-A1/A2 (Portion de pic E) suite à son passage sur le tamis moléculaire Séphadex G-50. Les fractions ont été rassemblées de la façon suivante:

Portion de Pic G, fractions 68 à 75; Portion de pic H, fractions 76 à 86; Portion de pic I, fractions 87 à 92.

B) Électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de Coomassie des protéines recueillies lors de la purification. Piste 1, marqueur de poids moléculaires; piste 2, Portion de pic E; piste 3, Portion de pic G; piste 4, Portion de pic H; piste 5, Portion de pic I.

A



B

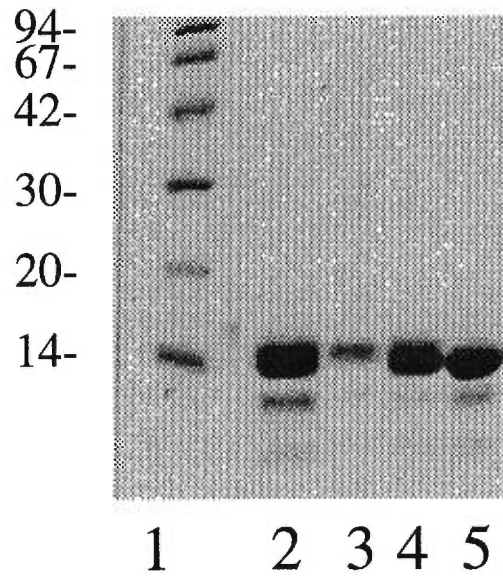
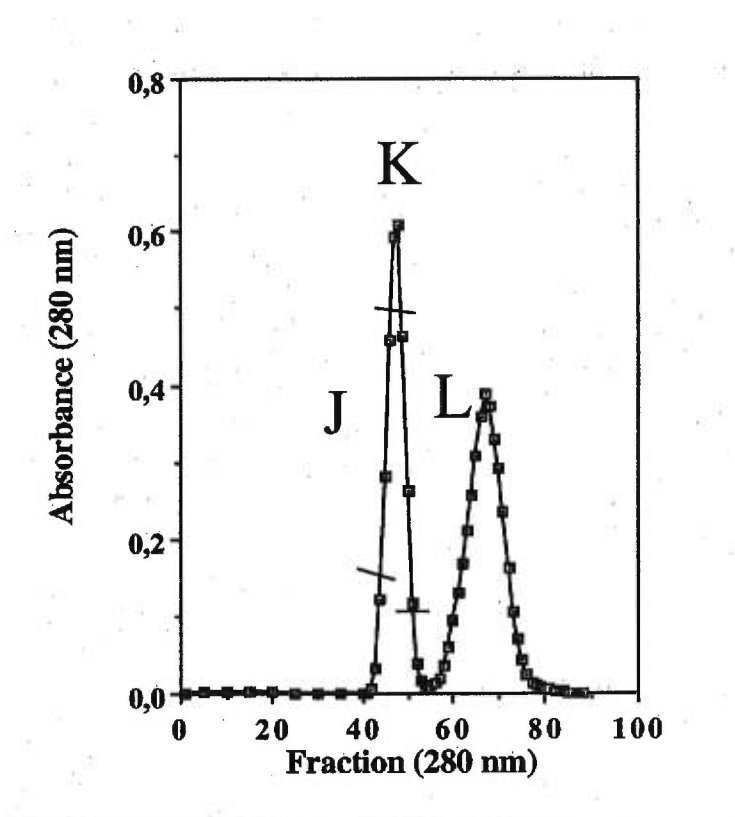
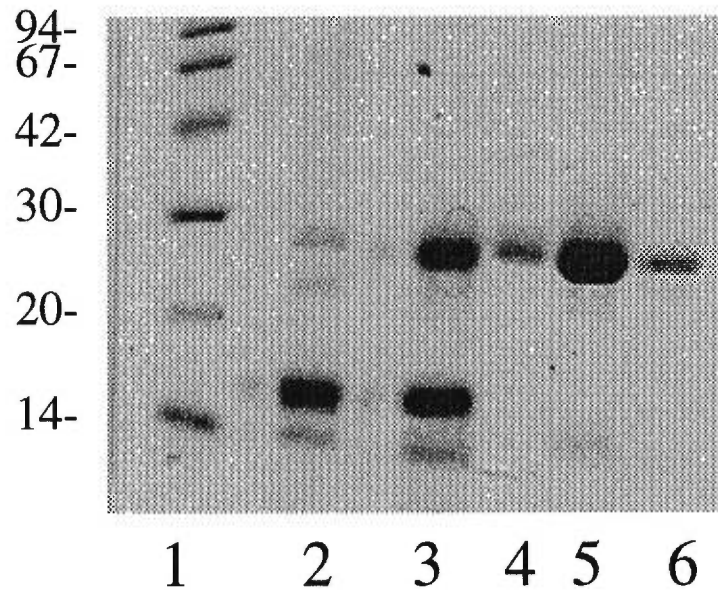


Figure 3-3. Purification de la protéine BSP-30 kDa sur un tamis moléculaire Séphadex G-50

A) Profil d'élution de la protéine BSP-30 kDa (Portion de pic B) suite à son passage sur le tamis moléculaire Séphadex G-50. Les fractions ont été rassemblées de la façon suivante:

Portion de pic J, fractions 42 à 44; Portion de pic K, fractions 45 à 48; Portion de pic L, fractions 49 à 51.

B) Électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de Coomassie des protéines recueillies lors de la purification. Piste 1, marqueur de poids moléculaires; piste 2, cBSP; piste 3, Portion de pic B; piste 4, Portion de pic J; piste 5, Portion de pic K; piste 6, Portion de pic L.

A**B**

sur cette colonne pour s'assurer d'enlever tout contaminant de poids moléculaire plus élevé (Figure 3-4.). Ces protéines sont ensuite mises sur SDS-PAGE pour vérifier leur pureté. Suite à la coloration des gels, on peut toujours observer une faible contamination.

3.1.3. Dernière étape de purification

3.1.3.1 Chromatographie sur G-50 en milieu basique

Malgré leurs poids très similaires les protéines BSP-A1/A2 et -A3 ont été purifiées sur un tamis moléculaire Sephadex G-50 en milieu basique. Pour cette partie, c'est la propriété d'agrégation qui permet de purifier les protéines. Sachant que BSP-A1/A2 (Figure 3-5.) s'agrège plus en condition basique que BSP-A3 (Figure 3-6.), il est donc possible de les séparer. Les protéines ont donc été éluées de la colonne avec du tampon de bicarbonate d'ammonium. Une fois les fractions contenant les protéines rassemblées et lyophilisées, les protéines ont été déposées sur un gel SDS-PAGE (Figure 3-6B). Ces gels montraient que nos protéines étaient bien pures et qu'elles pouvaient être utilisées pour la génération d'anticorps.

3.1.3.2 Chromatographie sur gélatine-Agarose

Pour ce qui est de la protéine BSP-30 kDa, une contamination constante était observée à environ 15 kDa, cette impureté a été finalement enlevée en passant la protéine sur une colonne d'affinité gélatine-Agarose. Comme précédemment, cette colonne sépare les protéines selon leur affinité pour la gélatine. Suite à la purification sur colonne (Figure 3-7.), la protéine a été mise sur gel et suite à la coloration de ce gel, la protéine BSP-30kDa était elle aussi assez pure pour servir à générer des anticorps.

Figure 3-4. Purification de la protéine BSP-A3 sur un tamis moléculaire Séphadex G-50

A) Profil d'élution de la protéine BSP-A3 (Portion de pic A) suite à son passage sur le tamis moléculaire Séphadex G-50. Les fractions ont été rassemblées de la façon suivante:

Portion de pic M, fractions 63 à 68; Portion de pic N, fractions 69 à 73; Portion de pic O, fractions 74 à 78; Portion de pic P, fractions 79 à 81.

B) Électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de Coomassie des protéines recueillies lors de la purification. Piste 1, marqueur de poids moléculaires; piste 2, cBSP; piste 3, Portion de pic A; piste 4, Portion de pic M; piste 5, Portion de pic N; piste 6, Portion de pic O; piste 7, Portion de pic P.

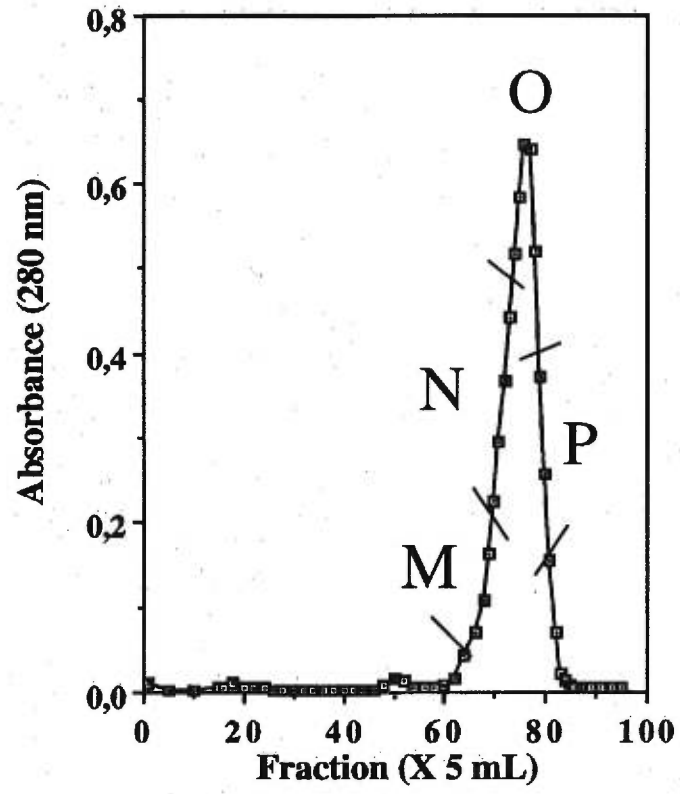
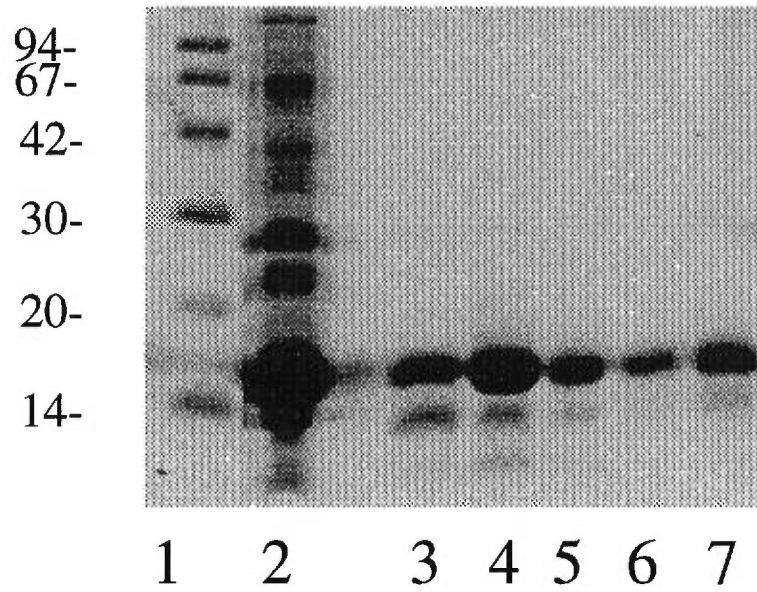
A**B**

Figure 3-5. Purification de la protéine BSP-A1/A2 sur un tamis moléculaire Séphadex G-50 basique

A) Profil d'élution de la protéine BSP-A1/A2 (Portion de pic H) suite à son passage sur le tamis moléculaire Séphadex G-50 basique. Les fractions ont été rassemblées de la façon suivante:

Portion de pic Q, fraction 31; Portion de pic R, fraction 32; Portion de pic S, fractions 33 à 35; Portion de pic T, fractions 36 à 37.

B) Électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de Coomassie des protéines recueillies lors de la purification. Piste 1, marqueur de poids moléculaires; piste 2, cBSP; piste 3, Portion de pic H; piste 4, Portion de pic Q; piste 5, Portion de pic R; piste 6, Portion de pic S; piste 7, Portion de pic T.

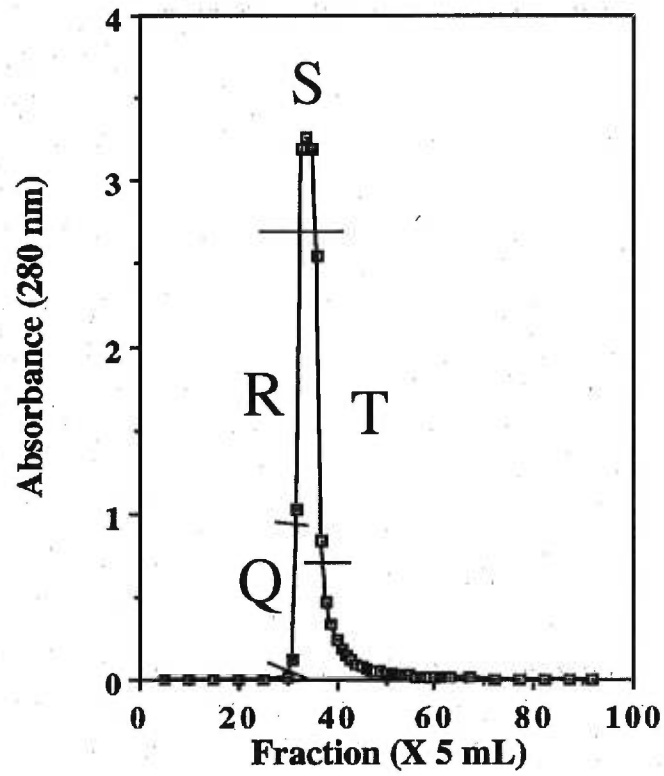
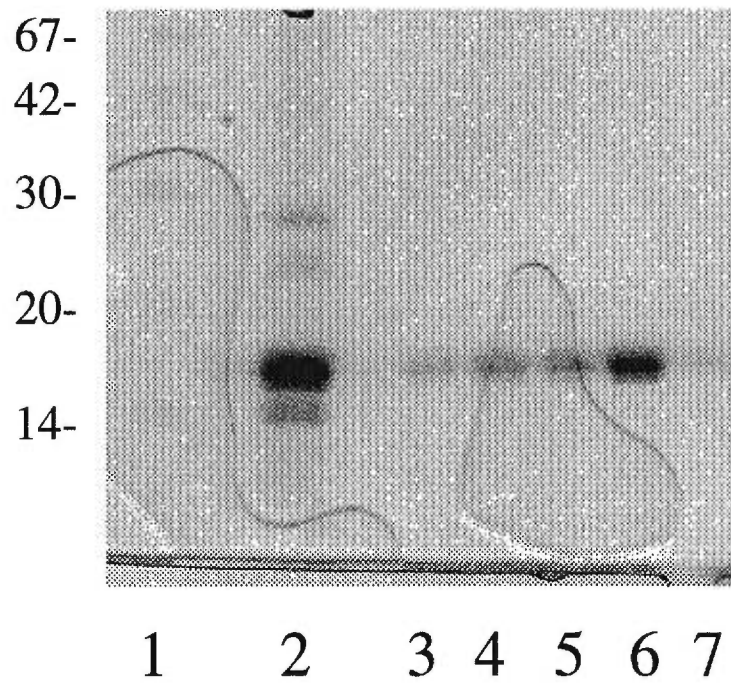
A**B**

Figure 3-6. Purification de la protéine BSP-A3 sur un tamis moléculaire Séphadex G-50 basique

A) Profil d'élution de la protéine BSP-A3 (Portion de pic O) suite à son passage sur le tamis moléculaire Séphadex G-50 basique. Les fractions ont été rassemblées de la façon suivante:

Portion de pic U, fraction 44 à 46; Portion de pic V, fraction 47 à 49; Portion de pic W, fractions 50 à 52; Portion de pic X, fractions 52 à 53.

B) Électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de Coomassie des protéines recueillies lors de la purification. Piste 1, marqueur de poids moléculaires; piste 2, cBSP; piste 3, Portion de pic O; piste 4, Portion de pic U; piste 5, Portion de pic V; piste 6, Portion de pic W; piste 7, Portion de pic X.

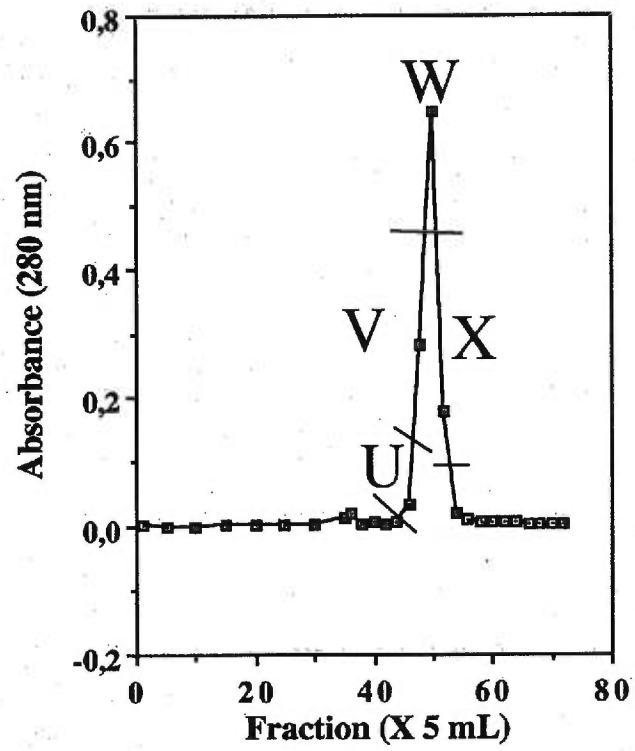
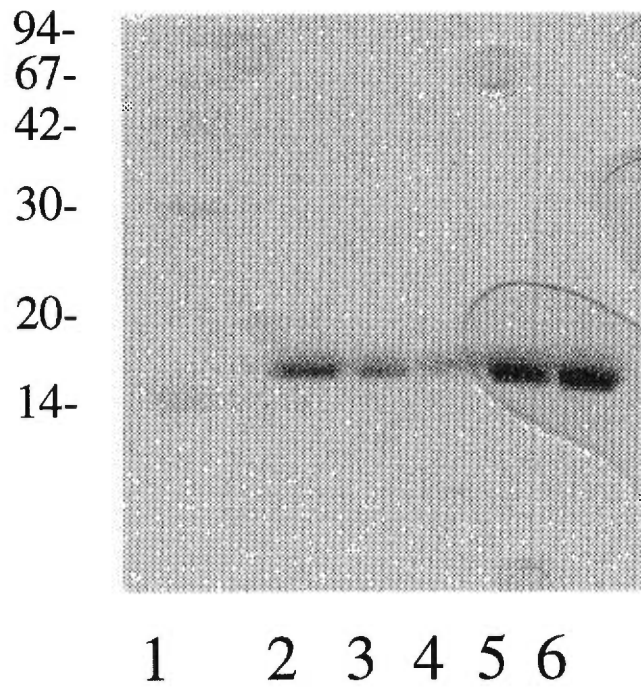
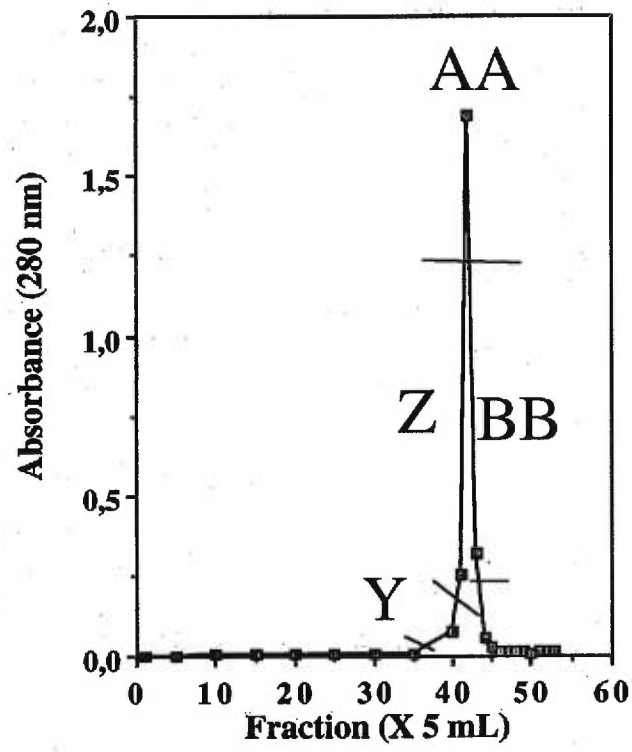
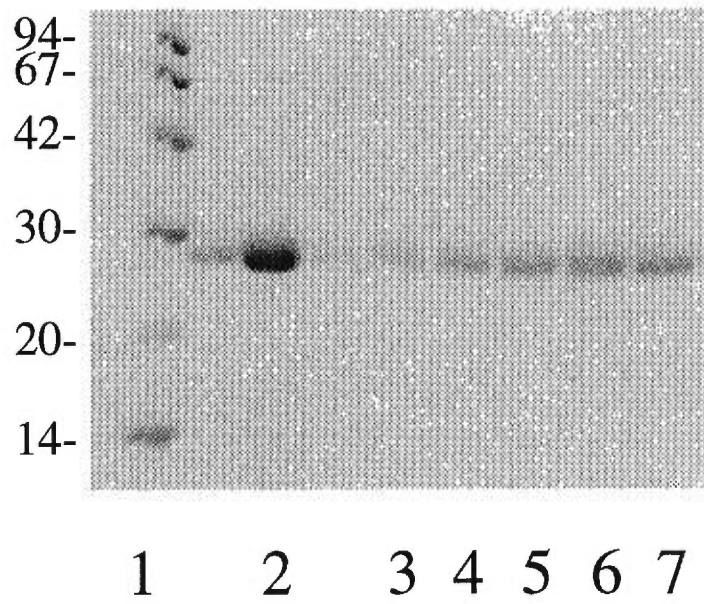
A**B**

Figure 3-7. Purification de la protéine BSP-30 kDa par chromatographie d'affinité sur gélatine-Agarose

A) Profil d'élution de la protéine BSP-30 kDa (Portion de pic K) sur gélatine-Agarose. Les fractions ont été rassemblées de la façon suivante:

Portion de pic Y, fractions 36 à 40; Portion de pic Z, fractions 41 à 42; Portion de pic AA, fractions 43 à 45; Portion de pic BB, fractions 46 à 48.

B) Électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de Coomassie des protéines recueillies lors de la purification. Piste 1, marqueur de poids moléculaires; piste 2, cBSP; piste 3, Portion de pic K; piste 4, Portion de pic Y; piste 5, Portion de pic Z; piste 6, Portion de pic AA; piste 7, Portion de pic BB.

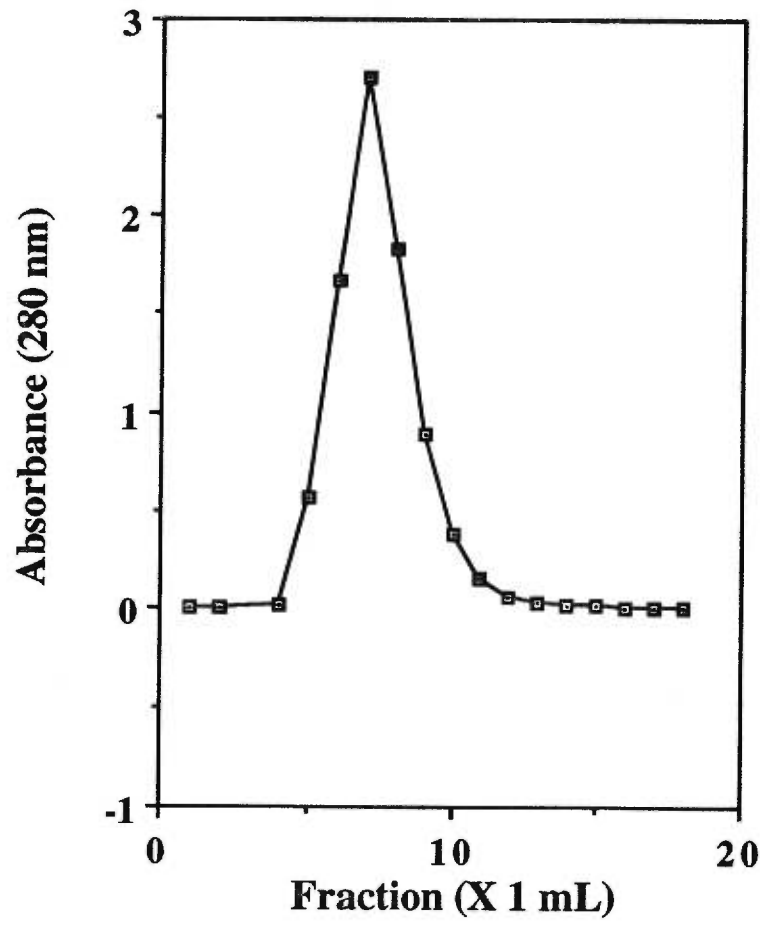
A**B**

3.2. Génération des anticorps polyclonaux contre les protéines BSP

Après les deux premières injections (intervalle d'un mois entre chaque injection), nous avons testé les sérums recueillis des lapins pour déterminer leur pureté. Par la suite, le meilleur sérum de chaque anticorps a été purifié sur colonne protéine A-Sépharose (Figure 3-8.). Ces séra ont ensuite été testés pour leur spécificité par immunobuvardage sur les protéines BSP pures. La figure 1 de la section 4 montre bien que les anticorps ne reconnaissent que leur propre antigène. Les anticorps ont donc pu être utilisés pour les essais de capacitation *in vitro*.

Figure 3-8. Purification des anticorps contre la protéine BSP-A1/A2 sur protéine A-Sépharose

Profil d'élution des anticorps (Anti-BSP-A1/A2) sur protéine A-Sépharose avec un tampon tris-glycine pH 2.2. La même purification a été effectuée avec les autres anticorps. Des profils semblables ont été obtenus.



4. ARTICLE

Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. M.-E. Lane, I. Thérien, R. Moreau and P. Manjunath. Sous Presse dans *Biology of Reproduction*.

Cet article comporte une étude suggérant que l'héparine et les HDL induisent la capacitation des spermatozoïdes bovins par des mécanismes différents. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines BSP, pour voir leurs effets sur la capacitation. Nous avons aussi étudié un des changements biochimiques qui a lieu durant la capacitation induite par l'héparine, soit la phosphorylation des tyrosines.

J'ai fait les expériences nécessaires pour cet article ainsi que la rédaction. Isabelle Thérien m'a montré les techniques nécessaires à la réalisation de cet article. Isabelle Thérien et Robert Moreau ont participé aux discussions scientifiques et à la correction de l'article. P. Manjunath a été le superviseur de ce travail.

Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms¹

M.-E. Lane, I. Thérien, R. Moreau and P. Manjunath

Departments of Biochemistry and of Medicine, University of Montreal and Guy-Bernier
Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 l'Assomption Blvd , Montreal,
Quebec, Canada, H1T 2M4

Key words : Capacitation, acrosome reaction, bovine sperm, seminal fluid proteins,
high-density lipoprotein, heparin, polyclonal antibodies, tyrosine
phosphorylation.

Short title : Heparin and HDL mediated sperm capacitation

All correspondence should be addressed to :

P. Manjunath, Ph. D.,

Centre de recherche Guy-Bernier, Hopital Maisonneuve-Rosemont

5415 boul. l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada, H1T 2M4

Tel : (514)-252-3562

(514)-252-3400 (ext : 3335)

Fax : (514)-252-3430

E-mail : manjunap@ere.umontreal.ca

Footnote: ¹This work was supported by a grant from the Medical Research Council of
Canada

ABSTRACT

Capacitation is an important process in bovine sperm maturation and is an obligatory step prior to fertilization. Two capacitating agents, namely heparin and high-density lipoprotein (HDL), have been shown to induce sperm capacitation. A family of major proteins of bovine seminal plasma designated as BSP-A1/A2, BSP-A3 and BSP-30kDa (collectively called BSP proteins) and, upon ejaculation, bind to the sperm surface via their membrane choline phospholipids. Our previous studies with bovine epididymal sperm showed that BSP proteins potentiate sperm capacitation induced by heparin and HDL. This study was undertaken to clarify the mechanism of capacitation induced by heparin and HDL in the presence of BSP proteins. Washed bovine ejaculated sperm were incubated with heparin (12 $\mu\text{g/ml}$) or HDL (10 - 160 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of polyclonal antibodies against purified BSP proteins (anti-BSP proteins). The percentage of capacitated sperm was evaluated after the induction of the acrosome reaction (AR) with lysophosphatidylcholine. When sperm were incubated for 5 h with heparin and anti-BSP proteins (40 $\mu\text{g/ml}$), the AR level was not significantly different from control levels ($16.8 \pm 0.9\%$ vs $12.9 \pm 0.9\%$). In contrast, incubation of sperm for 8 h with HDL and anti-BSP proteins did not inhibit the AR ($42.4 \pm 1.1\%$ vs 17.1 ± 1.6 for the control samples). We also investigated the effect of heparin and HDL on protein tyrosine phosphorylation associated with capacitation. The tyrosine phosphorylation of a group of proteins was increased in the presence of heparin. However, HDL did not stimulate significantly protein phosphorylation. The increase in phosphorylation correlated with an increase in the AR after the incubation with heparin but not with HDL. These results indicate that heparin and HDL mediate capacitation via different mechanisms.

INTRODUCTION

In mammals, freshly ejaculated sperm are incapable of fertilizing the egg. They gain this ability during their transit through the female reproductive tract and this process is called capacitation [1-4]. The mechanism of capacitation is poorly understood but it involves many biochemical changes. These include the removal of adsorbed components from the sperm surface, a change in membrane lipid composition, increased permeability to certain ions such as Ca^{2+} , a change in internal pH, an increase in plasma membrane fluidity and in metabolism [4-10]. There is also an increased hyperactivation that is believed to result from the redistribution of membrane components during capacitation [4]. Apart from these changes not much is known. In addition, several studies show that there is a decrease in the membrane cholesterol/phospholipid ratio during capacitation [8, 11]. All of these changes allow the spermatozoa to undergo the acrosome reaction (AR) following interaction with the zona pellucida, the egg's extracellular matrix [12-14].

Many studies have shown that heparin-like glycosaminoglycans (GAG) which are found in follicular fluid play a role in capacitation of bovine sperm [15-18]. Thus ejaculated sperm incubated with GAG, capacitate in a shorter period and then undergo the AR in the presence of the zona pellucida *in vivo* or in the presence of lysophosphatidylcholine (lyso-PC) *in vitro* [19]. Lyso-PC induces the AR in capacitated sperm only [19]. It has been postulated that GAG modulate capacitation by binding to proteins of the sperm membrane [20, 21]. In bovine, heparin binds to sperm [22] and induces changes in the intracellular environment of the sperm. This results in Ca^{2+} uptake and an increase in intracellular free calcium and intracellular pH [9,10]. Another change that is associated with heparin-induced capacitation in bovine sperm is an increase in protein phosphorylation [23]. The changes in phosphorylation and cyclic

nucleotide levels have also been observed in other sperm functions such as motility, and in AR induction [4, 13, 24-26]. Similar observations have been made in sperm of the pig, mouse and hamster [27-29].

Many studies show that the high-density lipoprotein (HDL) present in follicular and oviductal fluids [30-32], induce sperm capacitation [33]. HDL is the only lipoprotein found in the female genital tract [30-32]. Some studies have shown variations in HDL concentration during the oestrus cycle. Thus, the HDL level is higher during the ovulation period and lower during the remainder of the cycle [11]. The HDL present in the female genital tract facilitates the efflux of cholesterol that occurs during the early step of capacitation [30, 34]. In place of heparin, no such studies have been made with HDL as capacitating agents in bovine.

Studies in our laboratory have shown that the seminal plasma proteins are also important agents in sperm capacitation [21, 33]. Bovine seminal plasma (BSP) contains a family of closely related proteins designated BSP-A1/A2, -A3 and -30kDa (collectively called BSP proteins) [35-39]. These BSP proteins bind to the sperm membrane upon ejaculation and this binding takes place via choline phospholipids of sperm membrane [40]. They also bind to heparin [41] and HDL [38, 42]. The BSP proteins promote capacitation of bovine epididymal sperm in the presence of heparin [21] and HDL [33].

In this study, we used polyclonal antibodies raised against purified BSP proteins to gain further insight into the mechanism of capacitation induced by heparin and HDL. Our results indicate that these agents mediate sperm capacitation by different mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Materials. BSA (fraction V fatty acid-free), taurine, L-epinephrine, erythrosin B, flavianic acid (naphthol), heparin (purified from porcine intestinal mucosa), lysophosphatidylcholine (lyso-PC; purified from egg yolk), 3-iso-butyl-1-methylxanthine (IBMX), dibutyryl cAMP (db-cAMP) and Freund's adjuvant were from Sigma Chemical Company (St-Louis, MO); penicillin G and streptomycin sulfate were from Gibco (Burlington, ON). L-Cysteine, mercuripapain and iodoacetamide were from ICN (Aurora, Ohio). Anti-phosphotyrosine antibody (clone 4G10) was obtained from Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY). Orthovanadate was from Aldrich Chemical Co. Inc (Milwaukee, WI). ECL reagent kit was from Mandel Scientific (Boston, MA). Sephadex G-50 and Protein A-Sepharose were from Pharmacia Biotech Inc (Baie d'Urfé, QC). All other reagents used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

Freshly ejaculated bovine sperm were collected by using an artificial vagina and were obtained from the Centre d'Insémination Artificielle du Québec, (St-Hyacinthe, QC, Canada).

HDL were isolated by density gradient ultracentrifugation from normolipemic human serum as described by Thérien et al. [33]. The purity of HDL was assessed with the Paragon Lipo Gel Kit (Beckman Instruments, Fullerton, Ca) and the protein concentration was measured by a modified Lowry technique [43].

BSP protein purification. The bovine seminal plasma was first subjected to alcohol precipitation and the BSP-A1/-A2, -A3 and -30kDa proteins, were isolated by gelatin-Agarose affinity chromatography [36]. The adsorbed fractions were further fractionated on a Sephadex G-50 column. The purity of the BSP proteins was confirmed

by SDS-PAGE as described later.

Polyclonal Antibodies. The polyclonal antibodies against BSP proteins were raised in male rabbits as described previously [44, 45]. The antibodies were then purified by affinity chromatography on Protein A-Sepharose. Polyclonal antibodies against platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH) were used in control experiments.

Fabs. The antibodies adsorbed on Protein A-Sepharose were treated with mercuripapain for 1 h at 37°C (100 :1) (w/w) in 150 mM sodium-phosphate buffer, pH 7.0, containing 2 mM EDTA and 10 mM L-cysteine. The reaction was stopped by the addition of iodoacetamide to a final concentration of 25 mM [46]. The Fabs were separated from the Fcs and the intact antibodies by affinity chromatography on Protein A-Sepharose.

Sperm capacitation and AR. Studies were performed in modified Tyrode's medium as described previously [21, 33, 47]. Ejaculated sperm were washed twice (375 X g, 10 min) with mTALP, and were adjusted to a concentration of 1×10^8 /ml. Then sperm were incubated at a final concentration of 5×10^7 /ml under different conditions : with or without heparin (12 µg/ml) or HDL (10-160 µg/ml) for capacitation, with or without antibodies against BSP-A1/A2, -A3, -30kDa, or PAF-AH (1.25-160 µg/ml) or Fabs against BSP-A1/A2, -A3, -30k, or PAF-AH (1.25-40 µg/ml) for inhibition studies, and with or without IBMX (100 µM), db-cAMP (1 mM) for phosphorylation studies. The incubation was carried out in 11 X 75 mm culture tubes for 5 h with heparin or 8 h with HDL at 39°C in a humidified environment of 5% CO₂ [48]. At the end of incubation, lyso-PC was added at 100 µg/ml and the sperm were incubated for an additional 15 min. This concentration of lyso-PC was previously shown to induce acrosome reactions (AR) in capacitated sperm while having no effect on noncapacitated sperm [19]. Prior to drying and staining, randomly selected slides were examined using

light microscopy to verify sperm motility. The percentage of sperm that were acrosome-reacted was determined on air-dried sperm smears with a naphthol yellow-erythrosin B-staining procedure [49]. The viability of sperm was determined by staining the cells with eosine-negrosine [50], and observation under the microscope. In all of our studies on capacitation, sperm viability was between 65 to 70%.

Phosphorylation studies. After capacitation, 100 μ l aliquots of the sperm suspension were subjected to centrifugation (10 000 X g, 3 min) at room temperature and the sperm pellet was then washed in 1 ml PBS containing 0.2 mM orthovanadate [23]; the sperm pellet was then resuspended in sample buffer without mercaptoethanol and boiled for 5 min [51]. After centrifugation (10 000 X g, 3 min) the supernatant was removed and boiled in the presence of 5% mercaptoethanol in sample buffer for 5 min, and then subjected to SDS-PAGE as described below.

SDS-PAGE and immunoblotting. The SDS-PAGE was performed on a 10% gel for the phosphorylation studies and on a 15% gel for the verification of polyclonal antibodies. The proteins were transferred to Immobilon-P (Mandel Scientific, Boston, MA) as described by Towbin [52] and submitted to immunodetection [39] using ECL reagent (Mandel Scientific, Boston, MA).

Protein assay. The protein content of the sample was measured by the Bradford method [53] or by weighing purified proteins on a Cahn microbalance (model C-31); Fisher Scientific, Fairlawn, NJ.

Data analysis. The data presented here were analyzed for significant differences by a Student t-test on paired observations or by the Friedman nonparametric test.

RESULTS

Specificity of antibodies

We first established the specificity of the polyclonal antibodies. The alcohol-precipitated bovine seminal plasma proteins (crude bovine seminal plasma proteins, cBSP) and purified BSP proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to Immobilon-P membranes and probed with purified antibodies. Anti-BSP-A1/A2 recognized only BSP-A1/A2 proteins in the cBSP sample and purified BSP-A1/A2 proteins and not the other type of BSP proteins (-A3 and -30kDa). Similarly, anti-BSP-A3 recognized only BSP-A3 protein and anti-30kDa recognized only the BSP-30kDa protein (Fig.1 A, B and C). In these studies we used the antibodies against PAF-AH [44] as a negative control. The PAF-AH is another protein that is found in bovine seminal plasma in large concentration (~ 0.5 mg/ml). The anti-PAF-AH did not recognize any of the BSP proteins (Fig. 1D).

Effect of polyclonal antibodies or Fabs against BSP-A1/A2, -A3, -30kDa on sperm capacitation with heparin

Thérien et al [21, 33] have shown that the BSP proteins potentiate the sperm capacitation induced by heparin and HDL. In the present study, we evaluated the involvement of BSP proteins in the capacitation induced by these two different capacitation agents. We determined the levels of AR induced by lyso-PC when ejaculated sperm were incubated with heparin (12 $\mu\text{g/ml}$) and increasing concentrations of polyclonal antibodies (0-40 $\mu\text{g/ml}$) raised against the three different purified BSP proteins. In the absence of antibodies and in the presence of heparin $38.4 \pm 1.1\%$ of sperm underwent the AR (Fig. 2A, outside) which correlated with previous results [21]. Without the heparin the control level of the AR (medium alone) was approximately 12.9

$\pm 0.9\%$. The percentage of AR gradually decreased by increasing the concentrations of antibodies against BSP-A1/A2, -A3, -30kDa (Fig. 2A). At a concentration of 40 $\mu\text{g/ml}$ the AR levels were similar to the control level ($16.8 \pm 0.9\%$). In contrast, the addition of PAF-AH antibodies (negative control) resulted in no change in the percentage of AR ($36.7 \pm 2.5\%$).

In order to confirm that the inhibition was due to the interaction between the antibodies and the antigen and not due to interaction between the Fc portion of the antibodies, we prepared Fabs produced with our antibodies and conducted experiments as described above. The Fabs of the anti-BSP proteins (40 $\mu\text{g/ml}$) also inhibited the AR ($19.5 \pm 0.4\%$), whereas in the presence of the same concentrations of Fabs of PAF-AH, the levels of the AR were $38.7 \pm 1.8\%$ (Fig. 2B). The utilisation of Fabs instead of complete antibodies allowed us to eliminate the possible interactions between the antibodies. The antibodies and the Fab yielded essentially the same results (Fig. 2).

Effect of polyclonal antibodies against BSP-A1/A2, -A3, -30kDa on capacitation mediated with HDL

Similar experiments were performed using HDL (160 $\mu\text{g/ml}$) instead of heparin to induce sperm capacitation. We have shown in our previous studies that 160 $\mu\text{g/ml}$ of HDL is required to induce maximum capacitation in epididymal sperm exposed to BSP proteins [33]. In the absence of antibodies, the AR level was $42.4 \pm 1.1\%$ with HDL compared to $17.1 \pm 1.6\%$ for the control (Fig. 3A; outside). In the presence of HDL and increasing concentrations of polyclonal BSP antibodies, the percentage AR did not change (Fig. 3A). For an antibody concentration equivalent (40 $\mu\text{g/ml}$) to the one that inhibited AR in the presence of heparin there was no inhibition with HDL. The results obtained with the antibodies against the BSP proteins were the same as those obtained with antibodies against PAF-AH. The different results that we obtained with HDL may

indicate that the concentration of HDL used was too high or that the concentration of antibodies used was too low. Using lower concentrations of HDL (80 and 40 $\mu\text{g/ml}$), the percentage AR did not change ($43.8 \pm 2.7\%$ and $43.4 \pm 2.2\%$) (Fig. 3B). We also used 20 and 10 $\mu\text{g/ml}$ of HDL and we obtained the same results (data not shown). Similarly, at higher concentrations of antibodies (80 and 160 $\mu\text{g/ml}$), no change occurred that would indicate that the antibodies had an effect on the sperm AR (Table 1).

Studies of phosphorylation during capacitation with heparin or HDL

The second part of this study was to verify whether or not the phosphorylation observed during capacitation with heparin, as previously reported [23], also occurs during capacitation with HDL. For this study we incubated ejaculated sperm in the presence of HDL (10 and 160 $\mu\text{g/ml}$) or heparin (12 $\mu\text{g/ml}$) and with IBMX (100 mM) and db-cAMP (1 mM). As previously reported [23], IBMX (inhibitor of phosphodiesterase) and db-cAMP enhance tyrosine phosphorylation. After the incubation period of 5 or 8 h with heparin and HDL, respectively, an aliquot of the sperm suspension was removed and centrifuged. The sperm pellet was subjected to SDS-PAGE and immunodetection of phosphotyrosine was performed. In the presence of heparin, there was an increase in the intensity of the phosphorylation bands (40 – 96 kDa) that was stimulated by the addition of db-cAMP and IBMX (Fig. 4A). Concomitant AR studies were done for the incubation with heparin or HDL (Table 2). The results show that the increase in phosphorylation correlated with the increase in AR levels obtained in the presence of heparin. However, there was no increase in phosphorylation with HDL (Fig.4B). The only increase in phosphorylation observed was following the addition of IBMX and db-cAMP to the sample and not because of the presence of HDL. In this case, the level of AR was not correlated with an increase in tyrosine phosphorylation (Table 2).

DISCUSSION

Ejaculated sperm acquire fertilizing ability by interacting with capacitation factors present in the female genital tract. Several studies have shown that incubation with heparin or heparin-like GAG promotes capacitation in bovine sperm [15, 49, 54, 55]. Other studies have shown that the cholesterol efflux mediated by HDL may be an important step in sperm capacitation [34, 56, 57]. Bovine seminal plasma contains a family of three heparin-binding proteins (BSP proteins) that increase the number of binding sites for heparin on the sperm surface [41] and thereby potentiate heparin-induced bovine sperm capacitation [21]. These BSP proteins also potentiate HDL-induced bovine sperm capacitation [33] and stimulate sperm cholesterol efflux during ejaculation [57]. However, in each instance the mechanisms involved are not well understood.

In the current study, by using specific polyclonal antibodies against BSP proteins, we showed that heparin and HDL induce capacitation by different mechanisms. The bovine ejaculated sperm capacitation induced by heparin is inhibited by the addition of polyclonal antibodies against BSP proteins. These data correlate with our previous studies which indicate that the BSP proteins play an important role in heparin-induced capacitation [21]. The inhibition of sperm capacitation by anti-BSP proteins was dose-dependent and reached a maximum at a concentration of 40 $\mu\text{g/ml}$ of antibodies. The specificity of the inhibition was further confirmed by using Fabs instead of polyclonal antibodies. The studies with Fabs indicated that the inhibition was not due to the aggregation of sperm but due to the interaction of Fabs with the sperm-bound BSP proteins. Furthermore, the polyclonal antibodies against the BSP proteins did not interact with heparin as revealed by a dot blot experiment (data not shown). In addition, polyclonal antibodies against PAF-AH did not inhibit capacitation. Taken together,

these results indicate that the polyclonal antibodies to BSP proteins prevent heparin binding to BSP proteins on the sperm membrane. Therefore, it appears that in order for sperm to undergo capacitation, heparin must interact with sperm membrane bound BSP proteins. It is interesting to note that the ejaculated sperm are coated with all three BSP proteins [58] and all three BSP proteins promote heparin-induced capacitation [21]. Therefore, one would expect only partial inhibition of capacitation with polyclonal antibodies against one type of BSP protein. However, in the present investigation all three antibodies independently inhibit heparin-induced capacitation in ejaculated sperm when compared to control levels. Therefore, it appears that the binding of antibodies to any one type of BSP proteins prevents the interaction of heparin with the other BSP proteins, possibly by steric hinderance.

The second finding of this study is that anti-BSP proteins do not inhibit the HDL-induced capacitation. This absence of inhibition was confirmed by using a high concentration of antibodies (160 $\mu\text{g/ml}$) and a low concentration of HDL (10 $\mu\text{g/ml}$). These results indicate that potentiation of HDL-induced capacitation by BSP proteins occurs by a different pathway. Previous studies have shown that HDL induces sperm cholesterol efflux during capacitation [30, 34]. Our recent study indicates that BSP proteins and HDL stimulate sperm cholesterol efflux independently [57]. Although BSP proteins induce a significant cholesterol efflux after sperm are ejaculated and mixed with seminal plasma, this efflux is insufficient to complete capacitation. A second cholesterol efflux induced by HDL in the female genital tract may be essential for completion of capacitation. This second sterol efflux appears to be BSP independent since polyclonal antibodies against BSP proteins did not inhibit HDL-induced capacitation. It is not known how HDL interacts with the sperm membrane. HDL alone stimulates cholesterol efflux from ejaculated or epididymal sperm and capacitate sperm to levels induced in the presence of heparin [33, 57] and therefore it is unlikely that BSP

proteins are involved in HDL-induced capacitation. This is supported by the fact that the antibodies against BSP proteins had no effect on HDL-induced capacitation. Therefore it is likely that HDL exerts its effect by directly interacting with the sperm membrane.

The third finding of this study is that the HDL-induced capacitation, in contrast to heparin-induced capacitation, is not associated with an increase in protein tyrosine phosphorylation. The result with heparin confirms the report by Galantino-Homer et al [23] that the heparin-induced capacitation is associated with tyrosine phosphorylation. However, it should be noted that while this group reported that the levels of AR in the presence of IBMX or cAMP change significantly, no such changes were observed in our experiments. A cross talk between the PKA pathways and tyrosine phosphorylation has been reported [23]. Parrish et al [59] showed that IBMX and certain derivatives of cAMP do not induce capacitation in the absence of heparin and our results are in agreement with these observations.

In view of the present results, we propose the following mechanisms for heparin and HDL-induced sperm capacitation in the female reproductive tract. Capacitation in bovine sperm begins as soon as sperm are ejaculated and mixed with seminal vesicle secretions. The BSP proteins, the major products of the seminal vesicles, induce initial cholesterol efflux from sperm and prime them to undergo capacitation following further interaction with either heparin or HDL in the oviduct. A portion of the BSP proteins also coats the sperm membrane. With heparin-induced capacitation, the sperm-bound BSP proteins act as heparin receptors. Heparin could interact with the sperm membrane via BSP proteins to induce a series of intracellular events such as an increase in pH, Ca^{2+} and cAMP. The exact cascade is unknown but this pathway does not include protein G-like factors that are known to be associated with PKA [28]. With HDL-induced capacitation, HDL in the oviduct could mediate a second cholesterol efflux step and

result in further significant alterations in the sperm membrane. This later step in capacitation is BSP-independent. Furthermore, the HDL-induced capacitation does not involve the cAMP cascade since there was no significant increase in the tyrosine phosphorylation. Currently, we are investigating the effect of BSP antibodies on tyrosine phosphorylation. It is also important to establish whether or not pH and Ca^{2+} alterations occur in addition to cholesterol efflux during HDL-induced capacitation.

In summary, the results indicate that the mechanisms of heparin- and HDL-induced bovine sperm capacitation are obviously different. Following ejaculation, the BSP proteins interact with the sperm membrane and stimulate sperm cholesterol efflux. This initial cholesterol efflux primes the sperm to undergo capacitation upon interaction with heparin or HDL. BSP proteins bind to the sperm membrane and increase the heparin-binding sites on the sperm membrane. BSP proteins therefore play an important role both in heparin-induced capacitation and also in tyrosine phosphorylation that occurs during heparin-induced capacitation. Any interruption of this interaction between sperm-bound BSP proteins and heparin results in disruption of capacitation. In an alternative pathway, following the initial cholesterol efflux by BSP proteins, HDL mediates a second efflux of cholesterol (BSP protein-independent) leading to capacitation but without inducing phosphorylation.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Dr. Kenneth D. Roberts for proofreading the manuscript.

1. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in Fallopian tubes. *Nature* 1951; 168:997-998.
2. Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res* 1951; 4:581-596.
3. Austin CR. The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 1952; 170:326.
4. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. New York: Raven Press; 1994: 189-317.
5. Go KJ, Wolf DP. The role of sterols in sperm capacitation. *Adv Lipid Res* 1983; 20:317-330.
6. Meizel S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat* 1985; 174:285-302.
7. Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat* 1985; 174:269-283.
8. Langlais J, Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 1985; 12:183-224.
9. Handrow RR, First NL, Parrish JJ. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool* 1989; 252:174-182.
10. Parrish JJ, Vrendenburgh WL, Lavin CA. Increases in bovine sperm intracellular calcium (Cai) and pH (pHi) during capacitation. *Biol Reprod* 1993; 48 (suppl 1):106.
11. Parks JE, Ehrenwald E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. In: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS (eds.), *Fertilization in Mammals*. Norwell, MA; 1990:155-167.
12. Florman HM, Babcock DF. Progress toward understanding the molecular basis of capacitation In: Wassarman PM (eds.), *Element of Mammalian Fertilization*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991: 105-132.
13. Kopf GS, Gerton GL. The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: Wassarman PM (eds.), *Element of Mammalian Fertilization*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991: 153-203.
14. Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* 1984; 104:287-296.
15. Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Structural comparisons among

- glycosaminoglycans to promote acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107:1326-1332.
16. Lee CN, Clayton MK, Bushmeyer SM, First NL, Ax RL. Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *J Anim Sci* 1986; 63:861-867.
 17. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Ax RL, First NL. Effect of sulfated glycoconjugates on capacitation and acrosome reaction of bovine and hamster spermatozoa. *Gamete Res* 1989; 24:403-413.
 18. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 1989; 40:1020-1025.
 19. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38:1171-1180.
 20. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* 1990; 42:899-915.
 21. Thérien I, Bleau G, Manjunath P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 1995; 53:1372-1379.
 22. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by heparin is correlated with ³H-heparin binding and is blocked by protamine sulfate. *Biol Reprod* 1988; 38 (suppl 1):59.
 23. Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 1997; 56:707-719.
 24. Garbers DL, Kopf GS. The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1980; 13:251-306.
 25. Tash JS, Means AR. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 1983; 28:75-104.
 26. Lindermann CB, Kanous KS. Regulation of mammalian sperm motility. *Arch Androl* 1989; 23:1-22.
 27. Berger T, Clegg ED. Adenylate cyclase activity in porcine sperm in response to female reproductive tract secretions. *Gamete Res* 1983; 7:169-177.
 28. Fraser LR, Monks NJ. Cyclic nucleotides and mammalian sperm capacitation. *J Reprod Fertil Suppl* 1990; 42:9-21.

29. Visconti P, Tezon JG. Phorbol esters stimulate cyclic adenosine 3',5' monophosphate accumulation in hamster spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol Reprod* 1989; 40:223-231.
30. Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* 1990; 25:195-204.
31. Brantmeier SA, Grimmer RR, Ax RL. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J Dairy Sci* 1987; 70:2145-2149.
32. Jaspard B, Collet X, Barbaras R, Manent J, Vieu C, Parinaud J, Chap H, Perret B. Biochemical characterization of pre-beta 1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. *Biochemistry* 1996; 35:1352-1357.
33. 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.
34. Langlais J, Kan FWK, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res* 1988; 20:185-201.
35. Manjunath P. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. In: Sairam MR, Atkinson LE (eds.), *Gonadal Proteins and Peptides and their Biological Significance*. Singapore: World Scientific Publishing Company; 1984: 49-61.
36. 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.
37. 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.
38. 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 Corps.; 1988: 259-273.
39. 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.
40. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids. *J Biol Chem* 1992; 267:10149-10155.
41. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of

- heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26:313-318.
42. 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.
 43. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87:206-210.
 44. Soubeyrand S, Lazure C, Manjunath P. Phospholipase A2 from bovine seminal plasma is a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Biochem J* 1998; 329: 41-47.
 45. Harlow E, Lane D. Immunization. In: *Antibodies, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.; 1988:92-120.
 46. Kontou M, Vatzaki EH, Kokla A, Acharya KR, Oikonomakos NG, Tzartos SJ. Characterisation, crystallisation and preliminary X-ray diffraction analysis of a Fab fragment of rat monoclonal antibody with very high affinity for the human muscle acetylcholine receptor. *FEBS Letters* 1996; 389:195-198.
 47. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 1989; 41:683-699.
 48. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* 1990; 42:899-915.
 49. Lenz RW, Ball GD, Lohse JK, First NL, Ax RL. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1983; 28:683-690.
 50. Dott HM, Foster GC. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential "life-dead" stain. *J Reprod Fertil* 1972; 29:443-445.
 51. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
 52. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.
 53. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

54. Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106:1092-1098.
55. Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reaction in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res* 1985; 12:345-355.
56. Davis BK. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:7560-7564.
57. Thérien I, Moreau R, Manjunath P. The major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1998; in press.
58. Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50: 27-37.
59. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Uguz C, First NL. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol Reprod* 1994; 51:1099-1108.

Table 1

Assesment of the AR with HDL (160 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of different concentrations of antibodies against BSP-30kDa

Antibody concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Acrosome reaction ^{a,b,c} (%)
0	42.9 \pm 0.8
80	44.8 \pm 1.5
160	46.6 \pm 1.6

The control level is 17.1 \pm 1.6%

^a Ejaculated sperm were incubated with HDL (160 $\mu\text{g/ml}$) and different concentrations of anti-BSP-30kDa, after an 8 h incubation, lyso-PC was added to induce the AR.

^b Results represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

^c Non-significant for all concentrations of antibodies vs control (without antibodies).

Table 2

Assessment of the AR during phosphorylation studies

Conditions	Capacitating agent	
	Heparin 12 μ g/ml	HDL 10 μ g/ml
	% AR ^{c,d}	
Control (without agent) ^a	12.0 \pm 1.2	13.8 \pm 0.6
+ agent ^b	42.6 \pm 3.3 ^e	36.4 \pm 1.2 ^e
+ IBMX, dbcAMP ^a	17.1 \pm 1.2	22.3 \pm 1.4
+ agent + IBMX, dbcAMP ^b	39.6 \pm 2.7 ^e	40.6 \pm 2.3 ^e

^a without agent^b with heparin or HDL^c Ejaculated sperm were incubated with heparin (0 or 12 μ g/ml) and HDL (0 or 10 μ g/ml) and with or without IBMX (100 mM) and db-cAMP (1 mM), after a 5 and an 8 h incubation, lyso-PC was added to induce the AR.^d Results represent the mean \pm SEM of three independent experiments.^e Significantly different vs control (without agent): $p < 0.05$

Legends to figures

Figure 1. Immunoblotting of BSP proteins. Proteins were separated by SDS-PAGE on a 15% gel, transferred to Immobilon-P and probed with purified antibodies directed against BSP proteins or PAF-AH; A) anti-BSP-A1/A2, B) anti-BSP-A3, C) anti-BSP-30kDa and D) anti-PAF-AH. Lane 1, cBSP; lane 2, purified BSP-A1/A2; lane 3, purified BSP-A3; lane 4, purified BSP-30kDa; lane 5, purified PAF-AH.

Figure 2. Effect of polyclonal antibodies or Fabs raised against BSP proteins on sperm capacitation with heparin. Ejaculated sperm (1×10^8 /ml) were incubated in the presence or absence of heparin (12 $\mu\text{g/ml}$, outside) and in the presence of antibodies or Fabs against BSP proteins (0-40 $\mu\text{g/ml}$) for 5 h at 39°C. The sperm were then incubated with lyso-PC (100 $\mu\text{g/ml}$) for 15 minutes and AR was assessed as described in materials and methods. A) with antibodies, B) with Fabs. Open square anti-BSP-A1/A2, open triangle anti-BSP-A3, open diamond anti-BSP-30kDa, open circle anti-PAF-AH. The values represent the mean \pm SEM of three independent experiments with 200 sperm assayed/sample. Non-significant differences for anti-BSP-A1/A2, -A3, -30 kDa vs control (without heparin).

Figure 3. Effect of antibodies raised against BSP proteins on capacitation with HDL. The same protocol as in Figure 2 using HDL instead of heparin and incubation for 8 h. A) HDL alone (outside) or 160 $\mu\text{g/ml}$ with antibodies; open square anti-BSP-A1/A2, open triangle anti-BSP-A3, open diamond anti-BSP-30kDa, open circle anti-PAF-AH. B) with anti-BSP-30kDa (0 – 40 $\mu\text{g/ml}$) and with different concentration of HDL. Open circle 40 $\mu\text{g/ml}$, open triangle 80 $\mu\text{g/ml}$, open square 160 $\mu\text{g/ml}$. The values

represent the mean \pm SEM of three independent experiments with 200 sperm assayed/sample. Significant differences for all antibodies (40 μ g/ml) vs control (without HDL): $p < 0.05$.

Figure 4. The effects of heparin, HDL and db-cAMP plus IBMX on protein tyrosine phosphorylation. Ejaculated sperm were incubated in the presence of heparin (0 or 12 μ g/ml) or HDL (0 or 160 μ g/ml), for 5 or 8 h at 39°C. After these incubations an aliquot was submitted to SDS-PAGE, transferred to an Immobilon-P membrane and probed for protein tyrosine phosphorylation. A) Incubation with heparin after 5 h and B) Incubation with HDL after 8 h.

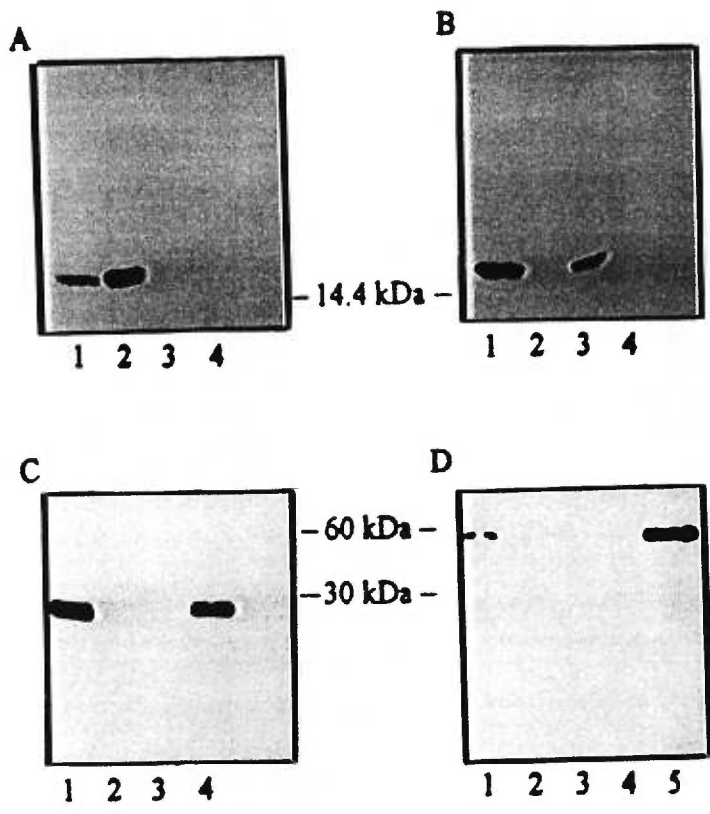


Figure 1

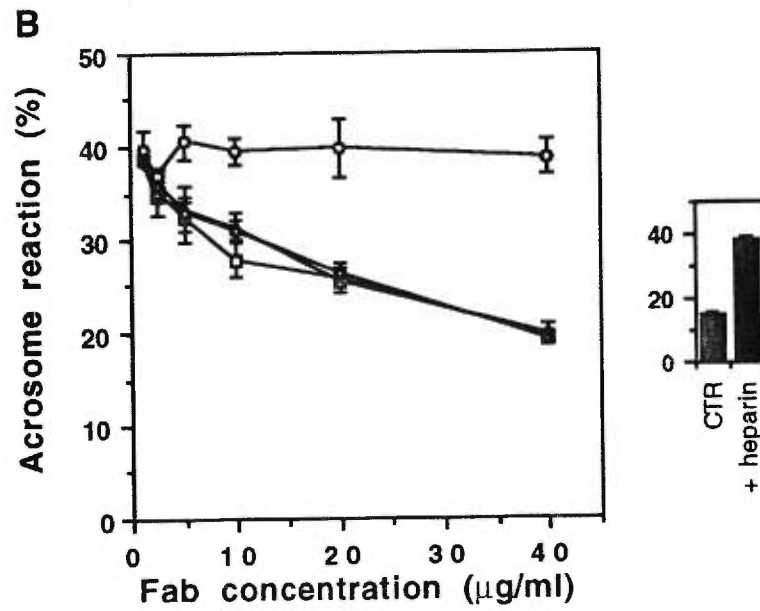
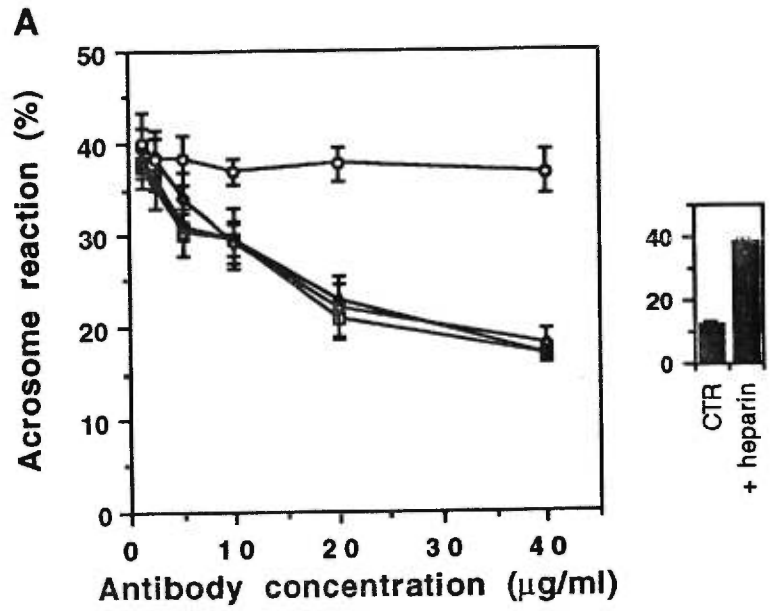


Figure 2

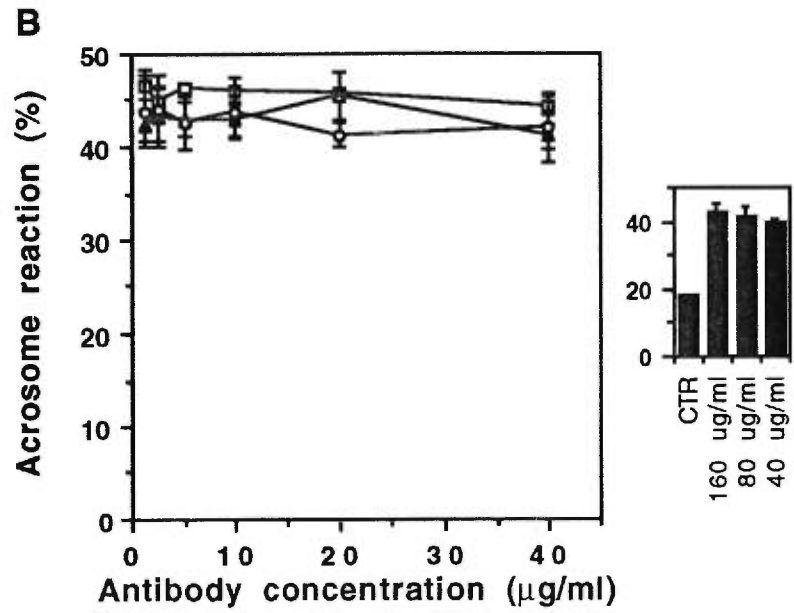
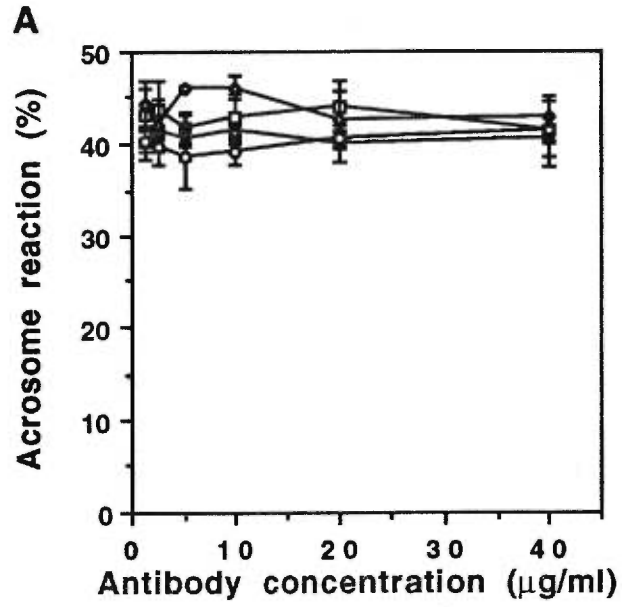


Figure 3

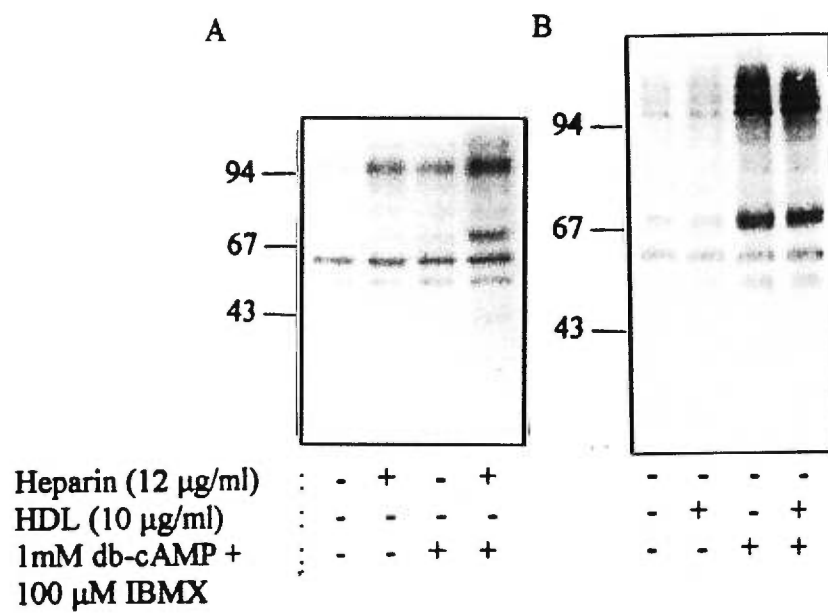


Figure 4

5. DISCUSSION

Suite à l'éjaculation, les spermatozoïdes bovins et des mammifères sont incapables de féconder l'oocyte. Ils doivent donc subir une série de modifications qui leur permettront d'acquérir leur pouvoir fécondant. Ces modifications sont appelées capacitation. Ce processus de capacitation a lieu lors de leur transit dans le tractus génital femelle et permet aux spermatozoïdes de subir la réaction de l'acrosome au contact de l'oocyte. Cette réaction de l'acrosome permet au spermatozoïde de pénétrer la zone pellucide et de fusionner avec la membrane plasmique de l'ovule (voir section 1.1).

Malgré plusieurs années d'étude, les mécanismes biochimiques de la capacitation sont peu connus. Plusieurs transformations biochimiques sont associées à la capacitation telles un influx de calcium, une augmentation de la concentration d'AMPc et une perméabilité membranaire aux ions. Des changements au niveau de la membrane plasmique sont aussi observés tels l'efflux de cholestérol et la diminution du rapport cholestérol/phospholipide (voir section 1.3.1).

Les spermatozoïdes éjaculés acquièrent leur habileté à féconder l'oocyte en interagissant avec des facteurs capacitants présents dans le tractus génital femelle. Comme nous l'avons vu aux sections 1.3.2. et 1.3.3, l'héparine et des HDL sont d'importants inducteurs de la capacitation.

Le plasma séminal contient un mélange de sécrétions provenant du testicule, de l'épididyme et des glandes accessoires et contiendrait des facteurs qui influenceraient de

façon positive ou négative la fécondation. Le plasma séminal bovin contient une famille de protéines acides connue sous le nom des protéines BSP. Ces protéines sont sécrétées par les vésicules séminales et constituent la partie protéique majeure du plasma séminal (20-40 mg/ml). Ces protéines se lient aux phospholipides de la surface du spermatozoïde lors de l'éjaculation et interagissent avec deux facteurs capacitants: l'héparine et les HDL. Ainsi, elles activeraient la capacitation des spermatozoïdes bovins induite par l'héparine en augmentant le nombre de sites de liaison pour l'héparine à la surface du spermatozoïde. De plus, les protéines BSP potentialiseraient aussi la capacitation induite par les HDL en stimulant un efflux de cholestérol de la membrane du spermatozoïde suite à l'éjaculation.

Dans la présente étude, nous avons tenté d'approfondir les mécanismes d'action des protéines BSP, de l'héparine et des HDL dans la capacitation des spermatozoïdes bovins. En utilisant des anticorps polyclonaux contre les protéines BSP, nous avons montré que l'héparine et les HDL induisaient la capacitation par des mécanismes différents.

5.1. Purification des protéines BSP et génération des anticorps polyclonaux

Premièrement afin d'obtenir des anticorps polyclonaux, les protéines BSP ont été purifiées en tirant profit de leurs affinités différentes pour la gélatine et de leur poids moléculaires différents (séparation sur tamis moléculaire). Nous pouvons observer aux Figures 3-5 à 3-7 que les protéines sont homogènes et très pures. Les protéines BSP-A1 et BSP-A2 ne peuvent être séparées par cette méthode étant donné qu'elles ne diffèrent que par leur composition en sucres (Manjunath et al., 1988). Toutefois, il n'est pas

nécessaire de les séparer car les anticorps polyclonaux ne distingueront pas les deux protéines. Les protéines pures ont été injectées aux lapins puis les anticorps ont été isolés du sérum. Nous avons vérifié leur spécificité par immunodétection (section 4.1, figure 1). Les trois anticorps ne reconnaissaient que leur propre antigène.

5.2. Capacitation induite par l'héparine

Suite à l'incubation des spermatozoïdes éjaculés en présence d'héparine et d'anticorps, nous avons observé que la capacitation des spermatozoïdes bovins éjaculés était inhibée par l'addition d'anticorps polyclonaux contre les protéines BSP (section 4.1, figure 2A). L'inhibition de la capacitation, mesurée par le pourcentage de réaction de l'acrosome, des spermatozoïdes par les anticorps dirigés contre chacune des trois protéines BSP était dose-dépendante et son maximum se situait à 40 µg/ml d'anticorps. Le niveau d'inhibition à cette concentration d'anticorps est comparable au niveau de capacitation obtenu pour le contrôle qui consiste en des spermatozoïdes incubés sans héparine et sans anticorps (section 4.1, figure 2A). La spécificité de cette inhibition a été confirmée premièrement en utilisant un anticorps contre une protéine du plasma séminal non impliquées dans la capacitation, la PAF-AH, un facteur activateur de plaquette acétylhydrolase. L'utilisation de cet anticorps n'a pas affecté le pourcentage de réaction de l'acrosome. Deuxièmement, nous avons pu démontrer par "dot blot" que nos anticorps polyclonaux n'interagissaient pas avec l'héparine (données non présentées). Enfin des Fabs, soit la partie de reconnaissance de l'antigène des anticorps, obtenus par digestion avec la papaïne (qui sépare les Fabs des Fcs), ont été utilisés au lieu des anticorps polyclonaux. L'étude avec les Fabs montre que l'inhibition observée avec l'anticorps complet n'était pas due à une agrégation des spermatozoïdes induit par

la portion Fc mais bien due à l'interaction des Fabs aux protéines BSP liées à la membrane du spermatozoïde. À première vue, le pourcentage de réaction de l'acrosome est un peu moins élevée à 40 µg/ml pour les Fabs (section 4.1, figure 2B) comparé aux anticorps complets. Cette différence n'est toutefois pas significative. Quoiqu'il en soit, il est évident que la liaison de l'anticorps aux protéines BSP liées à la membrane du spermatozoïde empêche la liaison ou du moins l'action de l'héparine au niveau de la capacitation. Il est à noter que les spermatozoïdes ont été lavés plusieurs fois afin d'enlever le plasma séminal, donc les BSP libres. Ces données sont en corrélation avec des résultats précédents, utilisant des spermatozoïdes épидидymaires, donc sans BSP, qui montraient que les protéines BSP jouaient un rôle important dans la capacitation induite par l'héparine (Thérien *et al.*, 1995).

Il est intéressant de noter que les spermatozoïdes éjaculés sont recouvert des trois protéines BSP (Manjunath *et al.*, 1994) et que chacune joue un rôle semblable dans la capacitation des spermatozoïdes bovins (Thérien *et al.*, 1995). Donc, une inhibition partielle de la capacitation devrait être observée en ajoutant seulement des anticorps contre un type de protéines BSP. Toutefois, dans la présente étude, chacun des trois anticorps inhibe presque totalement la capacitation induite par l'héparine des spermatozoïdes éjaculés. Ainsi, la liaison des anticorps à l'une ou l'autre des protéines BSP prévient la liaison de l'héparine aux protéines BSP, possiblement à cause de la propriété naturelle d'agrégation des protéines BSP. Il est aussi possible que le fait de ne bloquer qu'une partie des BSP empêche la transmission d'un signal quelconque. Les protéines BSP sont aussi présentes en quantité différente dans le plasma séminal, BSP-A1/A2 se retrouvant en plus grande quantité. Une plus forte inhibition par l'anticorps

contre la protéine BSP-A1/A2 devrait donc être observée. Cette égalité dans l'inhibition pourrait être causée par une quantité égale des protéines au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde et non proportionnellement à la quantité retrouvée dans le plasma séminal.

5.3. Capacitation induite par les HDL

Par la suite, nous avons observé que les anticorps contre les protéines BSP n'inhibaient pas la capacitation induite par les HDL dans nos conditions expérimentales (160 µg/mL de HDL) même en utilisant 40 µg/mL d'anticorps (section 4.1, figure 3A). Cette absence d'inhibition de la capacitation était toujours observée même à une concentration de 160 µg/ml d'anticorps et de plus faibles concentrations de HDL (40 µg/ml) (section 4.1, Tableau 1 et figure 3B) pour les anticorps contre la protéine BSP-30 kDa. Ces résultats semblent indiquer que la capacitation induite par les HDL a lieu par une voie différente de celle de l'héparine. Des études précédentes ont montré que les HDL stimulaient l'efflux de cholestérol des spermatozoïdes durant la capacitation (Ehrenwald *et al.*, 1990; Langlais *et al.*, 1988). Une récente étude dans notre laboratoire montre que les protéines BSP et les HDL stimulent deux efflux de cholestérol différents durant la capacitation (Thérien *et al.*, 1998). Même si les protéines BSP induisent un efflux de cholestérol significatif, suite à l'éjaculation, cet efflux n'est pas suffisant pour compléter la capacitation. Un second efflux de cholestérol induit par les HDL du tractus génital femelle serait essentiel à la capacitation.

Dans nos expériences, nous utilisons des spermatozoïdes éjaculés, donc déjà en contact avec les protéines BSP et qui ont donc déjà subi l'efflux de cholestérol provoqué

par les protéines BSP durant le transport, avant même les premières manipulations. L'interaction des HDL avec la membrane du spermatozoïde n'est pas bien connue. Les HDL seuls stimulent l'efflux de cholestérol des spermatozoïdes éjaculés et capacitent les spermatozoïdes au même niveau que lors de l'induction par l'héparine. L'effet des HDL sur la capacitation des spermatozoïdes epididymaires est moindre, confirmant l'importance des BSP pour la première étape d'efflux de cholestérol lors de la capacitation (Thérien *et al.*, 1997; 1998). D'après nos résultats, il semble peu probable que les protéines BSP soient impliquées dans le deuxième efflux de cholestérol induite par les HDL. Les HDL interagiraient donc directement avec la membrane du spermatozoïde, sans l'intermédiaire des protéines BSP.

5.4. Analyse de la phosphorylation induite par l'héparine et les HDL

Des études récentes ont montré une corrélation entre l'augmentation de la phosphorylation des tyrosines et l'augmentation de la capacitation induite par l'héparine. Cette phosphorylation est induite par la protéine kinase dépendante de l'AMPc (voir section 1.3.2.3.3). Nous avons donc évalué le niveau de phosphorylation des tyrosines intracellulaires lors de la capacitation induite soit par l'héparine ou par les HDL. Nous avons utilisé le db-AMPc, un analogue non hydrolysable de l'AMPc, et l'IBMX, un inhibiteur de la phosphodiesterase, pour augmenter le taux basal de phosphorylation. Après l'incubation, nous avons extrait les protéines du spermatozoïde et avons fait une détection à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre les tyrosines phosphorylées (section 4.1, figure 4 et Tableau 2). Nous avons montré dans cette étude que, contrairement à la capacitation induite par l'héparine, la capacitation induite par les HDL n'entraînait pas d'augmentation de la phosphorylation des tyrosines. Nos résultats

obtenus avec l'héparine confirment les résultats rapportés par Galantino-Homer *et al.* (1997) montrant que la capacitation induite par l'héparine était associée à une augmentation de la phosphorylation des tyrosines. Par contre, mentionnons que ce groupe a aussi montré une grande augmentation du niveau de la réaction de l'acrosome en présence d'IBMX ou d'analogues de l'AMPc sans inducteur. Cette augmentation n'a pas été observée dans nos conditions expérimentales et est similaire aux résultats de Parrish *et al.* (1994). Cette différence pourrait être expliquée par la méthode utilisée pour détecter la réaction de l'acrosome. Le groupe de Galantino-Homer utilise une technique mise au point chez le cheval utilisant la fluorescence, tandis que pour cette étude, nous avons utilisé une coloration à l'érythrosine B et à l'acide flavianique mise au point chez le bovin. La phosphorylation des tyrosines est impliquée dans plusieurs cascades de transmission de signaux intracellulaires. Des études récentes indiquent également une relation entre l'activation de la PKA et les phosphotyrosines. Cette relation a été montrée par "down regulation" (soit en utilisant des inhibiteurs de l'AMPc ou de la PKA) au niveau des récepteurs de l'insuline (Begum *et al.*, 1992) ou en "up regulation" en utilisant des agonistes de l'AMPc chez le spermatozoïde lors de la capacitation induite par l'héparine (Galantino-Homer *et al.*, 1997). Il serait intéressant de poursuivre ces expériences afin de mieux comprendre les mécanismes de capacitation des spermatozoïdes, par exemple de déterminer quelles protéines sont phosphorylées dans la cascade.

5.5. Conclusions et perspectives

D'après les résultats que nous avons obtenus dans cette étude, nous proposons deux mécanismes différents de capacitation des spermatozoïdes bovins qui a lieu dans le

tractus génital femelle. La capacitation des spermatozoïdes bovins commence tout de suite au moment de l'éjaculation avec le mélange des spermatozoïdes avec les sécrétions des vésicules séminales. Les protéines BSP qui sont les protéines majeures du plasma séminal, induisent un efflux initial de cholestérol des spermatozoïdes. Cet efflux déstabilise la membrane et la prépare à l'étape suivante de la capacitation. L'héparine ou les HDL, présents en quantité suffisante dans l'oviducte, induisent deux mécanismes différents menant à la capacitation. Lors de la capacitation induite par l'héparine, les protéines BSP liées à la membrane du spermatozoïde agiraient comme des récepteurs pour l'héparine. L'héparine interagit avec la membrane via les protéines BSP et peut-être d'autres effecteurs pour induire une série d'événements intracellulaires tels une augmentation du pH, de Ca^{2+} et d'AMPC, l'activation de la PKA et la phosphorylation des tyrosines (voir section 1.2.3.3). Les différents intermédiaires ne sont pas connus, mais cette voie n'inclut pas de protéines G qui sont souvent associées à la voie de la PKA (Fraser et Monks, 1990). Pour ce qui est de la capacitation induite par les HDL, les HDL de l'oviduct entraîneraient un deuxième efflux de cholestérol qui entraîneraient une plus grande altération de la membrane. Cette étape serait indépendante des protéines BSP. De plus, la capacitation induite par les HDL n'implique pas l'AMPC car aucune augmentation de la phosphorylation des tyrosines n'a été observée. Cette déstabilisation de la membrane serait suffisante pour entraîner la réaction de l'acrosome lors de l'interaction du spermatozoïde avec la zone pellucide. Si nous comparons ce mécanisme au modèle de la figure 1-3, nous pouvons voir que le modèle montre une activation de l'adénylate cyclase qui entraînerait une augmentation de l'AMPC en présence d'accepteurs de cholestérol, ce qui n'est pas du tout observé dans cette étude. De plus les auteurs de cette revue indiquait que les HDL pourrait remplacer la BSA au

niveau de l'efflux de cholestérol. Il est donc probable que les HDL ne remplace pas exactement la BSA ou bien que tout comme nous l'avons démontré l'efflux de cholestérol n'influence pas la concentration d'AMPc.

Afin de poursuivre ces travaux, il serait intéressant d'étudier l'effet des anticorps contre les protéines BSP sur la phosphorylation des tyrosines. Les deux mécanismes sont différents, mais il doit y avoir des communs pour que le résultat soit le même. Il serait important de vérifier si il y a des changements au niveau du pH et du Ca^{2+} lors du deuxième efflux de cholestérol dans la capacitation induite par les HDL. Aussi, il faudrait vérifier la composition lipidique après la capacitation induite par l'héparine.

6. BIBLIOGRAPHIE

Acott TS, Hoskins DD. Bovine sperm forward motility protein: Binding to epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1981; 24: 234-240.

Acott TS, Katz DF, Hoskins DD. Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: Effects of forward motility protein and epididymal maturation. *Biol Reprod* 1983; 29: 389-399.

Allison AC, Hartree EF. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod Fertil* 1970; 21: 501-515.

Arnoult C, Zeng Y, Florman HM. ZP-3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J Cell Biol* 1996; 134: 637-645.

Aumüller G, Vesper M, Seitz J, Kemme M, Scheit KH. Binding of a major secretory protein from bull seminal vesicles to bovine spermatozoa. *Cell Tissue Res* 1988; 252: 377-384.

Austin CR. Sperm maturation in the male and female genital tracts. Dans: Metz CB, Monroy A (eds.), *Biology of fertilization*, Vol. 2. New York: Academic Press; 1985: 121-155.

Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res* 1951; 4:581-596.

Austin CR. The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 1952; 170:326.

Austin CR, Bishop MWH. Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proc R Soc Lond* 1958; 149: 234-240.

Babcock DF, Rufo GA, Lardy HA. Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1327-1331.

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

Bearer EL, Friend DS. Modification of anionic-lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. *J Cell Biol* 1982; 92: 604-615.

Bedford JM, Calvin HI. Changes in -S-S- structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observation in sub-mammalian species. *J Exp Biol* 1974a; 187: 181-204.

- Bedford JM, Calvin HI. The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Biol* 1974b; 188: 137-156.
- Begum N, Graham AL, Sussman KE, Draznin B. Role of cAMP in mediating effects of fasting on dephosphorylation of the insulin receptor. *Am J Physiol* 1992; 262: E142-E149.
- Bellve AR, O'Brien DA. The mammalian spermatozoa: Structure and temporal assembly. Dans: Hartman JF (eds.), *Mechanism and control of animal fertilization*. New York: Academic Press; 1983: 55-137.
- Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Rosenfeld DL, Hershlag A. Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation associated membrane cholesterol loss. *Hum Reprod* 1993; 8: 2141-2154.
- Berger T, Clegg ED. Adenylate cyclase activity in porcine sperm in response to female reproductive tract secretions. *Gamete Res* 1983; 7:169-177.
- Bernal A, Torres J, Reyes A, Rosaldo A. Presence and regional distribution of sialyltransferase in the epididymis of the rat. *Biol Reprod* 1980; 23: 290-293.
- Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 1992; 356: 248-252.
- Boyd J, Williamson FB, Gettins P. A physico-chemical study of heparin: Evidence for a calcium-induced co-operative conformational transition. *J Mol Biol* 1980; 137: 175-190.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- Brantmeier SA, Grimmer RR, Ax RL. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J Dairy Sci* 1987; 70:2145-2149.
- Braun T. The effect of divalent cations on bovine spermatozoal adenylate cyclase activity. *J Cyclic Nucleotide Res* 1975; 1: 271-281.
- Brown MS, Goldstein JL. Dans: Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine* (11th ed.), p. 1651, McGraw-Hill (1987).
- 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* 1996; 399: 147-152.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Töpfer-Petersen. Isolation and

characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. FEBS 1997; 407: 201-206.

Cardin AD, Weintraub HJR. Molecular modelling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 1989; 9:21-32.

Carr DW, Acott TS. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of a sperm motility quiescence factor. *Biol Reprod* 1984; 30: 913-925.

Carr DW, Acott TS. Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biol Reprod* 1989; 41: 907-920.

Carr DW, Acott TS. The phosphorylation of a putative sperm microtubule-associated protein 2 (MAP2) is uniquely sensitive to regulation. *Biol Reprod* 1990; 43: 795-805.

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

Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in Fallopian tubes. *Nature* 1951; 168:997-998.

Chang MC. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 1957; 179: 258-260.

Chang SCS, Jones JD, Ellefson RD, Ryan RJ. The porcine ovarian follicle: I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biol Reprod* 1976; 15: 321-328.

Collado ML, Castro G, Hicks JJ. Effect of spermatozoa upon carbonyl anhydrase activity of rabbit endometrium. *Biol Reprod* 1979; 20: 747-750.

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

Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol reprod* 1998; 59: 7-11.

Cross NL. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol Reprod* 1996; 54: 138-145.

Cross NL, Razy-Faulkner P. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol reprod* 1997; 56: 1169-1174.

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

DasGusta S, Mills CL, Fraser LR. Ca^{2+} related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 135-143.

Davis BK. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. Symposium on the pharmacological Effects of Lipids. AOCS Monograph No 5 1978: 145-157.

Davis BK. Role of albumin in capacitation of spermatozoa. Seventh Ann Meeting Soc Study Reprod 1974: 74-75.

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

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

Davis BK, Richard B, Bedigin K. Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1546-1550.

deLamirande E, Leclerc P, Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 175-194.

Delgado NM, Reyes R, Huacuja L, Carranco A, Merchant H, Rosado A. Decondensation of human sperm nuclei by glycosaminoglycan sulfate from sea urchin egg. *J Exp Zool* 1982; 224: 457-460.

DeMayo FJ, Mizoguchi H, Dukelow WR. Fertilization of squirrel monkey and hamster ova in the rabbit oviduct. *Science* 1980; 208: 1468-1469.

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

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.

Dott HM, Foster GC. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential "life-dead" stain. *J Reprod Fertil* 1972; 29:443-445.

Dukelow WR, Chernoff HN, Williams WL. Properties of decapacitation factor and presence in various species. *J Reprod Fertil* 1967; 213: 1397-1400.

Duncan AE, Fraser LR. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse

sperm proteins during capacitation in vitro: identification of an Mr 95 000 phosphotyrosine-containing protein. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 287-299.

Eddy EM et O'Brien DA. The Spermatozoon. Dans: Knobil E, Neil J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. New York: Raven Press; 1994: 29-77.

Eddy EM, Vernon RB, Muller CH, Hahnel AC, Fenderson BA. Immunodissection of sperm surface modifications during epididymal maturation. *Am J Anat* 1985; 174: 225-237.

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

Ehrenwald E, Parks JE, Foote RH. Cholesterol efflux from bovine sperm I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Res* 1988; 20: 145-157.

Ehrenwald E, Parks JE, Foote RH. Effect of cholesterol removal from bovine sperm on penetration of hamster and bovine oocytes in vitro. *Biol Reprod* 1987; 36 (Suppl no 1): 54.

Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1984; 25: 1017-1058.

Esch FS, Ling NC, Böhlen P, Ying SY, Guillemin R. Primary structure of PDC-109, a major constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Comm* 1983; 113: 861-867.

Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 1975; 44: 394-436.

Fidge NH, Nestel PJ. Identification of apolipoproteins involved in the interactions of human high density lipoprotein with receptors on cultured cells. *J Biol Chem* 1985; 260: 3570-3575.

Fleming AD, Yanagimachi R. Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* 1984; 229: 485-489, 1984.

Fleming AD, Yanagimachi R. Fertile life of acrosome-reacted guinea pig spermatozoa. *J of Exp Zool* 1981; 220: 109-115.

Florman HM, Corron ME, Kim TD, Babcock DF. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Developmental Biology* 1992; 152: 304-314, 1992.

Florman HM, Babcock DF. Progress toward understanding the molecular basis of capacitation Dans: Wassarman PM (eds.), *Element of Mammalian Fertilization*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991: 105-132.

Florman HM, First NL. Regulation of acrosomal exocytosis. II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Developmental Biology* 1988; 128: 464-473.

Florman HM, Lemos JR, Arnoult C, Kazam I, Li C, O'Toole CM. A tale of two channels: a perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm. *Biol Reprod* 1998; 59: 12-16.

Focarelli R, Giuffrida A, Capparelli S, Scibona M, Fabris FM, Francavilla F, Francavilla S, Giovampaola CD, Rosati F. Specific localization in the equatorial region of gp20, a 20 kDa sialylglycoprotein of the capacitated human spermatozoon acquired during epididymal transit which is necessary to penetrate zona-free hamster eggs. *Mol Human Reprod* 1998; 4: 119-125.

Fraser LR. Accelerated mouse sperm penetration *in vitro* in the presence of caffeine. *J Reprod Fertil* 1979; 57: 377-384.

Fraser LR. Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time *in vitro* in mouse sperm spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1981; 62: 63-72.

Fraser LR, Monks NJ. Cyclic nucleotides and mammalian sperm capacitation. *J Reprod Fertil Suppl* 1990; 42:9-21.

Friend DS. Freeze-fracture alterations in guinea pig sperm membranes preceding gamete fusion. Dans: Gilula NB (eds.), *Membrane-membrane Interactions*. New York: Raven Press; 1980: 153-165.

Frelin C, Vigne P, Ledoux A, Lazdunski M. The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. *Eur J Biochem* 1988; 174: 3-14.

Funaki Y, Fukushima M, Ono H. Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation *in vitro*. *J Exp Zool* 1983; 226: 137-142.

Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 1997; 56:707-719.

Garbers DL. Molecular basis of fertilization. *Ann Rev Biochem* 1989; 58: 719-742.

Garbers DL, First NL, Lardy HA. Properties of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase isolated from bovine epididymal spermatozoa. *J Biol Chem* 1973; 248: 875-879.

Garbers DL, Kopf GS. The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1980; 13:251-306.

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

- Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 1985; 32: 145-153.
- Go KJ, Wolf DP. The role of sterols in sperm capacitation. *Adv Lipid Res* 1983; 20:317-330.
- Goh PP, White IG. Control of ram sperm adenylate cyclase by divalent cations. *Aust J Biol Sci* 1988; 41: 377-385.
- Gross MK, Toscano DG, Toscano WA Jr. Calmodulin-mediated adenylate cyclase from mammalian sperm. *J Biol Chem* 1987; 262: 8672-8676.
- Gwatkin RBL. Fertilization mechanisms in man and mammals. 1977; New York: Plenum Press.
- Hamilton DW. Steroid function in the mammalian epididymis. *J Reprod Fertil* 1971; Suppl. 13: 89-97.
- Hamilton DW. UDP-galactose: N-acetylglucosamine galactosyltransferase in fluids from rat testis and epididymis. *Biol Reprod* 1980; 23: 377-385.
- Hamilton DW. Evidence for α -lactoalbumin-like activity in reproductive tract fluids of the male rat. *Biol Reprod* 1981; 25: 385-392.
- Hamilton DW, Fawcett DW. *In vitro* synthesis of cholesterol and testosterone from acetate by rat epididymis and *vas deferens*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 133: 693-695.
- Hamilton DW, Gould RP. Galactosyltransferase activity associated with rat epididymis. *Anat Rec* 1980; 196: 71a.
- Handrow RR, Boehm SK, Lenz RW, Robinson JA, Ax RL. Specific binding of the glycosaminoglycan 3H-heparin to bovine, monkey and rabbit spermatozoa in vitro. *J Androl* 1984; 5: 51-63.
- Handrow RR, First NL, Parrish JJ. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool* 1989; 252:174-182.
- Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107:1326-1332.
- Harlow E, Lane D. Immunization. In: *Antibodies, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.; 1988:92-120.
- Helm G, Owman CH, Rosengren E, Sjoberg NO. Regional and cyclic variations in catecholamine concentrations of the human fallopian tube. *Biol Reprod* 1982; 26: 553-558.
- Hildebronth JD, Codina J, Tash JS, Kirchick HS, Lipschultz L, Sekure RD, Binboumer

- L. The membrane-bound spermatozoal adenylate cyclase system does not share coupling characteristics with somatic cell adenylate cyclase. *Endocrinology* 1985; 116: 1357-1366.
- Hirst PJ, DeMayo FJ, Dukelow WR. Xenogenous fertilization of laboratory and domestic animals in the oviduct pseudopregnant rabbit. *Theriogenology* 1981; 15: 67-75.
- Hoskins DD. Adenine nucleotide mediation of fructolysis and motility in bovine epididymal spermatozoa. *J Biol Chem* 1973; 248: 1135-1140.
- Hoskins DD, Casillas ER, Stephens DT. Cyclic AMP-dependent protein kinase of bovine epididymal spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 48: 1331-1338.
- Hoskins DD, Johnson DJ, Brandt H, Acott TS. Evidence for a role for forward motility protein in the epididymal development of sperm motility. Dans: Fawcett DW, Bedford JM (eds.), *The Spermatozoon*. München-Baltimore: Urban and Schwarzenberg; 1979: 43-53.
- Huang CL, Cogan MG, Cragoe EJ Jr, Ives HE. Thrombin activation of the Na⁺/H⁺ exchanger in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 14134-14140.
- Hyne RV, Edwards KP, Smith JD. Changes in guinea pig sperm intracellular sodium and potassium content during capacitation and treatment with monovalent ionophore. *Gamete Res* 1985; 12: 65-73.
- Infante JP, Huszagh VA. Synthesis of highly unsaturated phosphatidylcholine in the development of sperm motility: A role for epididymal glycerol-3-phosphorylcholine. *Mol Cell Biochem* 1985; 69: 3-9.
- Ishijima S, McCracken JA, Witman GB. Flagellar movement of intact and demembrated ram spermatozoa. *J Cell Biol* 1985; 101: 364a.
- Ishijima S, Mohri H. A quantitative description of flagellar movement in golden hamster spermatozoa. *J Exp Biol* 1985; 114: 463-475.
- Jaspard B, Collet X, Barbaras R, Manent J, Vieu C, Parinaud J, Chap H, Perret B. Biochemical characterization of pre-beta 1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. *Biochemistry* 1996; 35:1352-1357.
- Jaspard B, Fournier N, Vieitez G, Atger V, Barbaras R, Vieu C, Manent J, Chap H, Bertrand P, Collet X. Structural and functional comparison of HDL from homologous human plasma and follicular fluid. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997; 17: 1605-1613.
- Johnson MH. The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. *J Reprod Fertil* 1975; 44: 167-184.

Jones R, Brown CR. Association of epididymal secretory proteins showing α -lactoalbumin-like activity with plasma membrane of rat spermatozoa. *Biochem J* 1982; 206: 161-164.

Kemme M, Madiraju MVVS, Krauhs E, Zimmer M, Scheit KH. The major protein of bull seminal plasma is a secretory product of seminal vesicle. *Biochim Biophys Acta* 1986; 884: 282-290.

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 sperm. *Nucleosides & Nucleotides* 1988a; 7: 693-697.

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 sperm. *DNA* 1988b; 7: 595-599.

Killian GJ, Chapman DA, Kavanaugh H, Deaver DR. Changes in the composition of oviductal fluid during the cow estrus cycle. *Biol Reprod* 1987; 36 (Suppl no 1): 54

Koehler JK, Nudelman ED, Hakomori S. A collagen-binding protein of the surface of ejaculated rabbit spermatozoa. *J Cell Biol* 1980; 86: 529-536.

Kontou M, Vatzaki EH, Kokla A, Acharya KR, Oikonomakos NG, Tzartos SJ. Characterisation, crystallisation and preliminary X-ray diffraction analysis of a Fab fragment of rat monoclonal antibody with very high affinity for the human muscle acetylcholine receptor. *FEBS Letters* 1996; 389:195-198.

Kopf GS, Gerton GL. The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: Wassarman PM (eds.), *Element of Mammalian Fertilization*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991: 153-203.

Kornblihtt AR, Umezawa K, Vibe-Pedersen K, Baralle FE. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO Journal* 1985; 4: 1755-1759.

Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 1992; 13 : 342-348.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

Lakoski KA, Carron CP, Cabot CL, Saling PM. Epididymal maturation and the acrosomal reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biol Reprod* 1988; 38: 221-233.

Lakoski KA, William C, Saling PM. Proteins of the acrosomal region in mouse sperm: immunological probes reveal post-testicular modifications. *Gamete Res* 1989; 23: 21-37.

Langlais J, Kan FWK, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res* 1988; 20: 185-201.

Langlais J, Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 1985; 12:183-224.

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.

Lee CN, Ax RL. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci* 1984; 67: 2006-2009.

Lee CN, Clayton MK, Bushmeyer SM, First NL, Ax RL. Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *J Anim Sci* 1986; 63:861-867.

Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reaction in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res* 1985; 12:345-355.

Legault Y, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD. Steroid sulfatase activity of the hamster reproductive tract during the estrous cycle. *Biol Reprod* 1980; 23: 720-725.

Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106:1092-1098.

Lenz RW, Ball GD, Lohse JK, First NL, Ax RL. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1983a; 28:683-690.

Lenz, RW, Bellin ME, Ax RL. Rabbit spermatozoa undergo an acrosome reaction in the presence of glycosaminoglycans. *Gamete Res* 1983b; 8: 11-19.

Leyton L, Saling P. 95 kD sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 1989; 57: 1123-1130.

Lindermann CB, Kanous KS. Regulation of mammalian sperm motility. *Arch Androl* 1989; 23:1-22.

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 Corps.; 1988: 259-273.

Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. Major proteins of bovine

seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50: 27-37.

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.

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.

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. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. Dans: Sairam MR, Atkinson LE (eds.), *Gonadal Proteins and Peptides and their Biological Significance*. Singapore: World Scientific Publishing Company; 1984: 49-61.

Marieb EN. *Anatomie et physiologie humaines*. Montréal, Canada: Edition du renouveau pédagogique; 1993; 978.

Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87:206-210.

McMullen BA, Fujikawa K. Amino acid sequence of the heavy chain of human alpha-factor XIIa (activated Hageman factor). *Journal of Biological Chemistry* 1985; 260: 5328-5341.

Meizel S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat* 1985; 174:285-302.

Meizel S, Lui CW, Working PK, Mrsny RJ. Taurine and hypotaurine: Their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm *in vitro* and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Dev Growth Diff* 1980; 22: 483-494.

Miller DJ, Ax RL. An improved assay for measuring heparin binding to bull sperm. *J Dairy Science* 1988; 71: 239-244.

Miller DJ, Ax RL. Chemical N-desulfation of heparin negates its ability to capacitate bovine spermatozoa. *Gamete Res* 1989; 23: 451-465.

Miller DJ, Ax RL. Carbohydrates and fertilization in animals. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 184-198.

Miller DJ, Hunter AG. Effect of osmolarity and glycosaminoglycans on motility, capacitation, acrosome reaction, and *in vitro* fertilizability of bovine ejaculated sperm. *J*

Dairy Sci 1986; 69: 2915-2924.

Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. Biol Reprod 1990; 42:899-915.

Miller NE, La Ville A, Crook D. Direct evidence that reverse cholesterol transport is mediated by high density lipoprotein in the rabbit. Nature 1985; 314: 109-111.

Mohri H, Ishijima S. Epididymal maturation and motility of mammalian spermatozoa. In: Serio M. ed. Prospects in Andrology, New York: Raven Press; 1989: 291-298.

Mohri H, Yanagimachi R. Characteristics of motor apparatus in testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa: a study using demembrated sperm model. Exp Cell Res 1980; 127: 191-196.

Monaco L, Bond HM, Howell KE, Cortese R. A recombinant apoA-I-protein A hybrid reproduces the binding parameters of HDL to its receptor. EMBO 1987; 6: 3253-3260.

Morgan DO, Edman JC, Standring DN, Fried VA, Smith MC, Roth RA, Rutter WJ. Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. Nature 1987; 329: 301-307.

Mrsny RJ, Siiteri JE, Meizel S. Hamster sperm Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase: Increased activity during capacitation *in vitro* and its relationship to cyclic nucleotides. Biol Reprod 1984; 30: 573-584.

Murofushi H, Ishiguro K, Takahashi D, Ikeda J, Sakai H. Regulation of sperm flagellar movement by protein phosphorylation and dephosphorylation. Cell Motility and the Cytoskeleton 1986; 6: 83-88.

Nikolopoulou M, Soucek DA, Vary JC. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. Biochim Biophys Acta 1985; 815: 486-498.

Okabe M, Takada K, Adachi T, Kohama Y, Miura T. Inconsistent reactivity of an anti-sperm monoclonal antibody and its relationship to sperm capacitation. J Reprod Immunol 1986a; 9: 67-70.

Okabe M, Takada K, Adachi T, Kohama Y, Miura T, Aonuma S. Studies on sperm capacitation using monoclonal antibody. Disappearance of an antigen from anterior part of mouse sperm head. J Pharmacol Dyn 1986b; 9: 55-60.

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

Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. Sperm surface components involved in the

control of the acrosome reaction. *Am J Anat* 1985; 174:269-283.

Owen NE, Villereal ML. Evidence for a role of calmodulin in serum stimulation of Na influx in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 3537-3541.

Parks JE, Ehrenwald E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. In: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS (eds.), *Fertilization in Mammals*. Norwell, MA; 1990:155-167.

Parks JE, Hammerstedt RH. Developmental changes occurring on the lipid of ram epididymal sperm plasma membranes. *Biol Reprod* 1985; 32:653-668.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. (a) Capacitation of bovine spermatozoa by heparin is correlated with ³H-heparin binding and is blocked by protamine sulfate. *Biol Reprod* 1988; 38 (suppl 1):59.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. (a) Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 1989; 41:683-699.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Ax RL, First NL. (b) Effect of sulfated glycoconjugates on capacitation and acrosome reaction of bovine and hamster spermatozoa. *Gamete Res* 1989; 24:403-413.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 1989; 40:1020-1025.

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

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. (b) Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38:1171-1180.

Parrish JJ, Vrendenburgh WL, Lavin CA. Increases in bovine sperm intracellular calcium (Cai) and pH (pHi) during capacitation. *Biol Reprod* 1993; 48 (suppl 1):106.

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

Pellicciari C, Hosokawa Y, Fukuda M, Romanini MGM. Cytofluorometric study of nuclear sulphhydryl and disulphide groups during sperm maturation in the mouse. *J Reprod Fertil* 1983; 68: 371-376.

Perret BP, Parinaud J, Ribbes H, Moatti JP, Pontonnier G, Chap H, Douste-Blazy L. Lipoprotein and phospholipid distribution in human follicular fluids. *Fertility & Sterility* 1985; 43: 405-409.

Phelps BM, Koppel DE, Primakoff P, Myles DG. Evidence that proteolysis of the

surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *J Cell Biol* 1990; 111: 1839-1847.

Phelps BM, Myles DG. The guinea pig sperm plasma membrane proteins, pH-20, reaches the surface via two transport pathways and becomes localized to a domain after an initial uniform distribution. *Dev Biol* 1987; 123: 63-72.

Phillips DM, Jones R, Shalgi R. Alterations in distribution of surface and intracellular antigens during epididymal maturation in rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1991; 29: 347-356.

Presti FT. The role of cholesterol in regulating membrane fluidity. Dans: Aloia RC, Boggs JM (eds.), *Membrane Fluidity in Biology, Vol. 4: Cellular Aspect*. Orlando Fla: Academic Press; 1985: 97-146.

Primakoff P, Hyatt H, Tredick-Kline J. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm egg membrane fusion. *J Cell Biol* 1987; 104: 141-149.

Rahi H, Srivastava PN. Hormonal regulation of lysosomal hydrolases in the reproductive tract of rabbit. *J Reprod Fertil* 1983; 67: 447-455.

Rao VH, Sarmah BC, Bhattacharyya NK. Xenogenous fertilization of goat ova in the rabbit oviduct. *J Reprod Fertil* 1984; 71: 377-379.

Reyes R, Carranco A, Hernandez O, Rosada A, Merchant H, Delgado N. Glycosaminoglycan sulfate as acrosomal reaction-inducing factor of follicular fluid. *Arch Androl* 1984; 12: 203-209.

Reynolds AB, Thomas TS, Wilson WL, Oliphant G. Concentration of acrosome stabilizing factor (ASF) in rabbit epididymal fluid and species-specificity of anti-ASF antibodies. *Biol Reprod* 1989; 40: 673-680.

Rigoni F, Dell'Antone P, Deana R. Evidence for a pH-driven Ca^{2+} uptake in EGTA-treated bovine spermatozoa. *Eur J Biochem* 1987; 169: 417-422.

Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors. *Ann Rev Biochem* 1988; 57: 375-413.

Russel LD, Peterson RN, Hunt W, Strack LE. Post-testicular surface modifications and contributions of reproductive tract fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 1984; 30: 959-978.

Saling PM, Bedford JM. Absence of species-specificity for mammalian sperm capacitation *in vivo*. *J Reprod fertil* 1981; 63: 119-123.

Savion N, Laherty R, Cihen D, Lui G, Gospodarowicz D. Role of lipoproteins and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in progesterone production by cultured bovine granulosa cells. *Endocrinology* 1982; 110: 13-22.

Schaefer EJ, Foster DM, Zech LA, Lindgren FT, Brewer HB, Levy RI. The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 262-267.

Scheit KH, Kemme M, Aumüller G, Seitz J, Hagedorff G, Zimmer M. The major protein of bull seminal plasma: Biosynthesis and biological function. *Biosci Rep* 1988; 8: 589-608.

Schlegel RA, Hammerstedt R, Cofer GP, Kozarsky K. Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. *Biol Reprod* 1986; 34: 379-391.

Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, Chrétien M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. *Biochem J* 1987; 243: 195-203.

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

Shinohara H, Yanagimachi R, Srivastava PN. Enhancement of the acrosome reaction of hamster spermatozoa by proteolytic enzymes, kallikrein, trypsin, and chymotrypsin. *Gamete Res* 1985; 11: 19-28.

Simpson ER, Rochelle DB, Carr BR, MacDonald PC. Plasma lipoproteins in follicular fluid of human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 1469-1471.

Soubeyrand S, Lazure C, Manjunath P. Phospholipase A2 from bovine seminal plasma is a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Biochem J* 1998; 329: 41-47.

Stein DM, Fraser LR. Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation *in vitro*. *Gamete Res* 1984; 10: 283-299.

Stein DM, Fraser LR, Monks NJ. Adenosine and Gpp(NH)p modulate mouse sperm adenylate cyclase. *Gamete Res* 1986; 13: 151-158.

Suzuki F. Changes in the distribution of intramembranous particuls and Filipin-sterol complexes during epididymal maturation of golden hamster spermatozoa. *J Ultrast Mol Struct Res* 1988; 100: 39-54.

Suzuki F. Morphological aspects of sperm maturation. In: Bavister BD, Cummins J, Roldans ERS, eds. *Fertilization in mammals*. Norwell, Massachusetts: Serono Symposia USA; 1990: 65-75.

Swarup G, Garbers DL. Phosphoprotein phosphatase activity of sea urchin spermatozoa. *Biol Reprod* 1982; 26: 953-960.

Tajima Y, Okamura N, Sugita Y. The activating effects of bicarbonate on sperm motility and respiration at ejaculation. *Biochem Biophys Acta* 1987; 924: 519-529.

Tajima Y, Okamura N. The enhancing effects of anion channel blockers on sperm by bicarbonate. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1034: 326-332.

Tang FY, Hoskins DD. Phosphoprotein phosphatase of bovine epididymal spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 62: 328-335.

Tash JS, Krinks M, Patel J, Means RL, Klee CB, Means AR. Identification, characterization and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J of Cell Biology* 1988; 106: 1625-1633.

Tash JS, Means AR. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 1983; 28:75-104.

Thérien I, Bleau G, Manjunath P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 1995; 53:1372-1379.

Thérien I, Moreau R, Manjunath P. The major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1998; 59: in press.

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.

Thomas TS, Reynolds AL, Oliphant G. Evaluation of the site of synthesis of rabbit sperm acrosome stabilizing factor using immunocytochemical and metabolic labeling techniques. *Biol Reprod* 1984; 30: 693-705.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.

Tulsiani DRP, Skudlarek MD, Holland MK, Orgebin-Crist MC. Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biol Reprod* 1993; 48: 417-428.

Uguz C, Vredenburgh WL, Parrish JJ. Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate. *Biol Reprod* 1994; 51: 1031-1039.

Vijayaraghavan S, Hoskins DD. Changes in the mitochondrial calcium influx and efflux properties are responsible for the decline in sperm calcium during epididymal maturation. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 186-194.

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995; 121: 1129-1137.

Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, Kopf GS. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 1998; 19: 242-248.

Visconti P, Tezon JG. Phorbol esters stimulate cyclic adenosine 3',5' monophosphate accumulation in hamster spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol Reprod* 1989; 40:223-231.

Volgmayr JK, Sawyer FR. Surface transformation of ram spermatozoa in uterus, oviduct and cauda epididymal fluids in vitro. *J Reprod Fertil* 1980; 78: 315-325.

Vredenburg-Wilberg WL, Parrish JJ. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 490-502.

Ward CR, Kopf GS. Molecular events mediating sperm activation. *Dev Biol* 1993; 158: 9-34.

Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* 1984; 104:287-296.

Wassarman PM. The biology and chemistry of fertilization. *Science* 1987; 235: 553-560.

Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* 1988; 57: 415-442, 1988.

Weinstein I, Turner FC, Soler-Argilaga C, Heimberg M. Effects of ethynyl estradiol on serum lipoprotein lipids in male and female rats. *Biochim Biophys Acta* 1978; 559: 259-287.

White DR, Aitken RJ. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res* 1989; 22: 163-177.

White IG, Volgmayr JK. ATP-induced reactivation of ram testicular, caudal epididymal, and ejaculated spermatozoa extracts with Triton X-100. *Biol Reprod* 1986; 34: 183-193.

Wolf DE, Cardullo RA. Physiological properties of the mammalian sperm plasma membrane. Dans: Baccetti (ed.), *Comparative Spermatology 20 Years After*. New York: Raven Press; 1991: 599-604.

Wolf DE, Lipscomb AC, Maynard VM. Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biochemistry* 1988; 27: 860-865.

Wolf DE, Voglmayer JK. Diffusion and regionalization in membranes of maturing ram spermatozoa. *J Cell Biol* 1984; 98: 1678-1684.

Wooten MW, Voglmayer JK, Wrenn RW. Characterization of cAMP-dependant protein

kinase and its endogenous substrate proteins in ram testicular, cauda epididymal and ejaculated spermatozoa. *Gamete Res* 1987; 16: 57-68.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. Dans: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. New York: Raven Press; 1994: 189-317.

Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane (Review). *Biochim Biophys Acta* 1985; 822: 267-287.

Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reprod* 1991; 6: 1265-1274.

Zarintash RJ, Cross NL. Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biol Reprod* 1996; 55: 19-24.