

Université de Montréal

**Étude de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins en présence
des protéines majeures du plasma séminal bovin et des facteurs capacitants**

Par

Isabelle Thérien

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph. D.) en

Biochimie

Septembre, 1998

© Isabelle Thérien, 1998



W
4
USB
1999
v.031

University of Missouri

Library of the Department of Chemistry
University of Missouri

Department of Chemistry
University of Missouri

Library of the Department of Chemistry
University of Missouri



UNIVERSITY OF MISSOURI
LIBRARY OF THE DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée
**Étude de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins en présence
des protéines majeures du plasma séminal bovin et des facteurs capacitants**

Présentée par
Isabelle Thérien

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Président :	Dr R. Morais
Directeur de recherche :	Dr P. Manjunath
Membre du jury :	Dr L. DesGroseillers
Examineur externe :	Dr C. Gagnon
Représentant du doyen :	Dr F. Dubé

Thèse acceptée le : 99.01.25

capacitation.....	18
1.4.2. Changement dans la distribution des composantes intramembranaires	19
1.4.3. Changement dans la composition lipidique de la membrane plasmique lors de la capacitation	19
1.4.3.1. Le cholestérol.....	20
1.4.4. Variation de la concentration intracellulaire des ions durant la capacitation.....	21
1.4.4.1. Le calcium.....	21
1.4.4.2. Le potassium	23
1.4.4.3. L'ion bicarbonate.....	23
1.4.5. La phosphorylation sur tyrosine des protéines spermatiques lors de la capacitation.....	24
1.4.6. Les dérivés actifs de l'oxygène	25
1.4.7. L'hyperactivation	26
1.5. LA RÉACTION DE L'ACROSOME.....	27
1.6. LES FACTEURS CAPACITANTS PRÉSENTS DANS LE TRACTUS GÉNITAL FEMELLE	30
1.7. LES GLYCOSAMINOGLYCANES ET L'HÉPARINE.....	30
1.7.1. Caractérisation des glycosaminoglycanes.....	30
1.7.2. Source des glycosaminoglycanes	31

1.7.3.	Rôle des glycosaminoglycanes et de l'héparine dans la capacitation et la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes ..	33
1.7.4.	Voies de signalisation intracellulaire sollicitées par l'héparine ..	35
1.7.5.	Liaison de l'héparine au spermatozoïde	35
1.7.6.	Protéines spermatiques liant l'héparine	36
1.7.7.	Mécanisme d'action de l'héparine.....	36
1.8.	LES ACCEPTEURS DE CHOLESTÉROL	37
1.8.1.	L'albumine.....	37
1.8.2.	Les lipoprotéines de haute densité	38
1.8.2.1.	Le rôle physiologique des HDL.....	39
1.8.2.2.	Implication des HDL au niveau de la capacitation	39
1.9.	RÔLE DU PLASMA SÉMINAL BOVIN DANS LA CAPACITATION	40
1.9.1.	Rôle du plasma séminal bovin dans la capacitation induite par l'héparine	41
1.10.	LES PROTÉINES MAJEURES DU PLASMA SÉMINAL BOVIN	41
1.10.1.	Propriétés biochimiques des protéines BSP.....	42
1.10.2.	Structure des protéines BSP	45
1.10.3.	Distribution tissulaire des protéines BSP.....	45
1.10.4.	Propriétés de liaisons des protéines BSP.....	45
1.10.5.	Protéines analogues aux protéines BSP chez d'autres espèces..	47

1.11. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	48
2. ARTICLES.....	50
2.1. CHARACTERIZATION OF THE MAJOR PROTEINS OF BOVINE SEMINAL FLUID BY TWO-DIMENSIONAL POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS. L. Desnoyers, I. Thérien et P. Manjunath, <i>Molecular Reproduction and Development</i> , 37:425-435, 1994.....	50
2.2. PHOSPHATIDYLCHOLINE-BINDING PROTEINS OF BOVINE SEMINAL PLASMA MODULATE CAPACITATION OF SPERMATOZOA BY HEPARIN. I. Thérien, G. Bleau et P. Manjunath, <i>Biology of Reproduction</i> , 52: 1372-1379, 1995.....	62
2.3. MAJOR PROTEINS OF BOVINE SEMINAL PLASMA MODULATE SPERM CAPACITATION BY HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN. I. Thérien, S. Soubeyrand et P. Manjunath, <i>Biology of Reproduction</i> , 57: 1080-1088, 1997.....	71
2.4. MAJOR PROTEINS OF BOVINE SEMINAL PLASMA AND HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN INDUCE CHOLESTEROL EFFLUX FROM EPIDIDYMAL SPERM. I. Thérien, R. Moreau et P. Manjunath, <i>Biology of Reproduction</i> , 59: 768-776, 1998.....	82
2.5. HEPARIN AND HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN MEDIATE BOVINE SPERM CAPACITATION BY DIFFERENT MECHANISMS. M.-E. Lane, I. Thérien, R. Moreau et P. Manjunath, <i>Biology of Reproduction</i> , 60: 169-175, 1999.....	92
2.6. TYPE II DOMAINS OF BSP-A1/-A2 PROTEINS: BINDING PROPERTIES, LIPID EFFLUX, AND SPERM CAPACITATION POTENTIAL. R. Moreau, I. Thérien, C. Lazure et P. Manjunath, <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 246: 148-154,	

1998.....	101
3. DISCUSSION.....	110
3.1. EFFLUX DE CHOLESTÉROL MEMBRANAIRE STIMULÉ PAR LES PROTÉINES BSP LORS DE L'ÉJACULATION	110
3.2. DIMINUTION DE LA CHARGE NETTE DES SPERMATOZOÏDES PAR LES PROTÉINES BSP	112
3.3. CAPACITATION INDUITE PAR L'HÉPARINE EN PRÉSENCE DES PROTÉINES BSP	114
3.4. CAPACITATION INDUITE PAR LES HDL	120
3.5. MODÈLE DE CAPACITATION DES SPERMATOZOÏDES BOVINS	122
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	129
5. BIBLIOGRAPHIE.....	132

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I: VARIATIONS DANS LE NOMBRE DE SPERMATOZOÏDES DURANT LEUR TRANSIT DANS LE TRACTUS REPRODUCTEUR FEMELLE.....	12
TABLEAU II: PARCOURS DU SPERMATOZOÏDE DANS LE TRACTUS GÉNITAL FEMELLE.....	14
TABLEAU III: DIFFÉRENCES CHIMIQUES ENTRE LES DIFFÉRENTES CLASSES DE GLYCOSAMINOGLYCANES.....	32
TABLEAU IV: PROTÉINES CONTENANT DES STRUCTURES DE TYPE II.....	46

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

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1:	LA SPERMATOGENÈSE	3
FIGURE 2:	REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DU SPERMATOZOÏDE	7
FIGURE 3:	VOIES HYPOTHÉTIQUES DE SIGNALISATION MENANT À LA CAPACITATION	16
FIGURE 4:	LA RÉACTION DE L'ACROSOME ET LA PÉNÉTRATION DES SPERMATOZOÏDES.....	28
FIGURE 5:	STRUCTURE SECONDAIRE DES PROTÉINES BSP	43
FIGURE 6:	INDUCTION DE LA CAPACITATION PAR L'HÉPARINE	118
FIGURE 7:	MODÈLE DE LA CAPACITATION IMPLIQUANT LES PROTÉINES BSP.....	123

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

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

α :	alpha
Å:	armstrong
AMPc:	adénosine monophosphate cyclique
anticorps anti-BSP:	anticorps polyclonaux contre les protéines BSP
apoA-1:	apolipoprotéine A-1
AR:	réaction de l'acrosome (<i>acrosome reaction</i>)
aSFP:	la protéine acide du fluide séminal (<i>acidic seminal fluid protein</i>)
ATP:	adénosine triphosphate
BSA:	albumine sérique de boeuf (<i>bovine serum albumin</i>)
BSP:	plasma séminal bovin (<i>bovine seminal plasma</i>)
C:	cholestérol
CBSP ou cBSP:	précipitat de plasma séminal bovin (<i>crude bovine seminal plasma</i>)
2D:	deux dimensions
Db ou domaine b:	second domaine de type II des protéines BSP
Db-cAMP :	AMPc dibutyryle
DEAE:	diéthylaminoéthyle
DLSP:	plasma séminal dialysé et lyophilisé (<i>dialyzed and lyophilized seminal plasma</i>)

EAP:	la glycoprotéine associée à l'oestrus (<i>estrus associated glycoprotein</i>)
EDTA:	acide (éthylènedinitrilo) tétraacétique
FBS:	sérum bovin foetal
GAGs:	glycosaminoglycanes
H ⁺ :	proton
³ H:	tritium
HBP:	protéines liant l'héparine (<i>heparin binding proteins</i>)
HDL:	lipoprotéines de haute densité (<i>high density lipoprotein</i>)
IBMX:	3-iso-butyle-1-méthylxanthine
IGF-II:	facteur de croissance insulino-mimétique (<i>insulin-like growth factor</i>)
IMPs:	protéines intrinsèques de la membrane plasmique
LDL:	lipoprotéines de faible densité (<i>low density lipoprotein</i>)
LDS:	sérum déplété en lipoprotéines (<i>lipoprotein-depleted serum</i>)
LTP-I:	la protéine de transfert des lipides I (<i>lipid transfer protein I</i>)
lyso-PC:	lysophosphatidylcholine
Mr:	masse moléculaire relative
mTALP:	milieu Tyrode modifié
PAF-AH:	acétylhydrolase du facteur activateur de plaquettes (<i>platelet activating factor acetylhydrolase</i>)

PAGE:	électrophorèse en gel de polyacrylamide (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PB:	tampon phosphate (<i>phosphate buffer</i>)
PBS:	tampon phosphate salin (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PC:	phosphatidylcholine
PDE:	phosphodiesterase des nucléotides cycliques
PK-A:	protéine kinase A
PPC-agarose :	p-aminophénylphosphorylcholine immobilisée sur l'agarose
PTK:	protéine tyrosine kinase
Ptyr-Ptase:	phosphotyrosine phosphatase
RNase:	ribonucléase du plasma séminal bovin
SDS:	sodium dodecyl sulfate
TCA:	acide trichloroacétique
TBS:	tampon Tris salin (<i>Tris-buffered saline</i>)
Tris:	tris-(hydroxyméthyl) aminométhane
VLDL:	lipoprotéines de très faible densité (<i>very low density lipoprotein</i>)

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche le docteur P. Manjunath pour m'avoir permis d'effectuer mon doctorat dans son laboratoire avec une équipe merveilleuse.

J'aimerais remercier ensuite, mes collègues et amis qui ont su apporter chaque jour un peu de piquant, de joie et de réconfort et qui rendent les journées de travail si agréables; le docteur Luc Desnoyers pour m'avoir initié à la vie de laboratoire, Martin Ménard, Dominic Salois, Marie-Eve Lane, Martin Loignon et Véronica Nauc. Un merci particulier à Robert Moreau, "mon expert" pour avoir remplacé avec brio le Petit Gazou, pour avoir enduré mes longs monologues jusqu'à ce que je trouve la réponse, pour sa disponibilité et surtout sa patience, merci, merci, merci.

Un gros merci au docteur Sébastien Soubeyrand, un ami, un compagnon de voyage (monsieur Kodak) ainsi qu'un collègue indispensable. Merci pour ta présence et ton aide dans les moments propices surtout à l'époque où l'on était que deux dans le laboratoire.

J'aimerais également remercier le docteur G. Bleau et particulièrement le docteur K. Roberts pour avoir pris le temps de lire et corriger mes articles avant leur soumission ainsi que le docteur D. Lajeunesse pour m'avoir aidé au moment opportun.

Un gros gros merci à mon mari, Stéphane, pour avoir été là tous les jours, pour m'avoir soutenue, encouragée, pour avoir enduré les pépins de laboratoire et pour avoir souffert de mon insomnie à quelques reprises, mais surtout pour m'avoir apporté tout son amour. Finalement, je tiens à remercier ma famille, mes trois petits sourires ainsi que ma puce adorée qui du haut de ses quatre ans m'a demandé un jour, en me regardant travailler sur mon schéma de capacitation de lui expliquer mon dessin...

SOMMAIRE

Chez l'espèce bovine ainsi que chez les autres mammifères, les spermatozoïdes fraîchement éjaculés bien que complètement formés, sont incapables de féconder les oocytes. Pour ce faire, les spermatozoïdes doivent subir une série de modifications (la capacitation) au niveau du tractus génital femelle qui les rendent matures. La capacitation est un événement complexe encore mal défini qui implique plusieurs étapes. Les études structurales et biochimiques ont démontré que les spermatozoïdes subissant la capacitation démontrent une perte de composantes originaires du plasma séminal, une redistribution de leurs composantes de surface et intramembranaires, une modification dans la composition lipidique de leur membrane, une augmentation de leur perméabilité membranaire ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine d'un groupe de protéines. Plusieurs études ont démontré que le fluide oviductal contient plusieurs agents capacitants qui diffèrent selon les espèces. Chez le bovin, deux groupes de facteurs capacitants ont été identifiés soit les glycosaminoglycanes (GAGS) semblables à l'héparine et les lipoprotéines de haute densité (HDL). Une fois capités, les spermatozoïdes peuvent entreprendre leur dernière étape de maturation, la réaction de l'acrosome. Cette dernière est amorcée seulement lorsque les spermatozoïdes entrent en contact avec la zone pellucide entourant l'oocyte. Elle entraîne la libération de plusieurs enzymes hydrolytiques qui permettent aux spermatozoïdes de traverser la zone pellucide. Le contact du spermatozoïde avec l'oocyte résulte finalement en la fusion des gamètes.

Plusieurs évidences indiquent que le plasma séminal serait nécessaire à la capacitation des spermatozoïdes en plus de leur servir de source d'énergie. Le plasma séminal bovin contient un groupe de protéines, BSP-A1, -A2, -A3 et 30-kDa (appelées collectivement protéines BSP), sécrété par les vésicules séminales et qui constituent plus de 60% de la masse protéique totale du plasma séminal bovin. Suite à l'éjaculation, ces protéines se lient aux spermatozoïdes par leur liaison aux phospholipides portant un groupement choline de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Les protéines BSP interagissent aussi avec l'héparine,

l'apolipoprotéine A-I (apoA-I) ainsi qu'avec l'apoA-I associée aux HDL. Jusqu'à maintenant, la fonction des protéines BSP reste inconnue. Puisque les HDL et les GAG semblables à l'héparine sont reconnus pour être impliqués dans la capacitation, nous avons proposé que le rôle physiologique des protéines BSP pourrait se situer au niveau de la capacitation des spermatozoïdes. Il était donc nécessaire de vérifier cette hypothèse et plusieurs études ont été entreprises afin d'élucider la fonction des protéines BSP en étudiant leur effet sur la capacitation des spermatozoïdes bovins.

Le premier volet du projet a été de déterminer si les protéines BSP correspondaient aux composantes acides qui sont ajoutées à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation et enlevées au cours de la capacitation. Pour ce faire, nous avons déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en deux dimensions (2D-PAGE), le point isoélectrique (pI) et l'hétérogénéité moléculaire des protéines BSP. Plusieurs isoformes de chaque protéine BSP ont été trouvées lorsque les protéines purifiées et iodurées ont été analysées par 2D-PAGE. BSP-A1 a été retrouvée à une masse moléculaire relative (M_r) de 16,5 kilodalton (kDa) et entre les pH 4,6 et 5,0; BSP-A2 à 16 kDa et entre les pH 4,9 et 5,2; BSP-A3 à 15 kDa et entre les pH 4,8 et 5,2 et BSP-30-kDa à 28 kDa et entre les pH 3,9 et 4,6. La mobilité électrophorétique des protéines BSP était identique lorsque visualisée par immunobuvardage après analyse de l'ensemble des protéines du plasma séminale bovin (CBSP) par 2D-PAGE. La coloration à la dansyl hydrazine des CBSP analysées par 2D-PAGE a révélé que les protéines BSP étaient parmi les glycoprotéines majeures du plasma séminal bovin. Il est donc probable que les protéines BSP correspondent aux composantes acides ajoutées à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation.

Dans un deuxième temps, nous avons démontré la participation des protéines BSP au processus de capacitation des spermatozoïdes induit par l'héparine, les HDL et les liposomes d'apoA-I. Les résultats ont démontré que lors de la capacitation induite en présence d'héparine, les spermatozoïdes épидидymaires entreprenaient la capacitation seulement en présence des protéines BSP. Cet effet était dépendant de la

concentration des protéines BSP. Une stimulation maximale de la capacitation de 3 à 5 fois était obtenue après 5 h d'incubation en présence d'héparine lorsque les spermatozoïdes étaient pré-incubés en présence de 20 à 40 µg/ml de protéines BSP purifiées. Contrairement à l'héparine, les HDL seules et les liposomes d'apoA-I seules pouvaient stimuler la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires. Par contre, une stimulation plus importante a été obtenue lorsque les spermatozoïdes étaient pré-incubés en présence des protéines BSP purifiées. Ces études ont aussi permis de démontrer que les liposomes sans apoA-I, les lipoprotéines de faible et de très faible densité ainsi que le sérum dépourvu de lipoprotéines étaient incapables de stimuler la capacitation en présence ou en absence de protéines BSP. De plus, nous avons aussi démontré que lorsque l'héparine et les HDL ou les liposomes d'apoA-I sont utilisés ensemble, leurs effets combinés sur la capacitation n'étaient pas additifs. Ces résultats nous ont permis d'attribuer pour la première fois un rôle physiologique aux protéines BSP au niveau de la capacitation des spermatozoïdes.

Le troisième volet de notre étude a porté sur l'analyse du mécanisme des protéines BSP dans la capacitation. Une des hypothèses pour expliquer le mécanisme de capacitation implique la perte du cholestérol membranaire des spermatozoïdes. Donc, nous avons analysé l'effet des protéines BSP et des facteurs capacitants sur l'efflux de cholestérol membranaire des spermatozoïdes. En utilisant des spermatozoïdes épидидymaires bovins marqués ($[^3\text{H}]$ cholestérol), ou une méthode de détermination directe du cholestérol des spermatozoïdes non-marqués, nous avons démontré que lorsque les spermatozoïdes épидидymaires bovins sont incubés en présence du plasma séminal bovin (0,05-2%) ou des protéines BSP purifiées (20-120 µg/ml) pendant 8 h, les spermatozoïdes perdaient du cholestérol (de 3 à 3,6 fois) contrairement au contrôle (milieu seul). Une caractérisation sommaire a démontré que les particules d'efflux obtenues sont des particules homogènes qui contiennent des protéines BSP associées au cholestérol. Ces études ont aussi démontré que l'héparine seule ne pouvait pas stimuler un efflux de cholestérol des spermatozoïdes contrairement aux HDL (100 µg/ml) qui stimulaient l'efflux du cholestérol des spermatozoïdes jusqu'à 3,1 fois après 8 h. Cet efflux de cholestérol ne semblait pas

être affecté par la présence des protéines BSP-A1/-A2 à la surface des spermatozoïdes. Cependant, l'efflux de cholestérol total des spermatozoïdes était plus élevé lorsque les spermatozoïdes épидидymaires étaient pré-incubés 20 min avec les protéines BSP-A1/-A2, lavés puis incubés avec les HDL pendant 8 h, que lorsque les HDL seules étaient utilisées. Donc, les protéines BSP et les HDL semblent jouer un rôle important au niveau de l'efflux du cholestérol lors de la capacitation contrairement à l'héparine qui ne semble pas utiliser cette voie pour stimuler la capacitation.

Par la suite, nous avons entrepris de clarifier le mécanisme de capacitation induit par l'héparine et les HDL en présence des protéines BSP. Dans ce volet, nous avons incubé les spermatozoïdes éjaculés en présence d'héparine ou de HDL et en présence d'anticorps polyclonaux contre les protéines BSP purifiées (anticorps anti-BSP). Lorsque les spermatozoïdes éjaculés ont été incubés 5 h en présence d'héparine et d'anticorps anti-BSP, les spermatozoïdes perdaient leur capacité à subir la capacitation. Par contre, lorsque ces derniers étaient incubés en présence de HDL pendant 8 h, l'ajout d'anticorps anti-BSP n'affectait pas du tout la réponse et les spermatozoïdes éjaculés subissaient la capacitation. Au cours de ces études, nous avons aussi vérifié l'effet de l'héparine et des HDL sur la phosphorylation sur tyrosine des protéines associées à la capacitation. Nous avons démontré que la capacitation induite par l'héparine, contrairement à celle induite par les HDL, était accompagnée d'une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine d'un groupe de protéines spermatiques. Ces résultats nous ont permis de confirmer que l'héparine et les HDL stimulent la capacitation par des mécanismes différents.

Les protéines BSP possèdent deux domaines de type II similaires arrangés en tandem. Le dernier volet de notre étude a donc porté sur la détermination de la relation entre la structure et la fonction des domaines de type II des protéines BSP. Pour ces études, nous avons isolé le deuxième domaine de type II par digestion à la trypsine des protéines BSP-A1/-A2 préalablement citraconylisées. Ces études ont démontré que comme la protéine native, le second domaine de type II pouvait lier une

colonne héparine-Sepharose, une colonne p-aminophénylphosphorylcholine-agarose ainsi que des liposomes contenant de la phosphatidylcholine. Par contre, ce domaine était incapable de stimuler l'efflux de cholestérol des fibroblastes humains ou des spermatozoïdes épидидymaires bovins et était aussi incapable de stimuler la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins induite par les HDL ou l'héparine. Donc ces résultats nous indiquent que les motifs de type II des protéines BSP représentent des unités de liaison pour les phospholipides possédant un groupement choline des membranes plasmiques des spermatozoïdes ainsi que pour l'héparine. Toutefois, le second domaine de type II ne semble pas suffisant pour stimuler l'efflux de lipides et la capacitation des spermatozoïdes. Les deux domaines de type II semblent essentiels pour l'expression des fonctions biologiques des protéines BSP.

1. INTRODUCTION

1.1. LA REPRODUCTION

La reproduction est l'unité de mesure qui définit le succès évolutif des organismes. L'évènement clé de la reproduction sexuée est la fécondation, c'est-à-dire l'union de deux cellules reproductrices haploïdes, les gamètes, pour former un zygote diploïde. Chez tous les mammifères, les gamètes mâles et femelles ont une taille et une apparence différentes. Le gamète femelle est un gros ovule immobile qui regorge de réserves nutritives et de substances essentielles au développement initial de l'embryon. Le gamète mâle est un spermatozoïde mobile, capable de nager activement vers l'ovule. À la suite de la fécondation, le zygote traverse une période de développement embryonnaire, puis foetal jusqu'au moment de la naissance qui marque le début d'une nouvelle existence.

Pour pouvoir fusionner, les gamètes mâle et femelle doivent d'abord subir une série d'événements qui les rendent matures. La présente étude portera principalement sur la maturation des spermatozoïdes qui débute au niveau du tractus génital mâle et qui se complète dans le tractus génital femelle.

1.2. LE TRACTUS GÉNITAL MÂLE

1.2.1. Anatomie du système reproducteur mâle

De tous les systèmes physiologiques connus, le système reproducteur mâle des mammifères est probablement le plus diversifié entre les espèces. Il est constitué de deux testicules, deux épидидymes, deux canaux déférents et des glandes accessoires qui varient selon les espèces. L'organe principal du tractus reproducteur mâle est le testicule qui produit principalement les spermatozoïdes et la testostérone. Cette hormone est responsable de la différenciation du système reproducteur mâle et de l'induction de la spermatogenèse. L'épididyme est un long organe tubulaire attaché au testicule et divisé en trois parties: *caput* ou la tête, *corpus* ou le corps et *cauda* ou la queue (site d'entreposage des spermatozoïdes). Ces différentes régions de l'épididyme sécrètent spécifiquement plusieurs protéines ainsi que des composés de faibles poids moléculaires qui interagissent avec les spermatozoïdes (Hoskins et

Vijayaraghavan, 1990). Le canal déférent est un tubule qui connecte l'épididyme à l'urètre. Sa principale fonction réside dans son activité contractile qui permet de propulser les spermatozoïdes vers les parties distales du système reproducteur. Les canaux déférents se terminent par un élargissement de leur lumière formant la première glande accessoire, l'ampoule.

À sa sortie du canal déférent, le spermatozoïde entrera en contact avec les sécrétions de plusieurs glandes accessoires. La diversité entre les espèces du système reproducteur mâle est attribuable principalement à la présence ou l'absence de certaines glandes accessoires. Certains mammifères, incluant le bovin, possèdent jusqu'à quatre glandes accessoires: l'ampoule, les vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-uréthrales ou glandes de Cowper. L'ampoule n'est pas présente chez toutes les espèces, notamment chez le sanglier, mais est très développée chez d'autres espèces comme le cheval (Setchell, 1991). Chez le bovin et le sanglier, les vésicules séminales sont larges et contribuent à la majeure partie du plasma séminal mais elles sont absentes chez le chien et le chat (Miller et Ax, 1988). La prostate constitue la seule glande accessoire présente dans toutes les espèces et elle est aussi retrouvée chez les cétacés et les carnivores (Setchell et al., 1994). Les glandes bulbo-uréthrales sont situées sous les autres glandes. Chez le bovin, le bélier et le cheval, ces glandes sont très petites tandis qu'elles sont énormes chez le sanglier (Miller et Ax, 1988) et absentes chez le chien (Setchell, 1991). Leurs sécrétions sont très importantes pour la gélification du sperme suite à l'éjaculation qui sera par la suite liquifié.

1.2.2. La spermatogenèse

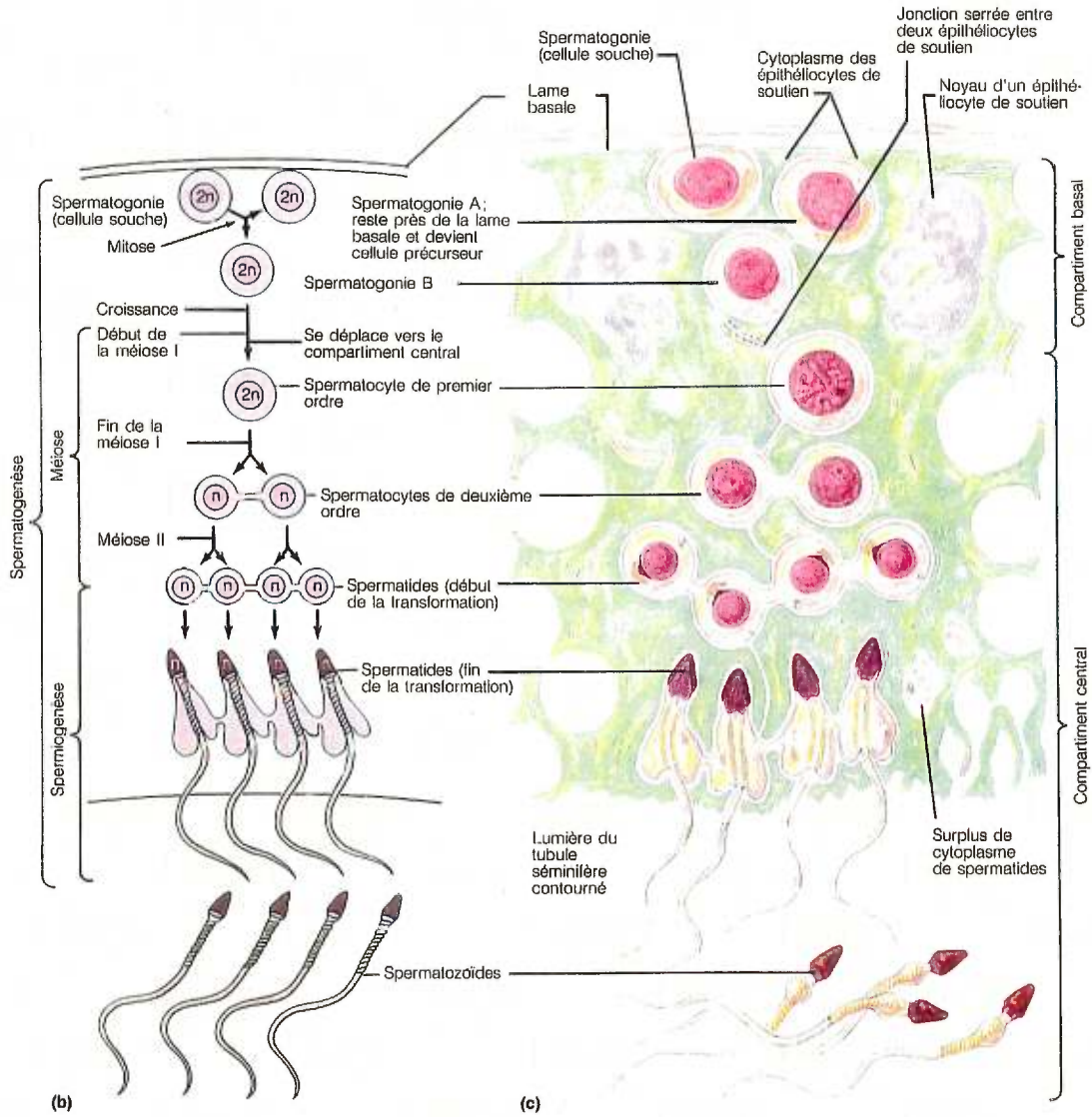
La spermatogenèse est une série d'événements qui se déroulent dans les tubules séminifères contournés du testicule et qui mènent à la production des gamètes mâles, les spermatozoïdes (Figure 1). La spermatogenèse se compose de divisions mitotiques (renouvellement des cellules souches) et méiotiques (réduction du nombre de chromosome) ainsi que d'un processus appelé spermiogenèse. Les cellules

FIGURE 1

LA SPERMATOGENÈSE

La figure ci-après représente les différentes étapes de la spermatogenèse. **(b)** Diagramme du déroulement de la spermatogénèse montrant la position relative des cellules germinales dans la paroi du tubule séminifère contourné. **(c)** Agrandissement d'une partie de la paroi du tubule séminifère contourné montrant les cellules germinales.

Tirée de: "Anatomie et Physiologie Humaines", Maried, 1993.



souches, les spermatogonies, sont les cellules les plus externes et les moins différenciées des tubules séminifères et se trouvent en contact direct avec la lame basale. Il est possible de distinguer trois types de spermatogonies chez le bovin (Hochereau, 1968): les spermatogonies A, intermédiaires et B. Les spermatogonies A sont les cellules souches restant au niveau de la lame basale pour perpétuer la lignée des cellules germinales. Ces dernières peuvent produire les spermatogonies intermédiaires qui à leur tour pourront engendrer les spermatogonies du type B. Ces dernières seront poussées vers la lumière du tubule, où elles se transformeront en spermatocytes de premier ordre. Tout au long de la spermatogenèse, les descendantes d'une même spermatogonie sont reliées les unes aux autres par des ponts cytoplasmiques (Fawcett, 1959; Huckins, 1971; Dym et Fawcett, 1971). Elles sont aussi reliées et entourées des cellules de Sertoli qui forment la barrière hémato-testiculaire. La barrière hémato-testiculaire sert à maintenir un gradient d'ions, de petites molécules et de protéines entre le sang et le fluide tubulaire (Bardin et al, 1994). Elle protège aussi les spermatozoïdes contre les agents mutagènes et contre le système immunitaire. Après la mitose, les jonctions serrées des cellules de Sertoli s'ouvrent afin de permettre aux spermatocytes de premier ordre de passer entre elles. Chaque spermatocyte de premier ordre subira par la suite la première phase de la méiose pour devenir deux cellules haploïdes, les spermatocytes de deuxième ordre. Ceux-ci entreprendront par la suite la deuxième phase de la méiose et deviendront quatre spermatides. Les spermatocytes et les spermatides sont presque enfouis dans des cavités des cellules de Sertoli qui les aident à se déplacer en plus de leur apporter les nutriments nécessaires.

Le spermatide doit encore subir une dernière maturation pour devenir un spermatozoïde. Ce processus de spermiogenèse consiste en la transformation morphologique d'une cellule arrondie et banale en une structure unique caractéristique du spermatozoïde. Pendant cette étape, le spermatide perdra la majeure partie de son cytoplasme (éliminé par les cellules de Sertoli) et sera doté d'une queue, le flagelle fabriqué par un centriole.

1.2.3. Morphologie des spermatozoïdes

Tous les spermatozoïdes des mammifères possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques. Ils sont formés de deux structures principales, la tête et le flagelle (Figure 2). Les structures spécialisées du spermatozoïde lui permettent d'accomplir sa fonction unique; le contenu enzymatique de l'acrosome au niveau de la tête est essentiel pour la fécondation, et le flagelle contient les sources énergétiques et la machinerie nécessaires pour assurer la motilité. Le rôle de ces composantes est d'assurer que le contenu génétique contenu dans le noyau du spermatozoïde soit transféré dans l'oocyte, où la combinaison des matériels génétiques mâle et femelle aura lieu pour produire le zygote.

La tête du spermatozoïde est composée du noyau coiffé de l'acrosome entouré d'une quantité modérée de composantes cytosquelettiques et très peu de cytoplasme. Le noyau renferme une copie de chaque chromosome. Sa chromatine est très condensée et est combinée à de très petites protéines basiques, les protamines (Grimes, 1986; Hecht, 1989; Oliva et Dixon, 1991). L'acrosome origine de l'appareil de Golgi des spermatides (Eddy et O'Brien, 1994) et peut être comparé à un lysosome modifié (Allison et Hartree, 1970) qui renferme les enzymes hydrolytiques qui permettront au spermatozoïde de pénétrer l'oocyte. Les composantes les plus caractérisées de l'acrosome sont la proacrosin, une protéase à sérine et l'hyaluronidase (Harrison, 1988; Klemn et al, 1991; Urch, 1991; Zaneveld et De Jonge, 1991). L'acrosome renferme aussi d'autres protéases, des phospholipases, des glycosidases et des estérases (Yanagimachi, 1994). L'acrosome se divise en deux parties, la partie supérieure est la capsule acrosomiale et la partie postérieure est le segment équatorial de l'acrosome. L'acrosome est délimité par une membrane interne (la membrane acrosomiale interne), accolée à la membrane nucléaire et par une membrane externe (la membrane acrosomiale externe), accolée à la membrane plasmique. La réaction de l'acrosome consiste en la fusion de ces deux dernières membranes (section 1.5.).

FIGURE 2

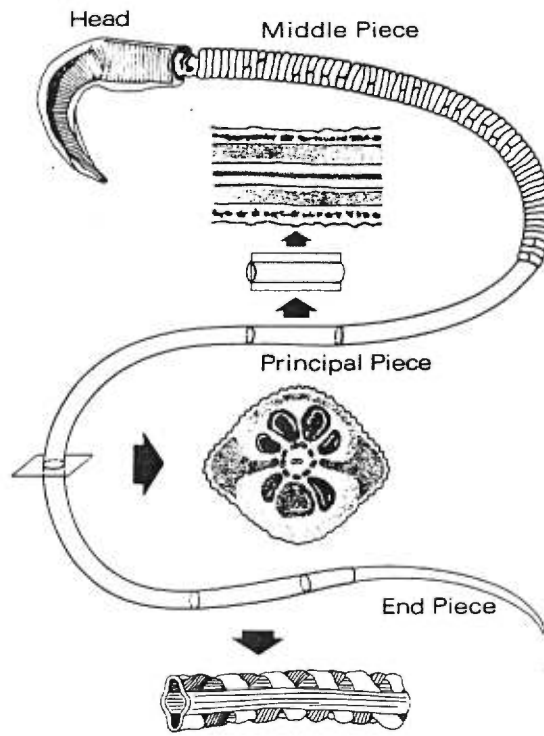
REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DU SPERMATOZOÏDE

La figure ci-après représente les caractéristiques générales des spermatozoïdes de mammifères. (a) Diagramme illustrant les structures principales des spermatozoïdes. La tête du spermatozoïde est attachée à la pièce connectrice du flagelle. Les autres régions du flagelle sont la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. (b) Diagrammes illustrant les différences entre la taille et la topographie de la tête du spermatozoïde entre sept espèces différentes: le taureau, le lapin, l'humain, le cobaye, la souris, le rat et le hamster. La figure centrale est une représentation schématique représentant les différentes parties de la tête du spermatozoïde.

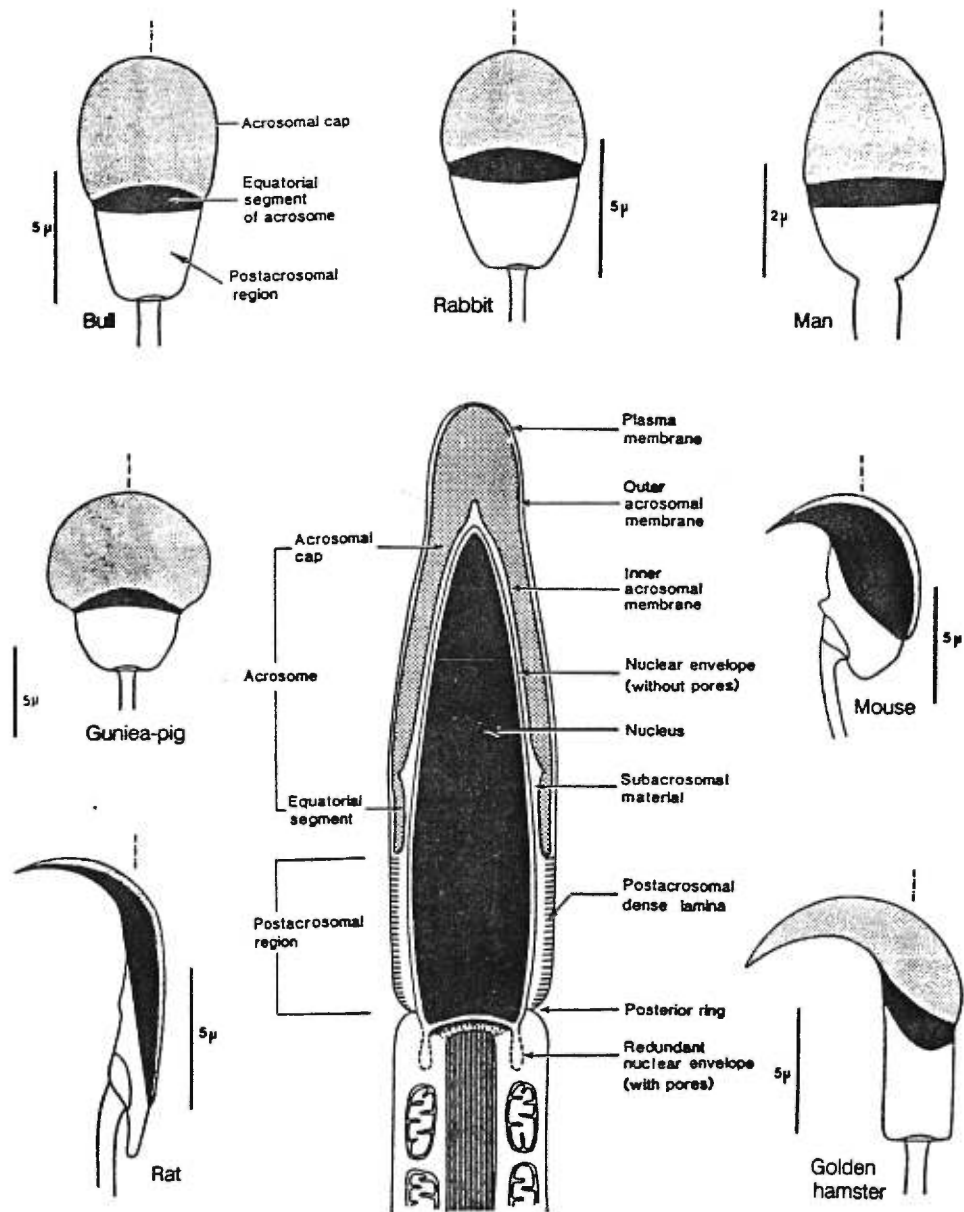
Tirée de: (a) "The Spermatozoon ", Eddy et O'Brien, 1994

(b) "Mammalian Fertilization", Yanagimachi, 1994.

a)



b)



À partir de la tête, le flagelle des spermatozoïdes des mammifères se divise en quatre segments différents: la pièce connectrice qui relie la tête au flagelle, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (Eddy et O'Brien, 1994). S'étendant sur toute la longueur du flagelle, on retrouve l'axonème responsable de la génération du mouvement. La pièce intermédiaire du spermatozoïde est formée de mitochondries enroulées en spirale serrée autour des fibres denses entourant l'axonème. Les mitochondries fournissent l'énergie métabolique (l'adénosine triphosphate, ATP) nécessaire pour produire les mouvements de la queue (10 battements/s chez le bovin) qui, chez le bovin, peuvent propulser le spermatozoïde à une vitesse de 100 $\mu\text{m/s}$ dans une solution saline mais qui est beaucoup moindre au niveau du mucus cervical (Bishop, 1962). La pièce intermédiaire renferme aussi la gouttelette cytoplasmique riche en lipides et en stérols. Cette dernière est complètement éliminée lors de la maturation épидидymaire (section 1.2.4.).

Comme chaque cellule, les spermatozoïdes sont enveloppés d'une membrane plasmique. Cette dernière a la particularité de posséder des régions spécialisées qui diffèrent en raison de leur composition et de leur fonction. Au niveau de la tête du spermatozoïde, on retrouve trois domaines distincts: l'acrosome antérieur, le segment équatorial et la région post-acrosomique. La membrane plasmique du flagelle peut se diviser en deux domaines: le domaine de la pièce intermédiaire et le domaine de la queue distale. La surface des spermatozoïdes est très hétérogène. Les spermatozoïdes ont une charge nette négative principalement attribuée au domaine de la queue (Bangham, 1961; Nevo et al, 1961; Bedford et al, 1963). La composition lipidique et protéique varie d'un domaine à l'autre, ce qui reflète probablement les différentes fonctions des différentes parties du spermatozoïde (Eddy et O'Brien, 1994). La section suivante portera en partie sur les changements que subit la membrane plasmique lors de la traversée des spermatozoïdes à travers l'épididyme.

1.2.4. Maturation épидидymaire des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes débutent leur maturation au niveau de l'épididyme. Le site exact de l'épididyme où les spermatozoïdes deviennent capables de féconder varie

d'une espèce à l'autre mais en générale, la majorité des spermatozoïdes acquièrent leur plein pouvoir fécondant au niveau de la partie proximale de la queue de l'épididyme (Yanagimachi, 1994). Durant le transit au niveau de l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent aussi le potentiel de bouger (Eddy et O'Brien, 1994). Chez la plupart des espèces, les spermatozoïdes de la tête de l'épididyme, une fois dilués, sont faiblement motiles (mouvement circulaire, Cooper 1986) tandis que ceux prélevés dans la queue de l'épididyme possèdent un mouvement progressif rectiligne similaire au mouvement des spermatozoïdes éjaculés. Le développement de la motilité serait attribué à une augmentation de pH intracellulaire des spermatozoïdes (Vijayaraghavan et al., 1985) ainsi qu'à un transfert de diverses molécules du liquide épидидymaire vers les spermatozoïdes, telles que la glycéryl-3-phosphorylcholine (Infante et Huszagh, 1985) et chez le bovin, une protéine retrouvée au niveau de la queue de l'épididyme, la "forward motility protein" (Acott et Hoskins, 1981; Acott et al, 1983), à une altération du système de protéine kinases modulé par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc, Wooten et al., 1987), et au développement de mécanismes capables de maintenir la concentration d'ions calcium intracellulaire à des niveaux bas (Vijayaraghvan et Hoskins, 1990). Le rôle de la "forward motility protein" est cependant contesté. L'équipe de Stephens et al. (1981) stipule que son effet sur la motilité n'est qu'un artefact; elle empêcherait seulement les spermatozoïdes d'adhérer aux parois de la chambre dans laquelle ils sont étudiés.

1.2.4.1. Modifications de la membrane plasmique des spermatozoïdes

Les différentes régions de l'épididyme sécrètent et absorbent différentes molécules spécifiques qui altèrent étape par étape la composition de la membrane plasmique des spermatozoïdes et ainsi, la fluidité membranaire (Yanagimachi, 1994). Durant le transit épидидymaire, différentes composantes à la surface du spermatozoïde sont modifiées ou ajoutées (Eddy et O'Brien, 1994). Certaines protéines sont relocalisées, d'autres sont altérées, masquées ou remplacées progressivement par de nouvelles protéines d'origine épидидymaire. La maturation épидидymaire est aussi accompagnée d'une augmentation du niveau de glycosylation à la surface des spermatozoïdes (Hamilton et al, 1986). Les modifications des glycoprotéines déjà

présentes ainsi que l'addition de nouvelles glycoprotéines seraient médiées, au moins en partie, par l'action de la galactosyltransférase et de la sialyltransférase présentes dans le fluide épидидymaire (Bernal et al, 1980; Hamilton, 1980; Hamilton et Gould, 1980; Tulsiani et al, 1993) ainsi que par une protéine semblable à l' α -lactalbumine (Hamilton, 1981; Jones et Brown, 1982). Certaines des glycoprotéines pourraient jouer un rôle au niveau de la fécondation en stabilisant la membrane plasmique des spermatozoïdes et ainsi en prévenant une réaction de l'acrosome précoce (Reynolds et al, 1989; Thomas et al, 1984), d'autres pourraient jouer un rôle dans l'interaction entre le spermatozoïde et la zone pellucide ou la membrane plasmique de l'oocyte (Lakoski et al, 1988; Phelps et al, 1990; Phelps et Myles, 1987).

La membrane plasmique des spermatozoïdes subit aussi une importante 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 Voglmayr, 1984). La modification majeure au niveau lipidique est probablement l'ajout de cholestérol au niveau de la membrane plasmique (Seki et al., 1992; Suzuki, 1988; 1990). En effet, certaines régions de l'épидидyme synthétisent de fortes concentrations de cholestérol (Hamilton, 1971; Hamilton et Fawcett, 1970) qui lorsque ajouté à la membrane plasmique des spermatozoïdes servirait à stabiliser le spermatozoïde afin de le rendre plus résistant pour les étapes à venir. Au niveau des spermatozoïdes éjaculés bovins, le cholestérol est le stérol libre le plus abondant de la membrane plasmique (Parks et al. 1987).

1.3. LE TRANSPORT DES SPERMATOZOÏDES AU NIVEAU DU TRACTUS GÉNITAL FEMELLE

Suite à l'éjaculation, les spermatozoïdes débutent un trajet périlleux dans le tractus génital femelle. Durant ce périple, des milliers de spermatozoïdes seront éliminés ou détruits et seulement quelques-uns auront la chance d'apercevoir l'oocyte (Tableau I).

TABLEAU I

VARIATIONS DANS LE NOMBRE DE SPERMATOZOÏDES DURANT LEUR
TRANSIT DANS LE TRACTUS REPRODUCTEUR FEMELLE

Espèces	Nombre de spermatozoïdes éjaculés (X 10 ⁶)	Nombre de spermatozoïdes dans l'isthme* (X 10 ³)	Nombre de spermatozoïdes dans l'ampoule**
Souris	50		≤5
Rat	58		2
Hamster	100	15,4	2
Lapin	280	5,5	118
Mouton	1000	4,4	≤26
Bovin	3000	21,2	≤10

* Spermatozoïdes recouverts avant l'ovulation

** Spermatozoïdes recouverts aux alentours du temps de fécondation

Adapté de: "Sperm motility in the oviduct" Suarez et al., 1990.

L'anatomie du tractus reproducteur femelle des mammifères est très conservée. Ce tractus consiste en un vagin, un utérus, deux oviductes et deux ovaires. Selon l'espèce, les spermatozoïdes sont éjaculés dans le vagin, le col de l'utérus ou l'utérus (Tableau II). Chez le bovin, les spermatozoïdes sont éjaculés par milliards sur le col de l'utérus. Avant d'atteindre l'utérus, les spermatozoïdes doivent pénétrer le mucus cervical jusqu'à l'épithélium auquel ils s'associeront transitoirement (Yanagimachi, 1994). Le mucus cervical est un treillis dense, de faible porosité, composé d'un plasma et de glycoprotéines (principalement la mucine cervicale, Katz et al., 1989). En plus de retenir les spermatozoïdes, le mucus cervical sert aussi à protéger les spermatozoïdes de l'environnement plutôt hostile du vagin (acide) ainsi que contre la phagocytose par les leucocytes provenant du fluide vaginal. Le mucus cervical va aussi permettre de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal et des protéines faiblement liées, ainsi qu'éliminer les spermatozoïdes endommagés (Katz et al., 1989; Hanson et Overstreet, 1981). Les spermatozoïdes seront par la suite relâchés progressivement de l'épithélium du col de l'utérus vers l'utérus par un processus qui chez l'humain peut durer plusieurs jours (Hanson et Overstreet, 1981; Mortimer, 1983; Overstreet, 1983).

Les spermatozoïdes traversent ensuite rapidement l'utérus grâce à l'activité contractile de la paroi utérine pour atteindre l'oviducte. L'oviducte forme un long conduit (d'environ 30 cm) chez la vache; Ellington, 1991) qui se divise en trois parties à partir de l'ovaire: l'*infundibulum*, l'ampoule et l'isthme. Chez la plupart des espèces, l'isthme sert principalement de réservoir pour les spermatozoïdes. Lorsque les spermatozoïdes atteignent l'isthme, ils s'attachent par la tête à l'épithélium où ils terminent une partie de leur maturation, la capacitation (section 1.4.). Il semble maintenant évident que les spermatozoïdes sont séquestrés pendant des heures et mêmes des jours au niveau de l'isthme jusqu'au début de l'ovulation. De cette façon, la montée des spermatozoïdes vers l'ampoule et la descente de l'oocyte vers l'ampoule se fait de manière synchronisée (Overstreet et Cooper, 1979; Hunter, 1980; Smith et Yanagimachi, 1991). Suite à l'ovulation, les spermatozoïdes matures quittent par

TABLEAU II

PARCOURS DU SPERMATOZOÏDE DANS LE TRACTUS GÉNITAL FEMELLE

Espèces	Lieu d'insémination <i>in vivo</i>	Vitesse maximale du spermatozoïde‡ (mm/min)	Distance à parcourir† (mm)	Temps minimum* (min)	Période entre le début de l'estrus et l'ovulation (h)
Souris	utérus	12,9	20	1,6	6
Hamster	utérus	15,5	27	1,7	8
Lapin	vagin	8,2	140	17,1	11
Bovin	vagin	5,9	630	106,8	30
Humain	vagin	7,8	130	16,7	n/a

‡ Calculée d'après la vitesse des spermatozoïdes hyperactivés

† Distance entre le lieu d'insémination et le lieu de fécondation

* Temps minimum calculé d'après la vitesse et la distance à parcourir

n/a: non-applicable

Adapté de: "Sperm motility in the oviduct", Suarez et al., 1990.

vagues l'isthme vers le site de fécondation. La fécondation s'effectue généralement dans l'ampoule ou à la jonction ampoulo-isthmique de l'oviducte (Ward et Kopf, 1993; Suarez et al., 1990). C'est à ce niveau, lors du contact avec l'oocyte, que les spermatozoïdes subissent l'ultime étape de leur maturation, la réaction de l'acrosome (section 1.5.).

1.4. LA CAPACITATION

Chez les mammifères, les spermatozoïdes émergeant du tractus reproducteur mâle doivent subir le processus de capacitation dans le tractus génital femelle pour pouvoir féconder l'ovule. La capacitation a été mise en évidence il y a maintenant près de 50 ans par deux équipes indépendantes, l'équipe de Chang (Chang, 1951; 1955) et celle d'Austin (Austin, 1951; 1967). Les événements moléculaires impliqués dans la capacitation ne sont pas encore bien définis, mais il semble maintenant évident que la capacitation des spermatozoïdes est un processus complexe comportant plusieurs étapes. Les études structurales et biochimiques ont démontré que la capacitation entraîne plusieurs modifications au niveau du spermatozoïde:

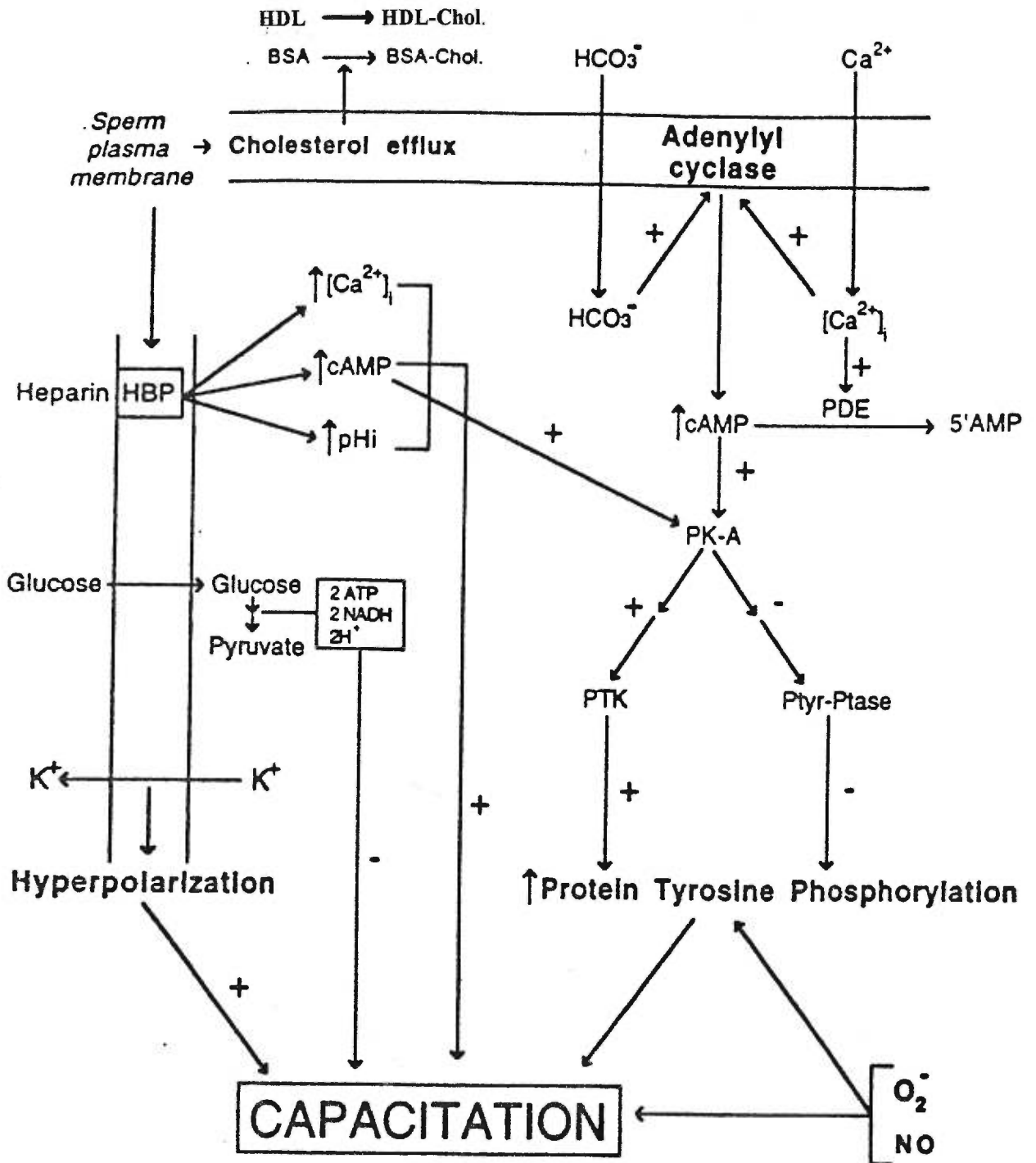
- ◆ perte de composantes originaires du plasma séminal
- ◆ redistributions des composantes de la surface des spermatozoïdes
- ◆ changement dans la distribution des composantes intramembranaires
- ◆ modification de la composition lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes
- ◆ augmentation de la perméabilité membranaire aux ions
- ◆ augmentation de la phosphorylation sur tyrosine des protéines du spermatozoïde

(Go et Wolf, 1983; Meizel, 1985; Oliphant et al, 1985; Langlais et Roberts, 1985; Yanagimachi, 1994; Galantino-Homer, 1997). Les différentes voies hypothétiques menant à la capacitation des spermatozoïdes sont illustrées à la Figure 3. Elles seront discutées en détail dans les sections suivantes.

FIGURE 3**VOIES HYPOTHÉTIQUES DE SIGNALISATION MENANT À LA
CAPACITATION**

La figure ci-après illustre les différentes voies hypothétiques de signalisation transmembranaire et intracellulaire jouant un rôle dans la régulation de la capacitation des spermatozoïdes. Le modèle a été élaboré à partir de résultats obtenus par plusieurs laboratoires. (+) Indique une régulation positive de la capacitation; (-) indique une régulation négative de la capacitation. Abréviations: BSA, albumine sérique bovine; Chol, cholestérol; HBP, protéines liant l'héparine; PTK, protéine tyrosine kinase, PTyr-Ptase, phosphotyrosine phosphatase; PDE, phosphodiesterase des nucléotides cycliques; PK-A, protéine kinase A; HCO_3^- , ion bicarbonate; HDL, lipoprotéines de haute densité.

Adaptée de: "Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation",
Visconti et Kopf, 1998.



1.4.1. Redistribution, altération et perte des composantes de surface de la membrane plasmique du spermatozoïde lors de la capacitation

L'importance de la redistribution et de l'altération des composantes de surface durant la capacitation a été postulée pour la première fois par Weinman et Williams (1961) et Piko (1967). Par la suite, leur hypothèse a été confirmée par plusieurs autres études (Clegg, 1983; Koehler, 1981a et b; Oliphant et al., 1985; Yanagimachi, 1981; Sidhu et Guraya, 1989). Plusieurs expériences utilisant des anticorps contre les glycoprotéines ont démontré qu'au moment de la capacitation, plusieurs glycoprotéines sont redistribuées sur la surface des spermatozoïdes tandis que d'autres sont pratiquement éliminées de la surface (Cohen-Dayag et Eisenbach, 1994; Yanagimachi, 1994). Par exemple, parmi les glycoprotéines redistribuées, on retrouve la 2B1. Cette glycoprotéine de 40-kDa est initialement retrouvée sur la queue des spermatozoïdes de rat et migre vers l'acrosome dans des conditions capacitantes (Shalgi et al., 1990). Chez le sanglier, on retrouve la glycoprotéine P86/5 au niveau de la région acrosomiale chez les spermatozoïdes non-capacités tandis qu'elle se retrouve seulement dans la région de la capsule acrosomiale suite à la capacitation (Töpfer-Peterson et al., 1990). Parmi les glycoprotéines éliminées, on retrouve chez la souris une protéine sécrétée par l'épididyme qui lie spécifiquement la queue des spermatozoïdes, la SMA-4. Cette protéine est éliminée à 90% de la surface des spermatozoïdes lors de la capacitation (Vernon et al., 1985). D'autres études utilisant différentes lectines ont aussi démontré que durant la capacitation, les glycoprotéines périphériques et intégrées sont aussi altérées au niveau du type et de la quantité de carbohydrates qu'elles contiennent (Yanagimachi, 1994).

Parmi les autres protéines redistribuées au cours de la capacitation, il y a des molécules semblables à la fibronectine à la surface des spermatozoïdes humains (Fusi et Bronson, 1992), les antigènes T et S de la tête des spermatozoïdes des cobayes (Marquant-Le Guienne et De Almeida, 1986) et une protéine de 37-kDa située sur la tête des spermatozoïdes de rat (Rochwerger et Cuasnicu, 1992). Parmi les autres constituants de la surface des spermatozoïdes éliminés ou altérés lors de la capacitation, on retrouve les facteurs décapacitants, la caltrine, une protéine de 6.4

kDa possédant une activité inhibitrice des protéinases, et la spermine tous originaires du plasma séminal, ainsi qu'une protéine, le facteur stabilisant l'acrosome, de 125-kDa (monomère) et 259-kDa (dimère) originaire de l'épididyme (Yanagimachi, 1994).

Benoff et al., (1993a-c) ont aussi démontré que durant la capacitation, il y avait exposition à la surface de récepteurs de mannose au niveau de la tête des spermatozoïdes humains. Il a été rapporté par Mori et al., (1989) qu'un prétraitement des spermatozoïdes humains avec le monosaccharide D-mannose (un des constituants de la zone pellucide des mammifères) inhibe la pénétration des spermatozoïdes à travers la zone pellucide entourant l'oocyte. De plus, le mannose ainsi que les protéines mannosylées induisent la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes. Ces résultats suggèrent que les récepteurs de mannose apparaissent lors de la capacitation et pourraient être importants dans la reconnaissance spermatozoïde/oocyte.

1.4.2. Changement dans la distribution des composantes intramembranaires

Des études au microscope électronique ont révélé que la capacitation était aussi accompagnée chez l'humain, le hamster et le cobaye d'un changement dans la distribution des particules intramembranaires (IMPs, protéines intrinsèques dans la bicouche lipidique, Yanagimachi, 1994). Les spermatozoïdes non-capacités démontrent une distribution égale des IMPs tandis que les spermatozoïdes capacités possèdent plusieurs zones où les IMPs sont absentes.

1.4.3. Changement dans la composition lipidique de la membrane plasmique lors de la capacitation.

Plusieurs études ont démontré que la capacitation des spermatozoïdes était accompagnée d'un changement dans la composition lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Plus spécifiquement, la capacitation entraîne une diminution du rapport cholestérol/phospholipides (Davis, 1981). Ce changement semble être un phénomène réversible qui influence la fluidité et la perméabilité de la membrane plasmique aux ions (Langlais et Robert, 1985; Parks et Ehrenwald, 1990; Kopf et Gerton, 1991).

1.4.3.1. Le cholestérol

Le cholestérol est le stérol libre qui est retrouvé en plus grande quantité dans les spermatozoïdes éjaculés bovins ainsi que chez plusieurs autres espèces (Parks et al., 1987). Plusieurs études ont démontré qu'un influx de cholestérol diminuait le taux de réaction de l'acrosome spontanée (Davis, 1980; Fleming et Yanagimachi, 1981) et inhibait la fécondation (inhibe ou retarde la capacitation) chez plusieurs espèces: le lapin (Davis, 1982), le rat (Davis et al., 1980), la souris (Go et Wolf, 1985), le cobaye (Fleming et Yanagimachi, 1981), l'humain (Moubasher et Wolf, 1986) et le bovin (Ehrenwald et al., 1988a et b). L'influx de cholestérol constitue le transfert de cholestérol d'un donneur vers la membrane des spermatozoïdes tandis que l'efflux de cholestérol constitue le transfert de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes vers un accepteur. Le cholestérol réduit aussi la motilité des spermatozoïdes de rat (Davis, 1976) et inhibe l'exposition à la surface des récepteurs de mannose de la tête des spermatozoïdes (Benoff, 1993d). L'influx de cholestérol décapacite les spermatozoïdes. Si des spermatozoïdes capités sont incubés en présence de vésicules lipidiques (contenant du cholestérol) du plasma séminal de lapin ou en présence de liposomes contenant du cholestérol, ils sont maintenant incapables de féconder des oocytes *in vivo* (Davis, 1978). Par contre, Ehrenwald et al. (1988a et b) ont montré que l'efflux de cholestérol membranaire capacite les spermatozoïdes bovins et prédispose les spermatozoïdes à pénétrer l'oocyte à un taux beaucoup plus important que les spermatozoïdes dont le niveau de cholestérol membranaire n'a pas été réduit. Récemment, Zarintash et Cross (1996) ont démontré que lorsque les spermatozoïdes humains perdent leur cholestérol non-estérifié ils deviennent capables de répondre à la progestérone (la progestérone est un inducteur de la réaction acrosomiale chez l'humain). À cet égard, quelques études tendent à suggérer une relation entre le cholestérol membranaire des spermatozoïdes et certains cas d'infertilité. Malgré que le nombre de sujets soit peu élevé, une étude de Sugraroek et al. (1991) rapportait que le ratio cholestérol/phospholipides des spermatozoïdes d'hommes présentant une infertilité inexplicée était deux fois plus élevé que celui des spermatozoïdes de sujets fertiles. Une explication est proposée par Hoshi et al. (1990)

qui rapportent que les spermatozoïdes présentant un ratio cholestérol/phospholipides élevé sont plus lents à capaciter que ceux ayant un ratio plus faible. Toutefois, il ne semble pas y avoir de corrélation directe entre les niveaux sanguins de cholestérol et de phospholipides et ceux du spermatozoïde et du plasma séminal (Grizard et al., 1995).

Puisque le cholestérol est reconnu pour avoir un effet stabilisant au niveau des membranes (Yeagle, 1985), l'efflux du cholestérol provoquerait probablement une réorganisation ou une déstabilisation de la membrane plasmique. Ces modifications pourraient réguler l'expression des récepteurs de la zone pellucide au niveau des spermatozoïdes (récepteurs de mannose) en plus de modifier la perméabilité membranaire.

Pour qu'il y ait un efflux de cholestérol des spermatozoïdes lors de la capacitation, le tractus génital femelle a nécessairement besoin d'accepteurs de cholestérol au moment approprié. Le fluide oviductal contient deux types d'accepteur de cholestérol: l'albumine (BSA) et les lipoprotéines de haute densité (HDL). Leur implication au niveau de la capacitation est expliquée à la section 1.7.

1.4.4. Variation de la concentration intracellulaire des ions durant la capacitation

1.4.4.1. Le calcium

Le niveau de calcium intracellulaire des spermatozoïdes est généralement très peu élevé tant au niveau de la tête qu'au niveau de la queue des spermatozoïdes. Le maintien du faible taux de calcium intracellulaire est régulé par la présence dans la membrane plasmique de plusieurs régulateurs calciques; une pompe calcique, un antiporteur sodium-calcium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), un échangeur $\text{Ca}^{2+}/(\text{proton})\text{H}^+$, ainsi que par la séquestration du calcium dans les mitochondries et par des protéines liant le calcium (Yanagimachi, 1994). Malgré que le calcium semble jouer un rôle très important au niveau de la capacitation, puisque la plupart des systèmes capacitants nécessitent la présence de calcium extracellulaire pour être efficace, l'augmentation intracellulaire de calcium lors de la capacitation demeure un sujet très controversé. Plusieurs auteurs

ont constaté une augmentation de calcium intracellulaire durant la capacitation (Baldi et al., 1991; Fraser, 1990; Fraser et McDermott, 1992; Okamura et al., 1993; Suarez et al., 1993; Adeoya-Osiguwa et Fraser, 1993; Handrow et al., 89; Parrish et al., 1993) tandis que d'autres n'ont observé aucun changement à ce niveau (Mahanes et al., 1986; Florman et al., 1989). Donc, il y aurait, chez certaines espèces, une augmentation très lente et modeste de la concentration intracellulaire de calcium lors de la capacitation (de l'ordre du micromolaire). À l'opposé, lors de la réaction acrosomiale, il y a une entrée massive (de l'ordre du millimolaire) et rapide du calcium chez toutes les espèces. Chez la souris, le bovin et l'humain la concentration de calcium intracellulaire serait modulée lors de la capacitation par l'action d'une pompe calcique (Ca^{2+} -ATPase). En effet, plusieurs expériences ont démontré chez ces espèces que l'inhibition de l'activité Ca^{2+} -ATPase accélère, soit directement (utilisation d'inhibiteurs) ou indirectement (via l'inhibition de la calmoduline), la capacitation (Fraser et al., 1995; DasGupta et al., 1994; Fraser et McDermott, 1992; Adeoya-Osiguwa et Fraser, 1994). Chez la plupart des cellules somatiques, l'activité des Ca^{2+} -ATPase est modulée par la calmoduline (Fraser, 1995). La calmoduline est une protéine acide de faible poids moléculaire reconnue pour moduler plusieurs processus cellulaires lors de sa liaison au calcium.

Chez le bovin, la concentration intracellulaire calcique pourrait aussi être modulée par l'activité d'un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. En effet, Lardy et San Agustin (1989) ont proposé qu'une protéine de faible poids moléculaire, la caltrine qui s'associe avec les spermatozoïdes bovins lors de l'éjaculation, pourrait initialement inhiber l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pour maintenir un faible taux de calcium intracellulaire lors du transit des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle. L'activité inhibitrice de la caltrine serait dépendante de la présence d'anions, principalement de la phosphatidylsérine et du citrate présents dans le fluide séminal. La perte de ces anions provoquerait un changement conformationnel de la caltrine qui pourrait alors stimuler l'échangeur et promouvoir l'entrée de calcium et la sortie de sodium (San Augustin et Lardy, 1990). La caltrine aurait un rôle à jouer autant au niveau de l'hyperactivation

lors de la capacitation (section 1.4.6.) qu'au niveau de la réaction de l'acrosome (Clark et al., 1993).

Une fois internalisé, le calcium pourrait jouer plusieurs rôles. Il est maintenant connu que le calcium module l'activité de l'adénylate cyclase et des phosphodiesterases du spermatozoïde soit directement ou indirectement via son action sur la calmoduline (Braun, 1975; Gross et al., 1987; Goh et White, 1988; Fraser et Monks, 1990).

1.4.4.2. Le potassium

La capacitation chez la souris et le bovin est accompagnée d'une hyperpolarisation de la membrane plasmique des spermatozoïdes probablement causée par une variation des concentrations intracellulaires de plusieurs ions, principalement du potassium (Zeng et al., 1995) et possiblement du calcium (Espinosa et Darszon, 1995). Le potentiel membranaire d'une population de spermatozoïdes capités diminue de -30 mV à -60 mV chez les spermatozoïdes bovins et de -35 mV à -50 mV chez les spermatozoïdes de souris (Zeng et al., 1995). Il a été suggéré par l'équipe de Florman (Florman et al., 1998; Arnoult et al., 1996) que l'hyperpolarisation de la membrane plasmique permettrait à des canaux calciques impliqués dans la réaction de l'acrosome (section 1.5.) de passer d'un état inactif à un état activable et seraient par la suite activés (ouvert) sous l'action de la zone pellucide.

1.4.4.3. L'ion bicarbonate

Les ions bicarbonate semblent aussi être impliqués dans la capacitation des spermatozoïdes de souris (Neill et Olds-Clarke, 1987; Visconti et al., 1995; Lee et Storey, 1986; Shi et Roldan, 1995) et de hamster (Boatman et Robbins, 1991). La concentration des ions bicarbonate est faible au niveau du fluide de l'épididyme et élevé au niveau du plasma séminal et dans les fluides du système reproducteur femelle (Brooks, 1983). À ce niveau, les ions bicarbonate semblent jouer un rôle important dans le contrôle du pH (Fraser, 1995). Chez le spermatozoïde, plusieurs études ont démontré que les ions bicarbonate activent l'adénylate cyclase (Okamura et al., 1985; Tajima et al., 1987; Tajima et Okamura, 1990; Garty et Salomon, 1987). Tajima et

Okamura (1990) ont constaté que des bloqueurs de canaux anioniques potentialisent la stimulation de l'adénylate cyclase par les ions bicarbonate. Il y aurait donc possiblement des canaux anioniques au niveau des spermatozoïdes qui réguleraient la concentration intracellulaire des ions bicarbonate mais leur présence reste à être confirmée. Ces auteurs ont suggéré que des bloqueurs de canaux anioniques existeraient qui empêcheraient les ions bicarbonate nouvellement produits, à cause de la conversion de l'oxyde de carbone, de sortir de la cellule. Ce mécanisme augmenterait ainsi la concentration intracellulaire de bicarbonates ce qui stimulerait ensuite l'adénylate cyclase. L'augmentation intracellulaire des ions bicarbonate pourrait aussi contribuer à l'augmentation du pH intracellulaire se produisant lors de la capacitation (Cross et Razy-Faulkner, 1997; Uguz et al., 1994; Zeng et al., 1996).

1.4.5. La phosphorylation sur tyrosine des protéines spermatiques lors de la capacitation

La capacitation des spermatozoïdes est aussi accompagnée d'une augmentation de l'AMPc (Parrish et al., 1994) ainsi que d'une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de protéines spécifiques (Leyton et Saling, 1989; Visconti et al., 1995a et b). Chez le bovin, la capacitation est corrélée avec la phosphorylation sur tyrosine d'un groupe de protéines de masses moléculaires variant entre 40 et 120-kDa (Galantino-Homer et al., 1997). Plusieurs expériences démontrent que la capacitation et la phosphorylation sur tyrosine des protéines sont régulées par le taux d'AMPc. En effet, ces deux événements sont stimulés par des analogues de l'AMPc ou des inhibiteurs de phosphodiésterases et inhibés par des inhibiteurs de la protéine kinase A (PK-A) (Fraser, 1979; Visconti et al., 1995b, Leclerc et al., 1996; Uguz et al., 1994, Parrish et al., 1994). Chez le bovin, la présence d'agents capacitants (héparine, BSA, ionophore de calcium, etc) dans le milieu d'incubation semble nécessaire pour observer ces différents effets (Aoyagi et al., 1988; Shioya et al., 1988; Handrow et al., 1989; Parrish et al., 1994). La PK-A est une enzyme présente dans les spermatozoïdes et son activité dépend de l'AMPc. Lorsque activée, elle phosphoryle les thréonines ou les sérines de protéines cibles (Hoskins et al., 1972; Garbers et al., 1973). Des changements au niveau du métabolisme de l'AMPc ont été reliés à la capacitation chez

le bovin (Parrish et al., 1994; Uguz et al., 1994), le cochon (Berger et Clegg, 1983), la souris (revue par Fraser et Monks, 1990), le hamster (Visconti et Tezon, 1989) et l'humain (Leclerc et al., 1996).

La concentration intracellulaire de l'AMPc est régulée par deux systèmes enzymatiques: les phosphodiesterases qui dégradent l'AMPc pour maintenir un faible niveau d'AMPc et l'adénylate cyclase qui génère l'AMPc. L'adénylate cyclase des spermatozoïdes n'est pas couplée à une protéine G (Hildebronth et al., 1985; Fraser et Monks, 1990; Ward et Kopf, 1993) mais son activité, tout comme celle des phosphodiesterases, serait plutôt régulée par les ions calcique et bicarbonate (voir sections précédentes).

Tous ces résultats appuient l'hypothèse de l'équipe de Galantino-Homer (1997) voulant que la capacitation des spermatozoïdes de mammifère soit médiée par une voie signalétique impliquant l'interaction de la voie de l'AMPc/PK-A et de la voie des tyrosines kinase/phosphatase. Cette voie de signalisation intracellulaire serait unique aux spermatozoïdes de mammifères. En effet, l'augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de protéines stimulée par la PK-A durant la capacitation serait la première démonstration qu'il y aurait une communication entre ces deux voies de signalisation. Présentement, il reste à démontrer si l'augmentation de la phosphorylation sur tyrosine des protéines est due à une stimulation d'une tyrosine kinase ou à une inhibition d'une phosphotyrosine phosphatase ou aux deux. La nature des enzymes impliquées dans cette voie de signalisation, l'identité des substrats phosphorylés et leur implication au niveau de la capacitation demeurent encore inconnues.

1.4.6. Les dérivés actifs de l'oxygène

Plusieurs études démontrent que la capacitation des spermatozoïdes est aussi modulée, *in vitro*, par la présence extracellulaire des dérivés actifs de l'oxygène. Chez l'humain, l'ajout, en faibles concentrations, d'anion superoxide, de peroxyde d'hydrogène ou d'oxyde nitrique au milieu d'incubation stimule la capacitation et l'hyperactivation des spermatozoïdes (de Lamirande et Gagnon, 1993; Griveau et al.,

1994; Zini et al., 1995). De plus, il a été démontré que les spermatozoïdes incubés dans des conditions capacitantes (en présence de fluide folliculaire, de sérum fœtal ou de plasma séminal) génèrent immédiatement des anions superoxyde au niveau de leur membrane plasmique (de Lamirande et Gagnon, 1995; 1998). Récemment, Leclerc et al. (1997) ont démontré que les dérivés actifs de l'oxygène stimulent la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs protéines spermatiques. Ces nouveaux résultats sont en accord avec les résultats de Aitken et al. (1995) qui démontrent une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs protéines spermatiques stimulée par l'addition de peroxyde d'hydrogène. Jusqu'à maintenant, l'enzyme responsable de la génération d'anions superoxyde ainsi que les mécanismes par lesquels les dérivés actifs de l'oxygène stimulent la capacitation et la phosphorylation sur tyrosine de protéines demeurent inconnus. Les dérivés actifs de l'oxygène sont aussi impliqués dans la capacitation des spermatozoïdes de hamster (Bize et al., 1991) et de souris (de Lamirande et al., 1997). De récents travaux (Blondin et al., 1997; O'Flaherty et al., 1997) indiquent que l'anion superoxyde pourrait aussi être impliqué dans la capacitation des spermatozoïdes bovin.

1.4.7. L'hyperactivation

Au moment de la dernière étape de la capacitation, les spermatozoïdes subissent un changement au niveau de leur motilité et deviennent hyperactivés. La motilité des spermatozoïdes hyperactivés est caractérisée par une grande vitesse, une lente progression vers l'avant, et un mouvement du flagelle ressemblant à celui d'un fouet (Yanagimachi, 1994). Les spermatozoïdes ont besoin d'être hyperactivés pour pouvoir féconder l'oocyte. En effet, il existe une très bonne corrélation entre l'hyperactivation de la motilité et l'habileté des spermatozoïdes à pénétrer la zone pellucide (Yanagimachi, 1994). Les mouvements non-directionnels associés à l'hyperactivité des spermatozoïdes permettraient à ces derniers de se détacher de l'épithélium des cryptes au niveau de l'isthme de l'oviducte (Demott et Suarez, 1992) tandis que les mouvements vigoureux de la queue des spermatozoïdes faciliteraient le mouvement des spermatozoïdes à travers le fluide oviductal (Demott et Suarez, 1992; Suarez et al., 1991; Suarez et Dai, 1992) et faciliteraient la pénétration de la zone

pellucide ainsi que des autres couches de l'oocyte (Katz et Yanagimachi, 1981; Yanagimachi, 1981; Bedford et Hoskins, 1990). L'initiation et le maintien de l'hyperactivation nécessitent la présence de calcium, de potassium et de substrats énergétiques. Les ions bicarbonate semblent aussi bénéfiques à l'hyperactivation mais leur présence n'est pas essentielle (Yanagimachi, 1994). Le mécanisme impliqué dans l'hyperactivation n'est pas encore identifié. Toutefois, on sait que le maintien de l'hyperactivation nécessite la présence de calcium extracellulaire et que la queue des spermatozoïdes renferme des protéines G (Garty et al., 1988; Hirsch et al., 1992) et des protéines kinases (Molenaar et al., 1981; Parisel et al., 1984; Rotem et al., 1990). Donc, le mécanisme d'hyperactivation postulé par Yanagimachi (1994) implique la stimulation par le calcium de l'adénylate cyclase qui activerait ensuite la cascade des protéines kinases dépendantes de l'AMP_c.

1.5. LA RÉACTION DE L'ACROSOME

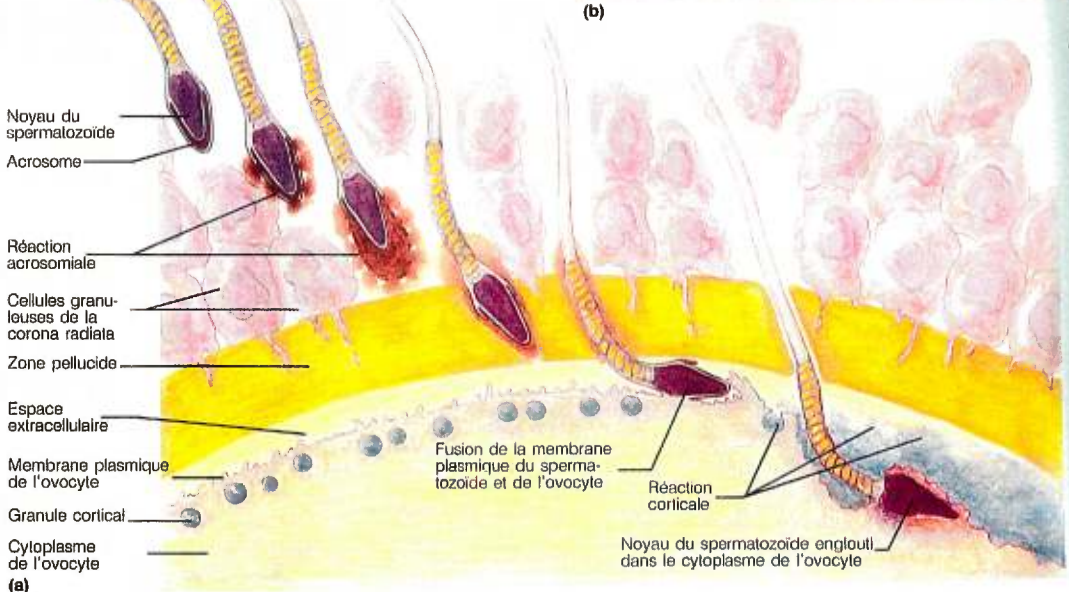
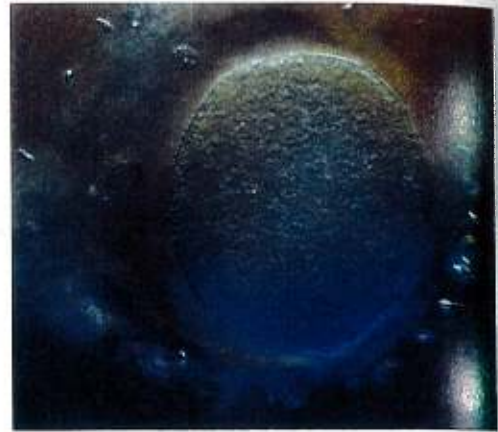
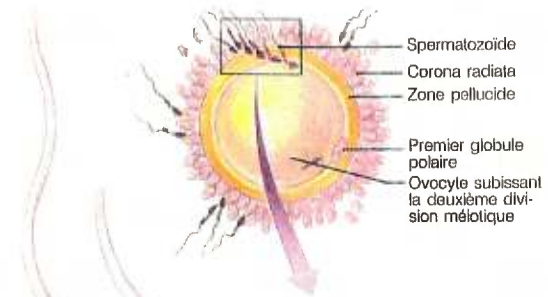
Le spermatozoïde capacité peut maintenant entreprendre la dernière étape de sa maturation, la réaction de l'acrosome, afin de féconder l'ovule. La réaction de l'acrosome consiste en la fusion de la membrane plasmique du spermatozoïde avec la membrane acrosomiale externe (Figure 4). Dans la plupart des espèces, incluant le bovin, seulement les spermatozoïdes possédant un acrosome intact peuvent interagir avec la zone pellucide par des récepteurs spécifiques à la surface du spermatozoïde. C'est la protéine ZP3 de la zone pellucide qui induit la réaction acrosomiale des spermatozoïdes. Un des récepteurs potentiels au niveau des spermatozoïdes pour la protéine ZP3 (riche en mannose) serait les récepteurs de mannose exposés à la surface des spermatozoïdes lors de la capacitation. Lorsque la protéine ZP3 entre en contact avec le spermatozoïde, elle active les canaux calciques T du spermatozoïde ce qui entraîne une entrée massive de calcium essentiel à la réaction de l'acrosome (Arnoult et al., 1996). La fusion des membranes lors de la réaction acrosomiale entraîne le relâchement des enzymes hydrolytiques de l'acrosome qui facilite le passage du spermatozoïde à travers la zone pellucide. La réaction de l'acrosome expose aussi de nouveaux récepteurs au niveau du spermatozoïde qui permettent sa liaison à la

FIGURE 4

LA RÉACTION DE L'ACROSOME ET LA PÉNÉTRATION DES SPERMATOZOÏDES

La figure ci-après illustre les différentes étapes de la réaction acrosomiale du spermatozoïde ainsi que la pénétration du spermatozoïde dans l'oocyte. **(a)** Les étapes de la réaction acrosomiale et de la pénétration du spermatozoïde sont représentées de gauche à droite. Lorsque les spermatozoïdes atteignent l'oocyte, ceux-ci doivent franchir plusieurs couches de cellules pour pouvoir atteindre leur but. Ils traversent premièrement les cellules granuleuses de la *corona radiata* puis rencontrent la zone pellucide. Au contact de la zone pellucide, les spermatozoïdes subissent la réaction de l'acrosome. Celle-ci consiste en la fusion à plusieurs endroits de la membrane plasmique et de la membrane acrosomiale externe entraînant la libération de plusieurs enzymes hydrolytiques. Suite à la réaction de l'acrosome, les vésicules membranaires sont dispersées et les spermatozoïdes exposent une nouvelle surface membranaire (la membrane acrosomiale interne) avec de nouveaux récepteurs pour l'oocyte. L'action des enzymes acrosomiales permet aux spermatozoïdes de traverser plus facilement la zone pellucide et facilite aussi le passage des autres spermatozoïdes à travers les cellules de la *corona radiata*. Ils traversent ensuite l'espace extracellulaire ou périvitelin. Finalement, un seul spermatozoïde pourra fusionner avec la membrane plasmique de l'oocyte. La tête du spermatozoïde est par la suite engloutie dans le cytoplasme de l'oocyte. **(b)** Photomicrographie de spermatozoïdes humains entourant un oocyte humain (x 750).

Tirée de: "Anatomie et Physiologie Humaines", Maried, 1993.



membrane plasmique de l'oocyte. Cette interaction résulte éventuellement en la fusion des gamètes.

La zone pellucide est l'inducteur physiologique de la réaction de l'acrosome. Par contre *in vitro*, d'autres substances peuvent être utilisées pour provoquer la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes. Chez le bovin, la lysophosphatidylcholine (lyso-PC) est fréquemment utilisée pour les études de capacitation *in vitro*. En effet, la lyso-PC a la propriété d'induire la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes capités mais n'a aucun effet sur les spermatozoïdes non-capités (Parrish et al, 1988).

1.6. LES FACTEURS CAPACITANTS PRÉSENTS DANS LE TRACTUS GÉNITAL FEMELLE

Les fluides oviductal et folliculaire possèdent tous les éléments nécessaires pour induire la capacitation. Ils contiennent les ions nécessaires en quantité suffisante (Ca^{2+} , HCO_3^- , K^+) ainsi que plusieurs agents capacitants qui diffèrent selon les espèces. En effet, plusieurs études ont démontré que lorsque les spermatozoïdes éjaculés sont incubés en présence de fluide oviductal ou folliculaire, les spermatozoïdes capitent après une certaine période (Lenz et al., 1982; Parrish et al., 1989a; Langlais et al., 1988; Grippo et al., 1995; Anderson et Killian, 1994; McNutt et Killian, 1991). La présence d'agents capacitants dans l'oviducte du tractus génital femelle permet aux spermatozoïdes d'enclencher la capacitation et la réaction de l'acrosome au bon endroit, au bon moment.

Au niveau du tractus femelle bovin, deux groupes de facteurs capacitants sont prédominants, soient les glycosaminoglycane (GAGs) et les accepteurs de cholestérol. Les prochaines sections s'attarderont sur ces deux groupes d'inducteurs.

1.7. LES GLYCOSAMINOGLYCANES ET L'HÉPARINE

1.7.1. Caractérisation des glycosaminoglycane

Les GAGs sont de longues chaînes de polysaccharides habituellement attachées à un corps protéique formant ainsi les protéoglycane (Ax et Lenz, 1987). Les

protéoglycanes et les GAGs sont des composantes de la matrice extracellulaire (interaction avec la fibronectine, le collagène, etc) et sont retrouvés à la surface des cellules. Ils sont aussi des composantes intégrées aux membranes. Puisqu'ils sont associés aux cellules, les GAGs jouent un rôle à plusieurs niveaux cellulaires notamment au niveau de l'adhésion, de la prolifération, de la migration ainsi que de la différenciation cellulaire (Gallagher et Hampson, 1984; Turley, 1984). Les GAGs sont composés d'unités de disaccharide répétées dont un des deux résidus est toujours un sucre aminé, soit la N-acétylglucosamine ou la N-acétylgalactosamine, et au moins un des deux sucres est chargé négativement due à la présence de groupements sulfate ou carboxyle. Les différences chimiques entre les différentes classes de GAGs sont rapportées au tableau III.

Au niveau de la reproduction bovine, la glycosaminoglycane ayant le plus grand pouvoir capacitant est l'héparine ou les GAGs semblables à l'héparine (section suivante). L'héparine a un poids moléculaire entre 5-60 kDa et est le GAG qui possède le plus de groupement sulfate. L'unité répétitive des dissaccharides de l'héparine est constituée de la N-acétylglucosamine ainsi que de l'acide D-glucuronique ou de l'acide L-ioduronique.

1.7.2. Source des glycosaminoglycanes

Les GAGs sont présents chez plusieurs mammifères autant au niveau du tractus reproducteur femelle qu'au niveau du plasma séminal (Jansen et Bagjai, 1982; Kitamaru et al, 1980; Lee et Ax, 1984; Lee et al., 1986; Zachariae et Thorsoe, 1966 et Lee et al., 1985). Chez la vache, la concentration totale des GAGs varie selon les différentes parties du système génital femelle; elle est de 34 mg/100 mg de protéine au niveau du col de l'utérus, 20 mg/100 mg de protéine au niveau de l'utérus et diminue à 9 mg/100 mg de protéine au niveau des oviductes (Lee et Ax, 1984). Il a été démontré que des concentrations élevées en GAGs ($> 100 \mu\text{g/ml}$) inhibent la capacitation (Lee et al., 1985) des spermatozoïdes. Ainsi, cette diminution progressive de GAGs au niveau du tractus génital femelle pourrait permettre

TABLEAU III

DIFFÉRENCES CHIMIQUES ENTRE LES DIFFÉRENTES CLASSES DE
GLYCOSAMINOGLYCANES

GAGs	Poids moléculaire (Da)	Nombre de sulfate par disaccharide	Sucres majoritaires ¹
Sulfate (4) de chondroïtine ²	1-5 X 10 ⁴	0,1-1,3	D-GalNAc; D-GlcUA
Sulfate (6) de chondroïtine ²	1-5 X 10 ⁴	0,1-1,3	D-GalNAc; D-GlcUA
Sulfate de dermatine ²	1-5 X 10 ⁴	1,0-3,0	D-GalNAc; L-IdUA; D-GlcUA
Sulfate d'héparine ³	2-50 X 10 ³	0,4-2,0	D-GlcNAc; D-GlcNSO ₃ ; L-IdUA; D-GlcUA
Héparine ³	5-30 X 10 ³	1,6-3,0	D-GlcNAc; D-GlcNSO ₃ ; L-IdUA; D-GlcUA
Acide hyaluronique	1-8 X 10 ⁶	0	D-GlcNAc; D-GlcUA
Sulfate de kératine	4-20 X 10 ³	0,9-1,8	D-GlcNAc; D-Gal

¹ Abréviations: D-GlcNAc, N-acétyl-D-glucosamine; D-GlcUA, acide D-glucuronique; D-GalNAc, N-acétyl-D-galactosamine; L-IdUA, acide L-ioduronique; D-Gal, D-galactose; D-GlcNSO₃; N-sulfo-D-glucosamine.

² La disulfatation du résidu D-GalNAc arrive occasionnellement.

³ L'héparine contient essentiellement du D-GlcNSO₃ tandis que le sulfate d'héparine contient principalement du D-GlcNAc. Le taux de sulfatation à la position 3 des résidus glucosamine est très faible. La sulfatation de toutes les positions possibles simultanément ne semble pas arrivée.

Adapté de: "Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls", Ax et Lenz, 1987.

d'optimiser la capacitation au niveau de l'oviducte. Le plasma séminal bovin possède aussi une forte concentration de GAGs (1,6 mg/ml) dont 61,6% correspondent aux sulfates de chondroïtine, 17,6% à l'héparine, 0,3% à l'acide hyaluronique et 20,5% ne sont pas encore identifiés (Lee et al, 1985). Donc, le plasma séminal et les différentes portions du tractus femelle auraient comme fonction de maintenir une concentration de GAGs élevée pour éviter une capacitation précoce.

Seul le fluide oviductal bovin récolté au moment de l'oestrus (période de fécondité) possède un pouvoir capacitant important (Parrish et al., 1989). L'acide hyaluronique (très faible pouvoir capacitant) est le GAGs retrouvé en plus grande quantité (40%) au niveau du fluide oviductal (26% de GAGs semblables à l'héparine, 12% de GAGs semblables aux sulfate de chondroïtine, 24% de GAGs non-identifiés (Lee et Ax, 1984). Par contre, le type de GAGs varie selon le cycle oestral. On remarque une augmentation (3 fois) de la quantité de GAGs semblables à l'héparine et de GAGs semblables à la chondroïtine durant la période de l'oestrus (Zachariae et Thorsoe, 1966). Puisque l'héparine a le meilleur pouvoir capacitant, l'habilité des sécrétions oestrales à capaciter les spermatozoïdes bovins serait probablement due à l'augmentation de GAGs semblables à l'héparine.

Les autres sources de GAGs rencontrées au niveau du tractus femelle sont l'acide hyaluronique sécrété par les cellules du cumulus (Ax et al., 1984; Ball et al., 1982) ainsi que le sulfate de dermatine et le sulfate d'héparine du fluide folliculaire (Ax et al., 1985).

1.7.3. Rôle des glycosaminoglycanes et de l'héparine dans la capacitation et la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes

Chez l'espèce bovine, les GAGs et l'héparine présents dans le tractus génital femelle semblent jouer un rôle très important au niveau du processus de capacitation. En effet, plusieurs études ont démontré que les GAGs isolés du liquide folliculaire bovin et l'héparine peuvent induire la capacitation et la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes éjaculés bovins en 9 h mais ne peuvent pas induire le même phénomène chez des spermatozoïdes épидидymaires bovins, le temps requis étant de 22

h en présence des GAGs (Handrow et al, 1982; Lenz et al, 1982; Lenz et al, 1983a; Parrish et al, 1985). Handrow et al (1982) ont testé la capacité de différents types de GAGs d'induire la réaction de l'acrosome chez les spermatozoïdes épидидymaires bovins. Leurs résultats ont permis d'établir que le pouvoir inducteur des GAGs était en partie relié au degré de sulfatation du GAG; l'héparine (30% de sulfatation) est le meilleur inducteur de la réaction acrosomiale tandis que l'acide hyaluronique (non-sulfaté) est le moins efficace. Chez le bovin, il a été démontré que l'action des GAGs et de l'héparine s'exercerait principalement au niveau de la capacitation, facilitant ainsi la réaction de l'acrosome de façon indirecte. En effet, les spermatozoïdes éjaculés bovins, contrairement aux spermatozoïdes épидидymaires, lorsque incubés pendant 4 h en présence d'héparine, subissent la réaction de l'acrosome immédiatement après l'addition de zone pellucide soluble (Florman et First, 1988) ou de lyso-PC (Parrish et al, 1988). Toutes ces expériences ont été effectuées en présence de calcium extracellulaire et sa présence est indispensable pour que la capacitation des spermatozoïdes induite par l'héparine ait lieu (Handrow et al., 1989). La capacitation des spermatozoïdes induite par l'héparine peut être inhibée par la présence du glucose (Parrish et al., 1989b). Le glucose inhibe la capacitation induite par l'héparine *in vitro* en bloquant la production d'AMPC et en provoquant une diminution du pH intracellulaire (la glycolyse génère des protons) (Uguz et al., 1994; Parrish et al., 1994) ce qui est à l'opposé des effets produits par l'héparine lors de la capacitation (voir les sections suivantes).

La capacitation induite par l'héparine entraîne plusieurs changements intracellulaires au niveau des spermatozoïdes. En effet, l'utilisation de calcium radioactif dans le milieu d'incubation a démontré que l'incubation des spermatozoïdes en présence de 10 µg/ml d'héparine amenait un influx de calcium intracellulaire après 2, 3 et 4 h d'incubation (Handrow et al., 1986). Suite à cette incubation de 4 h, jusqu'à 73% des spermatozoïdes sont capités (subissent la réaction de l'acrosome suite à l'ajout de lyso-PC au milieu), ce qui démontre bien que l'héparine provoque un influx calcique au moment de la capacitation *in vitro*. De plus, la capacitation des

spermatozoïdes par l'héparine stimule aussi l'alcalinisation intracellulaire des spermatozoïdes bovins (Parrish et al, 1989b).

L'héparine ne participe pas seulement au niveau de la reproduction bovine mais joue aussi un rôle chez les autres mammifères soit au niveau de la capacitation ou soit directement au niveau de la réaction de l'acrosome comme chez le hamster. Jusqu'à maintenant, l'héparine semble influencer la reproduction de l'humain (Delgano et al., 1988), du hamster (Meizel et Turner, 1986), du cochon (Reyes et al., 1984), du cheval (Varner et al., 1993) et du lapin (Lenz et al., 1983b).

1.7.4. Voies de signalisation intracellulaire sollicitées par l'héparine

Chez les spermatozoïdes bovins, il a été postulé que les effets de l'héparine sur la capacitation sont médiés par l'AMPc. En effet, des données récentes montrent que la capacitation induite par l'héparine peut être empêchée par l'action d'antagonistes de l'AMPc et que cette inhibition peut être renversée par un analogue de l'AMPc (8-bromo-AMPc, Uguz et al., 1994). De plus, cet analogue de l'AMPc ainsi que les inhibiteurs des phosphodiésterases renversent aussi l'inhibition de la capacitation par le glucose de manière dose-dépendante (Parrish et al., 1994). La capacitation par l'héparine est aussi accompagnée d'une augmentation de la synthèse de l'AMPc (Parrish et al, 1994). Cette augmentation de l'AMPc peut aussi être inhibée par la présence de glucose. L'héparine régule aussi des changements au niveau de la phosphorylation sur tyrosine des protéines associées à la capacitation (Galantino-Homer et al, 1997). Ces changements au niveau de l'AMPc et de la phosphorylation ont déjà été abordés à la section 1.4.5. Donc la stimulation par l'héparine et l'inhibition par le glucose de la capacitation des spermatozoïdes bovins semblent impliquer la voie des PK-A dépendantes de l'AMPc ainsi que la phosphorylation des protéines.

1.7.5. Liaison de l'héparine au spermatozoïde

Puisque l'héparine capcite les spermatozoïdes bovins, plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que l'héparine devait lier spécifiquement les spermatozoïdes pour provoquer son effet capacitant. Les études de Handrow et al (1984) ont démontré que

l'héparine se lie aux spermatozoïdes bovins selon une interaction typique récepteur-ligand. En effet, l'utilisation d'héparine radioactive a démontré que l'héparine se lie spécifiquement aux spermatozoïdes et que cette liaison est saturable, réversible, dépendante du pH, de la température et de la concentration en calcium du milieu d'incubation. De plus cette liaison est spontanée et exothermique. Chaque spermatozoïde semble posséder entre $1,5$ et $1,8 \times 10^6$ sites de liaison pour l'héparine (Marks et Ax, 1985). L'héparine se lie au niveau de la membrane acrosomiale, du flagelle et de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes. La liaison de l'héparine aux spermatozoïdes a aussi été démontrée chez le singe et le lapin (Marks et Ax, 1985), chez l'humain (Delgado et al., 1982) ainsi que chez le sanglier (Sánchez-Prieto et al., 1996). Toutefois jusqu'à maintenant, aucun résultat démontre que la capacitation des spermatozoïdes induite par l'héparine est médiée par un récepteur.

1.7.6. Protéines spermatiques liant l'héparine

L'analyse des protéines liant l'héparine à la surface des spermatozoïdes a révélé que les spermatozoïdes épидидymaires avaient beaucoup moins de sites de liaison pour l'héparine à leur surface que les spermatozoïdes éjaculés (Lee et al., 1985). Au niveau de la surface des spermatozoïdes épидидymaires, plusieurs protéines (24-28, 31, 40, 45, 80 kDa) liant l'héparine ont été identifiées à leur surface (Hurst et al., 1988; Miller et al., 1990). Ces protéines sont aussi présentes à la surface des spermatozoïdes éjaculés, toutefois un grand nombre de protéines liant l'héparine sont ajoutées lors du contact avec le plasma séminal. Le plasma séminal bovin contient trois familles de protéines ayant la propriété de lier l'héparine, elles sont produites par les glandes accessoires et elles ont des masses moléculaires de 14-18, 24 et 31 kDa. Ces protéines lient les spermatozoïdes épидидymaires et facilitent la liaison de l'héparine aux spermatozoïdes (Miller et al., 1990; Lee et al., 1985; Nass et al., 1990).

1.7.7. Mécanisme d'action de l'héparine

Durant la maturation épидидymaire ainsi que lors de l'éjaculation, des protéines liant l'héparine ainsi que des facteurs décapacitants seraient ajoutés à la surface des spermatozoïdes. Lorsque les spermatozoïdes parcourent le tractus reproducteur

femelle, ils sont exposés au niveau de l'isthme à des GAGs semblables à l'héparine qui se lient à des protéines spécifiques des spermatozoïdes. Cette interaction amènerait le relâchement des facteurs décapacitants ou des facteurs stabilisant l'acrosome, entraînerait l'activation des canaux à protons ce qui provoquerait l'alcalinisation cytoplasmique et stimulerait l'entrée de Ca^{2+} . L'augmentation de Ca^{2+} et du pH activerait l'adénylate cyclase ou inhiberait les phosphodiesterases ce qui résulterait en une augmentation intracellulaire de l'AMPc. Étant un faible bloqueur des canaux anioniques, l'héparine pourrait aussi stimuler l'adénylate cyclase via son action sur les canaux anioniques. En effet, comme mentionné à la section 1.4.4.3., les bloqueurs de canaux anioniques augmentent la concentration intracellulaire de bicarbonates qui peut lui aussi stimuler l'adénylate cyclase. Cette augmentation provoquerait une série d'événements résultant en l'activation/inactivation de protéines cellulaires cibles par l'action de la voie des protéines kinases (phosphorylation sur tyrosine de protéines spécifiques).

1.8. LES ACCEPTEURS DE CHOLESTÉROL

Il a été clairement démontré que l'efflux de cholestérol constitue une des toutes premières étapes de la capacitation (section 1.4.3.1.). L'efflux net de cholestérol lors de la capacitation est affecté par la capacité du milieu à lier le cholestérol. Plusieurs évidences indiquent maintenant qu'il y a des composantes dans le tractus génital femelle qui facilitent l'efflux de cholestérol. Plusieurs études ont démontré que l'albumine (Davis et al., 1980; Go et Wolf, 1985; Benoff et al., 1993b-d; Davis et al., 1979; Langlais et al., 1988) et les lipoprotéines de haute densité (HDL, Ehrenwald et al., 1990; Langlais et al., 1988) étaient des accepteurs de cholestérol.

1.8.1. L'albumine

L'albumine fut le premier candidat identifié comme accepteur de cholestérol due probablement à sa capacité de liaison aux stérols (Bartholow et Geyers, 1981; Fielding et Fielding, 1985). Elle est la protéine majeure du fluide oviductal et constitue plus de 90% des protéines totales de ce fluide (Ehrenwald et al., 1990; Beier, 1974). Il a été démontré que l'albumine induit l'efflux de cholestérol durant la

capacitation *in vitro* des spermatozoïdes de rat (Davis et al., 1979; 1980), de souris (Go et Wolf, 1985), et d'humain (Moubasher et Wolf, 1986; Langlais et al., 1988). Contrairement à ces observations, Ehrenwald et al. (1990) ont démontré que chez le bovin, il y avait une diminution de la quantité de cholestérol dans la fraction correspondante à celle de l'albumine lors de l'incubation des spermatozoïdes en présence de fluide oviductal. Les études de Langlais et al. (1988) ont montré que l'affinité de l'albumine du fluide folliculaire humain pour le cholestérol semble être deux à trois fois supérieure à celle de l'albumine du sérum. Cependant, la distribution du cholestérol spermatique n'est pas limitée à l'albumine lors de l'incubation des spermatozoïdes avec le fluide folliculaire; une certaine quantité du cholestérol est aussi associée avec les HDL.

1.8.2. Les lipoprotéines de haute densité

Les HDL, comme son nom l'indique, sont des lipoprotéines dont la densité varie entre 1,063 et 1,210 g/ml et qui sont retrouvées principalement au niveau du plasma sanguin. Les HDL du plasma sanguin humain ont un diamètre de 80-130 Å et sont constituées de phospholipides (25%), de cholestérol libre (5%), de triglycérides (7%), d'esters de cholestérol (10-20%) et d'apolipoprotéines (45%) dont la forme majeure est l'apolipoprotéine A-I (apoA-I, 65%). Chez le bovin, les HDL du sérum ont une densité de 1,075 g/ml (Ehrenwald et al., 1990). Les HDL se retrouvent aussi dans le système reproducteur femelle; il a été démontré par de nombreuses équipes que les HDL sont la seule classe de lipoprotéines présente dans les fluides oviductal et folliculaire bovin, humain et porcine (Ehrenwald et al., 1990; Savion et al., 1982; Chang et al., 1976; Simpson et al., 1980; Langlais et al., 1988; Brantmeier et al., 1987; Jaspard et al., 1996). Les HDL du fluide folliculaire proviennent de la filtration du plasma par la barrière folliculaire et la modification des lipoprotéines filtrées par les enzymes lipolytiques du fluide folliculaire (Le Goff, 1994). Pour le fluide oviductal, l'origine des HDL demeure encore inconnue. Dans le fluide oviductal bovin, les HDL constituent moins de 5% de la quantité totale de protéines et ont une densité variant entre 1,056 et 1,140 g/ml. L'apolipoprotéine associée avec les HDL du fluide oviductal est l'apoA-I dont la masse moléculaire est de 28 kDa (Ehrenwald et al.,

1990). Chez le bovin, la quantité de HDL oviductales est élevée durant la période de l'oestrus et plus faible durant les autres périodes du cycle oestral (Parks et Ehrenwald, 1990).

1.8.2.1. Le rôle physiologique des HDL

Les HDL ont la propriété de capter du cholestérol de la membrane cellulaire, Ainsi, les HDL du plasma sanguin jouent un rôle important au sein de l'homéostasie du cholestérol cellulaire. Les cellules périphériques sont incapables de dégrader le cholestérol et l'organisme a mis au point un mécanisme permettant son élimination. Ce processus nommé le transport inverse de cholestérol (Miller et al., 1985) consiste à transporter le cholestérol des cellules périphériques vers le foie où il sera métabolisé. Les HDL sont impliquées principalement dans la première étape de ce mécanisme et sont considérées comme étant l'accepteur physiologique du cholestérol lors de l'efflux.

1.8.2.2. Implication des HDL au niveau de la capacitation

Les HDL du fluide folliculaire semblent être des particules idéales pour l'efflux de cholestérol lors de la capacitation. En effet, elles sont très pauvres en cholestérol contrairement aux HDL du sérum et elles renferment une quantité un peu plus importante de phospholipides (28,5%) que ces dernières (Jaspard et al., 1997). Comparativement aux HDL du sérum, les HDL du fluide folliculaire contiennent une sous-classe de HDL, les pré- β -HDL, en plus grande proportion (Jaspard et al., 1996). Ces derniers sont reconnus pour être le premier accepteur de cholestérol (Castro et Fielding, 1988; Huang et al., 1993). Ehrenwald et al., (1990) ont démontré que l'incubation des spermatozoïdes bovins avec du fluide oviductal causait un transfert net du cholestérol spermatique vers les HDL d'au moins 25% du cholestérol spermatique total. Les études de Langlais et al. (1988) et celles de Ehrenwald et al. (1990) sont toutes les deux arrivées à la conclusion que les HDL étaient des accepteurs de cholestérol beaucoup plus efficaces que l'albumine. En effet, suite à une incubation avec le fluide folliculaire des spermatozoïdes humains marqués avec du cholestérol radioactif, on retrouve 75% du cholestérol radioactif retiré associé aux

HDL et seulement 25% associé avec l'albumine du fluide folliculaire. Chez le bovin, l'albumine ne semble pas servir d'accepteur de cholestérol, il y aurait même un transfert du cholestérol de l'albumine vers les HDL.

1.9. RÔLE DU PLASMA SÉMINAL BOVIN DANS LA CAPACITATION

Le plasma séminal est constitué d'un mélange complexe de sécrétions provenant des testicules, de l'épididyme et des glandes accessoires. Plusieurs études ont démontré que le plasma séminal pouvait grandement affecter le potentiel des spermatozoïdes à féconder l'ovule (Lee et al., 1985; Florman et First, 1988; Miller et al., 1990) mais le sujet est controversé. En effet, la présence de certaines glandes accessoires n'est pas absolument requise pour la fécondation *in vivo*. Chez la souris, l'ablation des vésicules séminales réduit le nombre moyen de femelles fécondes de 20% (Peitz et Olds-Clarke, 1986) tandis que chez le rat cette ablation rend essentiellement infertile (Quenn et al., 1981). Une autre étude démontre que l'ablation de ces glandes chez le porc diminue de 80% le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat mais n'affecte pas la fertilité du verrat (Davies et al., 1975).

Le plasma séminal renferme plusieurs facteurs pouvant moduler la fécondation des spermatozoïdes (Miller et Ax, 1988). Il possède des facteurs décapacitants et stabilisants l'acrosome qui empêchent la capacitation, l' α -lactalbumine qui pourrait jouer un rôle au niveau de la capacitation et dans l'interaction spermatozoïde-oeuf, la caltrine qui semble impliquer au niveau de la réaction de l'acrosome ainsi que des protéines liant l'héparine qui jouent un rôle important au niveau de la capacitation. Le plasma séminal renfermerait aussi du cholestérol, un inhibiteur majeur de la capacitation chez l'humain (Cross, 1996) et des composantes acides qui seraient ajoutées à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation et qui seraient par la suite enlevées au moment de la capacitation (Oliphant, 1976; Aonuma et al., 1973; Oliphant et Brackett, 1973; Farooqui, 1983)

1.9.1. Rôle du plasma séminal bovin dans la capacitation induite par l'héparine

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les GAGs et l'héparine induisent la capacitation et la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes éjaculés bovins en 9 h. Ils stimulent le même phénomène chez les spermatozoïdes épидидymaires mais en un temps beaucoup plus long, soit 22 h. Par contre, si les spermatozoïdes épидидymaires bovins sont exposés au plasma séminal bovin (1:3 volume/volume) pendant 20 min puis exposés aux GAGs, le temps nécessaire pour que les GAGs induisent la réaction de l'acrosome diminue de 22 h à 9 h *in vitro* (Lee et al, 1985). Ces résultats suggèrent fortement que les spermatozoïdes épидидymaires sont modifiés par les sécrétions des glandes accessoires. Le rôle du plasma séminal au niveau de la capacitation des spermatozoïdes induite par l'héparine a aussi été confirmé par l'équipe de Miller et al. (1990) et par celle de Florman et First (1988). En effet, ces équipes ont démontré que les spermatozoïdes épидидymaires pré-incubés en présence de plasma séminal puis incubés pendant 4 h en présence d'héparine pouvaient répondre à la zone pellucide solubilisée et entreprendre la réaction de l'acrosome dans le même laps de temps que les spermatozoïdes éjaculés. L'effet du plasma séminal sur la capacitation induite par l'héparine serait dû à l'ajout de plusieurs protéines liant l'héparine (présentant des poids moléculaires de 14-18, 24 et 31 kDa) à la surface des spermatozoïdes lors du contact avec le plasma séminal (section 1.7.6.). Ces protéines semblent correspondre aux protéines majeures du plasma séminal bovin (Manjunath et al., 1994).

1.10. LES PROTÉINES MAJEURES DU PLASMA SÉMINAL BOVIN

Le plasma séminal bovin contient une grande variété de protéines représentant une concentration totale moyenne de 68 mg/ml (Miller et Ax, 1988). La majeure partie (60-70%) de ces protéines est constituée d'un groupe de protéines sécrétées par les vésicules séminales (Manjunath et al., 1987) et appelées protéines BSP ("Bovine seminal plasma proteins"; Manjunath et al., 1988). Cette famille comprend quatre protéines homologues: BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 et BSP-30-kDa. La caractérisation plus détaillée de BSP-A1, BSP-A2 et BSP-A3 a permis de démontrer

que ces protéines étaient identiques aux gonadostatines BSP-III, II et I respectivement isolées du plasma sérial bovin par Esch et al (1983a). Les protéines BSP-A1 et BSP-A2 portent aussi ensemble le nom de BSP-A1/-A2 ou de PDC-109 (P pour protéine, D et C pour l'abréviation des acides aminés se trouvant aux extrémités amino-terminale et carboxy-terminale respectivement et 109 pour le nombre d'acides aminés) (Esch et al, 1983b). La protéine PDC-109 est synthétisée par les vésicules séminales et elle a été identifiée comme étant la protéine majeure du plasma sérial bovin (Kemme et al., 1986).

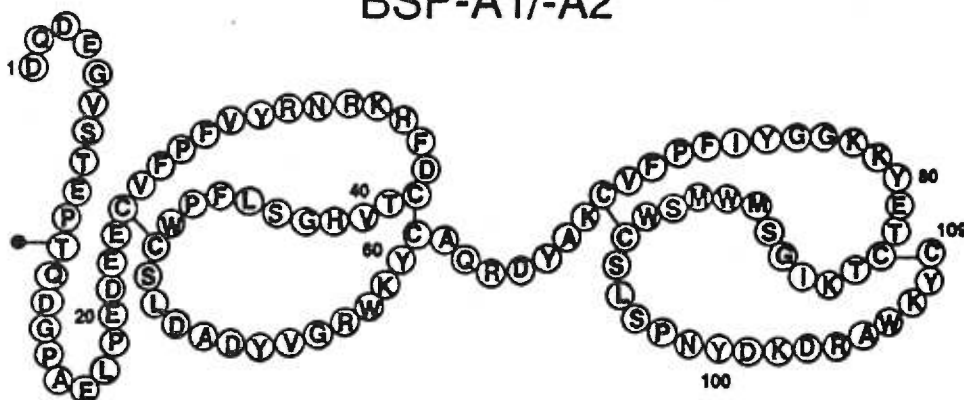
1.10.1. Propriétés biochimiques des protéines BSP

Les protéines BSP-A1, -A2 et -A3 sont des protéines qui ont des masses moléculaires entre 15 et 16,5 kDa tandis que la protéine BSP-30-kDa a un poids moléculaire près du double, 28-30 kDa (Esch et al., 1983a; Manjunath, 1984; Manjunath et al., 1987; 1988; Manjunath et Sairam, 1987). Les protéines BSP-A1 et BSP-A2, en milieu basique et neutre, peuvent former des agrégats de poids moléculaires variant entre 20 et 150 kDa (Manjunath et Sairam, 1987; Gasset et al., 1997). Par contre, en condition acide ou en présence de 8 M d'urée, elles restent sous forme de monomères (Manjunath et al., 1988). À l'exception de la protéine BSP-A3, les protéines BSP sont glycosylées: BSP-A1 contient des sucres neutres, de la galactosamine et de l'acide sialique; BSP-A2 contient elle aussi de la galactosamine et de l'acide sialique en plus faible quantité que BSP-A1 mais ne contient aucun sucre neutre. La protéine BSP-30-kDa contient les mêmes sucres que la protéine BSP-A1 et est la plus glycosylée des protéines BSP (Manjunath et al., 1988; Manjunath et Sairam, 1987). Les protéines BSP-A1 et BSP-A2 ont toutes les deux une séquence d'acides aminés identique (Figure 5) et la seule différence réside dans leur degré de glycosylation, BSP-A1 étant la plus glycosylée des deux. Les protéines BSP-A3 et BSP-30-kDa ont chacune une composition en acides aminées différente de BSP-A1/-A2 (Manjunath et al., 1987; 1988).

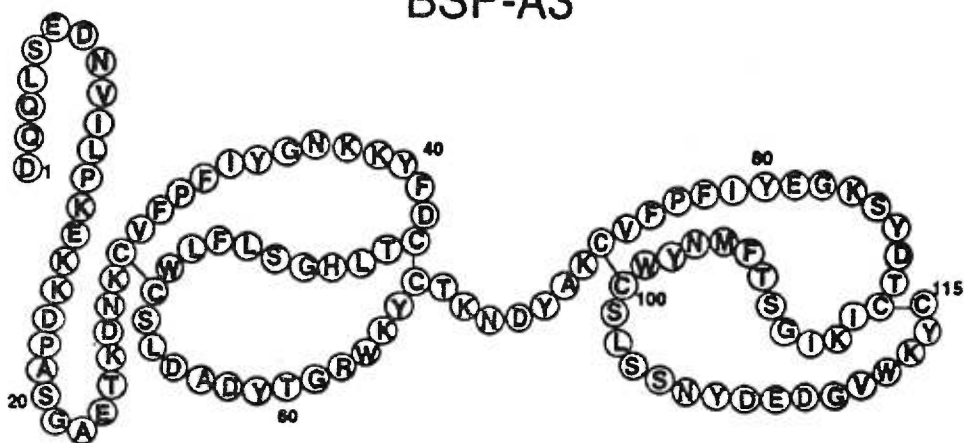
FIGURE 5**STRUCTURE SECONDAIRE DES PROTÉINES BSP**

La structure secondaire des protéines BSP est représentée ci-après. Les protéines BSP possèdent deux domaines de type II délimités par des ponts disulfures. Les sites glycosylés des protéines BSP-A1/-A2 et BSP-30-kDa sont indiqués par des cercles (●).

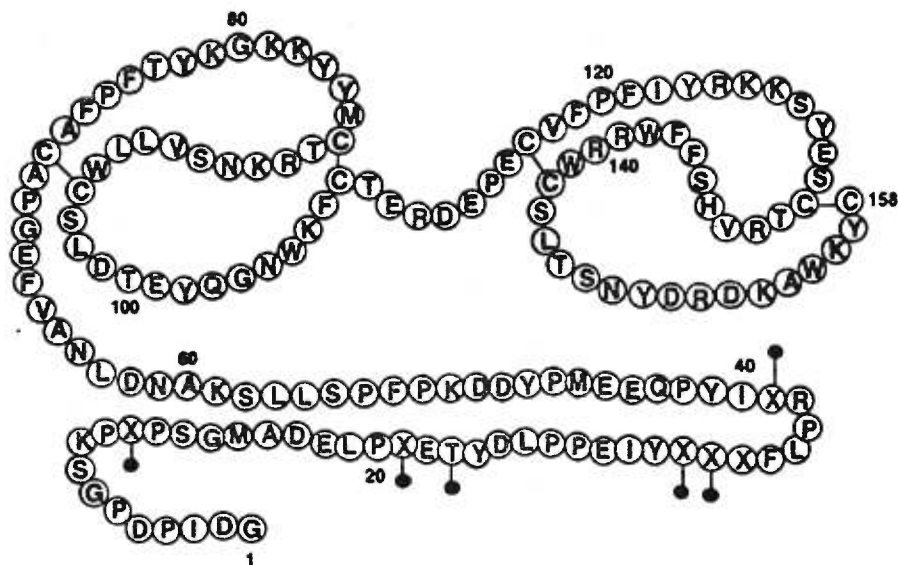
BSP-A1/-A2



BSP-A3



BSP-30-kDa



1.10.2. Structure des protéines BSP

Les structures des protéines BSP, comme l'illustre la Figure 5, sont similaires; chaque protéine contient deux domaines de type II disposés en tandem (Esch et al., 1983; Seidah et al., 1987; Calvete et al., 1996) et une portion N-terminale qui varie pour chaque protéine. La protéine BSP-30-kDa se distingue par sa longue queue N-terminale. Les domaines de type II sont caractérisés par une boucle polypeptidique comprenant deux ponts disulfures reliant les cystéines 1 et 3 et 2 et 4. Plusieurs protéines possèdent un ou plusieurs domaines de types II. La fibronectine contient deux domaines de types II. Le récepteur de mannose et celui de la phospholipase A2, contiennent un seul domaine tandis que les gélatinases A et B contiennent trois domaines de ce type (Tableau IV). Les domaines de type II de la fibronectine et des gélatinases A et B sont reconnus pour lier le collagène mais chez toutes les autres protéines possédant des domaines de type II aucune fonction ne leur sont attribuées. Les domaines de type II ont aussi une homologie avec les structures *Kringle* retrouvées dans plusieurs protéines de la cascade de coagulation (Baker et al., 1985; Patthy et al., 1984). Les domaines *Kringle* sont des unités structurales ou fonctionnelles responsables des interactions protéine-protéine (Banyai et al., 1990).

1.10.3. Distribution tissulaire des protéines BSP

Plusieurs études de notre laboratoire semblent indiquer que les protéines BSP se retrouvent uniquement au niveau du plasma sérial. De récentes études effectuées dans notre laboratoire par Dominic Salois, confirment les résultats obtenus précédemment (résultats non-publiés).

1.10.4. Propriétés de liaison des protéines BSP

Plusieurs études utilisant divers types de colonnes d'affinité ont démontré que les protéines BSP sont capables, *in vitro*, de s'associer à plusieurs macromolécules. Elles peuvent interagir avec la gélatine (Manjunath et al., 1987), avec différents types de collagène (types I, II, IV et V), avec le fibrinogène (Manjunath et al., 1988), ainsi qu'avec les facteurs capacitants majeurs chez le bovin, l'héparine et les HDL. La

TABLEAU IV

PROTÉINES CONTENANT DES STRUCTURES DE TYPE II

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

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

² Tiré de: "McMullen et Fujikawa, 1985"

³ Tiré de: "Morgan et al., 1987; Oshima et al., 1988; Lobel et al., 1988"

⁴ Tiré de: "Ishizaki et al., 1994"

⁵ Tiré de: "Taylor et al., 1990"

⁶ Tiré de: "Miyazawa et al., 1993"

⁷ Tiré de: "Jiang et al., 1995"

⁸ Tiré de: "Kornbliht et al., 1985; Baker, 1985; Banyai et al., 1990"

⁹ Tiré de: "Calvete et al., 1995"

¹⁰ Tiré de: "Sanz et al., 1993; Calvete et al., 1997"

¹¹ Tiré de: "Esch et al., 1983"

¹² Tiré de: "Calvete et al., 1996"

¹³ Tiré de: "Banyai et al., 1996"

liaison des protéines BSP à l'héparine a été démontrée en utilisant une colonne d'héparine-Sepharose (Chandonnet et al., 1990). Jusqu'à maintenant, le site de liaison des protéines BSP à l'héparine n'a pas encore été déterminé. Manjunath et al. (1989) ont démontré, en utilisant du sérum humain passé sur une colonne d'affinité BSP-A1/-A2-agarose, que les protéines BSP liaient l'apoA-I du sérum humain (Manjunath et al., 1989). Ces études ont aussi démontré la liaison des protéines BSP à l'apoA-I purifiée ainsi qu'à l'apoA-I associée aux HDL. Les protéines BSP lient aussi la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation (Manjunath et al., 1988; Manjunath et al., 1994). Des études d'immunofluorescence ont démontré que la liaison des protéines BSP à la surface des spermatozoïdes n'est pas uniforme. Les protéines BSP se lient préférentiellement à certaines régions à la surface des spermatozoïdes (partie intermédiaire de la tête) et que les régions liées varient légèrement pour chaque type de BSP (Manjunath et al., 1994). Due à son interaction avec l'héparine, cette liaison des protéines BSP à la surface des spermatozoïdes pourrait augmenter le nombre de sites de liaison pour l'héparine. Le site de liaison des protéines BSP à la surface membranaire des spermatozoïdes a été déterminé comme étant les phospholipides portant un groupement choline (Desnoyers et Manjunath, 1992). De plus, des études de dialyse à l'équilibre montrent que les protéines BSP-A1/-A2 ont deux sites de liaison pour la choline par mole de protéine et que la liaison des protéines BSP à la choline implique des interactions hydrophobes (Desnoyers et Manjunath, 1993).

1.10.5. Protéines analogues aux protéines BSP chez d'autres espèces

L'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-protéines BSP, nous ont permis de détecter des protéines analogues aux protéines BSP dans le plasma sérial de hamster, d'humain, de souris, de porc et de rat (Leblond et al., 1993). Des analogues ont aussi été détectés et séquencés chez le cheval et le porc (Calvete et al., 1997; 1995; Sanz et al., 1993). Dans le plasma sérial équin, deux protéines ont été purifiées en quantité importante, HSP-1 et HSP-2, dont l'organisation topologique et les propriétés de liaison ressemblent à celles des protéines BSP-A1/-A2 et BSP-A3 (Calvete et al., 1995). La protéine retrouvée chez le porc a été nommée pB1. On la

retrouve en beaucoup plus faible quantité au niveau du plasma séminal du porc comparativement aux protéines BSP (Sanz et al., 1993; Calvete et al., 1997).

1.11. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Bien que la liaison des protéines BSP à la surface des spermatozoïdes soit un fait maintenant bien établi, le rôle physiologique des protéines BSP reste encore un grand mystère. Nous savons que lors de l'éjaculation, une certaine quantité de protéines BSP se lie au groupement choline des phospholipides de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Nous savons également que les protéines BSP peuvent interagir avec plusieurs protéines et macromolécules notamment avec les deux principaux facteurs capacitants retrouvés dans les fluides oviductal et folliculaire bovins soient l'héparine et les HDL. Toutes ces propriétés de liaison suggèrent que les protéines BSP pourraient jouer un rôle important au niveau de la capacitation des spermatozoïdes. Nous nous sommes donc proposés de vérifier cette hypothèse.

Pour débiter, nous avons caractérisé le pH isoélectrique et les modifications post-traductionnelles des protéines BSP afin de vérifier si elles pouvaient correspondre aux protéines acides ajoutées à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation et enlevées au cours de la capacitation.

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié l'effet des protéines BSP sur la capacitation et la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes épидидymaires bovins en présence des facteurs capacitants, l'héparine et les HDL. Ces études nous ont permis de déterminer que les protéines BSP agissent au niveau de la capacitation des spermatozoïdes et ne stimulent aucunement la réaction de l'acrosome. Ces études nous ont aussi permis de déterminer que les protéines BSP seules (20 min d'incubation) ne peuvent pas stimuler la capacitation et nécessitent la présence d'héparine ou de HDL pour induire son effet sur les spermatozoïdes. De plus, ces études nous ont aussi permis de vérifier que la présence des protéines BSP semble être essentielle pour l'induction de la capacitation par l'héparine tandis que les HDL seules peuvent stimuler la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires. La présence des protéines BSP ne permet que d'accélérer et de stimuler davantage la capacitation.

Enfin, nous avons entrepris de clarifier le mécanisme d'action des inducteurs de la capacitation des spermatozoïdes. Ces études nous ont permis de constater que le mécanisme de capacitation induit par l'héparine était différent du mécanisme de capacitation stimulée par les HDL. Les HDL stimulent un efflux de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes et ne stimulent aucunement la phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes contrairement à l'héparine qui ne stimule pas un efflux de cholestérol membranaire mais stimule la phosphorylation d'un groupe de protéines spermatiques. Ces études nous ont aussi permis de déterminer que les protéines BSP seules incubées en présence des spermatozoïdes pour une longue période de temps (8 h) peuvent stimuler l'efflux de cholestérol membranaire ainsi que la capacitation des spermatozoïdes. De plus, nous avons caractérisé sommairement la particule d'efflux générée par cette incubation. Par la suite, nous avons aussi démontré que la présence des deux domaines de type II des protéines BSP est essentielle pour l'expression des fonctions biologiques des protéines BSP soit l'efflux de cholestérol et la capacitation des spermatozoïdes en présence des facteurs capacitants. Tous ces résultats nous ont permis d'élaborer un modèle incluant deux mécanismes de capacitation des spermatozoïdes impliquant les protéines BSP.

2. ARTICLES

- 2.1. **CHARACTERIZATION OF THE MAJOR PROTEINS OF BOVINE SEMINAL FLUID BY TWO DIMENSIONAL POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS.** L. Desnoyers, I. Thérien, and P. Manjunath, *Molecular Reproduction and Development*, **37**: 425-435, 1994.

Préambule:

Les protéines BSP forment une famille de quatre protéines similaires (BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 et BSP-30-kDa), sécrétées par les vésicules séminales et représentant 60-70% du contenu protéique total du plasma séminal bovin. Ces protéines sont maintenant bien caractérisées. Par contre, on ignore encore leur point isoélectrique exact ainsi que leur hétérogénéité moléculaire. Afin de combler cette lacune, nous avons entrepris leur analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide en deux dimensions. Dans cet article, nous démontrons que les protéines BSP sont acides (parmi les plus acides des protéines du plasma séminal bovin), nous identifions leur point isoélectrique et constatons leur grande hétérogénéité moléculaire. De plus, nous analysons différentes modifications post-traductionnelles que subissent ces protéines. Sachant que lors de l'éjaculation plusieurs composantes acides sont ajoutées à la surface des spermatozoïdes (diminuant la charge nette), puis enlevées lors du processus de capacitation, nous pourrions croire que la nature acide des protéines BSP puisse leur conférer une telle propriété.

La réalisation de ce travail a débuté au cours de mon stage d'été dans le laboratoire du Dr. P. Manjunath où j'ai travaillé sous la supervision de M. Luc Desnoyers et s'est terminée tout au début de ma maîtrise. M. Luc Desnoyers a effectué la mise au point des différentes techniques utilisées et a planifié l'ensemble des travaux. Pour ma part, j'ai apporté l'aide technique, j'ai contribué à la mise au point des différentes techniques utilisées et j'ai écrit la première ébauche de l'article. L'ensemble des travaux a été exécuté sous la supervision de Dr. P. Manjunath.

Characterization of the Major Proteins of Bovine Seminal Fluid by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis

L. DESNOYERS, I. THÉRIEN, AND P. MANJUNATH

Department of Medicine, University of Montreal, and the Endocrine Laboratory, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Montreal, Québec, Canada

ABSTRACT Recently, we demonstrated that the major proteins from bovine seminal plasma BSP-A1, -A2, -A3 and -30-kDa (collectively called BSP proteins) specifically interact with choline phospholipids. These proteins coat the surface of the spermatozoa after ejaculation and are believed to play an important role in membrane modifications occurring during capacitation. In this study we determined the isoelectric point (pI) and analysed the molecular heterogeneity of BSP proteins. Total protein from bovine seminal plasma (CBSP) and purified BSP proteins were iodinated using chloramine T. Samples were reduced, denatured, separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE), and visualized by autoradiography. Analysis of CBSP proteins demonstrated the presence of polypeptides migrating in the pH range of 3.5–7.8 and at molecular weights (Mr) between 6 and 100 kDa. Many isoforms of each BSP protein were found when purified iodinated proteins were analysed by 2D-PAGE. BSP-A1 was found at a Mr of 16.5 kDa and in the range of pI of 4.7–5.0; BSP-A2 at 16 kDa and at a pI of 4.9–5.2; BSP-A3 at 15 kDa and at a pI of 4.8–5.2, and BSP-30-kDa at 28 kDa and at a pI of 3.9–4.6. Similar results were obtained with immunolocalization of BSP proteins after Western blot using specific antibodies. The treatment of purified iodinated BSP proteins with neuraminidase increased the pI of BSP-30-kDa to 4.8–5.0 and decreased its Mr to 25 kDa, but no change was observed for BSP-A1, -A2 and -A3. The treatment of BSP proteins with sulfatase or acid phosphatase modified neither their Mr nor their pI. Furthermore, when CBSP proteins were separated in 2D-PAGE and the gels stained for glycoproteins with dansyl hydrazine, BSP proteins were among the major glycoproteins found in the bovine seminal plasma. In conclusion, BSP proteins are acidic and have several isoforms. Furthermore, the heterogeneity of BSP-30-kDa is mainly due to its sialic acid content. © 1994 Wiley-Liss, Inc.

Key Words: Seminal fluid proteins, Isoelectric focusing, Molecular heterogeneity

junath, 1984; Manjunath and Sairam, 1987; Manjunath et al., 1987). These proteins are now well characterized with respect to their biochemical properties and structures (Manjunath et al., 1988). BSP-A1, -A2, and -A3 have molecular weights of 15,000–16,500 daltons, whereas BSP-30-kDa has a molecular weight of 28,000 daltons. BSP-A1, -A2, and -30-kDa are glycoproteins, whereas BSP-A3 does not contain any carbohydrate. BSP-A1 and -A2 have an identical amino acid sequence but their difference resides in the degree of glycosylation. BSP-A1 contains neutral sugars, galactosamine, and sialic acid, whereas BSP-A2 does not contain neutral sugar and has three to four times less galactosamine and sialic acid than BSP-A1 (Manjunath et al., 1988). These two proteins together have previously been called gonadostatins or PDC-109 (Esch et al., 1983) and cloning of these proteins has been reported (Kemmer and Scheit, 1988). BSP-30-kDa is the most glycosylated member of this family containing neutral sugars, galactosamine, and sialic acid. BSP-A3 and -30-kDa proteins each have an amino acid composition different from -A1/-A2. BSP-A1/-A2 and -A3 display 66% sequence identity and each contains two homologous domains (Esch et al., 1983; Seidah et al., 1987) that are similar to type-II structures present in the gelatin-binding domain of fibronectin (Baker, 1985; Seidah et al., 1987), human plasma factor XII (McMullen and Fujikawa, 1985), insulin-like growth factor II (IGF-II) or cation-independent mannose-6-phosphate receptor (Lobel et al., 1988; Oshima et al., 1988; Morgan et al., 1987), 72 kDa and 92 kDa type IV collagenases (Collier et al., 1988; Wilhelm et al., 1989). Type-II structures present in BSP proteins interact with different genetic types of collagens (type I, II, IV, V), fibrinogen (Manjunath et al., 1988), heparin (Chandonnet et al., 1990), calmodulin (Manjunath et al., 1993), apolipoprotein A-I (apoA-I), and apoA-I associated with high density lipoproteins (HDL; Manjunath et al., 1988, 1989). We also showed that BSP proteins bind to

INTRODUCTION

The major proteins of bovine seminal fluid named BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa (collectively called BSP proteins) constitute a family of closely related proteins secreted by the seminal vesicles (Man-

Received July 12, 1993; accepted September 27, 1993.

Address reprint requests to P. Manjunath, Centre de Recherche, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boul. de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada H1T 2M4.

the surface of the spermatozoa upon ejaculation (Manjunath et al., 1994). Recently, we characterized the BSP proteins binding sites on the sperm membrane to be choline phospholipids (Desnoyers and Manjunath, 1992). In addition, we showed that BSP-A1/-A2 proteins have two binding sites for the choline head group and the binding involves a structure-dependent hydrophobic interaction (Desnoyers and Manjunath, 1993). These proteins are not related to any other known lipid-binding proteins. In view of their lipid and lipoprotein binding properties, these BSP proteins appear to play an important role in the modification of the sperm plasma membrane that occurs during capacitation (Manjunath et al., 1989; Chandonnet et al., 1990; Desnoyers and Manjunath, 1992).

In this study, we used the high resolution, two-dimensional gel electrophoresis technique of O'Farrell (1975) to characterize proteins of bovine seminal plasma. We determined the isoelectric points of BSP proteins and present evidence for their molecular heterogeneity. In addition, we examined the effect on the 2D-PAGE pattern of BSP proteins upon treatment with neuraminidase, sulfatase, and phosphatase.

MATERIALS AND METHODS

Lactoperoxidase, arylsulfatase (type H-5 from *Helix pomatia*), and acid phosphatase (type VII from white potato) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Neuraminidase (type VIII from *Clostridium perfringens*) was bought from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Na¹²⁵I was purchased from Amersham Corp. (Oakville, Ontario). Electrophoresis reagents were from NCI (Cleveland, OH). Low molecular weight standards and pH 2.5-5 carrier ampholytes were from Pharmacia (Canada). Urea and pH 3-10 carrier ampholytes were from Bio-Rad (Richmond, CA). Nitrocellulose paper was purchased from Schleicher and Schuell (Keene, NH). Goat antibodies directed against rabbit IgG (H and L chains) were from Jackson Immuno-research Laboratories (Avondale, PA). All other chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

Ejaculates from adult Holstein bulls were obtained from the Veterinary Medical College (St-Hyacinthe, Québec). BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa were isolated by affinity chromatography as described earlier (Manjunath et al., 1987). BSP-A1 and BSP-A2 have the same amino acid sequence, but they differ in their extent of glycosylation (Manjunath and Sairam, 1987) and are considered as a single chemical unit. Antisera against purified BSP-A1/-A2, -A3 and -30-kDa proteins were raised in rabbits (Manjunath and Sairam, 1987) and purified on affinity columns (Chandonnet et al., 1990). Dialysed and lyophilized seminal plasma proteins (DLSP) were prepared by ethanol precipitation of bovine seminal plasma followed by dialysis of the precipitates against 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilization. This preparation consists of 60–70% of BSP proteins.

Iodination

BSP and CBSP proteins were labeled with ¹²⁵I using a chloramine T method described by Parker (1990) with minor modifications. Briefly, proteins (5 µg) were incubated for 30 sec at room temperature in a solution containing 0.5 mCi of Na¹²⁵I and 50 µg of chloramine-T in a total volume of 40 µl of 50 mM phosphate buffer (PB) pH 7.4. Reaction was stopped by the addition of 20 µl of 5 mg/ml sodium metabisulfite. Proteins were separated from the free iodine by gel filtration on a Sephadex G-25 column (1 × 20 cm) equilibrated with phosphate-buffered saline (PBS; 50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.1% BSA and 0.2% sodium azide. Radiolabeled proteins were kept frozen (−20°C) in aliquots of 100 µl until used. The specific activities were usually between 70 and 100 µCi/µg.

Goat antirabbit IgG antibodies were labeled with ¹²⁵I using the lactoperoxidase method as described earlier (Manjunath and Sairam, 1982). The specific activities were usually between 60 and 80 µCi/µg.

Enzymatic Treatments

Treatment with neuraminidase was carried out as described by the supplier (Boehringer Mannheim). Briefly, purified ¹²⁵I-BSP proteins (4 ng) were first denatured prior to neuraminidase treatment. They were successively heated at 100°C for 2 min after their solubilization in 200 µl of 50 mM PB, pH 7.4, containing 1% SDS, and after the addition of 200 µl of 50 mM PB, pH 7.4, containing 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 20 mM NaN₃. After cooling, neuraminidase (0.025 U) was added and the samples were incubated at 37°C for 20 hr. The reaction was stopped by freezing (−20°C) the samples.

Hydrolysis of the sulfate groups was carried out as described by Hortin et al. (1986) with modifications. Briefly, iodinated purified BSP proteins (4 ng) in 200 µl of 100 mM ammonium acetate (pH 5.2) were incubated with arylsulfatase (4.6 U) at 37°C for 20 hr without previous denaturation. Hydrolysis of the phosphate groups of purified ¹²⁵I-BSP proteins using acid phosphatase (0.2 U) was done in a similar manner. After the incubations, samples were frozen (−20°C) until used.

Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Two-dimensional gel electrophoresis was performed according to the method of O'Farrell (1975) with minor modifications. Briefly, samples were solubilized in lysis buffer (9.5 M urea, 2% v/v Tween-20, 5 mM dithiothreitol, 2% ampholytes and 0.003% bromophenol blue) for 2 hr, centrifuged at 13,000 × g for 1 hr and applied to the gel rods (0.3 cm × 12 cm). Isoelectric focusing using final concentration of 1% pH 2.5–5 and 1% pH 3–10 ampholytes was carried out with 10,000 volts/hr (500 V for 20 hr) at a constant temperature of 15°C. Phosphoric acid 0.085% was used as anode buffer whereas 0.02 M NaOH was used as cathode buffer. The final pH gradient extended from pH 3.4 to 8.1 as mea-

sured with a conventional electrode after cutting out 5 mm segments of the gel rod and eluting in 0.5 ml of 10 mM KCl for 1 hr. After focusing, the gels were either frozen for later use or immediately equilibrated (1 hr) in 6.25 mM Tris-HCl, pH 6.8 containing 2.3% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerin, 5 mM dithiothreitol, and 0.003% (w/v) bromophenol blue and then sealed with Agarose above a slab gel of 12 cm long and 1.5 mm thick containing 15% acrylamide with a 2.5% stacking gel (Laemmli, 1970). Following the second dimension, gels were stained for proteins with Coomassie blue R-250 and silver nitrate (Bürk et al., 1983) or for carbohydrate with dansyl hydrazine after periodic acid oxidation (Eckardt et al., 1976). The gels stained with dansyl hydrazine were photographed under longwave (365 nm) ultraviolet transilluminator using a Polaroid-type 667 film (ASA 3000) and an orange filter (Kodak Wratten no. 16). Gels containing radiolabeled proteins were dried and visualized by autoradiography. The apparent molecular mass was determined using the low molecular weight calibration kit of Pharmacia (Dorval, Canada) containing phosphorylase b (Mr 94,000), bovine serum albumin (Mr 43,000), carbonic anhydrase (Mr 30,000), trypsin inhibitor (Mr 20,100), and α -lactalbumin (Mr 14,400).

Immunoblotting

Proteins from 2D-PAGE were electrophoretically transferred to nitrocellulose sheets as described by Towbin et al. (1979). Nonspecific binding sites were blocked using PBS containing 0.1% BSA and 0.05% Tween-20 for 90 min at 25°C. The sheets were then incubated with the respective affinity purified antibodies directed against BSP protein for 90 min at 25°C. After washing three times (5 min each), the nitrocellulose paper was incubated with the same buffer containing ^{125}I -labeled goat antirabbit IgG (40,000 cpm/ml; 250 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) for 90 min at 25°C, followed by washing four times (10 min). The nitrocellulose paper was then dried and the immunoreaction was detected by autoradiography.

Analytical Methods

The protein content of samples was measured according to the method of Bradford (1976) or by weighing freeze-dried purified proteins on a Cahn microbalance (Model C-31). The scanning and integration of the relative intensity of the spots on autoradiography were done using the LKB ultrosan XL enhanced laser densitometer.

RESULTS

SDS-PAGE Analysis

Figure 1A shows the SDS-PAGE analysis of the bovine seminal plasma proteins (lane 1) and purified BSP proteins (lanes 2–4). BSP-A1/-A2 (lane 2) appeared as a doublet located at 16–16.5 kDa; BSP-A3 gave one band at 15 kDa (lane 3), whereas BSP-30-kDa (lane 4) migrated at 28 kDa. The mobility of purified BSP proteins

corresponded to the bands of the major proteins of the bovine seminal plasma (lane 1). Figure 1B shows the immunolocalization of BSP proteins in bovine seminal plasma. The immunoreactive bands revealed by the specific antibodies had the same electrophoretic mobility as the purified BSP proteins and corresponded to the major proteins of bovine seminal plasma.

2D-PAGE Analysis

In order to determine the isoelectric point and the molecular heterogeneity of BSP proteins, we analysed their electrophoretic mobility on two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Figure 2 shows the typical pattern of bovine seminal plasma proteins on 2D-PAGE. Proteins were either iodinated prior to electrophoresis and visualized by autoradiography (Fig. 2A) or doubly stained with Coomassie blue and silver nitrate (Fig. 2B). The protein spots extend from pH 3.5 to 7.8 and from 6,000 to 100,000 daltons. Electrophoretic patterns of bovine seminal plasma proteins appeared similar whether they were visualized by autoradiography after iodination of the samples or by silver nitrate staining. However, some proteins or groups of isoforms were more easily visualized by one of the two methods. A group of isoforms located at 28 kDa and at pH 3.9–4.6 is readily seen upon silver nitrate staining, whereas on autoradiography it gave a faint spot. This protein may contain less accessible tyrosine residues and more silver-sensitive residues. On the contrary, a group of proteins migrating at 21–26 kDa gave a dark spot on the autoradiogram, but it could not be seen after protein staining. Furthermore, several proteins found in bovine seminal plasma displayed charge heterogeneity and are represented by groups of spots located at the same molecular weight but distributed at different isoelectric points. By both techniques the major proteins were easily seen in the pH range of 4.6 to 7.2 and at the molecular weight of 12 to 17 kDa. The integration of the autoradiogram using a densitometer revealed that this group of proteins represented 57% of bovine seminal plasma proteins. The autoradiography also revealed two other important groups of proteins. One located between pH 5.8 and 6.8, with a molecular weight between 20 and 26 kDa, representing 12% of seminal plasma proteins. The second one accounted for 9% of the total proteins and had a molecular weight of 42 kDa and migrated in the pH range of 4.6 to 5.4. On the silver-stained gel, another major component was identified at pH 3.9–4.6 and at a molecular weight of 28 kDa. This group of isoforms constitutes the most acidic proteins found in bovine seminal plasma.

Immunoblotting of BSP Proteins Resolved by 2D-PAGE

Bovine seminal plasma proteins were separated by 2D-PAGE, electrotransferred to a nitrocellulose membrane, and probed with specific antibodies in order to locate BSP-A1/-A2, -A3 and -30-kDa proteins. Figure 3A shows that BSP-A1 migrates at a molecular weight of 16,500 Da and in the pH range of 4.7 to 5.0,

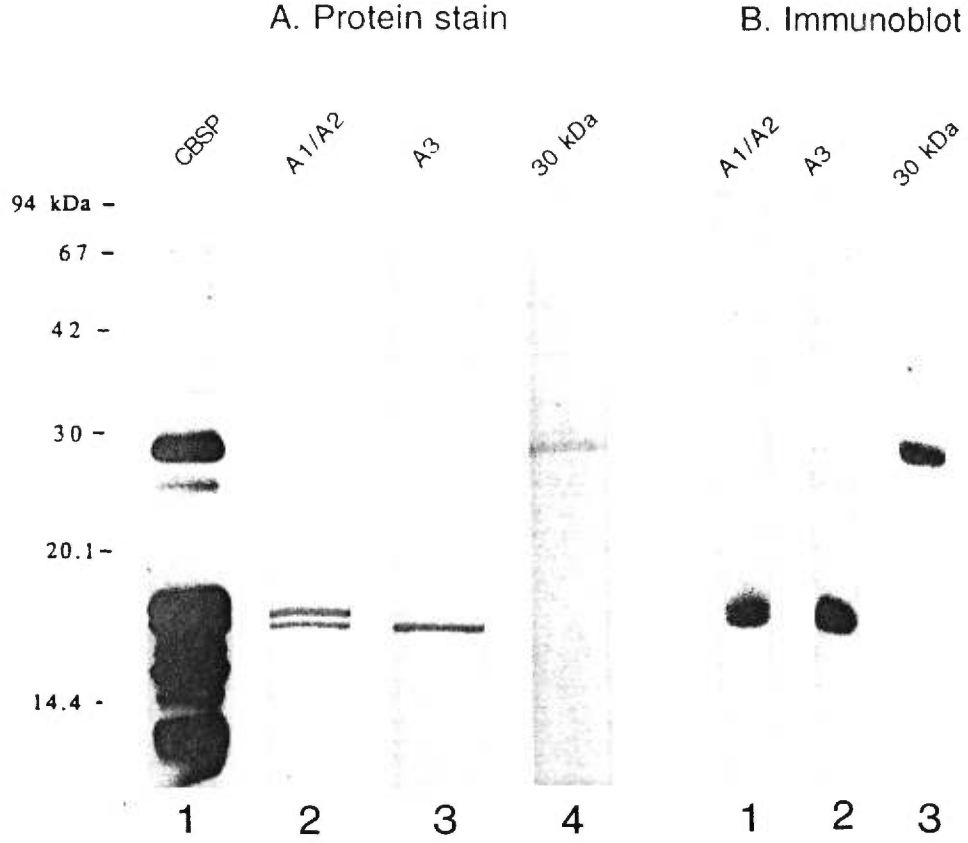


Fig. 1. SDS-PAGE and immunoblot analysis of CBSP proteins. CBSP (30 μ g) and purified BSP proteins (15 μ g) were reduced, denatured, and separated on a 15% polyacrylamide gel slab. **A.** Electrophoretic pattern of CBSP and purified BSP proteins on a gel stained with silver nitrate. **B.** CBSP proteins electrotransferred from SDS-PAGE onto nitrocellulose membrane and submitted to immunodetection using purified antibodies directed against respective BSP proteins.

the major isoform having an isoelectric point of 4.9. BSP-A2 is less acidic and migrates at pH 4.9 to 5.2 and has a molecular weight of 16,000 Da; the major form has an isoelectric point of 5.2 (Fig. 3A). Streaking of these proteins in the first dimension is seen as an extension of the major spot toward the acidic end of the gel. This could be due mostly to charge heterogeneity since a poor solubility would tend to create streaking toward the basic end of the gel. BSP-A3 (Fig. 3B) migrates between pH 4.8 and 5.2 at a molecular weight of 15,000 Da. This protein showed at least four isoforms, the major form being at pH 4.9. BSP-30-kDa migrates in the pH range of 3.9 to 4.6 and isoforms have a molecular weight of 28 kDa (Fig. 3C). When compared to 2D patterns of total proteins (Fig. 2), BSP-30-kDa corresponded to the most acidic protein found in bovine seminal fluid. A minor form of BSP-30-kDa could occasionally be detected as a discrete spot at a molecular weight of 25 kDa around pH 5. This could correspond to a posttranslational modification encountered by a minor fraction of the BSP-30-kDa population.

Similarly, radiolabeled purified BSP proteins were analyzed by 2D-PAGE (Fig. 4). Electrophoretic mobilities were identical to the immunoreactive spots localized in bovine seminal plasma proteins using the spe-

cific antibodies directed toward BSP proteins. Charge heterogeneity was very obvious, when in each case as many as six isoforms could be identified following long-term exposure of the autoradiographic film.

Enzymatic Treatments

To verify the quantitative importance of sialic acid in the isoforms, iodinated purified BSP proteins were treated with neuraminidase prior to their analysis on 2D-PAGE. As seen in Figure 5A,B, migration of BSP-A1/-A2 and -A3 treated with neuraminidase was similar to untreated proteins (controls) or immunolocalized proteins in bovine seminal plasma. However, BSP-30-kDa displayed a different electrophoretic pattern after neuraminidase treatment. The molecular weight of the protein decreased from 28 kDa to 25 kDa, whereas its isoelectric point shifted from 3.9–4.6 to 4.8–5.0. Furthermore, removal of sialic acid from BSP-30-kDa protein diminished the number of isoforms identified after autoradiography (Fig. 5C). This is expected for glycoproteins in which sialic acid represents a major fraction of the carbohydrate moiety. In contrast, treatment of BSP proteins with acid phosphatase or arylsulfatase did not modify their mobility (data not shown), giving a

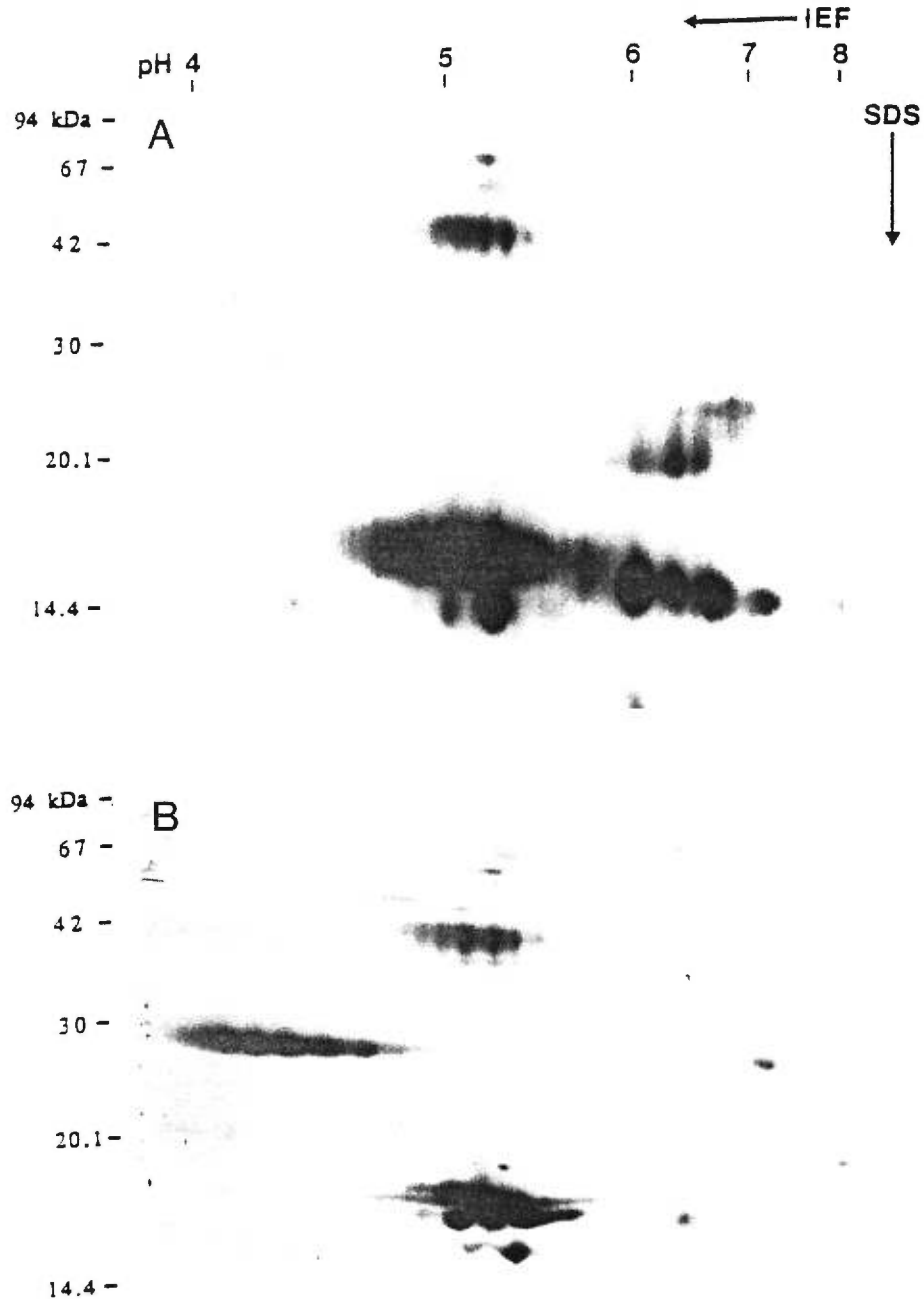


Fig. 2. CBSP separated by 2D-PAGE. Bovine seminal plasma proteins were reduced, denatured, and applied to the first dimension. After the focusing, gel rods were equilibrated in SDS sample buffer and applied to 15% polyacrylamide gel slabs. Following electrophoresis in the second dimension, the slab gels were either dried and visual-

ized by autoradiography for iodinated samples (A) or fixed and stained with silver nitrate (B). The mobility and molecular weight (kilodaltons) of standard proteins are indicated on the left. The pH markers indicated at the top of the gel are approximate.

2D-PAGE pattern identical to that of untreated proteins (Fig. 3).

Glycoprotein Staining

Bovine seminal plasma proteins were separated by 2D-PAGE and the gel was stained for glycoproteins

with dansyl hydrazine after periodic acid oxidation (Fig. 6). The glycoproteins were localized in three groups. The first group migrated at a molecular weight of 15–17 kDa, with a pI of 4.8–5.2 and corresponded to BSP-A1 and -A2. The second group migrated at 28 kDa, at a pI of 3.9–4.6 and corresponded to BSP-30-kDa. A

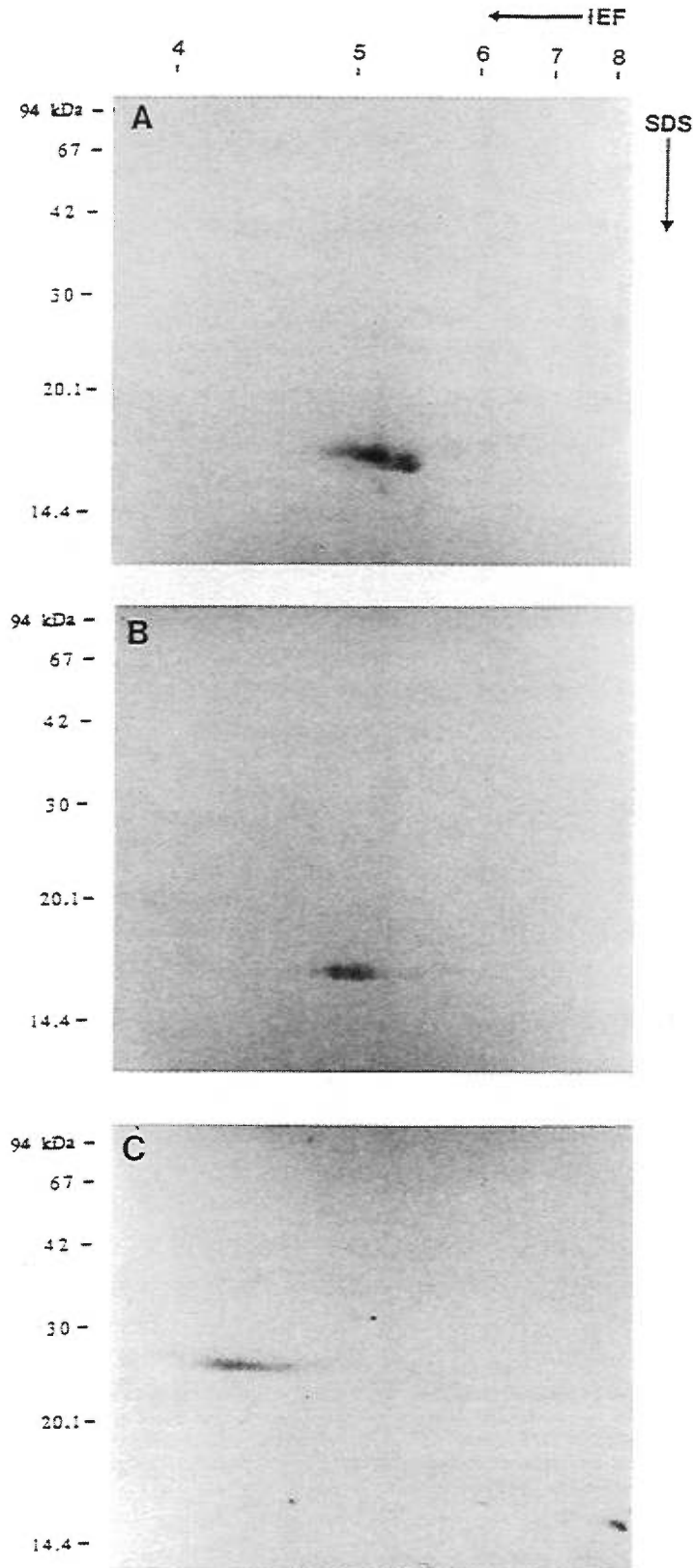


Fig. 3. Immunoblotting of CBSP analysed by 2D-PAGE. Proteins (100 μ g) were reduced, denatured, and separated by 2D-PAGE. Gels were electrotransferred to nitrocellulose, and submitted to immunodetection using purified antibodies directed against (A) BSP-A1/A2, (B)

BSP-A3, or (C) BSP-30-kDa. Immunoreactivity was visualized by autoradiography after incubation with a radiolabeled second antibody. Molecular weight markers ($M_r \times 10^{-3}$) are indicated at the left and pH markers indicated on top of the gel are approximate.

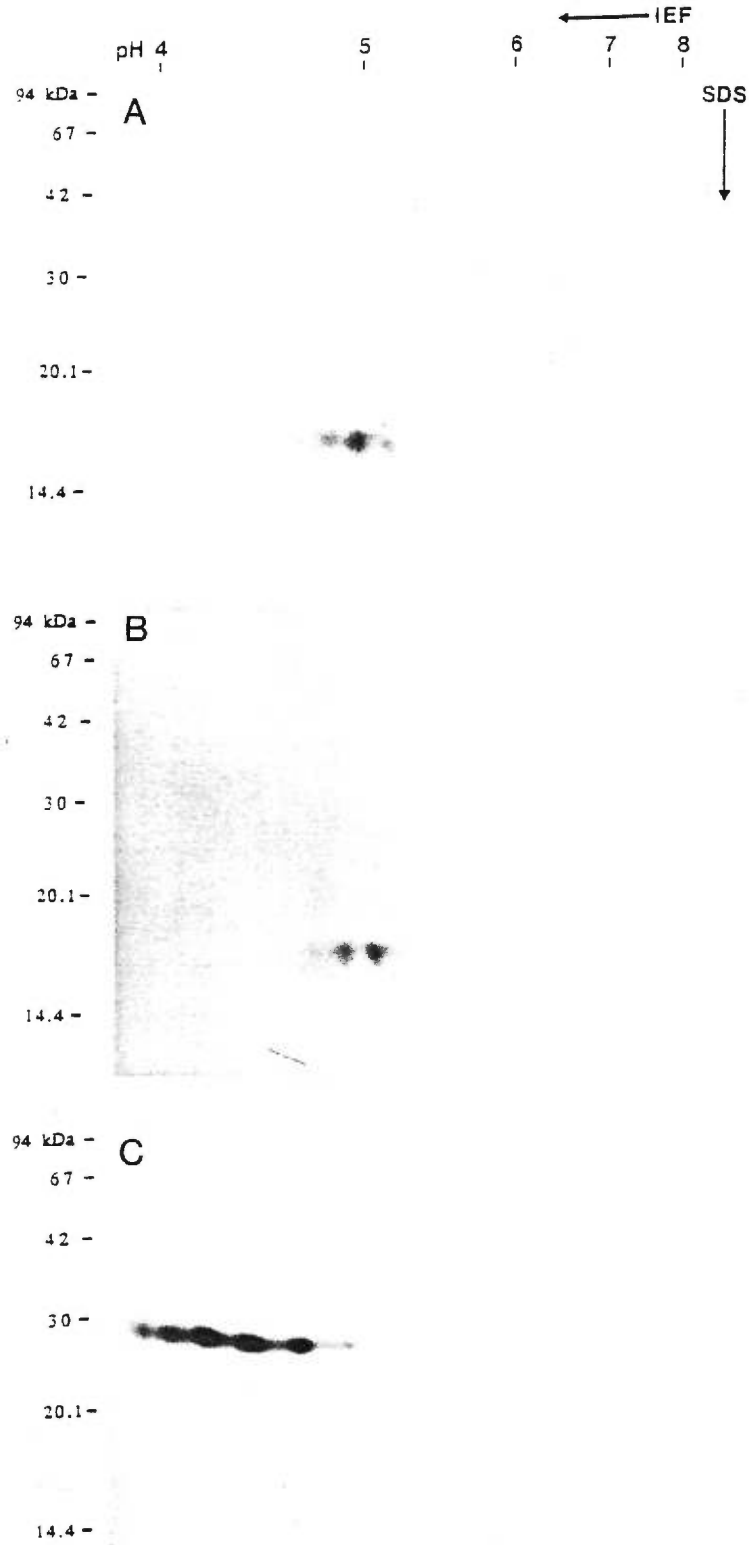


Fig. 4. Iodinated purified BSP proteins separated by 2D-PAGE. Purified BSP proteins (10^6 cpm; 4 ng) iodinated using Chloramine T were separated by 2D-PAGE. The gels were dried and the proteins were localized by autoradiography. **A:** BSP-A1/-A2, **B:** BSP-A3, **C:** BSP-30-kDa.

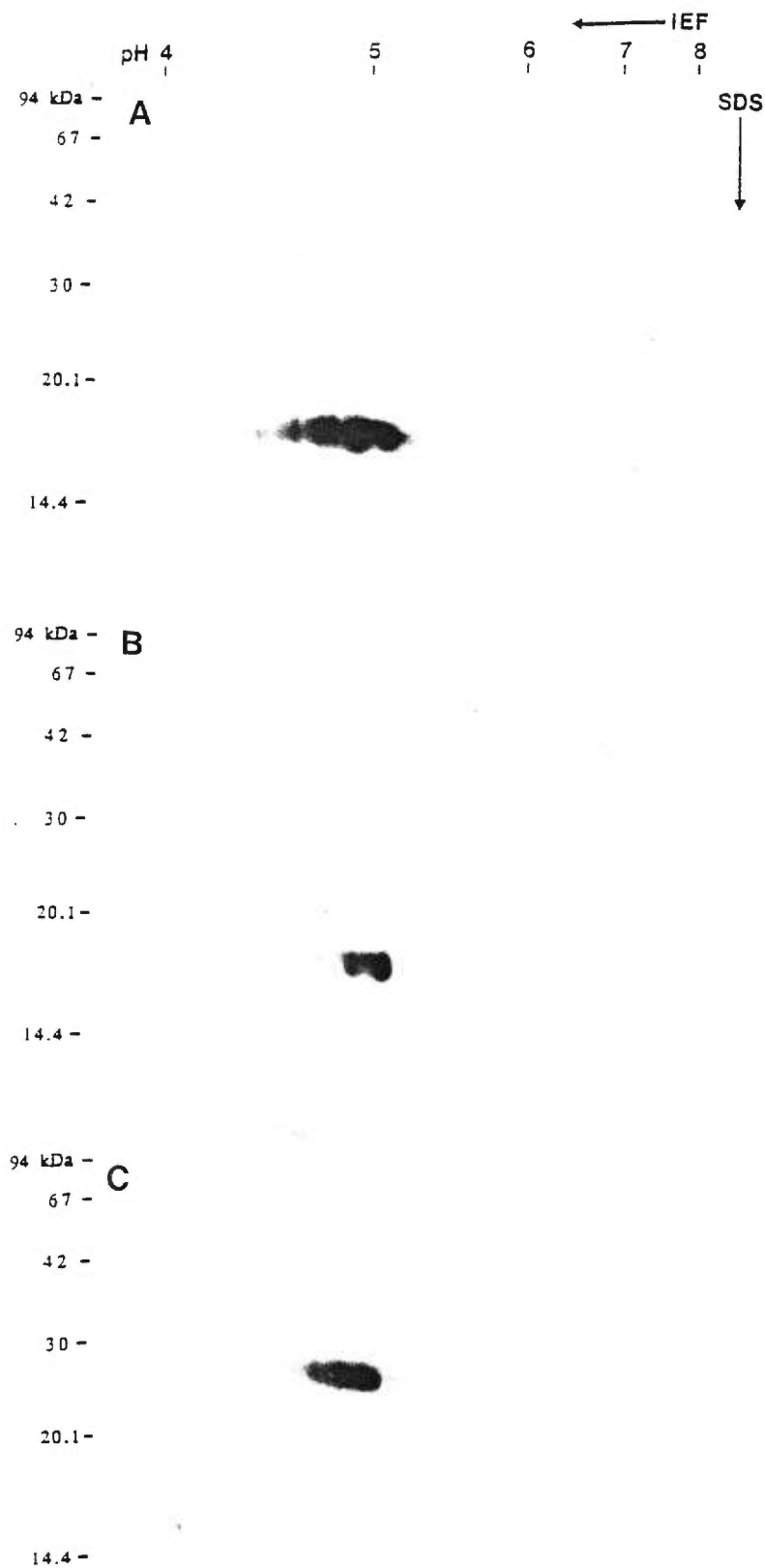


Fig. 5. 2D-PAGE of purified ^{125}I -BSP treated with neuraminidase. Iodinated purified BSP proteins (10^5 cpm; 4 ng) were denatured and incubated 20 hr at 37°C with 0.025 U of neuraminidase. At the end of the reaction, samples were reduced, denatured and analysed by 2D-PAGE. The gels were dried and proteins were visualized by autoradiography. A: BSP-A1/-A2; B: BSP-A3; C: BSP-30-kDa.

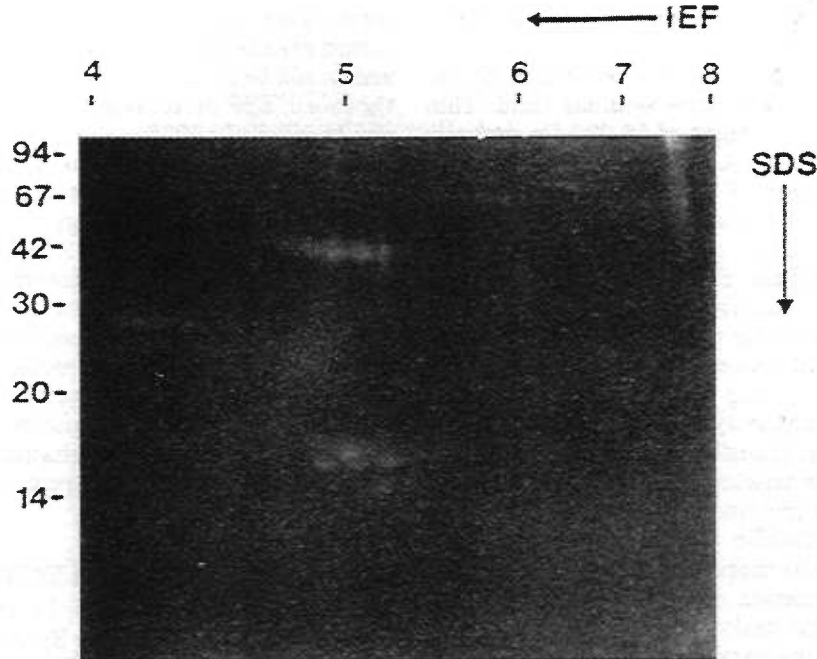


Fig. 6. 2D-PAGE of CBSP stained for glycoproteins. CBSP (200 μ g) were reduced, denatured, and separated by 2D-PAGE. The gel was fixed and stained for carbohydrates with dansyl hydrazine after periodic acid oxidation. Glycoproteins were visualized with a longwave uv transilluminator.

st group of isoforms was located at 42 kDa and at a pI 4.7–5.2.

DISCUSSION

Analysis of bovine seminal plasma proteins by SDS-PAGE indicated the presence of two major groups of proteins with molecular weights of 28 kDa and 6–16 kDa (Fig. 1A, lane 1). Using specific antibodies we showed that these major proteins are respectively BSP-1-kDa and, BSP-A1, -A2, -A3 and their respective fragments (Fig. 1B). Moreover, these groups of major proteins showed the same electrophoretic mobility as purified BSP proteins (Fig. 1A, lanes 2–4). High resolution 2D-PAGE was used to determine the isoelectric point and analyze the molecular heterogeneity of these proteins.

When CBSP proteins were analyzed by 2D-PAGE, a number of proteins could be resolved. The most abundant proteins found in seminal plasma are represented by a doublet of 16,000–16,500 Da migrating between pI 4.8 and 5.2. These proteins have been identified as BSP-A1/A2 by immunoblotting (Fig. 3A) and by the comparison of their 2D-PAGE mobility with purified iodinated proteins (Fig. 4A). BSP-A1 has a higher molecular weight (16,500 Da) and is more acidic (pI 4.8–5) compared to BSP-A2 (16,000 Da and pI 4.9–5.2). BSP-A1 and BSP-A2 have an identical amino acid sequence, their difference resides only in their carbohydrate content (Manjunath and Sairam, 1987). Since BSP-A1 contains 1.6–2.5 g sialic acid/100 g protein

compared to 0.6–1.0 g/100 g for BSP-A2, it is expected that the first one is more acidic (Manjunath et al., 1988). A lower molecular weight peptide of 12 kDa was also detected at pH 4.9. This may correspond to a fragment of BSP-A1 or BSP-A2 generated by proteolytic degradation that did not alter the net charge of the resulting peptide. However, treatment of the purified proteins with neuraminidase (Fig. 5A) did not alter the molecular weight, the isoelectric point, nor the number of isoforms of these proteins. It is possible that sialic acid residues are not accessible to the enzyme for the cleavage. Since sulfate and phosphate could also contribute to the net negative charge and the heterogeneity of these proteins, we treated iodinated purified proteins with arylsulfatase or acid phosphatase. No modification of the mobility was observed after any of these treatments.

Immunolocalized (Fig. 3B) or purified (Fig. 4B) BSP-A3 migrated at a similar pH range as BSP-A1/A2 (pH 4.8–5.2) but at slightly lower molecular weight (15 kDa). This location also corresponds to the mobility of the major group of proteins of bovine seminal proteins. BSP-A3 is not glycosylated, its acidity and its charge heterogeneity cannot be attributed to the presence of sialic acid. Moreover, treatment of purified BSP-A3 with neuraminidase did not modify its 2D-PAGE pattern (Fig. 4B). Although sulfatase and phosphatase treatments did not alter the mobility of BSP-A3 (results not shown), we cannot rule out the presence of sulfate or phosphate on this protein, since the enzymes used

may not have access to these residues under the conditions we used.

In contrast, BSP-30-kDa has been identified as the most acidic protein of the bovine seminal fluid. This protein has a molecular weight of 28,000 Da and migrated between pH 3.9 and 4.6 (Figs. 3C, 4C). It is the most glycosylated protein of the BSP family and contains high amounts of sialic acid (4.6–5.5 g sialic acid/100 g protein; Manjunath et al., 1988). The removal of these sialic acid residues using neuraminidase decreased its molecular weight from 28 kDa to 25 kDa and increased its isoelectric point from pH 3.9–4.6 to 4.8–5.0. This treatment also reduced the heterogeneity of the protein by decreasing the number of isoforms. Furthermore, the acid hydrolysis of the sialic acid residues generated similar transformations of the BSP-30-kDa pattern, but this treatment also resulted in the partial degradation of proteins (results not shown). The location of the BSP-30-kDa treated with neuraminidase corresponded to the mobility of a faint spot visualized after immunodetection of this protein in CBSP. This could indicate that desialated BSP-30-kDa is naturally present in bovine seminal plasma. In contrast, sulfatase and phosphatase treatments of BSP-30-kDa did not modify its 2D-PAGE pattern. Comparison of the 2D-PAGE pattern of the different BSP proteins suggested that BSP-30-kDa is not a dimer of -A1/-A2 or -A3 or a heterodimer of -A1 (or -A2) and -A3. BSP-A1, -A2, and -A3 migrated at a similar pH range, whereas BSP-30-kDa displayed a much more acidic pI. It is, therefore, unlikely that the dimerisation would generate a molecule more acidic than its constituents. However, it cannot answer the question whether BSP-30-kDa is a large precursor for BSP-A1/-A2 or -A3. Finally, CBSP proteins resolved in 2D-PAGE were stained for glycoprotein with dansyl hydrazine. Three groups of glycoproteins were identified. Two of them being BSP-A1/-A2 and BSP-30-kDa with their different isoforms.

Recently, we demonstrated that BSP proteins bind to the choline phospholipids of the sperm plasma membrane upon ejaculation (Desnoyers and Manjunath, 1992). We have postulated that BSP proteins would serve as docking proteins for high density lipoproteins (HDL) present in the female genital tract (Manjunath et al., 1989). They would mediate the exchange of cholesterol and phospholipids between the sperm membrane and HDL. It is then suggested that BSP proteins would stabilize the sperm membrane (decapacitate) and prevent a premature acrosomal reaction. In a latter step, they would participate in the membrane modification necessary for the acrosome reaction to proceed (Desnoyers and Manjunath, 1992). The present results demonstrate that BSP proteins are the most acidic components of bovine seminal plasma. These proteins could correspond to the acidic components that are added to the surface of the spermatozoa upon ejaculation and removed during the capacitation process (Oliphant, 1976; Aonuma et al., 1973; Oliphant and Brackett, 1973; Farooqui, 1983). Their removal would cause a decrease in the net negative surface charge of sperma-

tozoa. This would correlate with the previously reported results (Rosado et al., 1973; Vaidya et al., 1971) and would be in agreement with the proposed model for the role of BSP proteins during capacitation (Desnoyers and Manjunath, 1992).

In summary, BSP proteins, the major proteins of the bovine seminal plasma, are acidic and display charge heterogeneity. BSP-A1 migrated in the pH range of 4.6–5.0; BSP-A2, pH 4.9–5.2; BSP-A3, pH 4.8–5.2 and BSP-30-kDa, 3.9–4.6. The treatment of these proteins with neuraminidase did not change the mobility of BSP-A1, -A2 or -A3 but increased the pI of BSP-30-kDa to 4.8–5.0 and decreased its molecular weight by 3 kDa. The treatment of BSP proteins with arylsulfatase or acid phosphatase did not modify their 2D-PAGE pattern. Furthermore, we demonstrated that BSP proteins are among the major glycoproteins of bovine seminal plasma.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Medical Research Council of Canada and the Special Programme of Research, Development, and Research Training in Human Reproduction, World Health Organization. P.M. is a recipient of a Senior Scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- Aonuma S, Mayumi T, Suxuki K, Noguchi T, Iwai M, Okabe M (1973): Studies on sperm capacitation. *J Reprod Fert* 35:425–433.
- Baker ME (1985): The PDC-109 protein from bovine seminal plasma is similar to the gelatin-binding domain of bovine fibronectin and as kringle domain of human tissue-type plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Comm* 130:1010–1014.
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Bürk RR, Eschenbruch M, Leuthard P, Steck G (1983): Sensitive detection of proteins and peptides in polyacrylamide gels after formaldehyde fixation. *Meth Enzymol* 91:247–254.
- Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P (1990): Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 26:313–318.
- Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant G, Seltzer JL, Kronberger A, He C, Bauer EA, Goldberg GI (1988): H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 263:6579–6587.
- Desnoyers L, Manjunath P (1992): Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 267:10149–10155.
- Desnoyers L, Manjunath P (1993): Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices. *Arch Biochem Biophys* 305:341–349.
- Eckhardt AE, Hayes CE, Goldstein IJ (1976): A sensitive fluorescent method for the detection of glycoproteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 73:192–197.
- Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Ying SY, Guillemin R (1983): Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 113:861–867.
- Farooqui AA (1983): Biochemistry of sperm capacitation. *Int J Biochem* 15:463–468.
- Hortin G, Sims H, Strauss AW (1986): Identification of the site of sulfation of the fourth component of human complement. *J Biol Chem* 261:1786–1793.
- Kemme M, Scheit KH (1988): Cloning and sequence analysis of a

- cDNA clone from seminal vesicle tissue encoding the precursor of the major protein of bull semen. *DNA* 7:595-599.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Leblond E, Desnoyers L, Manjunath P (1993): Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 34:443-449.
- Lobel P, Dahms NM, Kornfeld S (1988): Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 263:2563-2570.
- Manjunath P (1984): Gonadotropin release and stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. In MR Sairam, LE Atkinson (eds): "Gonadal proteins and peptides and their biological significance," Singapore: World Scientific Publishing Company, pp 49-61.
- Manjunath P, Sairam MR (1982): Biochemical, biological and immunological properties of chemically deglycosylated human choriongonadotropin. *J Biol Chem* 257:7109-7115.
- Manjunath P, Sairam MR (1987): Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 241:685-692.
- Manjunath P, Sairam MR, Uma J (1987): Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci Rep* 7:231-238.
- Manjunath P, Chandonnet L, Baillargeon L, Roberts KD (1993): Calmodulin-binding proteins in bovine semen. *J Reprod Fert* 97:75-81.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L (1994): The major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 50:27-37.
- Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A (1988): Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: KW McKerns, M Chrétien (eds): "Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems." New York: Plenum Press, pp 259-273.
- Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A (1989): Apolipoprotein A-1 binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 264:16853-16857.
- McMullen BA, Fujikawa K (1985): Amino acid sequence of the heavy chain of human α -factor XIIa (activated Hageman factor). *J Biol Chem* 260:5328-5341.
- Morgan DO, Edman JC, Standring DN, Fried VA, Smith MC, Roth RA, Rutter W J (1987): Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329:301-307.
- O'Farrel PH (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-4021.
- Oliphant G (1976): Removal of sperm bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of the acrosomal reaction. *Fertil Steril* 27:28-38.
- Oliphant G, Brackett BG (1973): Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol Reprod* 9:404-414.
- Oshima A, Nolan CM, Kyle JW, Grubb JH, Sly WS (1988): The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 263:2553-2562.
- Parker CW (1990): Radiolabeling of proteins. In: Deutscher MP (ed): "Guide to Protein Purification." San Diego: Academic Press, pp 721-737.
- Rosado A, Velazquez A, Lara-Ricalde R (1973): Cell polarography. II: Effect of neuraminidase and follicular fluid upon the surface characteristics of human spermatozoa. *Fert Steril* 24:349-354.
- Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, Chrétien M (1987): Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. *Biochem J* 243:195-203.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.
- Vaidya RA, Glass RW, Dandekar P, Johnson K (1971): Decrease in electrophoretic mobility of rabbit spermatozoa following intra-uterine incubation. *J Reprod Fert* 24:299-301.
- Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI (1989): SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophage. *J Biol Chem* 264:17213-17221.

- 2.2. PHOSPHATIDYLCHOLINE-BINDING PROTEINS OF BOVINE SEMINAL PLASMA MODULATE CAPACITATION OF SPERMATOZOA BY HEPARIN. I. Thérien, G. Bleau, and P. Manjunath, *Biology of Reproduction*, **52**, 1372-1379, 1995.

Préambule:

Des études précédentes ont démontré que les protéines BSP interagissaient avec plusieurs molécules notamment avec l'héparine, une glycosaminoglycane. Chez les bovins, l'héparine ainsi que d'autres GAGs présents dans le tractus génital femelle semblent jouer un rôle important dans le processus de capacitation. En effet, les spermatozoïdes éjaculés, incubés 4 heures en présence d'héparine, subissent la réaction de l'acrosome immédiatement suite à l'addition de zones pellucides solubilisées ou de lyso-PC (inducteur de la réaction de l'acrosome chez les spermatozoïdes capités). Ce phénomène n'est pas retrouvé lorsqu'on utilise des spermatozoïdes épидидymaires. Par contre, lorsque ces derniers sont incubés en présence du plasma séminal bovin avant l'incubation avec l'héparine, ils acquièrent leur habilité à répondre à la zone pellucide et à subir la réaction de l'acrosome. Puisque les protéines BSP lient l'héparine et constituent la fraction majeure du plasma séminal bovin, nous nous sommes intéressés à démontrer la participation des protéines BSP lors du processus de capacitation des spermatozoïdes induit par l'héparine. Dans cet article, nous démontrons que les spermatozoïdes épидидymaires subissent la réaction de l'acrosome suite à l'ajout de lyso-PC seulement lorsqu'ils sont préalablement incubés en présence des protéines BSP avant l'incubation avec l'héparine. Cet effet est dépendant de la concentration des protéines BSP. De plus, la présence d'héparine et de lyso-PC est absolument nécessaire afin que les protéines BSP stimulent la réaction de l'acrosome. Nous montrons également que lorsque les protéines du fluide séminal bovin dépourvu des protéines BSP sont utilisées, on ne retrouve aucune activité significative. Ces résultats indiquent que les protéines BSP sont des facteurs de régulation de la capacitation des spermatozoïdes.

Phosphatidylcholine-Binding Proteins of Bovine Seminal Plasma Modulate Capacitation of Spermatozoa by Heparin¹

I. THÉRIEN,⁵ G. BLEAU,^{4,5} and P. MANJUNATH^{2,3,5}

Departments of Medicine³ and Obstetrics and Gynecology,⁴ University of Montreal and Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center,⁵ Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

ABSTRACT

Bovine seminal plasma (BSP) contains four similar acidic proteins, previously designated as BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa. These proteins are secreted by the seminal vesicles and coat the surface of the spermatozoa after ejaculation. The binding site of BSP proteins on the sperm surface has been identified as choline phospholipids on the plasma membrane. This study was undertaken to determine whether BSP proteins modulate capacitation of bovine spermatozoa induced by heparin. Bovine epididymal spermatozoa were washed and incubated in buffer containing BSP proteins and then washed and incubated with heparin. The percentage of capacitated spermatozoa was determined under the microscope after the acrosome reaction has been initiated with the addition of lysophosphatidylcholine. The results demonstrated that epididymal sperm undergo the acrosome reaction only in the presence of BSP proteins. This effect was concentration-dependent and reached a maximum level of a 3–5-fold increase at 20–40 µg/ml BSP protein concentrations. In contrast, ribonuclease (purified from bovine seminal fluid) or seminal fluid proteins depleted of BSP proteins (by sequential absorption of BSP proteins on gelatin-Agarose and DEAE-Sephadex columns) showed no significant potentiating activity. The purified BSP proteins were more active than crude alcohol precipitates of bovine seminal plasma. These results indicate that BSP proteins are regulatory factors of capacitation.

INTRODUCTION

Several studies suggest that seminal plasma, which consists of a complex mixture of secretions originating from the testis, the epididymis, and accessory glands, contains factors that may influence the fertilizing ability of sperm. In bovine seminal fluid, the major proteins consist of a family of closely related acidic proteins named BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa (collectively called BSP proteins). These proteins are the secretory products of the seminal vesicles and constitute the major protein fraction of bovine seminal plasma (20–40 mg/ml) [1–4]. Biochemical properties and structure of these proteins have been studied in detail [4, 5]. BSP-A1, -A2, and -A3 have molecular masses of 15 000–16 500 daltons, with isoelectric points (pI) in the range of 4.7–5.2, whereas BSP-30-kDa has a molecular mass of 28 000–30 000 daltons and a pI of 3.9–4.6. All proteins of this family are glycoproteins with the exception of BSP-A3. BSP-A1 contains neutral sugars, galactosamine, and sialic acid, whereas BSP-A2 contains galactosamine and sialic acid in less quantity than does BSP-A1 but does not contain neutral sugar [4]. BSP-30-kDa contains neutral sugars, galactosamine, and sialic acid and is the most glycosylated member of this family. BSP-A1 and BSP-A2 have an identical amino acid sequence, with their difference residing in the degree of glycosylation; they are thus considered a single chemical

entity named BSP-A1/-A2 (previously called gonadostatins or PDC-109) [6]. Cloning of these two proteins [7] and part of the tertiary structure [8, 9] have been reported. BSP-A3 and BSP-30-kDa proteins each has an amino acid composition different from that of BSP-A1/-A2. BSP-A1/-A2 and BSP-A3 proteins contain two homologous domains [6, 10] that are similar to type II structures present in the gelatin-binding domain of fibronectin [11], human plasma factor XII [12], insulin-like growth factor II (IGF-II) or cation-independent mannose-6-phosphate receptor [13–15], and 72-kDa and 92-kDa type IV collagenase [16, 17]. The BSP proteins interact with different types of collagens (types I, II, IV, V), fibrinogen, apolipoprotein A-1 (ApoA-1), ApoA-1 associated with high-density lipoproteins (HDL) [4, 18], and calmodulin [19]. Interestingly, the BSP proteins also bind to heparin, a glycosaminoglycan [20]. In the bovine species, heparin and other glycosaminoglycans (GAGs) present in the female reproductive tract appear to participate in the process of capacitation [21–27]. The BSP proteins also bind to the surface of spermatozoa upon ejaculation [4, 28]. The binding sites of BSP proteins on the sperm membrane have been identified as choline phospholipids [29]. Furthermore, BSP-A1/-A2 proteins have two binding sites for the choline head group, and this binding depends on hydrophobic interaction [30]. Because of their phospholipid binding properties, BSP proteins appear to participate in sperm lipid metabolism and may play an important role in the phenomenon of capacitation [18, 20, 29].

In mammals, sperm cells emerging from the male reproductive tract must undergo a capacitation process during transit through the female genital tract, in order to be capable of fertilizing the ovum. The molecular events involved in sperm capacitation are not well understood, but

Accepted February 1, 1995.

Received September 19, 1994.

¹This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Special Programme of Research, Development, and Research Training in Human Reproduction, World Health Organization.

²Correspondence: P. Manjunath, Ph.D., Centre de Recherche, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boul. de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada H1T 2M4. FAX: (514)-252-3569.

it is believed to be a multistep process. Ultrastructural and biochemical studies have indicated that sperm undergoing capacitation exhibit loss of adsorbed components originating from the seminal plasma, modification of lipid composition, increased permeability to Ca^{2+} , redistribution of surface components, and changes in intramembranous particle distribution (for reviews, see Go and Wolf [31]; Meizel [32]; Oliphant et al. [33]; Langlais and Roberts [34]; Yanagimachi [35]). These structural changes allow the spermatozoa to engage in a second mechanism, the acrosome reaction (AR), which involves the fusion of the plasma membrane and outer acrosomal membrane. In most species (including cattle), acrosome-intact sperm bind to the zona pellucida using a specific set of gamete receptors. The zona induces the AR, which allows the release of hydrolytic enzymes and the penetration of sperm through the zona pellucida. The AR also exposes a second receptor on sperm that binds to the ovum plasma membrane. This interaction eventually results in gamete fusion.

Previous studies have shown that heparin or other GAGs could induce capacitation and AR of ejaculated bovine spermatozoa in 9 h but could not induce the same phenomenon in the same time with cauda epididymal bovine sperm, which required 22 h in the presence of GAGs to undergo AR [21–23, 36]. However, if epididymal bovine sperm are exposed to seminal plasma for 20 min before incubation with GAGs, the time necessary for GAG-induced AR to occur decreased from 22 to 9 h in vitro [37]. Also, ejaculated, but not epididymal, spermatozoa incubated 4 h with heparin acrosome-react immediately upon addition of soluble zona pellucida. Nevertheless, once the epididymal bovine sperm were incubated with bovine seminal plasma prior to heparin incubation, they recovered their ability to respond to solubilized zona pellucida and undergo AR [27, 38]. In view of the heparin-binding property of the BSP proteins, the major proteins of bovine seminal plasma, we proposed that they are involved in the capacitation of the bovine epididymal spermatozoa induced by heparin. In this study, we have demonstrated that the BSP proteins potentiate sperm capacitation.

MATERIALS AND METHODS

Materials

BSA (fraction V fatty acid-free), taurine, L-epinephrine, erythrosin B, flavianic acid (naphthol), heparin (purified from porcine intestinal mucosa), and lysophosphatidylcholine (lyso-PC; purified from egg yolk) were from Sigma (St. Louis, MO); penicillin G and streptomycin sulfate from Gibco (Burlington, ON); eosin B from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ); and nigrosine from Kodak (Rochester, NY). All other chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

Bovine testes and epididymides were obtained from Abattoir Les Cèdres (St-Lazare, PQ). BSP-A1, -A2, -A3, and

-30-kDa proteins of bovine seminal plasma were isolated by use of gelatin-agarose affinity chromatography [3]. The adsorbed fractions were eluted and resolved on G-75 under conditions described by Manjunath and Sairam [2]. Crude seminal plasma proteins (cBSP) were prepared by ethanol precipitation of bovine seminal plasma followed by dialysis of the precipitates against 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilization. This preparation consists of 60–70% BSP proteins. The proteins of bovine seminal plasma depleted of BSP proteins correspond to the proteins unadsorbed after consecutive passages on gelatin-agarose [3] and DEAE-Sephadex [30]. The ribonuclease (RNase) was purified from bovine seminal plasma.

Culture Medium

Sperm were cultured in a modified Tyrode's medium, designated mTALP, containing 100 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 0.3 mM NaH_2PO_4 , 35.7 mM NaHCO_3 , 0.1 mM Na pyruvate, 17.4 mM Na lactate, 0.5 mM taurine, 0.05 mM L-epinephrine, 63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin G (1585 U/mg), 0.1 mM streptomycin sulfate, and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phenol red dye. The medium was sterilized by Millipore (Bedford, MA) filtration (0.2 μm pore) and frozen at -20°C . Before use, 6 mg/ml BSA was added, and the pH was adjusted to 7.4. It is important to note that glucose was not present in mTALP, because it has been shown that this sugar is an inhibitor of bovine sperm capacitation [39].

Sperm Capacitation and AR

Cauda epididymal sperm were collected by retroperfusion from four different bulls, pooled, washed twice ($300 \times g$, 10 min) with 10 vol of mTALP, and adjusted to a concentration of $1 \times 10^8/\text{ml}$. Then, 250 μl of sperm suspension were preincubated for 20 min with 100 μl of different concentrations of BSP proteins or controls (proteins unadsorbed after consecutive passages on gelatin-agarose and on DEAE-Sephadex, and bovine seminal ribonuclease, RNase) and 150 μl of culture medium at 37°C in an environment of 5% CO_2 in air. After preincubation, the cells were washed twice ($300 \times g$, 10 min), resuspended in 500 μl of mTALP containing 0 or 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of heparin, and incubated 5 h in $11 \times 75\text{-mm}$ culture tubes at 37°C [27]. At the end of incubation, lyso-PC was added at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and the sperm were incubated for an additional 15 min. This concentration of lyso-PC was previously shown to induce AR in capacitated sperm while having no effect on noncapacitated sperm [40]. Prior to drying and staining, randomly selected slides were examined by light microscopy to verify that sperm were motile. The percentage of sperm that were acrosome-reacted was determined on air-dried sperm smears with a naphthol yellow-erythrosin B staining procedure.

Staining Procedure

The naphthol yellow S-erythrosin B staining procedure has been described previously by Lenz et al. [23]. The slides

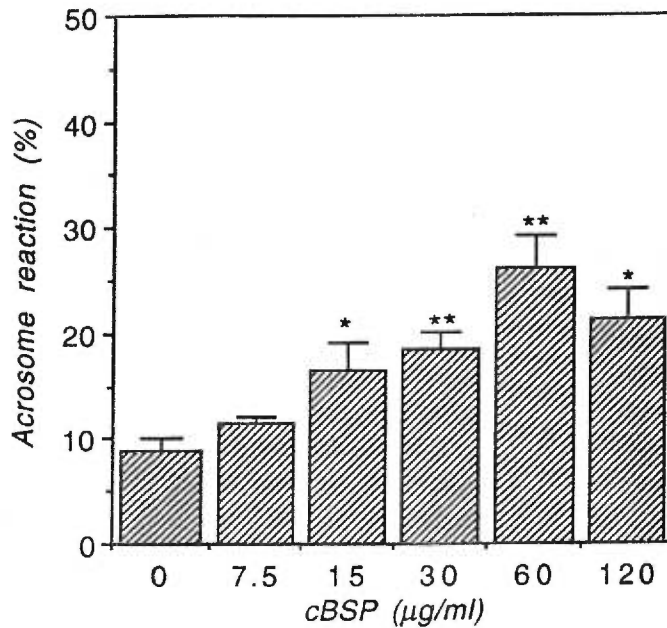


FIG. 1. Effect of cBSP proteins on AR of epididymal sperm incubated with heparin. Cauda epididymal sperm were collected from four bulls, pooled, washed twice, and preincubated 20 min with different concentrations of cBSP proteins (see *Materials and Methods*). Then cells were washed and resuspended in 500 μ l of mTALP with 12 μ g/ml of heparin. After a 5-h incubation, lyso-PC (100 μ g/ml) was added and sperm were incubated an additional 15 min. Percentage of sperm that were acrosome-reacted was determined on air-dried sperm smears with naphthol yellow-erythrosin B staining procedure. Results represent mean \pm SD of three independent experiments that included two samples/experiment and 200 sperm assayed/sample. Significant differences vs. control (without protein): * p < 0.05; ** p < 0.01.

were placed in 0.1% naphthol yellow S in 1% aqueous acetic acid for 30 min and rinsed in 1% aqueous acetic acid for 10 sec. Then the slides were drained and placed in equal parts of 0.2% aqueous naphthol yellow S and 0.2% aqueous erythrosin B, pH 4.8, for 13 min, rinsed in distilled water, and air-dried.

Sperm Viability

In some experiments, sperm viability was estimated by the viability staining protocol of Dott and Foster [41]. An aliquot of each sperm suspension (50 μ l) was mixed with 200 μ l of eosin B 5%, and 150 μ l of a saturated solution of nigrosin was added. The stained sperm were spread on glass slides and dried, and 200 viable (white) and nonviable (red) spermatozoa were counted under light microscopy.

Electrophoresis

SDS-PAGE was performed according to Laemmli [42] with use of a Bio-Rad (Richmond, CA) Protein II mini-gel electrophoresis apparatus. The apparent molecular mass was determined by using the low-molecular weight calibration kit of Pharmacia (Dorval, PQ, Canada) containing phosphorylase b (M_r 94 000), BSA (M_r 67 000), ovalbumin (M_r

43 000), carbonic anhydrase (M_r 30 000), trypsin inhibitor (M_r 20 100), and α -lactalbumin (M_r 14 400).

Protein Assay

The protein content of the samples was measured according to the method of Bradford [43] or by weighing freeze-dried purified proteins on a Cahn microbalance (Model C-31; Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ).

Data Analysis

The data presented here were analyzed for significant differences by Student's *t*-test on paired observations.

RESULTS

It is known that the incubation of ejaculated sperm in the presence of heparin for 4–5 h results in the appearance of sperm that have undergone AR upon addition of soluble zona pellucida; nevertheless, heparin could not induce the same phenomenon with bovine epididymal sperm [38]. These results suggest that epididymal sperm are modified by accessory gland secretions. In the first experiment, therefore, we tested the effect of bovine seminal plasma on the ability of heparin to allow epididymal sperm to be capacitated and undergo AR in response to lyso-PC. Lyso-PC induces AR in capacitated sperm while having no effect on noncapacitated sperm [40]. Thus, capacitation is measured as the ability of sperm to undergo an AR when an inducer of the AR (lyso-PC) is added. Dialyzed and lyophilized cBSP prepared by ethanol precipitation of bovine seminal fluid were incubated 20 min with cauda epididymal sperm pooled from four bulls. Then, epididymal sperm were incubated with heparin for 5 h, and lyso-PC was added to induce the AR. Figure 1 shows that in the presence of cBSP proteins, the epididymal sperm had the ability to undergo acrosomal exocytosis induced by lyso-PC. This effect was concentration-dependent with a maximum 2.9-fold increase at 60 μ g/ml of cBSP proteins. When a higher concentration of cBSP was tested, such as 120 μ g/ml, a small decrease in the stimulation of the AR was observed compared to that obtained using 60 μ g/ml of cBSP proteins.

Since the major protein fraction of this preparation of cBSP consisted of the BSP proteins (60–70%) and since they bind to heparin, in the second experiment the purified BSP proteins were tested to determine whether they could give heparin the ability to induce capacitation of epididymal sperm that could then respond to lyso-PC and undergo AR. The BSP proteins used in this study were purified by gelatin-agarose affinity chromatography. Only BSP proteins and their proteolytic fragments (above 8 kDa) bind to this affinity matrix exclusively [3]. BSP proteins were further purified on Sephadex G-75 [2], and purified proteins were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions (Fig. 2). BSP-A1/-A2 (lane 2) appeared as a doublet located at 16–16.5 kDa; BSP-A3 gave one band at 15 kDa (lane 3), whereas BSP-30-kDa



FIG. 2. SDS-PAGE of purified BSP proteins. Purified BSP proteins (5 μg) were reduced, denatured, and separated on a 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue R-250 dye. Lane 1, Standard (low-molecular weight calibration kit, Pharmacia); lane 2, BSP-A1/-A2; lane 3, BSP-A3, lane 4, BSP-30-kDa.

(lane 4) migrated at 28 kDa. There were no other detectable bands in the low-molecular mass region that corresponds to caltrin (6 kDa). Epididymal sperm were then treated for 20 min with these highly purified BSP proteins, washed, and reincubated with heparin for 4 h, and the AR was induced by the addition of lyso-PC. All purified BSP proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa) allowed the epididymal sperm to undergo the AR (Fig. 3). This effect was dose-dependent, with a maximum range of 20–40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of BSP proteins. When the concentration of BSP-A1/-A2 was increased, it produced an increased incidence of the AR, with a maximum level at 20–40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSP-A1/-A2 proteins that was 3 times (22–24%) the stimulation rate of spontaneous (agonist-independent) exocytosis of 7.6% (Fig. 3A). Similarly, the BSP-A3 protein produced an increased occurrence of the AR, with a maximum level at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ protein concentration that was 3.8 times (29.0%) the spontaneous rate (Fig. 3B). When the concentration of BSP-30-kDa proteins was gradually increased, there was an increased frequency of the AR of the epididymal sperm to a maximum level at 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of protein concentration. In the presence of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of BSP-30-kDa protein, a 3.5-fold (28.7%) stimulation of the AR in epididymal sperm was observed (Fig. 3C). However, at 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of BSP-30-kDa, 5 times (43%) more sperm underwent an AR after incubation with heparin and lyso-PC compared to the control value. When epididymal sperm were not incubated with lyso-PC, after their incubation with BSP proteins and heparin, the number of sperm that underwent an AR was approximately 2–4% higher than for sperm that were not exposed to BSP

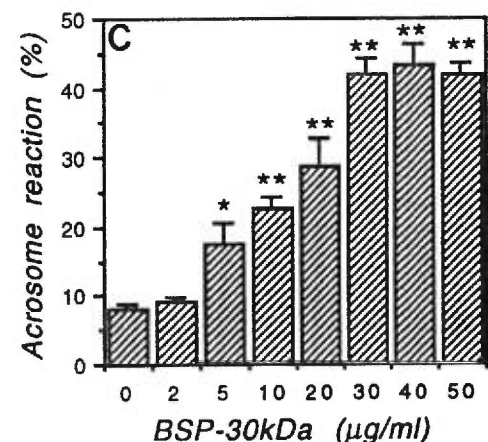
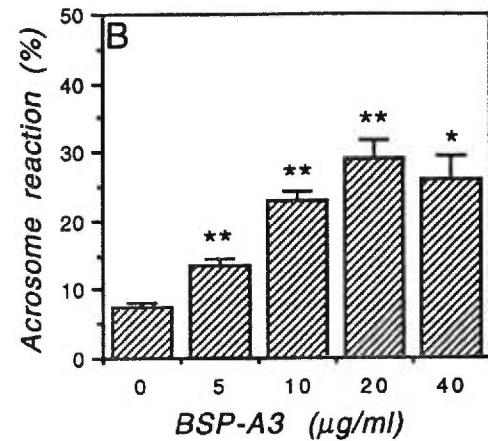
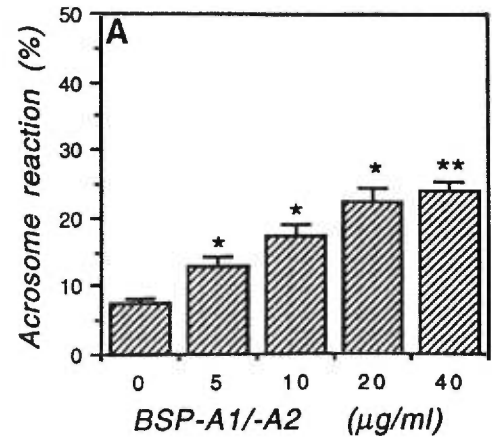


FIG. 3. Effect of BSP proteins on AR of epididymal sperm incubated with heparin. Protocol as in Figure 1 but using purified BSP proteins. A) BSP-A1/-A2 protein. B) BSP-A3 protein. C) BSP-30-kDa protein. Data represent mean \pm SD of three independent experiments with two samples/experiment and 200 sperm assayed/sample. Significant differences vs. control (without protein): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

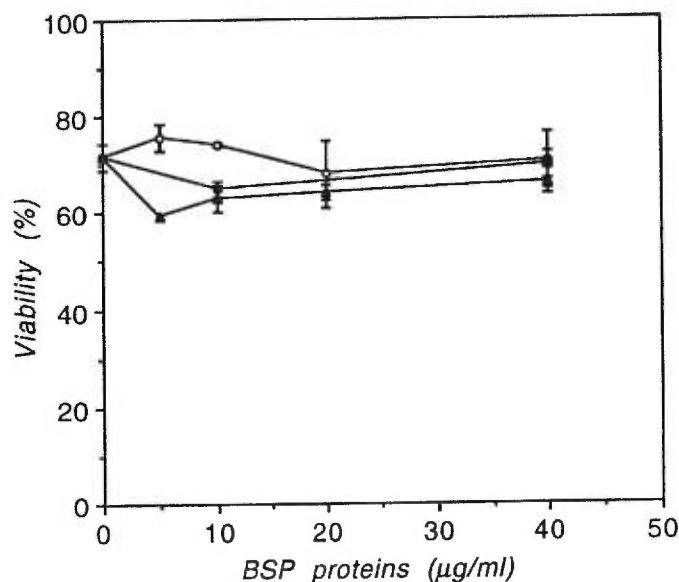


FIG. 4. Effect of BSP proteins on sperm viability. Protocol as in Figure 1 but using purified BSP proteins and assay for sperm viability. Percentage of viability was determined with an eosin B-nigrosine staining procedure. Each symbol represents means \pm SD from two independent experiments using different pools of epididymal sperm. Open circles, BSP-A1/-A2 proteins; solid circles, BSP-A3 protein; solid triangles, BSP-30-kDa protein.

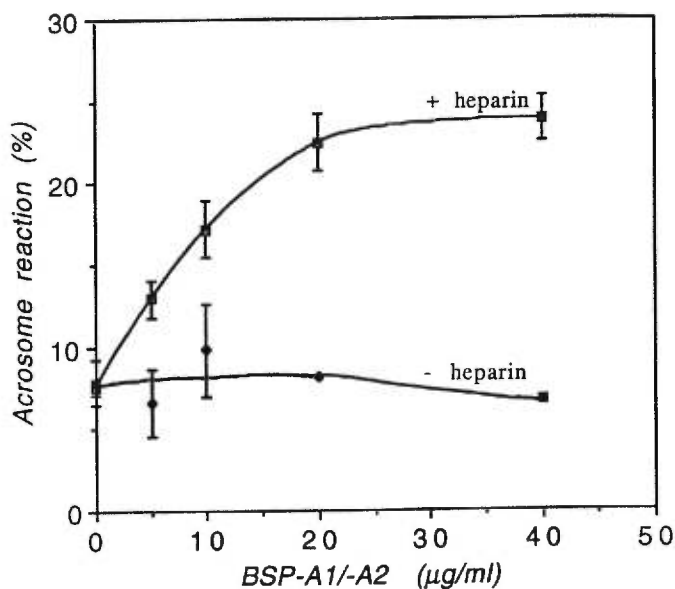


FIG. 5. Effect of BSP proteins on AR of epididymal sperm incubated with or without heparin. Protocol as in Figure 1 but using purified BSP-A1/-A2 protein in presence (12 μ g/ml) or absence of heparin. Results are sum of two independent experiments using different pools of epididymal sperm. AR assays represent means \pm SD, based on observations of two samples/experiment and 200 sperm scored/sample.

proteins. Thus, our results show that the BSP proteins are involved in capacitation of spermatozoa and that they do not stimulate the AR without the presence of lyso-PC. None of the treatments affected the viability of the epididymal sperm, which was between 60% and 75% (Fig. 4).

The presence of heparin was required for the BSP-A1/-A2 to display stimulatory activity. In fact, in the absence of added heparin in the medium, no significant increase in the AR was detected (Fig. 5). The same results were obtained with the two other BSP proteins, BSP-A3 and BSP-30-kDa (data not shown).

In the next experiment, the unadsorbed proteins after consecutive passages on gelatin-agarose and DEAE-Sephadex, which correspond to all proteins of bovine seminal plasma except BSP proteins, were tested as controls to determine the ability of treated sperm to undergo the heparin-induced capacitation. Figure 6 shows that this protein fraction could not stimulate epididymal spermatozoa to undergo an AR induced by lyso-PC. The same result was obtained when RNase (another control), purified from bovine seminal plasma, was tested for its ability to stimulate the AR of epididymal spermatozoa induced by lyso-PC after incubation with heparin (Fig. 7).

DISCUSSION

The phenomena of capacitation and AR of bovine spermatozoa have been studied extensively but are not yet fully understood. GAGs (such as heparin) from several sources have been shown to increase the incidence of the AR in

epididymal and ejaculated bovine spermatozoa [21–23, 37]. Parrish et al. [40] have provided evidence that heparin affects capacitation of ejaculated bovine sperm and found that this effect required at least a 4-h exposure of sperm to heparin when sperm were incubated with lyso-PC to induce the AR. Nevertheless, in another study heparin could not induce capacitation in bovine epididymal sperm during the same period (4 h) [38], but a 20-min exposure of epididymal sperm to seminal plasma and washing prior to incubation with heparin reduced the time required for the AR to 4 h [27, 38]. Bovine seminal plasma contains three families of heparin-binding proteins, produced by the accessory sex glands and having molecular masses of 14–18, 24, and 31 kDa, which bind epididymal sperm and facilitate the binding of heparin to spermatozoa [27, 37, 44]. We have reported the purification and characterization of a family of four closely related proteins from bovine seminal fluid [3, 4]. These proteins, designated as BSP-A1, -A2, -A3, and -30-kDa, bind to heparin [20]. Furthermore, we have shown that the seminal vesicles are the major source of these proteins [3, 4]. More recently, we showed that these proteins coat the sperm surface [28].

Our results indicate that BSP proteins potentiate bovine spermatozoa capacitation. Epididymal sperm incubated with cBSP, which corresponds to all proteins of bovine seminal plasma, for 20 min prior to incubation with heparin were able to respond to lyso-PC and undergo the AR with a maximum level at 60 μ g/ml of cBSP proteins that was 2.9 times the control value (Fig. 1).

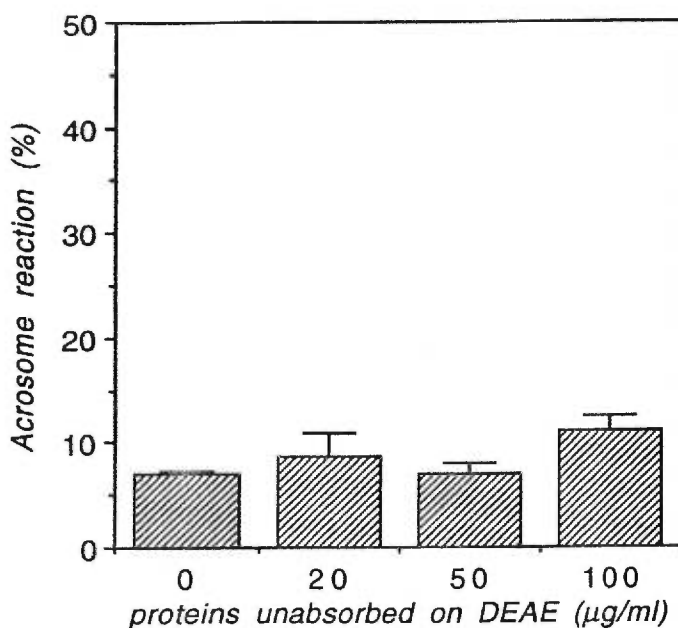


FIG. 6. Effect of total proteins of bovine seminal plasma depleted of BSP proteins on AR of epididymal sperm incubated with heparin. Protocol as in Figure 1 but using proteins of bovine seminal plasma depleted of BSP proteins. Results are sum of two independent experiments using different pools of epididymal sperm. AR assays represent means \pm SD, based on observations of two samples/experiment and 200 sperm scored/sample. No significant difference vs. control without protein was observed.

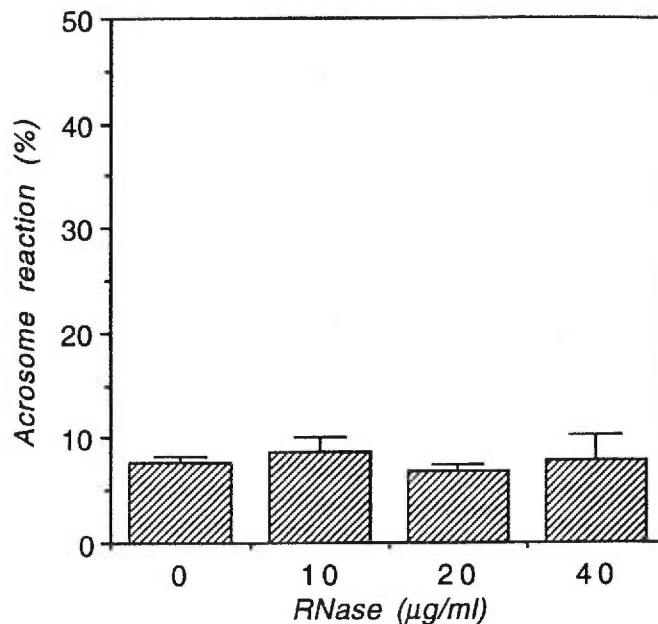


FIG. 7. Effect of RNase on AR of epididymal sperm incubated with heparin. Protocol as in Figure 6 but using bovine seminal RNase (see *Materials and Methods*). No significant difference vs. control without protein was observed.

When purified BSP proteins were tested to determine whether they could provide heparin with the ability to induce the capacitation in epididymal spermatozoa and stimulate the AR in the presence of lyso-PC, the result demonstrated that all purified BSP proteins shared this property in a dose-dependent manner (Fig. 3). The BSP-A1/-A2 and BSP-A3 proteins exert their maximum effect at 20 $\mu\text{g/ml}$, but more BSP-30-kDa (40 $\mu\text{g/ml}$) was needed to reach maximum activity. On a molar basis all BSP proteins seem to exhibit their maximum activity at the same concentration because the BSP-30-kDa protein has a molecular mass of 28–30 kDa, which is approximately twice that of BSP-A1/-A2 or -A3 proteins (15–16 kDa). When the same quantity of proteins (20 $\mu\text{g/ml}$) was used in the incubation of epididymal spermatozoa, the stimulation of the AR was similar for each BSP protein (BSP-A1/-A2, 3-fold; BSP-A3, 3.8-fold, and BSP-30-kDa 3.5-fold the control value). However, BSP-30-kDa can provoke a much higher stimulation (5-fold) than the other BSP proteins at 40 $\mu\text{g/ml}$. The purified BSP proteins were slightly more active than crude alcohol precipitates of bovine seminal plasma. However, the increase in specific activity upon purification was relatively low, since 60–70% of the total proteins in bovine seminal fluid is represented by BSP proteins. Furthermore, purified BSP proteins could not induce the same phenomenon when lyso-PC was omitted. Lyso-PC can induce an AR in capacitated but not in noncapacitated sperm [40]. All these results in-

dicate that the BSP proteins play an important role in the process of capacitation. This also confirms the previous report that bovine seminal plasma proteins have a positive regulatory role in the capacitation of bovine spermatozoa [27, 38, 40]. Control assays using unadsorbed proteins (Fig. 6) and RNase (Fig. 7) suggest that the BSP proteins are the most important factors in bovine seminal plasma responsible for the stimulation of capacitation of spermatozoa.

The significance of several different BSP proteins having the same effect on the sperm is not clear. We have tested the effect of reconstituted pooled purified BSP proteins at approximately the same proportion as they are present in the seminal fluid (BSP-A1/-A2, 65%; BSP-A3, 15%; BSP-30-kDa, 20% as determined by respective RIAs). The effect was similar to those shown by individual proteins (maximum effect below 40 $\mu\text{g/ml}$; data not shown). The effect appears to be synergistic and not additive. Higher concentrations did not stimulate capacitation any further, in fact, some degree of inhibition was observed in most cases. Furthermore, gelatin-agarose-adsorbed material, which contains all BSP proteins in the same proportions in which they exist in the seminal plasma, also gave results (not shown) similar to those obtained with reconstituted BSP proteins.

The BSP proteins cannot stimulate the AR of epididymal spermatozoa in the absence of heparin (Fig. 5). Another factor present in follicular fluid (e.g., heparin, heparin-like proteoglycan, other GAGs) is necessary so that the BSP proteins act at the right time in the right place. Because of this requirement, the sperm begin their capacitation only within the female genital tract, remaining uncapacitated until they

reach the appropriate time and place for capacitation. The mechanism underlying the heparin-induced capacitation is unknown. Handrow et al. [45] have shown that heparin binds to bull spermatozoa in a typical receptor-ligand interaction. Moreover, heparin stimulates the uptake of Ca^{2+} and an intracellular alkalinization of bovine spermatozoa [39, 46]. Parrish and First [47] have proposed a mechanism for the induction of capacitation by heparin. During epididymal maturation as well as at ejaculation, heparin-binding and decapacitation proteins are added to the surface of the spermatozoa. As the sperm travel through the female genital tract, they are exposed to heparin-like GAGs that bind to specific sperm proteins. This interaction would result in the release of decapacitation or acrosome-stabilizing factors, triggering the activation of proton channels that may then provoke cytoplasmic alkalinization and ultimately stimulating Ca^{2+} uptake. The rise in Ca^{2+} and pH could activate adenylate cyclase or could inhibit phosphodiesterases, either of which event may increase intracellular cAMP concentration. This increase would then set up a series of events resulting in the activation/inactivation of target cellular proteins through protein kinase pathways. Bovine epididymal sperm have few binding sites for heparin and are unable to undergo capacitation and AR. In this mechanism, the BSP proteins, which are heparin-binding proteins added to epididymal sperm upon their exposure to seminal plasma, may increase the number of heparin-binding sites on the plasma membrane of sperm, thus giving them the ability to respond to heparin and undergo capacitation.

Other proposed mechanisms aside from a net influx of extracellular Ca^{2+} include 1) removal of surface-associated components [33, 48] 2) efflux of membrane cholesterol [49, 50], and 3) decrease in membrane cholesterol/phospholipid ratio [34, 51]. Recently, we demonstrated that BSP proteins bind to choline phospholipids of the sperm plasma membrane upon ejaculation [29]. BSP proteins also bind to isolated apoA-1 as well as to apoA-1 associated with HDL [4, 18]. The HDL present in follicular and oviductal fluids has been implicated in sperm capacitation and the AR [34, 50, 52]. In view of these observations, we have proposed another mechanism of action for BSP proteins in sperm capacitation. It involves the binding of BSP proteins to the sperm surface upon ejaculation (through a specific interaction with choline phospholipids), where they would mediate the exchange of cholesterol and phospholipids between the sperm membrane and HDL. This may result in a decreased cholesterol/phospholipid ratio leading to capacitation [18, 29]. This model does not explain why heparin is required for capacitation by these proteins as shown in the present study (Fig. 5) and those reported previously [27].

Recently, Clark et al. [53] have isolated a 6-kDa seminal fluid peptide with biological and biochemical properties similar to those of caltrin. This peptide has been shown to be an acrosomal reaction-inducing factor (denoted PMF or

positive modulation factor) that inhibits Ca^{2+} transport and regulates zona pellucida agonist signal transduction pathways in bovine sperm. This peptide shows a maximal activity at a concentration of approximately 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, whereas BSP proteins show maximal activity at 20–40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ protein concentration. It could be argued that the capacitation modulatory activity associated with BSP proteins may be due to caltrin contamination. However, BSP proteins used in the present study were purified by means of a gelatin-agarose affinity matrix and gel filtration on Sephadex G-75. In our previous study, we clearly showed that even though bovine seminal fluid contains over fifty proteins, only BSP proteins and their proteolytic fragments (above 8 kDa) bind to this affinity matrix. All other polypeptides (small or big) are eluted unadsorbed [3]. Moreover, SDS-PAGE analysis of our purified proteins (Fig. 2) did not reveal any detectable band in the region of the gel corresponding to caltrin (6 kDa). We believe that the modulatory effect is due to BSP proteins and is not due to any contamination. Furthermore, Clark et al. [53] stated that caltrin accounts for some, but not all, of the PMF activity in seminal secretions. Capacitation and the AR are complex phenomena that implicate the contribution of several proteins; further studies are required in order to elucidate their exact roles.

As shown in Figure 6, the unadsorbed fraction on gelatin-agarose and DEAE-Sephadex presumably containing caltrin cannot stimulate capacitation of epididymal bovine sperm except at very high concentrations. We do not know the reasons for this discrepancy, but it should be noted that Clark et al. [53] used solubilized zonae pellucidae to induce the AR; in contrast we used lyso-PC in the present study. Alternatively, the unadsorbed fraction may contain certain inhibitors of capacitation and the AR that could modify the effect of the caltrin.

In summary, the present results demonstrate that the BSP proteins can potentiate capacitation of bovine epididymal spermatozoa induced by heparin. The mechanism by which these BSP proteins stimulate the heparin-induced capacitation is unknown, but we suggest that the sperm-bound BSP proteins interact with heparin-like GAGs present in the female reproductive tract and thereby participate in the modifications of the plasma membrane that occur during capacitation. Thus, they may act as regulatory factors of capacitation.

REFERENCES

1. Manjunath P. Gonadotropin release and stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. In: Sairam MR, Atkinson LE (eds.), *Gonadal Proteins and Peptides and Their Biological Significance*. Singapore: World Scientific Publishing Company; 1984: 49–61.
2. 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.
3. 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.
4. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: McKerns KW, Chrétien M (eds.),

- Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems. New York: Plenum Publishing Corp; 1988: 259–273.
5. 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.
 6. Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Ying SY, Guillemin R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113:861–867.
 7. Kemme M, Scheit KH. Cloning and sequence analysis of a cDNA clone from seminal vesicle tissue encoding the precursor of the major protein of bull semen. *DNA* 1988; 7:595–599.
 8. Constantine KL, Ramesh V, Banyai L, Trexler M, Patthy L, Llinas M. Sequence-specific ^1H NMR assignments and structural characterization of bovine seminal fluid protein PDC-109 domain b. *Biochemistry* 1991; 30:1663–1672.
 9. Constantine KL, Madrid M, Banyai L, Trexler M, Patthy L, Llinas M. Refined solution structure and ligand-binding properties of PDC-109 domain b: a collagen-binding type II domain. *J Mol Biol* 1992; 223:281–298.
 10. 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.
 11. Baker ME. The PDC-109 protein from bovine seminal plasma is similar to the gelatin-binding domain of bovine fibronectin and as kringle domain of human tissue-type plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130:1010–1014.
 12. McMullen BA, Fujikawa K. Amino acid sequence of the heavy chain of human α -factor XIIa (activated Hageman factor). *J Biol Chem* 1985; 260:5328–5341.
 13. Lobel P, Dahms NM, Kornfeld S. Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 1988; 263:2563–2570.
 14. Oshima A, Nolan CM, Kyle JW, Grubb JH, Sly WS. The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 1988; 263:2553–2562.
 15. Morgan DO, Edman JC, Standing 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.
 16. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant G, Seltzer JL, Kronberger A, He C, Bauer EA, Goldberg GI. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988; 263:6579–6587.
 17. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophage. *J Biol Chem* 1989; 264:17213–17221.
 18. Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A. Apolipoprotein A-1 binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 1989; 264:16853–16857.
 19. Manjunath P, Chandonnet L, Baillargeon L, Roberts KD. Calmodulin-binding proteins in bovine semen. *J Reprod Fertil* 1993; 97:75–81.
 20. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26:313–318.
 21. Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Structural comparison among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107:1326–1332.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Meizel S, Turner KO. Glycosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of golden hamster in vitro. *J Exp Zool* 1986; 237:137–139.
 25. First NL, Parrish JJ. In-vitro fertilization in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* 1987; 34:151–165.
 26. Miller DJ, Ax RL. Chemical N-desulfation of heparin negates its ability to capacitate bovine spermatozoa. *Gamete Res* 1989; 23:451–465.
 27. 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.
 28. Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. The major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50:27–37.
 29. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 1992; 267:10149–10155.
 30. Desnoyers L, Manjunath P. Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305:341–349.
 31. Go KJ, Wolf DP. The role of sterols in sperm capacitation. *Adv Lipid Res* 1983; 20:317–330.
 32. 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.
 33. Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat* 1985; 174:269–283.
 34. Langlais J, Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 1985; 12:183–224.
 35. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil J (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1988: 135–186.
 36. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 1985; 24:537–549.
 37. Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res* 1985; 12:345–355.
 38. 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. *Dev Biol* 1988; 128:464–473.
 39. 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.
 40. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38:1171–1180.
 41. 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.
 42. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680–685.
 43. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–254.
 44. Nass SJ, Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Mol Reprod Dev* 1990; 25:237–246.
 45. Handrow RR, Boehm SK, Lenz RW, Robinson JA, Ax RL. Specific binding of the glycosaminoglycan ^3H -heparin to bull, monkey and rabbit spermatozoa. *J Androl* 1984; 5:51–63.
 46. Handrow RR, Parrish JJ, First NL. Heparin stimulates calcium uptake by bovine sperm in vitro. *J Androl* 1986; 7(suppl):23.
 47. Parrish JJ, First NL. Bovine in vitro fertilization. In: Dunbar BS, O'Rand MG (eds.), *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. New York: Plenum Press; 1991: 351–361.
 48. Sidhu PM, Guraya SS. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int Rev Cytol* 1989; 118:231–280.
 49. Ehrenwald E, Parks JE, Foote RH. Cholesterol efflux from bovine sperm: II. Effect of reducing sperm cholesterol on penetration of zona-free hamster and in vitro matured bovine ova. *Gamete Res* 1988; 20:413–420.
 50. 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.
 51. Parks EJ, 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: Sereno Symposia; 1990: 155–167.
 52. 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.
 53. Clark EN, Corron ME, Florman HM. Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to egg's zona pellucida. *J Biol Chem* 1993; 268:5309–5316.

2.3. MAJOR PROTEINS OF BOVINE SEMINAL PLASMA MODULATE SPERM CAPACITATION BY HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN. I.

Thérien, S. Soubeyrand, and P. Manjunath, *Biology of Reproduction*, **57**, 1080-1088, 1997.

Préambule:

Plusieurs études ont démontré que la capacitation était accompagnée d'un changement dans la composition lipidique de la membrane plasmique du spermatozoïde. Elle entraîne plus particulièrement une diminution du rapport cholestérol/phospholipides. Il existerait des composantes présentes dans le tractus génital femelle qui faciliteraient l'efflux de cholestérol se produisant lors des premières étapes de la capacitation. Plusieurs études ont démontré que l'albumine et les HDL seraient des accepteurs de cholestérol. Les HDL présentes dans le fluide oviductal bovin seraient des accepteurs de cholestérol plus efficaces que l'albumine. Donc, au niveau du fluide oviductal bovin il y aurait deux différents types d'agents capacitants soit les accepteurs de cholestérol et les glycosamoglycannes semblables à l'héparine. Nous avons déjà démontré que les protéines BSP liaient l'héparine et stimulaient la capacitation induite par ce dernier. Sachant que les protéines BSP interagissent aussi avec l'apoA-I (l'apolipoprotéine majeure des HDL) ainsi qu'avec l'apoA-I associé avec les HDL, nous avons voulu vérifier le rôle possible des protéines BSP dans la capacitation en présence des HDL et de liposomes d'apoA-I en l'absence ou en présence d'héparine. Dans cet article, nous démontrons que les HDL seules peuvent stimuler la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes épидидymaires suite à l'ajout de lyso-PC. Par contre, une stimulation plus importante de la réaction de l'acrosome est obtenue lorsque les spermatozoïdes sont préalablement incubés en présence des protéines BSP. Nous démontrons aussi que les liposomes d'apoA-I stimulent la réaction de l'acrosome plus rapidement que les HDL et que cet effet est aussi augmenté par une préincubation en présence des protéines BSP. De plus, nous montrons que les liposomes sans apoA-I, les lipoprotéines de faible et de très faible densité (LDL, VLDL) ainsi que le sérum dépourvu de lipoprotéines sont incapables de stimuler la réaction de l'acrosome en présence ou en absence des protéines BSP. De plus, les résultats démontrent que

lorsque l'héparine et les HDL ou les liposomes d'apoA-I sont utilisés ensemble comme facteurs capacitants, leurs effets combinés sur la réaction de l'acrosome ne sont pas additifs. Finalement, nous suggérons que les protéines BSP jouent un rôle important dans le processus de capacitation induit par l'héparine, les HDL et les liposomes d'apoA-I.

Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Modulate Sperm Capacitation by High-Density Lipoprotein¹

I. Thérien, S. Soubeyrand, and P. Manjunath²

Department of Medicine, University of Montreal and Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

ABSTRACT

Bovine seminal plasma (BSP) contains four similar proteins secreted by the seminal vesicles, designated BSP-A1, -A2, -A3, and -30 kDa. These proteins bind to choline phospholipids on the surface of the sperm after ejaculation. These BSP proteins also interact with heparin, apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I associated with high-density lipoprotein (HDL). The HDL and heparin present in the female reproductive tract have been implicated in sperm capacitation and the acrosome reaction (AR). This study was undertaken to determine whether or not these BSP proteins and HDL could modulate the capacitation of sperm, and to determine the combined effect of HDL and heparin on capacitation. Washed bovine epididymal sperm were preincubated in buffer containing BSP proteins, washed, and incubated with lipoproteins (HDL, and low- and very low-density lipoproteins) or liposomes with or without apoA-I in the presence or absence of heparin. The percentage of capacitated sperm was evaluated after the AR was induced with lysophosphatidylcholine. HDL alone (160 µg/ml) after an 8-h incubation stimulated the AR of epididymal sperm. The percentage of HDL-enhanced AR further increased when sperm were preincubated with BSP proteins. ApoA-I-liposomes stimulated the AR more rapidly (5 h, 160 µg/ml) than HDL. When sperm were preincubated with BSP proteins, the percentage of apoA-I-enhanced AR further increased. In contrast, when liposomes without apoA-I or when low- or very low-density lipoproteins or lipoprotein-depleted serum was used, no significant increase in the AR was detected with or without BSP proteins. When heparin and HDL or apoA-I-liposomes were used together, their combined effects on the AR were not additive. These results indicate that BSP proteins modulate the process of capacitation induced by heparin, HDL, and apoA-I-liposomes.

INTRODUCTION

In the bovine species as well as in other mammals, freshly ejaculated sperm are not capable of fertilizing eggs. They must first undergo capacitation and the acrosome reaction (AR) during their transit through the female reproductive tract to become fully competent to fertilize an ovum [1–3]. The cellular changes involved in sperm capacitation are poorly understood, but it is believed to be a multistep process (for review see [4]). Several lines of evidence indicate that sperm capacitation involves a decrease in the membrane cholesterol/phospholipid ratio (for reviews see [5, 6]). This is a widely accepted theoretical model that warrants continued investigation. Many studies have shown that al-

bumin [7–12] and high-density lipoprotein (HDL) [13, 14] present in the female genital tract facilitate the efflux of cholesterol that occurs during the early step of capacitation. HDL, probably derived from plasma, is the only class of lipoprotein present in bovine follicular and oviductal fluids [13, 15, 16]. In bovine species, oviductal HDL is elevated during the estrous period and is low throughout the rest of the estrous cycle [6]. Ehrenwald et al. [13] showed that the apolipoprotein associated with oviductal fluid HDL is apolipoprotein A-I (apoA-I) and has a molecular mass of 28 kDa. Only after capacitation do mammalian sperm interact with oocytes to undergo the AR, which involves the fusion of the plasma membrane and outer acrosomal membrane, and the release of acrosomal enzymes. This fusion exposes the receptor(s)/ligand(s), located on the internal acrosomal membrane of sperm, that interact with the receptor(s)/ligand(s) of the ovum. The sperm can then recognize and penetrate the ovum.

Many studies suggest that factors present in the bovine seminal fluid are important for the acquisition of fertility [17–20], but the role of accessory glands in fertility remains unclear since removal of the various accessory sex glands has ranged from no effect on fertility to decreased fertility to complete infertility [21–23]. In the house mouse, removal of the seminal vesicles results in decreased fertility (pregnancy rates), which appears to be due to an alteration in sperm transport in the female reproductive tract [23]. However, there is no explanation for the different results from the few other studies that have been reported. Bovine seminal plasma (BSP) contains a family of four acidic proteins, secreted by the seminal vesicles, designated BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, and BSP-30 kDa. These proteins constitute the major protein fraction of bovine seminal fluid (20–40 mg/ml) [24–28]. BSP-A1, -A2, and -A3 have molecular masses of 15 000–16 500, whereas BSP-30 kDa has a molecular mass of 28 000–30 000 [27]. Since BSP-A1 and BSP-A2 have an identical amino acid sequence and differ only in the degree of glycosylation, they are considered to be a single chemical entity named BSP-A1/-A2 (also called gonadostatins or PDC-109) [29]. Similar proteins are present in seminal plasma and/or seminal vesical secretions from humans, hamsters, mice, rats, stallions, and boars [30–32]. These BSP proteins interact with the choline phospholipids on the sperm membrane after ejaculation [33]. They also bind to heparin [34], a glycosaminoglycan (GAG) also implicated in capacitation [35]. Recently, we have shown that BSP proteins potentiate heparin-induced sperm capacitation [20]. BSP proteins also interact with apoA-I and apoA-I associated with HDL [27, 36]. Since HDL and heparin-like GAGs are present in follicular and oviductal fluids and have been implicated in sperm capacitation and the AR, in this study we investigated the effect of BSP proteins on capacitation in the presence of HDL and apoA-I with or without heparin.

Accepted June 25, 1997.

Received November 5, 1996.

¹This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada and the Special Programme of Research, Development, and Research Training in Human Reproduction, World Health Organization.

²Correspondence: P. Manjunath, Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boul. de l'Assomption, Montréal, PQ, Canada H1T 2M4. FAX: (514) 252-3430; e-mail: [REDACTED]

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), and cholesterol were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO); penicillin G and streptomycin sulfate were from Gibco (Burlington, ON, Canada), and phosphatidylcholine (PC) was from Serydary Research Laboratories (London, ON, Canada). All other chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

Bovine testes and epididymides were obtained from Abattoir Les Cèdres (St-Lazare, PQ, Canada), and freshly ejaculated bovine sperm collected with an artificial vagina were obtained from the Centre d'Insémination Artificielle du Québec (St-Hyacinthe, PQ, Canada). BSP-A1/-A2, -A3, and -30-kDa proteins of bovine seminal plasma were isolated using gelatin-agarose affinity chromatography [26]. The adsorbed fractions were eluted and resolved on Sephadex G-75 and G-200 columns (Pharmacia and Upjohn, Kalamazoo, MI) under conditions described previously [25]. The purity of the BSP proteins was confirmed by SDS-PAGE.

Culture Medium

Sperm were cultured in a modified Tyrode's medium, designated mTALP, containing 100 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 0.3 mM NaH₂PO₄, 35.7 mM NaHCO₃, 0.1 mM sodium pyruvate, 17.4 mM sodium lactate, 0.5 mM taurine, 0.05 mM L-epinephrine, 63 µg/ml penicillin G (1585 U/mg), 0.1 mM streptomycin sulfate, and 20 µg/ml phenol red dye. The medium was sterilized by Millipore (Bedford, MA) filtration (0.2 µm pore) and frozen at -20°C. Before use, 6 mg/ml of BSA (essentially fatty acid-free) was added, and the pH was adjusted to 7.4. It is important to note that glucose was not present in the mTALP, because it has been shown that this sugar is an inhibitor of bovine sperm capacitation [37].

Separation of Lipoproteins

HDL, low-density lipoproteins (LDL), and very low-density lipoproteins (VLDL) were purified from human serum by density gradient ultracentrifugation with some modifications [38]. EDTA (1 mM) was added to human serum, and the density of the serum was raised to 1.070 kg/L by the addition of KBr. Then the serum was transferred into Quick Seal tubes (Mandel Scientific Co., Guelph, ON, Canada), and the tubes were centrifuged for 20 h at 60 000 rpm at 20°C. After centrifugation, the LDL and VLDL were concentrated in a layer at the top of the tube, and the bottom fraction contained HDL. The LDL and VLDL fraction was mixed with a solution containing EDTA (1 mM) and NaN₃ (0.02%), pH 7, to obtain a density of 1.020 kg/L, and was transferred to a Quick Seal tube. The density of the bottom fraction was increased to 1.210 kg/ml by the addition of KBr; the volume of the fraction was adjusted by the addition of a solution containing EDTA (1 mM), NaN₃ (0.02%), and KBr (30.50 g/100 ml), pH 7 (final density of 1.210 kg/L); and the fraction was transferred to a Quick Seal tube. After recentrifugation under the same conditions, the VLDL and HDL were concentrated in a layer at the top of their respective tubes, and the bottom fraction contained VLDL in the first tube and the lipoprotein-depleted serum

(LDS) in the other. The purity of the lipoproteins was verified by agarose-gel electrophoresis using the Paragon lipoprotein (Lipo) electrophoresis kit (Beckman Instruments, Fullerton, CA) and following the protocol described by the manufacturer. The concentration of lipoproteins was measured according to the modified Lowry procedure [39].

Preparation of Liposomes

ApoA-I was purified from human serum using a BSP-A1/-A2-agarose column [36]. ApoA-I-liposomes (PC/cholesterol/apoA-I/sodium cholate: 88:44:1:88) were prepared by the sodium cholate dialysis method [40]. PC liposomes and PC + cholesterol liposomes were prepared by sonication [41].

Sperm Capacitation and AR

Caudal sperm were collected by retroperfusion of the epididymides obtained from four different bulls, pooled, and washed twice (300 × g, 10 min) with 10 vol of mTALP, and were adjusted to a concentration of 1 × 10⁸/ml. Then, 250 µl of sperm suspension was preincubated in a humidified atmosphere (5% CO₂, 37°C) for 20 min with 100 µl of different concentrations of BSP proteins and 150 µl of culture medium. The cells were then washed twice (300 × g, 10 min), resuspended in 500 µl of mTALP containing different concentrations of HDL or liposomes (with or without apoA-I) and with or without heparin (12 µg/ml). At the end of the incubation (37°C, 5% CO₂ atmosphere), lyso-PC was added at 100 µg/ml, and the sperm were reincubated for an additional 15 min. This concentration of lyso-PC was previously shown to induce the AR in capacitated sperm while having no effect on noncapacitated sperm [35]. The lyso-PC-induced AR is a well-characterized method that has been correlated with *in vitro* fertilization rates and validated by electron micrograph studies [35]. Ejaculated sperm were pooled from four different bulls, washed twice, and incubated with capacitating agents (heparin and/or HDL, under the same conditions as described for epididymal sperm) for 5 h or 8 h, and lyso-PC was added to induce AR. Before 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.

Staining Procedure

The naphthol yellow S-erythrosin B-staining procedure has been described previously by Lenz et al. [42]. The slides were placed in 0.1% naphthol yellow S in 1% aqueous acetic acid for 30 min. The slides were rinsed in 1% aqueous acetic acid for 10 sec and then drained and placed in equal parts of 0.2% aqueous naphthol yellow S and 0.2% aqueous erythrosin B, pH 4.8, for 13 min. Slides were rinsed in distilled water and air-dried.

Protein Assay

The protein content of the samples was measured according to the method of Bradford [43] or by weighing freeze-dried purified proteins on a Cahn microbalance (Model C-31; Fisher Scientific, Fairlawn, NJ).

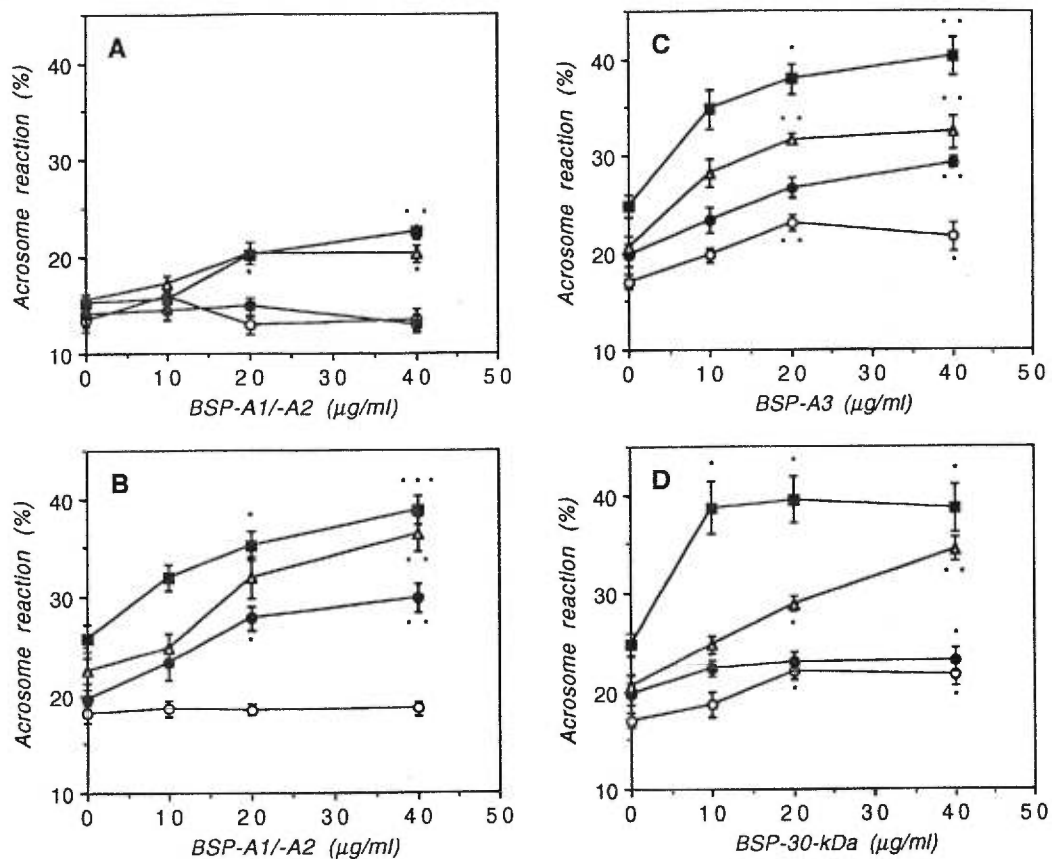


FIG. 1. Effect of BSP proteins on the AR of epididymal sperm incubated with HDL. Epididymal sperm were preincubated 20 min with different concentrations of BSP proteins, washed, and incubated with different concentrations of HDL (see *Materials and Methods*). After a 5-h (A) or 8-h (B–D) incubation, lyso-PC (100 $\mu\text{g/ml}$) was added to induce the AR. A, B) BSP-A1/-A2, C) BSP-A3, D) BSP-30 kDa. Open circles, without HDL; solid circles, HDL (40 $\mu\text{g/ml}$); triangles, HDL (80 $\mu\text{g/ml}$); squares, HDL (160 $\mu\text{g/ml}$). Results represent the mean \pm SEM of six independent experiments, with duplicate samples for each experiment and 200 sperm assayed per sample. Significant differences vs. control (without BSP proteins): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Data Analysis

The data presented here were analyzed for significant differences by a nonparametric Friedman test followed by a Wilcoxon-Wilcox test (nonparametric comparisons of a control group to other groups) when the Friedman test was significant or by a Student's *t*-test on paired observations.

RESULTS

Effect of BSP Proteins on the AR of Epididymal Sperm Incubated with HDL

BSP proteins as well as HDL have been implicated in sperm capacitation, and they interact with each other [13, 14, 20, 27, 36]. In the current study, we were interested in comparing the percentage of AR obtained in the presence or absence of BSP proteins and capacitating agents (HDL, heparin, and apoA-I-liposomes) in the presence of lyso-PC. Lyso-PC, which induces the AR only in capacitated sperm, was used as an indirect method to measure sperm capacitation [35]. Therefore, the AR in the present context is meant to reflect capacitation rather than the AR per se unless otherwise specified. In the first experiment, we tested whether or not the purified BSP proteins and HDL could capacitate epididymal sperm. After 5 h of incubation (Fig. 1A), HDL alone failed to stimulate the AR of epididymal sperm, but the combined presence of BSP-A1/-A2 and HDL stimulated the AR. The percentage of AR at this time was low but represented an increase of 1.5-fold of the AR

(BSP-A1/-A2, 40 $\mu\text{g/ml}$; HDL, 160 $\mu\text{g/ml}$) obtained without BSP-A1/-A2 but with HDL. After a longer incubation period (8 h, Fig. 1B), the percentage of AR was much higher and reached a maximum level when 40 $\mu\text{g/ml}$ BSP-A1/-A2 and 80–160 $\mu\text{g/ml}$ HDL were used. This effect was dose-dependent: when the concentrations of BSP-A1/-A2 or HDL were increased, we observed an increased incidence in the AR. After 8 h of incubation, HDL alone (but not BSP-A1/-A2 alone) stimulated the AR of epididymal sperm up to 1.4-fold (HDL, 160 $\mu\text{g/ml}$) as compared to the control without HDL (unenhanced AR). BSP-A3 and BSP-30 kDa also showed a stimulatory effect on AR comparable to that of BSP-A1/-A2 after 5 h (data not shown) or 8 h of incubation (Fig. 1, C and D). When the concentration of BSP-A3 was gradually increased (Fig. 1C), there was an increased frequency of the AR at each concentration tested of HDL. A maximum level of stimulation of the AR of 1.7-fold at 40 $\mu\text{g/ml}$ BSP-A3 and 160 $\mu\text{g/ml}$ HDL was obtained as compared to stimulation at the same concentration of HDL but without BSP-A3. Similarly, BSP-30 kDa caused an increased occurrence of the AR, with a maximum level at 40 $\mu\text{g/ml}$ of protein concentration when less than 80 $\mu\text{g/ml}$ of HDL was used; but when the sperm were incubated with 160 $\mu\text{g/ml}$ of HDL, a maximum stimulation of AR was reached when only 10 $\mu\text{g/ml}$ BSP-30 kDa was used (Fig. 1D). The combined stimulatory effect of BSP-A3 or BSP-30 kDa and HDL on the AR was approximately 2.4-fold the level of unenhanced AR. BSP-A3 or BSP-30

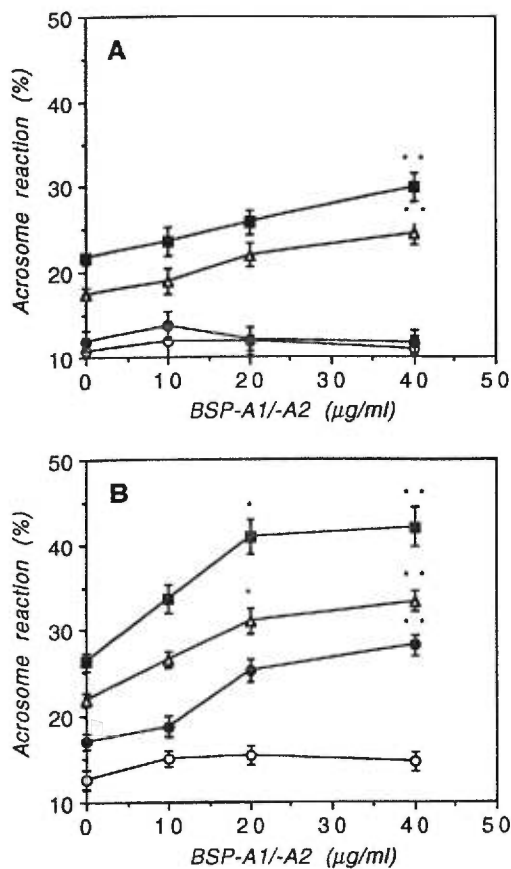


FIG. 2. Effect of BSP-A1/-A2 proteins on the AR of epididymal sperm incubated with apoA-I-liposomes. The same protocol as in Figure 1 but using different concentrations of apoA-I liposomes (A, B) instead of HDL; lyso-PC (100 $\mu\text{g/ml}$) was added after 2 h (A) or 5 h (B). Open circles, without apoA-I-liposomes; solid circles, 40 $\mu\text{g/ml}$ apoA-I-liposomes; triangles, 80 $\mu\text{g/ml}$ apoA-I-liposomes; squares, 160 $\mu\text{g/ml}$ apoA-I-liposomes. Results represent the mean \pm SEM of five independent experiments, with duplicate samples for each experiment and 200 sperm assayed per sample. Significant differences vs. control (without BSP-A1/-A2 protein): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

kDa proteins alone slightly stimulated the exocytosis up to 5–6% after 8 h of incubation followed by induction with lyso-PC compared to the level of AR induced with lyso-PC in the absence of any BSP proteins. None of the treatments affected the motility of the epididymal sperm (data not shown). The sperm motility of the control (unenhanced AR) was the same as observed with other treatments.

Effect of BSP-A1/-A2 Proteins on the AR of Epididymal Sperm Incubated with apoA-I-Liposomes

ApoA-I is the major constituent of HDL. This apolipoprotein (associated with HDL or not) interacts with BSP proteins [27, 36]. Thus, apoA-I-liposomes were tested to determine whether, in the presence or absence of BSP-A1/-A2, they could capacitate epididymal sperm (Fig. 2, A and B). BSP-A1 and -A2 were chosen because they are the most abundant BSP proteins in bovine seminal fluid (BSP-A1/-A2, ~65%; BSP-A3, ~15%; BSP-30 kDa, ~20% as determined by respective RIAs). ApoA-I-liposomes alone (at the highest concentration tested, without preincubation with BSP-A1/-A2) significantly stimulated the AR up to 2-fold after 2 h or 5 h of incubation (Fig. 2, A and B) as compared to the level of unenhanced AR. When epididymal sperm were preincubated with BSP-A1/-A2, more sperm under-

TABLE 1. Effect of the BSP-A1/-A2 proteins on the AR of epididymal sperm incubated with LDL, VLDL, LDS, PC liposomes or PC + C liposomes.

Experimental conditions		
Lipoproteins or liposomes (160 $\mu\text{g/ml}$) ^a	BSP-A1/-A2 proteins (40 $\mu\text{g/ml}$)	% AR ^{b,c}
—	—	17.3 \pm 1.0
—	+	19.2 \pm 1.0
LDL	—	12.9 \pm 0.4
LDL	+	12.1 \pm 2.1
VLDL	—	16.9 \pm 1.6
VLDL	+	20.1 \pm 2.1
LDS	—	15.6 \pm 1.3
LDS	+	17.1 \pm 3.2
PC liposomes	—	17.1 \pm 2.7
PC liposomes	+	18.4 \pm 3.4
PC + C liposomes	—	16.6 \pm 1.6
PC + C liposomes	+	16.4 \pm 0.3

^a Lipoproteins or liposomes were incubated 8 h with epididymal sperm before lyso-PC was added to induce the AR. Experiments were also conducted with 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ of BSP-A1/-A2 and with 40 and 80 $\mu\text{g/ml}$ of lipoproteins or liposomes; the results obtained were not significant (data not shown).

^b Results represent the mean \pm SEM of five independent experiments that included duplicate samples/experiment and in which 200 sperm were assayed/sample.

^c No significant difference vs. control (without BSP-A1/-A2 protein) or vs. different treatment were observed.

went the AR. This effect was dose-dependent, with a maximum range of 20–40 $\mu\text{g/ml}$ of BSP-A1/-A2. Compared to values obtained in the absence of BSP-A1/-A2, increases of ~1.4-fold and 1.6-fold of the AR were observed when the sperm cells were preincubated in the presence of BSP-A1/-A2 (40 $\mu\text{g/ml}$) and then incubated for 2 h or 5 h with apoA-I-liposomes (160 $\mu\text{g/ml}$). The combined stimulatory effect of BSP-A1/-A2 and apoA-I-liposomes was 3.3-fold that of unenhanced AR.

Effect of BSP-A1/-A2 Proteins on the AR of Epididymal Sperm Incubated with LDL, VLDL, LDS, PC Liposomes, or PC + C Liposomes

As controls, other lipoproteins (LDL, VLDL) as well as LDS, PC, and PC + cholesterol (C) liposomes were also tested to determine their ability to induce sperm capacitation. After 8 h of incubation, LDL, VLDL, LDS, PC liposomes, and PC + C liposomes failed to stimulate the AR in the presence or absence of BSP-A1/-A2 (Table 1). The same results were obtained with BSP-A3 and BSP-30 kDa (data not shown).

Effect of Lipoproteins on the AR of Epididymal Sperm Incubated with BSP-A1/-A2 Proteins and Heparin

In view of the fact that GAGs and HDL are present in the female genital tract, and that they interact with BSP proteins and modulate capacitation [13, 14, 20, 27, 34–36], we tested the simultaneous effect of heparin and HDL on the capacitation of bovine epididymal sperm in the presence or absence of BSP-A1/-A2. When epididymal sperm were incubated with BSP-A1/-A2 and then with heparin alone (without HDL), their combined effect on the AR, after only a 5-h incubation, was ~2.8-fold the stimulation rate of unenhanced AR (Fig. 3A). In contrast, the combined effect of BSP-A1/-A2 and HDL over the same period was only ~1.7-fold (Fig. 1A). When the sperm were incubated with

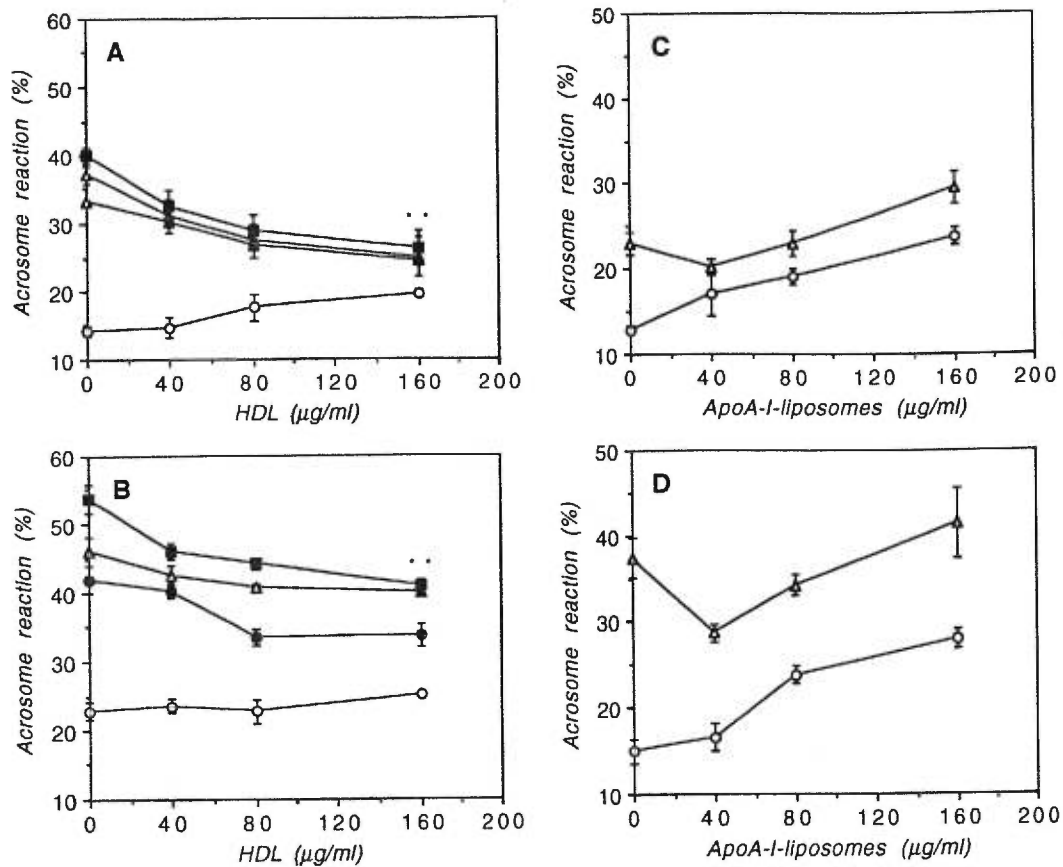


FIG. 3. Effect of HDL and apoA-I-liposomes on the AR of epididymal sperm incubated with BSP-A1/A2 proteins and heparin. Epididymal sperm were preincubated for 20 min with different concentrations of BSP proteins, washed, and incubated with 12 $\mu\text{g/ml}$ of heparin plus different concentrations of HDL or apoA-I-liposomes. After a 5-h (A, D), 8 h (B), or 2-h (C) incubation, lyso-PC (100 $\mu\text{g/ml}$) was added to induce the AR. Open circles, without BSP-A1/A2 proteins; solid circles, BSP-A1/A2 proteins (10 $\mu\text{g/ml}$); triangles, BSP-A1/A2 proteins (20 $\mu\text{g/ml}$); squares, BSP-A1/A2 proteins (40 $\mu\text{g/ml}$). Results represent the mean \pm SEM of four (A, B) or three (C, D) independent experiments, with duplicate samples for each experiment and 200 sperm assayed per sample. Significant differences vs. control (without HDL or apoA-I-liposomes): ** $p < 0.01$.

BSP-A1/A2 and then with HDL and heparin, the effect of heparin alone was inhibited by the addition of HDL for each concentration of BSP-A1/A2 tested. The higher the concentration of HDL added, the higher the inhibition observed. When 160 $\mu\text{g/ml}$ of HDL was used, the percentage of AR decreased to 25–26% compared to 37–40% without HDL. After 8 h of incubation with heparin and HDL (Fig. 3B), similar results were obtained, but the observed decrease was relatively small (from 53.7% to 40.9% at 160 $\mu\text{g/ml}$ HDL), probably because at 8 h, BSP-A1/A2 and HDL together could stimulate the AR up to 38.8% (Fig. 1B). LDL, VLDL, and LDS also partially inhibited the effect of heparin on sperm capacitation in the presence of BSP-A1/A2 (Table 2). The same results were obtained when BSP-A3 or BSP-30 kDa was used (data not shown).

Effect of apoA-I-Liposomes, PC, and PC + C Liposomes on the AR of Epididymal Sperm Incubated with BSP-A1/A2 Proteins and Heparin

Subsequently, apoA-I-liposomes and heparin were used together to determine their simultaneous effect on sperm capacitation in the presence of 20 $\mu\text{g/ml}$ BSP-A1/A2. The sperm were incubated for 2 h or 5 h with heparin along with different concentrations of apoA-I-liposomes after their preincubation with or without BSP-A1/A2. Heparin alone stimulated the AR after 2 h (Fig. 3C) and 5 h (Fig. 3D) of incubation when the sperm cells were preincubated

with BSP-A1/A2. However, when apoA-I-liposomes were added, the percentage of stimulation of the AR decreased at a low concentration (40 $\mu\text{g/ml}$) and then increased as the concentration of apoA-I-liposomes increased. For each concentration of apoA-I-liposomes tested, the stimulation was similar to that induced by apoA-I-liposomes alone (Fig. 2). PC and PC + C liposomes after 8 h of incubation with sperm preincubated with BSP-A1/A2 also inhibited the stimulation of the AR induced by heparin (Table 2). The inhibition by PC alone was not significant when compared to the inhibition by PC + C.

Effect of Capacitating Agents on Bovine Ejaculated Sperm

Finally, we compared the effect of capacitating agents (heparin and HDL) on epididymal sperm treated with BSP proteins and ejaculated sperm. No significant differences were observed between ejaculated sperm (Table 3) and epididymal sperm treated with BSP proteins (Fig. 1 and Fig. 3, A and B).

DISCUSSION

Several studies have shown that sperm cholesterol efflux may be an important event in capacitation [8, 14, 44–46]. The loss of cholesterol from sperm appears to be mediated by two cholesterol acceptors present in the genital tract, albumin and HDL [6, 7–14, 47]. The present study indi-

PHOSPHOLIPID-BINDING PROTEINS MODULATE SPERM CAPACITATION

TABLE 2. Effect of LDL, VLDL, LDS, PC liposomes and PC + C liposomes on the AR of epididymal sperm incubated with or without the BSP-A1/-A2 proteins and heparin.

Experimental conditions		
Lipoproteins or liposomes (160 µg/ml) ^a	BSP-A1/-A2 proteins (µg/ml) ^b	% AR ^{c, d}
—	—	22.9 ± 1.3
—	+	47.5 ± 1.8
LDL	—	20.6 ± 1.1
LDL	+	27.8 ± 2.3
VLDL	—	21.7 ± 1.4
VLDL	+	30.4 ± 3.2
LDS	—	24.5 ± 1.7
LDS	+	32.5 ± 1.7
PC liposomes	—	18.0 ± 3.1
PC liposomes	+	27.3 ± 4.0
PC + C liposomes	—	19.4 ± 3.9
PC + C liposomes	+	26.4 ± 2.4

^a Lipoproteins or liposomes and heparin (12 µg/ml) were incubated 8 h with epididymal sperm before lyso-PC was added to induce the acrosome reaction.

^b For LDL, VLDL, and LDS, 40 µg/ml of BSP-A1/-A2 were used; for PC or PC + C liposomes, 20 µg/ml of BSP-A1/-A2 were used (results with 40 µg/ml BSP-A1/-A2 were similar).

^c Results represent the mean ± SEM of four (LDL, VLDL, LDS) or three (PC and PC + C liposomes) independent experiments that included duplicate samples/experiment and in which 200 sperm were assayed/sample.

^d Decreases in AR stimulation by lipoproteins or liposomes in the presence of BSP-A1/-A2 proteins are significant differences vs. control (without lipoprotein or liposomes, $p < 0.001$); no significant difference vs. control in the absence of BSP-A1/-A2 proteins or vs. different treatments was observed.

cates that BSP proteins, which interact with HDL, can accelerate the sperm capacitation process triggered by HDL. HDL alone requires at least 8 h of incubation to stimulate the AR, but in the presence of BSP-A1/-A2, the time required for a significant increase in the AR was only 5 h (Fig. 1A). In the presence of HDL, each BSP protein increased the incidence of the AR to similar levels and in a dose-dependent manner (Fig. 1, B-D). The combined stimulatory effect of BSP proteins and HDL on the AR was from 2.1- to 2.4-fold the level of unenhanced AR.

The unenhanced AR represents the AR induced with lyso-PC in the absence of capacitating agents (BSP proteins, HDL, apoA-I-liposomes, and heparin). The values for the unenhanced AR varied from 10.8% after 2 h to 18.1% after 8 h. This increase in unenhanced AR could be due to the incubation period: the longer the incubation, the more likely that the sperm will undergo a spontaneous AR, i.e., an AR observed in the absence of any inducer. On the other hand, this increase could also be due to the presence of albumin in the culture medium. Albumin decreases the cholesterol:phospholipid ratio in the sperm plasma membrane [8], leading to capacitation. Thus, prolonged incubation of epididymal sperm with albumin (8 h) followed by the addition of lyso-PC may lead to an increase in the unenhanced AR percentage.

ApoA-I present in HDL appears to be an important factor in the stimulation of the AR. Indeed, ApoA-I-liposomes alone stimulated the AR more rapidly than HDL (Fig. 2). After only 2 h of incubation, the stimulation obtained was twice that of the unenhanced AR. The stimulation of the AR reached a maximum level of three times the control value when the stimulatory effects of BSP-A1/-A2 and apoA-I-liposomes were combined. The other lipoproteins

TABLE 3. Effect of capacitating agents on bovine ejaculated sperm.

Capacitating agents	% AR ^{a, b}	
	5 h incubation	8 h incubation
—	11.3 ± 2.5	17.4 ± 2.4
Heparin (12 µg/ml)	39.3 ± 2.4	45.6 ± 2.7
HDL (160 µg/ml)	18.3 ± 3.1	36.8 ± 2.5
Heparin and HDL	28.1 ± 3.6	36.7 ± 2.3

^a Ejaculated sperm were incubated with capacitating agents; after 5 h or 8 h incubation, lyso-PC was added to induce the AR.

^b Results represent the mean ± SEM of three independent experiments that included duplicate samples/experiment and in which 200 sperm were assayed/sample.

(LDL and VLDL) or LDS, PC, and PC + C liposomes did not stimulate the AR in the presence or absence of BSP proteins (Table 1). All of these particles contain phospholipids similar to HDL, but they do not contain apoA-I. Thus, the presence of apoA-I appears to be crucial for the stimulation of the AR by BSP proteins, and therefore, the interaction of BSP proteins and apoA-I probably plays an important role in the regulation of the capacitation process.

In this study, we showed that BSP proteins potentiate sperm capacitation in the presence of HDL and apoA-I-liposomes. Many other studies have shown that heparin and other GAGs also induce capacitation [17-19, 42, 48-50]. Our previous study [20] has shown that BSP proteins potentiate sperm capacitation induced by heparin. Moreover, oviductal HDL and heparin-like GAG levels are apparently elevated during the estrous period and remain low throughout the rest of the estrous cycle [6]. Therefore, it is likely that BSP proteins interact simultaneously with both HDL and heparin-like GAGs. The combined effects of HDL and heparin, in the presence or absence of BSP proteins, do not appear to be additive: the stimulation of the AR obtained with heparin alone was inhibited by the addition of HDL for each concentration of BSP-A1/-A2 used (Fig. 3, A and B). This result can be explained by the fact that BSP proteins have more affinity for apoA-I associated with HDL than for heparin [34, 36], while the latter is a more efficient capacitation factor than HDL. On the other hand, heparin and HDL may interact with each other, and this could result in a decrease in the stimulation of capacitation. In this regard, human plasma HDL contains 1-3% apolipoprotein E, which can bind heparin [51]. When LDL, VLDL, and LDS were used in the presence of BSP proteins and heparin, they inhibited the effect of heparin on sperm capacitation. Human plasma LDL and VLDL contain a high amount of apolipoprotein E and/or apolipoprotein B, which bind heparin [51]. LDS also contains several factors that bind heparin. All of these interactions can interfere with the binding of heparin and BSP proteins and therefore inhibit capacitation induced by heparin. Ehrenwald et al. [41] have reported that PC + C liposomes have no effect on capacitation, whereas PC alone stimulated the capacitation of bovine ejaculated sperm. In our experiments, neither PC nor PC + C liposomes stimulated epididymal sperm capacitation in the presence or absence of BSP-A1/-A2 (Table 1); however, both inhibited the capacitation induced by heparin (Table 2). In view of these discrepancies, further investigations are warranted.

In view of the fact that the effect of heparin and HDL on sperm capacitation is not additive and that these capacitation factors are present at the same time in the female genital tract, they appear to compete to interact with BSP proteins bound to the sperm membrane. BSP proteins seem

to have more affinity for HDL than for heparin. Therefore, the proportion of sperm that interact with HDL will be higher than the fraction that interact with heparin. On the other hand, the stimulation obtained with heparin and BSP proteins is more rapid than that obtained with HDL and BSP proteins. Therefore, different sperm populations could capacitate at different times depending on their relative binding to HDL and heparin. Because the sperm must spend some time in the genital tract before reaching the site of fertilization, the different effects of heparin and HDL on sperm could allow the capacitation of a sperm population at the appropriate time. The BSP proteins alone cannot sufficiently increase the capacitation of epididymal sperm; they require other factor(s) present in follicular fluid (heparin and/or HDL) to have an effect. Thus, BSP proteins ensure that the sperm cells remain uncapacitated until they reach the appropriate place, and stimulate capacitation only within the female genital tract upon interaction with HDL and/or heparin.

Lyso-PC was used in our studies to induce the AR of capacitated sperm. The lyso-PC-induced AR is a well-characterized method that has been correlated with *in vitro* fertilization rates and validated by electron micrograph studies [35]. *In vivo*, the physiological inducer of the AR is the zona pellucida, which is also used *in vitro* to induce the AR [18, 53]. No significant differences between these two methods have been reported: when ejaculated sperm were incubated for 4–5 h with heparin and then incubated with lyso-PC or solubilized zona to induce the AR, the same percentage of AR was obtained (35–40%) [19, 35, 53, 54]. Moreover, Miller et al. [19] have shown that the bovine seminal heparin-binding proteins (BSP proteins) potentiate heparin-induced capacitation in epididymal sperm, and the incidence of AR was similar whether solubilized zonae or lyso-PC was used. Therefore, the results obtained in the current investigation using lyso-PC should be comparable to those obtained with solubilized zonae.

The mechanism underlying the heparin-induced capacitation is unknown. Handrow et al. [52] have shown that heparin binds to bull sperm in a typical receptor-ligand interaction. Moreover, heparin stimulates the uptake of Ca^{2+} and an intracellular alkalization of bovine sperm [37, 55]. Bovine epididymal sperm have few binding sites for heparin and are unable to undergo capacitation within the same time period as ejaculated sperm exposed to heparin [17, 19]. However, a 20-min exposure of epididymal sperm to seminal plasma reduced the time required for heparin-induced capacitation to 4 h [18, 19]. This stimulatory effect was due to a group of heparin-binding proteins (14–18-, 24-, and 31-kDa) produced by the accessory glands [19]. Our previous study has shown that these proteins correspond to the BSP proteins and that they potentiate heparin-induced capacitation [20, 34]. Thus, BSP proteins may increase the number of heparin-binding sites on the sperm plasma membrane and thereby provide them with the ability to respond to heparin and undergo capacitation. Concerning a second mechanism of sperm capacitation, we postulated that BSP proteins are involved in the sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. After ejaculation, BSP proteins bind to the sperm surface by their specific interaction with choline phospholipids. The sperm coated with BSP proteins then travel through the female genital tract, in which they encounter HDL. The BSP proteins bound to sperm can then interact with HDL and mediate the exchange of cholesterol and phospholipids between the sperm membrane and HDL [33, 36]. This may

result in a decrease in the cholesterol/phospholipid ratio, leading to capacitation. Since cholesterol is recognized to have a stabilizing effect on membranes [56], its efflux would be expected to provoke a reorganization of the membrane. This could regulate the surface expression of sperm zona pellucida receptors [11]. The adhesion to the zona pellucida would then trigger the AR.

When we compared ejaculated sperm to epididymal sperm treated with BSP proteins, the capacitation results obtained were very similar (Table 3). So the BSP proteins seem sufficient to allow epididymal sperm to behave as though they were ejaculated sperm. However, BSP proteins are not the only group of proteins that promote the capacitation of bovine sperm. Caltrin, a 6-kDa peptide isolated from seminal fluid, has been shown to be an acrosomal reaction-inducing factor (denoted PMF or positive modulation factor) that inhibits Ca^{2+} transport and regulates zona pellucida agonist signal transduction pathways [57]. Oviductal and follicular fluids also contain factors (such as HDL and heparin-like GAGs) that can stimulate sperm capacitation [58, 59]. An oviduct-specific estrus-associated glycoprotein (EAP) with a molecular weight of ~95 000 [60, 61] also facilitates the capacitation of ejaculated sperm [62]. Albumin, the major protein of follicular fluid, can act as a sterol acceptor similar to HDL [8] and may mediate capacitation of sperm in many species including rats [63], mice [8], and humans [64]. The amount of sterol associated with follicular fluid albumin was 2-fold higher than that associated with serum albumin [14], but when human and bovine sperm were incubated with oviductal fluid, the HDL seemed to be the most potent acceptors of cholesterol [13, 14]. Human follicular fluid is reported to contain a lipid transfer protein I (LTP-I) that facilitates exchange of cholesteryl esters, triglycerides, and phospholipids, and stimulates human sperm capacitation [65, 66]. The effects of LTP-1 appear to be very similar to those of BSP proteins, but no sequence homologies exist between these proteins. Further studies are required in order to elucidate the relative contribution of each capacitation factor.

In summary, we found that BSP proteins accelerate the capacitation of bovine epididymal sperm triggered by HDL and also potentiate capacitation induced by heparin. The exact contribution of these two mechanisms is unknown. BSP proteins may, on the one hand, play a role via their interaction with heparin-like GAGs in the uptake of Ca^{2+} and in the intracellular alkalization of bovine sperm [37, 55], and, on the other hand, participate via their interaction with HDL in the plasma membrane modifications that occur during capacitation.

ACKNOWLEDGMENT

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

REFERENCES

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

6. 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.
7. Davis BK, Byrne R, Bedigian 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.
8. Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 1985; 32:145-153.
9. Benoff S, Cooper GW, Hurley I, Mandel FS, Rosenfeld DL. Anti-sperm antibody binding to human sperm inhibits capacitation induced changes in the levels of plasma membrane sterols. *AJRI* 1993; 30: 113-130.
10. Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Hershlag A, Scholl GM, Rosenfeld DL. Fertilization potential *in vitro* is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Hum Reprod* 1993; 8:2155-2166.
11. 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.
12. Davis BK, Byrne R, Hungund B. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation. *Biochim Biophys Acta* 1979; 558:257-266.
13. 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.
14. 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.
15. Brantmeier SA, Grummer RR, Ax RL. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J Dairy Sci* 1987; 70:2145-2149.
16. 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.
17. Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa *in vitro*. *Gamete Res* 1985; 12:345-355.
18. Florman H, First NL. The regulation of acrosomal exocytosis. II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Dev Biol* 1988; 128:464-473.
19. 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.
20. Therien I, Bleau G, Manjunath P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 1995; 52:1372-1379.
21. Davies DC, Hall G, Hibbitt KG, Moore HD. The removal of the seminal vesicles from the boar and the effects on the semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1975; 43:305-312.
22. Queen K, Dhabuwala CB, Pierrepoint CG. The effect of the removal of the various accessory sex glands on the fertility of male rats. *J Reprod Fertil* 1981; 62:423-426.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: Chretien M, McKerns KW (eds.), *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems*. New York: Plenum Publishing Corp.; 1988: 259-273.
28. Desnoyers L, Therien 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.
29. Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Ying SY, Guillemin R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113:861-867.
30. Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Topfer-Petersen E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 1995; 310:615-622.
31. Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Gabius H, Topfer-Petersen E. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol Reprod Dev* 1993; 35:37-43.
32. 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.
33. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 1992; 267: 10149-10155.
34. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26:313-318.
35. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38:1171-1180.
36. Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 1989; 264:16853-16857.
37. 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.
38. Terpstra AHM, Woodward CJH, Sanchez-Muniz FJ. Improved techniques for the separation of serum lipoproteins by density gradient ultracentrifugation: visualization by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum. *Anal Biochem* 1981; 111:149-157.
39. 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.
40. Jonas A, Kezdy KE, Hefele Wald J. Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs. *J Biol Chem* 1989; 264:4818-4824.
41. Ehrenwald E, Parks JE, Foote RH. Cholesterol efflux from bovine sperm: II. Effect of reducing sperm cholesterol on penetration of zona-free hamster and *in vitro* matured bovine ova. *Gamete Res* 1988; 20: 413-420.
42. 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.
43. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
44. Davis BK. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch Androl* 1980; 5:249-254.
45. Davis BK. Uterine fluid proteins bind sperm cholesterol during capacitation in the rabbit. *Experientia* 1982; 38:1063-1064.
46. 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.
47. Gerena RL, Killian GJ. Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *J Exp Zool* 1990; 256: 113-120.
48. Handrow R, Lenz RW, Ax RL. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107:1326-1332.
49. Lenz RW, Ball GD, Lohse JK, First NL, Ax RL. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidence by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* 1983; 28:683-690.
50. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology* 1985; 24:537-549.
51. Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity TL. Interaction of plasma lipoproteins containing apolipoproteins B and E with heparin and cell surface receptors. *Biochim Biophys Acta* 1979; 575:81-91.

52. Handrow RR, Boehm SK, Lenz RW, Robinson JA, Ax RL. Specific binding of the glycosaminoglycan 3H-heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa in vitro. *J Androl* 1984; 5:51-63.
53. Florman H, First NL. The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev Biol* 1988; 128:453-463.
54. 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.
55. Handrow RR, Parrish JJ, First NL. Heparin stimulates calcium uptake by bovine sperm in vitro. *J Androl* 1986; 7:23.
56. Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane. (Review). *Biochim Biophys Acta* 1985; 822:267-287.
57. Clark EN, Corron ME, Florman HM. Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida. *J Biol Chem* 1993; 268:5309-5316.
58. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 1989; 40:1020-1025.
59. McNutt TL, Killian GJ. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J Androl* 1991; 12:244-252.
60. Boice ML, Geisert RD, Blair RM, Verhage HG. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol Reprod* 1990; 43:457-465.
61. Wegner CC, Killian GJ. Origin of oestrus-associated glycoproteins in bovine oviductal fluid. *J Reprod Fertil* 1992; 95:841-854.
62. King RS, Anderson SH, Killian GJ. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* 1994; 15:468-478.
63. Davis BK, Byrne R, Hungund B. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1979; 558:257-266.
64. Moubasher AED, Wolf DP. The effect of exogenous cholesterol on human sperm function in vitro. *J Androl* 1986; 7:22 (abstract).
65. Ravnik SE, Zarutskie PW, Muller CH. Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation. *Biol Reprod* 1992; 47:1126-1133.
66. Ravnik SE, Albers JJ, Muller CH. Stimulation of human sperm capacitation by purified lipid transfer protein. *J Exp Zool* 1995; 272:78-83.

- 2.4. MAJOR PROTEINS OF BOVINE SEMINAL PLASMA AND HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN INDUCE CHOLESTEROL EFFLUX FROM EPIDIDYMAL SPERM. I. Thérien, R. Moreau, and P. Manjunath. *Biology of Reproduction*, **59**, 768-776, 1998.

Préambule:

Après avoir démontré que les protéines BSP accélèrent la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins induite par l'héparine et les HDL, nous nous sommes intéressés à analyser l'effet des protéines BSP et des facteurs capacitants sur l'efflux de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes afin de mieux comprendre les mécanismes d'actions des protéines BSP dans la capacitation. Des études précédentes ont démontré que l'efflux de cholestérol de la membrane capacite les spermatozoïdes bovins et prédispose les spermatozoïdes à pénétrer les oocytes à un taux plus élevé que les spermatozoïdes dont le niveau de cholestérol membranaire n'a pas été réduit. Dans cet article, nous démontrons que lorsque les spermatozoïdes épидидymaires bovins sont incubés en présence du plasma séminal bovin ou des protéines BSP, les spermatozoïdes perdent de leur cholestérol membranaire. L'analyse des particules d'efflux obtenues suite à l'incubation des spermatozoïdes en présence des protéines BSP nous a permis de montrer que les particules d'efflux obtenues sont des particules homogènes qui contiennent des protéines BSP associées au cholestérol. De plus, nous montrons que l'héparine seule ne peut pas stimuler l'efflux de cholestérol des spermatozoïdes contrairement aux HDL qui peuvent stimuler l'efflux du cholestérol. Nous montrons également que lorsque les spermatozoïdes épидидymaires sont pré-incubés avec les protéines BSP-A1/-A2 avant l'incubation avec les HDL, l'efflux de cholestérol total des spermatozoïdes est plus élevé que lorsque les HDL seules sont utilisées. Ces résultats indiquent que les protéines BSP et les HDL semblent jouer un rôle important au niveau de l'efflux du cholestérol lors de la capacitation contrairement à l'héparine qui ne stimule aucunement l'efflux de cholestérol des spermatozoïdes.

Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein Induce Cholesterol Efflux from Epididymal Sperm¹

I. Thérien, R. Moreau, and P. Manjunath²

Department of Medicine, University of Montreal, and Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

ABSTRACT

One of the hypotheses to explain the mechanism of capacitation involves the loss of sperm membrane cholesterol. Here, we studied whether or not the major proteins of bovine seminal plasma designated as BSP-A1, -A2, -A3, and -30-kDa (collectively called BSP proteins), which are implicated in sperm capacitation, induce cholesterol efflux. When epididymal sperm were labeled with [³H]cholesterol and incubated with bovine seminal plasma (0.05–2%) or BSP proteins (20–120 µg/ml) for 8 h, the sperm lost [³H]cholesterol (3.6-fold and 3-fold, respectively). The same results in the presence of BSP-A1/-A2 were obtained (3.5-fold) by direct determination of cholesterol on unlabeled epididymal sperm. Analysis of efflux particles by ultracentrifugation on a sucrose gradient revealed a single symmetrical peak of radioactivity at 1.14 g/ml. Immunoblotting of the fractions obtained from size-exclusion chromatography of the efflux particles showed that a portion of the BSP proteins were associated with [³H]cholesterol. Heparin (12 µg/ml) alone did not stimulate cholesterol efflux. In contrast, high-density lipoprotein (HDL, 100 µg/ml) alone stimulated cholesterol efflux up to 3.1-fold after 8 h. When labeled epididymal sperm were preincubated for 20 min with BSP-A1/-A2 (120 µg/ml), washed, and incubated with HDL (100 µg/ml) for 8 h, the total cholesterol efflux of the sperm suspension was $51.8 \pm 5.0\%$ compared to $39.3 \pm 1.2\%$ when HDL alone was used. These results indicate that BSP proteins and HDL play an important role in the sperm sterol efflux that occurs during capacitation. Furthermore, the heparin-induced sperm capacitation did not involve the efflux of sperm membrane cholesterol.

INTRODUCTION

During their transit through the female genital tract, mammalian sperm must undergo the process of capacitation and the acrosome reaction (AR) before fertilization of the ovum [1–3]. Sperm capacitation is a multistep process that is not well understood and that involves several biochemical and ultrastructural changes in the sperm membrane (for review see [4]). Many studies have shown that sperm capacitation is accompanied by a change in the lipid composition of the sperm plasma membrane. More specifically, capacitation involves a decrease in the membrane cholesterol:phospholipid ratio [5]. These changes appear to be a reversible phenomenon that influences the fluidity and ionic permeability of the sperm membrane [6–8]. Cholesterol is the major free sterol in ejaculated bovine sperm [9]. Several studies have demonstrated that cholesterol influx reduces the rate of spontaneous AR [10, 11] and also inhibits fer-

tilization (inhibits or delays capacitation) in many species including the rabbit [12], rat [13], mouse [14], guinea pig [11], human [15], and bovine [16, 17]. The influx of cholesterol also reverses capacitation of sperm: indeed, vesicles from rabbit seminal plasma containing cholesterol and liposomes containing cholesterol render capacitated sperm incapable of fertilizing eggs *in vivo* [18]. On the other hand, Ehrenwald et al. [16, 17] have shown that the efflux of membrane cholesterol leads to bovine sperm capacitation and predisposes the sperm to penetrate ova at a higher rate than those sperm without reduced cholesterol levels. Recently, Zarintash and Cross [19] have shown that as human sperm lose their unesterified cholesterol they become responsive to progesterone (progesterone induces the AR in human sperm).

The net cholesterol efflux that is observed during capacitation is affected by the capacity of the medium to bind cholesterol. Several lines of evidence indicate that there are components in the female genital tract that facilitate this efflux of cholesterol. Many studies have shown that albumin [13, 14, 20, 21] and high-density lipoprotein (HDL) [22, 23] are acceptors of cholesterol. HDL, the only class of lipoprotein present in bovine and human oviductal and follicular fluid, appears to be a more efficient acceptor of cholesterol than albumin [22–25]. Therefore, HDL appears to play an important role in the sperm sterol modification that occurs during an early step of capacitation.

Bovine seminal plasma contains a family of closely related major proteins designated as BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa (collectively called BSP proteins). These BSP proteins are secretory products of seminal vesicles; they bind to sperm upon ejaculation and play a role in capacitation [26–30]. BSP-A1, -A2, and -A3 have molecular masses of 15–16.5 kDa, whereas BSP-30-kDa has a molecular mass of 28–30 kDa [29]. BSP-A1 and BSP-A2 are considered to be a single chemical entity named BSP-A1/-A2 (also called gonadostatin or PDC-109) [31] since they have an identical amino acid sequence but differ only in their degree of glycosylation. Upon ejaculation, the BSP proteins interact with the choline phospholipids on the sperm membrane [32]. These BSP proteins also bind to heparin, a glycosaminoglycan also implicated in capacitation [33], and to apolipoprotein A-I in free form or associated with HDL [29, 34, 35]. Recently, we have shown that the BSP proteins accelerate the capacitation of bovine epididymal sperm induced by heparin and HDL [36, 37]. In order to gain further insight into the mechanisms of sperm capacitation mediated by BSP proteins and capacitating factors (heparin and HDL), we investigated whether or not these factors stimulate cholesterol efflux from the plasma membrane of sperm during capacitation. The results showed that the BSP proteins and HDL play an important role in the efflux of cholesterol that occurs during capacitation.

Accepted May 11, 1998.

Received March 9, 1998.

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

²Correspondence: P. Manjunath, Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boul. de l'Assomption, Montréal, PQ, Canada H1T 2M4. FAX: (514) 252-3430; e-mail: [REDACTED]

MATERIALS AND METHODS

Materials

BSA (fraction V fatty acid-free), taurine, L-epinephrine, erythrosin B, flavianic acid (naphthol), heparin (purified from porcine intestinal mucosa), and lysophosphatidylcholine (lyso-PC; purified from egg yolk) were from Sigma (St. Louis, MO); penicillin G and streptomycin sulfate were from Gibco (Burlington, ON, Canada); [^3H]cholesterol was from DuPont Canada (Mississauga, ON, Canada); transferrin was from Boehringer Mannheim (Laval, PQ, Canada); and Sepharose CL-4B was purchased from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). All other chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

Bovine testes and epididymides were obtained from Abattoir Les Cèdres (St-Lazare, PQ, Canada), and freshly ejaculated bovine semen collected with an artificial vagina was obtained from the Centre d'Insémination Artificielle du Québec (St-Hyacinthe, PQ, Canada). The semen was centrifuged at $5000 \times g$ for 10 min, and the seminal plasma was aspirated and then re-centrifuged at $10\,000 \times g$ for 15 min before the supernatant was used or for further purification of BSP proteins. BSP-A1/-A2, -A3, and -30-kDa were isolated using gelatin-agarose affinity chromatography [28]. The adsorbed fractions were eluted and resolved on Sephadex G-75 and G-200 columns under conditions described previously [27]. The purity of the BSP proteins was confirmed by SDS-PAGE.

Separation of HDL

HDL was isolated from human serum by density gradient ultracentrifugation [37]. The purity of the HDL was assessed by the Lipo-Gel kit following the manufacturer's instructions (Beckman Instruments, Fullerton, CA).

Sperm Labeling and Cholesterol Efflux

The medium used for washing and incubation of sperm was a modified Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) medium, designated mTALP [36]. Caudal sperm were collected by retroperfusion of the epididymides obtained from four different bulls, pooled, and washed 3 times ($350 \times g$, 10 min) with 10 vol of mTALP. The sperm were then labeled using the method described by Langlais et al. [23] with minor modifications. At the end of the incubation (conducted at 39°C instead of 37°C), sperm labeled with [^3H]cholesterol were washed 3 times ($350 \times g$, 10 min) and resuspended in 5 ml of medium. The sperm were incubated for 1 h at 39°C under 5% CO_2 for equilibration of the label, centrifuged, and resuspended in medium to obtain 1×10^8 cells/ml. Approximately 50–60% of [^3H]cholesterol was incorporated into sperm and was $< 0.11\%$ of the sperm cholesterol mass. This value is comparable to those reported (60–65%) previously [23]. Studies of sperm cholesterol efflux were done by incubating 500 μl of the labeled sperm suspension with 500 μl of medium alone or 500 μl of medium containing different concentrations of bovine seminal plasma or of BSP proteins. The sperm were then incubated for 8 h at 39°C under 5% CO_2 , during which two samples of 50 μl were withdrawn at different times to determine the percentage of [^3H]cholesterol taken up by the incubation medium. The percentage of [^3H]cholesterol released into the medium was calculated from the radioactivity retrieved in the incubation medium divided by the total radioactivity associated with the sperm in the suspension. In another set of experiments, labeled sperm were incubated in the presence or absence of

BSP-A1/-A2 for 20 min, washed twice ($350 \times g$, 10 min), and incubated for 8 h at 39°C under 5% CO_2 in the presence or absence of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of HDL or 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of heparin. Experiments were done under similar conditions in the presence of BSA and transferrin, which served as control proteins.

Density Gradient Ultracentrifugation

After cholesterol efflux in the presence of 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of BSP proteins (8-h incubation), the incubation medium containing the efflux particles was centrifuged twice ($940 \times g$, 15 min) to remove sperm. The supernatant (1 ml) was applied to a sucrose gradient (1.5 ml of 65% sucrose and 2 ml of 34% sucrose in PBS pH 7.4). The samples were then centrifuged at 50 000 rpm for 24 h at 18°C (rotor AH-650; Sorval Instrument, DuPont, Wilmington, DE). After ultracentrifugation, the samples were fractionated into 225- μl aliquots. The amount of radioactivity present in each fraction was then determined using a beta-counter, and the density was determined by the refractive index measured with a refractometer (ABBE-3L; Milton Roy, Rochester, NY).

Chromatographic Analysis

After cholesterol efflux in the presence of 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of BSP-A1/-A2 (8-h incubation), the incubation medium containing the efflux particles was centrifuged twice ($940 \times g$, 15 min) to remove sperm. The supernatant (1 ml) was applied to a Sepharose CL-4B column (2.5×90 cm) previously washed with 50 mM PBS buffer (pH 7.4). The elution was carried out at a flow rate of 50 ml/h with the same buffer. Fractions of 2.5 ml were collected, and the radioactivity was determined using a beta-counter. One hundred microliters of each fraction was treated with trichloroacetic acid (TCA, final concentration of 15%) to precipitate the proteins, which were then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

SDS-PAGE Analysis and Immunoblotting

SDS-PAGE in 15% polyacrylamide gels was performed as described previously [38]. The gels were then transferred to nitrocellulose membranes as described by Towbin et al. [39], and immunodetection using affinity-purified polyclonal antibodies against BSP-A1/-A2 was done as previously described [40] by using an enhanced chemiluminescence reagent kit (Mandel Scientific, Guelph, ON, Canada) for detection.

Determination of Sperm Cholesterol

Washed unlabeled epididymal sperm (final concentration of 5×10^7 cells/ml) were incubated for 8 h in the presence or absence of 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of BSP-A1/-A2. After incubation, the sperm suspension was centrifuged ($940 \times g$, 15 min) to remove the supernatant, which contained the efflux particles. Then the sperm pellet was incubated for 20 min with 200 mM of choline in mTALP to release BSP-A1/-A2 bound to sperm in order to prevent interference with the lipid extraction. After incubation, sperm lipids were extracted using chloroform/methanol (2:1) [41]. After evaporation of solvent with N_2 , the lipids were resuspended in isopropanol, and the amount of cholesterol was determined using the cholesterol determination kit (Boehringer Mannheim; cat. no. 139 050) and following the protocol described by the manufacturer.

Sperm Capacitation and AR

To determine the number of capacitated sperm after the efflux studies, lyso-PC was added at 100 $\mu\text{g/ml}$, and the sperm were reincubated for an additional 15 min. This concentration of lyso-PC was previously shown to induce the

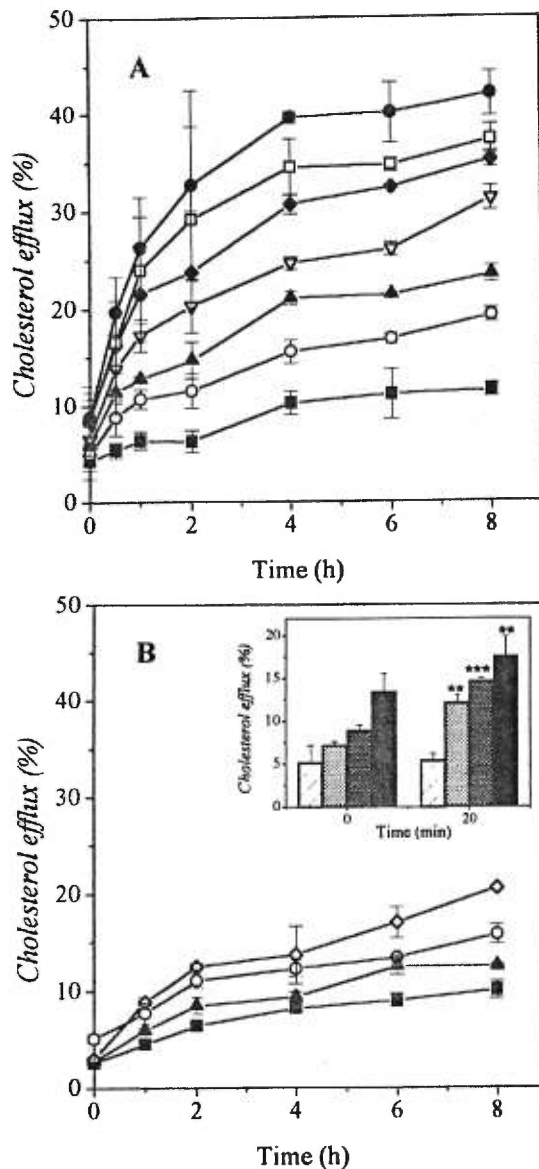


FIG. 1. Cholesterol efflux from bovine epididymal sperm in the presence of seminal plasma. **A**) Labeled (^3H)cholesterol epididymal sperm were incubated for 8 h with bovine seminal plasma or culture medium: 0% (control; solid squares); 0.05% (open circles); 0.1% (solid triangles); 0.25% (inverted triangles); 0.5% (diamonds); 1% (open squares), and 2% (solid circles) seminal plasma. The cholesterol efflux in the presence of more than 0.1% of bovine seminal plasma was significantly different from control ($p < 0.05$). **B**) Labeled (^3H)cholesterol epididymal sperm were incubated for 20 min with bovine seminal plasma (inset: 0%, white [control, culture medium only]; 0.5%, light gray; 2%, gray; 25%, black), washed twice ($350 \times g$, 10 min), and incubated with culture medium for 8 h. 0% (control, squares); 0.5% (circles); 2% (triangles), and 25% (diamonds). The percentage of cholesterol efflux at each time point was calculated as described in *Materials and Methods*. Results represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. Significant differences vs. control (without seminal plasma, inset): ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$. The cholesterol efflux in the presence of more than 25% of bovine seminal plasma was significantly different from control (without seminal plasma; $p < 0.05$).

AR in capacitated sperm while having no effect on non-capacitated sperm [33]. The lyso-PC-induced AR is a well-characterized method that has been correlated with in vitro fertilization rates and validated by electron micrograph studies [33]. Before 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 [42], and viability was estimated by the viability staining protocol of Dott and Foster [43].

Protein Assay

The protein content of the samples was measured according to the method of Bradford [44] or by weighing freeze-dried 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 covariance analysis or by a Student's *t*-test on paired observations.

RESULTS

Cholesterol Efflux from Bovine Epididymal Sperm in the Presence of Seminal Plasma

To study the sperm cholesterol efflux, spermatozoa were labeled with [^3H]cholesterol, and increasing concentrations of whole bovine seminal plasma were added to the medium. The appearance of cholesterol in the medium was determined at different times (see *Materials and Methods*). As shown in Figure 1A, the whole seminal plasma stimulated sperm cholesterol efflux in a dose-dependent manner. The rate of sperm cholesterol efflux was rapid in the first 2 h and then reached a plateau after 4 h. Whole seminal plasma (2%, 8 h) increased sperm [^3H]cholesterol efflux to $42.0 \pm 2.3\%$ compared to control without seminal plasma ($11.5 \pm 0.7\%$). Since seminal plasma gradually becomes diluted in the female genital tract fluid and those sperm that are in transit through the female genital tract gradually escape from seminal fluid, in the next experiment labeled sperm were preincubated with whole seminal plasma (0.5%, 2%, and 25%), washed twice, and then reincubated for 8 h in culture medium (Fig. 1B). During the first 20 min of incubation with whole seminal plasma, the efflux of [^3H]cholesterol was rapid (Fig. 1B, inset), as observed in the previous experiment (Fig. 1A). When the spermatozoa were washed twice to remove those proteins that were not bound to the sperm membrane and then incubated with protein-free medium, the capacity of whole seminal plasma to stimulate cholesterol efflux decreased (only 20.6% after 8 h using 25% seminal plasma, Fig. 1B). For all of the experiments, the epididymal sperm viability and motility of treated sperm were the same as those observed in the control sample (medium alone; data not shown).

Cholesterol Efflux from Bovine Epididymal Sperm in the Presence of BSP Proteins

The BSP proteins constitute 60–70% of the proteins in bovine seminal plasma; therefore in the next experiment we used purified BSP proteins to verify whether these proteins were responsible for the sperm cholesterol efflux stimulation effect of seminal plasma. When we used increasing

TABLE 1. AR of labeled epididymal sperm incubated 6 h in the presence or absence of purified BSP proteins (120 $\mu\text{g/ml}$).

Treatments ^a	AR (%) ^{b,c}
Medium alone	15.1 \pm 0.4
BSP-A1/-A2	33.8 \pm 1.4
BSP-A3	38.5 \pm 0.3
BSP-30-kDa	33.5 \pm 0.5

^a Labeled epididymal sperm were incubated for 6 h in the presence or absence of purified BSP proteins before lyso-PC was added to induce the AR.

^b Results represent the mean \pm SEM of two independent experiments that included three samples per experiment and in which 200 sperm were assayed per sample.

^c Increases of AR stimulation by purified BSP proteins are significant vs. control sample (without BSP proteins, $p < 0.001$).

concentrations of BSP proteins, we obtained approximately the same stimulation of cholesterol efflux (Fig. 2) as found with bovine seminal plasma. The efflux of sperm [³H]cholesterol was rapid during the first 2 h and then reached a plateau. BSP-A1/-A2 stimulated the efflux of sperm cholesterol in a dose-dependent manner, with a maximum stimulation of $32.4 \pm 1.3\%$ when 120 $\mu\text{g/ml}$ of protein were used. This concentration of proteins corresponds to the quantity of BSP proteins present in 0.25–0.5% of bovine seminal plasma. Similar results were obtained with BSP-30-kDa and BSP-A3 (Fig. 2B). The efflux curve obtained in the presence of BSP-A3 was slightly different from that obtained with BSP-A1/-A2 and BSP-30-kDa. However, after 8 h, each purified BSP protein provided a similar percentage of cholesterol efflux. After 6 h of incubation, an aliquot of labeled sperm suspension of the control sample as well as that incubated with purified BSP proteins was taken to evaluate sperm capacitation (Table 1). After a 6-h incubation, all the purified BSP proteins stimulated the AR of labeled sperm (33.5% to 38.5%) compared to control ($15.1 \pm 0.4\%$). Lyso-PC, which induces the AR only in capacitated sperm, was used as an indirect method to measure sperm capacitation (see *Materials and Methods*). Therefore, the AR in the present context is meant to reflect capacitation rather than the AR.

Density Gradient Ultracentrifugation Analysis

To analyze the lipid efflux particles generated in the presence of BSP proteins, labeled sperm were incubated for 8 h in the presence or absence of purified BSP proteins. The incubation medium containing the efflux particles was subjected to sucrose gradient ultracentrifugation. In the presence of purified BSP proteins, we observed a single symmetrical peak of radioactivity at 1.14 g/ml (Fig. 3, B–D).

Chromatographic Analysis of the Efflux Particle

To verify whether the efflux particles contained BSP proteins associated with [³H]cholesterol, chromatographic analysis, SDS-PAGE analysis, and immunoblotting were used. After cholesterol efflux in the presence of BSP-A1/-A2 (more abundant BSP proteins), the incubation medium containing the efflux particles was chromatographed on a Sepharose CL-4B column (Fig. 4A). A single peak of radioactivity was obtained (fractions 12–20), and a single detectable peak of protein that corresponded to the BSA present in the medium was also obtained (fractions 59–67). The proteins of each fraction were analyzed by immunoblotting

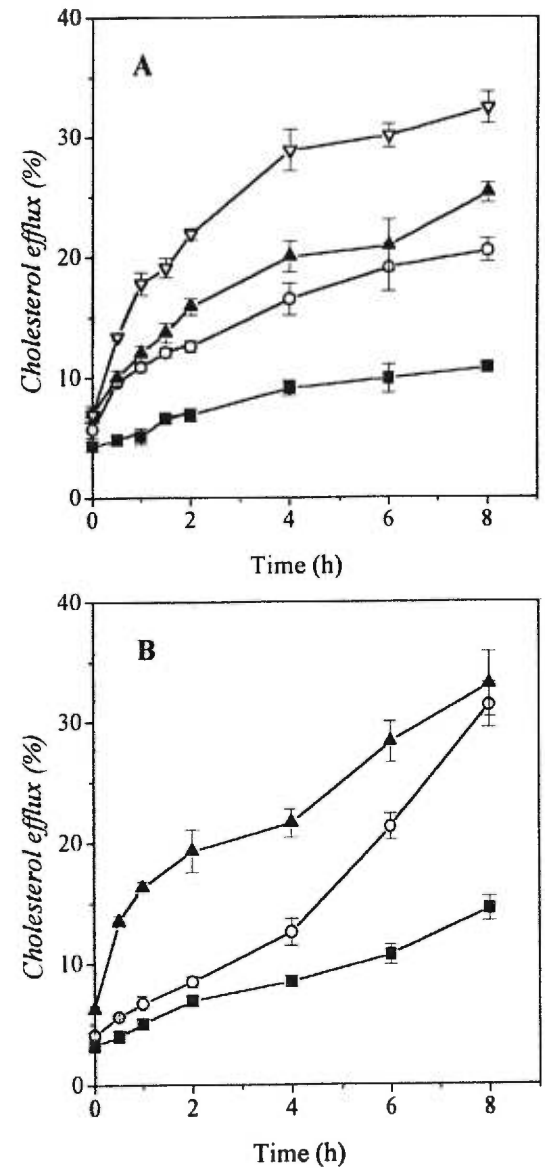


FIG. 2. Cholesterol efflux from bovine epididymal sperm in the presence of BSP proteins. The same protocol was used as described in Figure 1A using purified BSP proteins instead of seminal plasma. **A**) BSP-A1/-A2 (20 $\mu\text{g/ml}$, circles, 40 $\mu\text{g/ml}$, solid triangles and 120 $\mu\text{g/ml}$, inverted triangles) or culture medium (control, squares). **B**) BSP-A3 (120 $\mu\text{g/ml}$, circles) and BSP-30-kDa (120 $\mu\text{g/ml}$, triangles) or culture medium (control, squares). Results represent the mean \pm SEM of three (A) or two (B) independent experiments performed in triplicate. The cholesterol efflux in the presence of more than 20 $\mu\text{g/ml}$ of BSP-A1/-A2 or in the presence of BSP-A3 (120 $\mu\text{g/ml}$) or BSP-30 kDa (120 $\mu\text{g/ml}$) was significantly different from control (without BSP proteins, $p < 0.025$).

using affinity-purified antibody against BSP-A1/-A2 (Fig. 4B). The results showed that a portion of BSP-A1/-A2 was detected in fraction 14, and the major part was detected in fractions 54–75.

Cholesterol Efflux from Unlabeled Epididymal Sperm With or Without BSP Proteins

To confirm whether BSP proteins specifically remove sperm cholesterol, washed epididymal sperm that were not labeled with cholesterol were incubated for 8 h with or without BSP-A1/-A2. Before the incubation, a fraction was taken to determine the amount of cholesterol present in epididymal

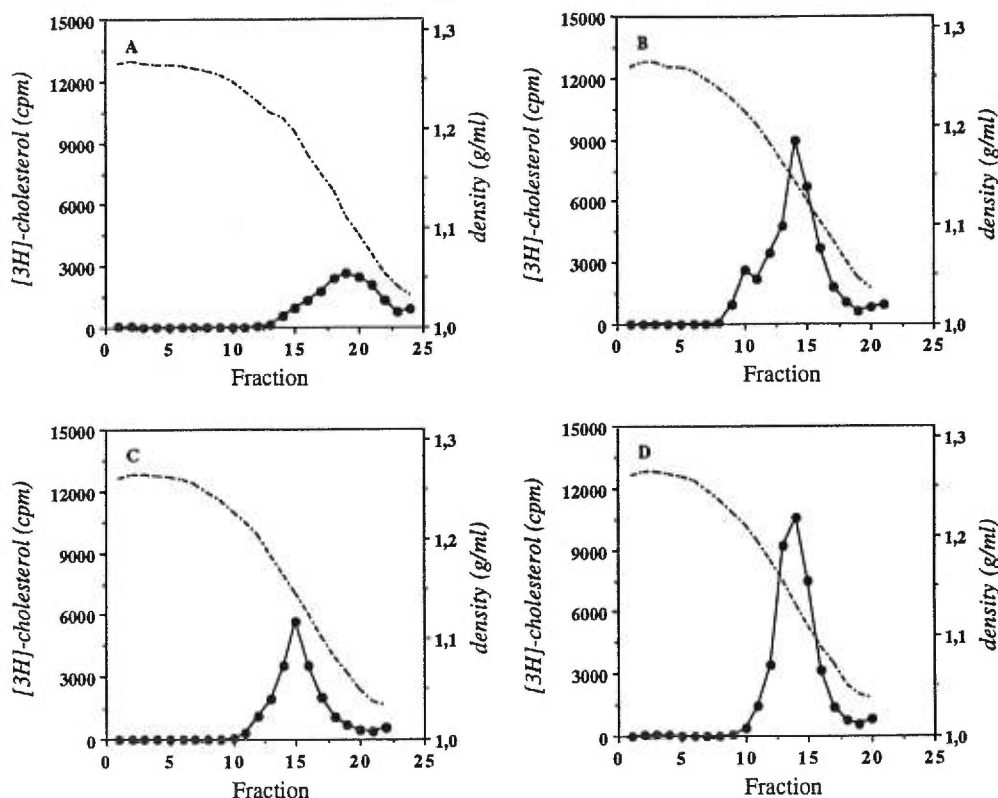


FIG. 3. Analysis by density gradient ultracentrifugation of lipid particles recovered in the incubation medium after [^3H]cholesterol efflux in the presence of BSP proteins. Labeled (^3H)cholesterol epididymal sperm were incubated for 8 h with 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of purified BSP proteins BSP-A1/-A2 (B), BSP-A3 (C), and BSP-30-kDa (D), or with culture medium (control, A). After incubation, the samples were centrifuged twice ($940 \times g$, 15 min). An aliquot (1 ml) of each supernatant was analyzed by sucrose density gradient ultracentrifugation. The samples were fractionated (225 μl), and the radioactivity in each fraction was determined. The density was determined on the basis of the refractive index.

sperm ($246.1 \pm 16.0 \mu\text{g}$ cholesterol/ 1×10^9 sperm). After incubation with or without BSP-A1/-A2, spermatozoa were centrifuged and incubated with choline to release any BSP-A1/-A2 bound to sperm (to prevent interference with subsequent lipid extraction), and sperm cholesterol was extracted and quantified. After 8 h of incubation, spermatozoa that were incubated with BSP-A1/-A2 lost 19.1% of their cholesterol compared to spermatozoa that were incubated with medium alone, which lost only 5.4% (Table 2).

Cholesterol Efflux from Bovine Epididymal Sperm in the Presence of BSP-A1/-A2 and Capacitating Agents

Several studies have shown that the HDL present in the female reproductive tract can facilitate the sperm chole-

sterol efflux that occurs during capacitation [22, 23]. Heparin is another important factor that is also implicated in bovine sperm capacitation [33, 36]. In the next experiment, we investigated whether or not these capacitating factors could stimulate sperm cholesterol efflux in the presence or absence of BSP-A1/-A2. For these experiments, labeled sperm were preincubated with BSP-A1/-A2 or medium alone for 20 min. This period of time is sufficient for maximum binding of BSP-A1/-A2 to the sperm membrane [45, 46]. During the first 20 min, BSP-A1/-A2 stimulated cholesterol efflux ($17.3 \pm 4.0\%$ compared to the control $6.9 \pm 0.6\%$, Fig. 5A, inset). After this preincubation, sperm were washed twice and then incubated with heparin or HDL for 8 h. After washing, which removed the proteins that were not bound to sperm, bound BSP-A1/-A2 stimulated the cholesterol efflux only weakly (Fig. 5, A and B). Likewise, heparin alone or preincubated in the presence of BSP-A1/-A2 did not stimulate sperm cholesterol efflux (Fig. 5A). On the other hand, HDL alone continuously stimulated the cholesterol efflux; no plateau was reached even after 8 h of incubation ($32.4 \pm 0.6\%$ cholesterol efflux, Fig. 5B). The efficiency of HDL in promoting cholesterol efflux was similar from sperm preincubated with or without BSP-A1/-A2. However, the total cholesterol efflux of the sperm suspension (20 min + 8 h) was more substantial in the presence of BSP-A1/-A2 and HDL ($51.8 \pm 5.0\%$) than of HDL alone ($39.3 \pm 1.2\%$).

The medium, mTALP, used in each treatment contained 0.6% BSA (6 mg/ml); this concentration of BSA barely stimulated sperm cholesterol efflux (Figs. 1, 2, and 5, control medium alone). When higher concentrations of BSA

TABLE 2. Cholesterol content of epididymal sperm before and after 8-h incubation with BSP-A1/-A2.

Treatments ^a	Cholesterol/ 1×10^9 sperm ^{b,c} (μg)	Cholesterol loss (%)
Epididymal sperm (no treatment)	246.1 ± 16.0	—
Epididymal sperm incubated with medium alone	232.8 ± 14.4	5.4
Epididymal sperm incubated with BSP-A1/-A2 (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	199.2 ± 7.5	19.1

^a Unlabeled epididymal sperm were incubated for 8 h in the presence or absence of BSP-A1/A2 before determination of sperm cholesterol.

^b Results represent the mean \pm SEM of two independent experiments that included two samples per experiment.

^c Decreases of sperm cholesterol content obtained in the presence of BSP-A1/-A2 are significant vs. epididymal sperm not incubated ($p < 0.05$).

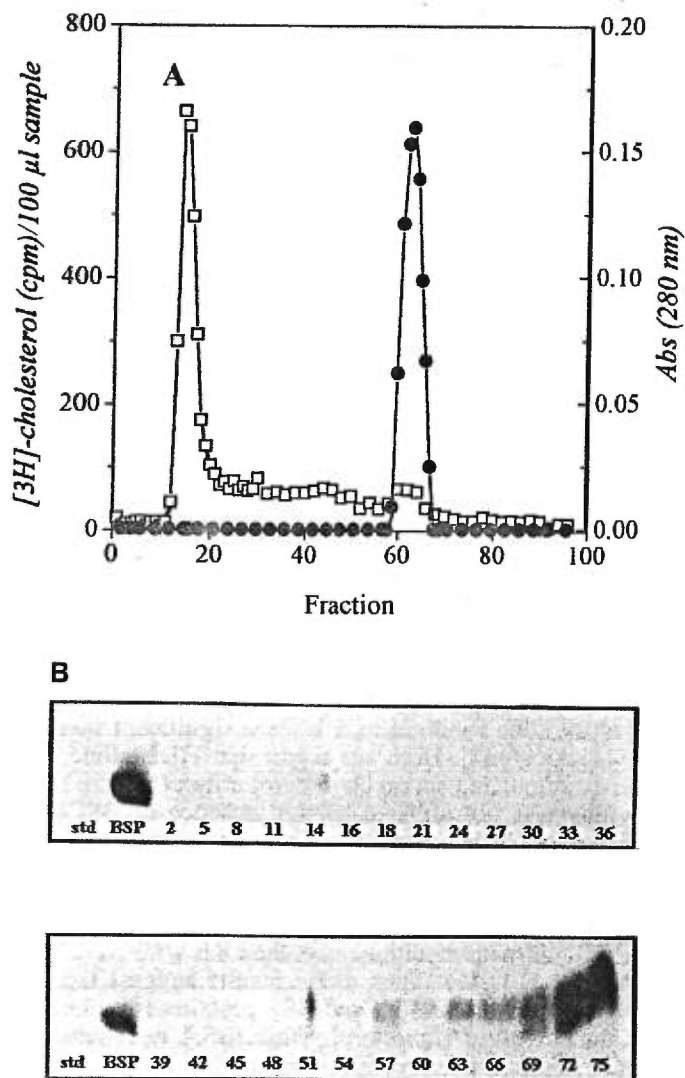


FIG. 4. Chromatographic analysis of the efflux particles. Labeled (^3H)cholesterol epididymal sperm were incubated for 8 h with 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of purified BSP-A1/-A2. Then the incubation medium containing the efflux particles was centrifuged to remove spermatozoa. The supernatant (1 ml) was applied to a Sepharose CL-4B column. After 60 min, fractions of 2.5 ml were collected, and the absorbance (280 nm, circles) and the radioactivity (using a beta-counter, squares) were determined (A). One hundred microliters of certain fractions were treated with 15% TCA to precipitate the proteins, which were then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting (B).

were used (20 and 50 mg/ml), the efflux of cholesterol did not exceed $16.2 \pm 1.1\%$ after 8 h (data not shown). As a protein control, transferrin was also tested for the stimulation of cholesterol efflux. The maximal cholesterol efflux value obtained in the presence of transferrin (data not shown) was not significantly different from control (medium alone).

DISCUSSION

In mammals, loss of sperm cholesterol during capacitation has been demonstrated to occur in many species including cattle, rabbit, mouse, and human [14, 16, 22, 23]. The magnitude of net cholesterol efflux is affected by the cholesterol-binding capacity of those components present in the follicular and oviductal fluids (HDL and BSA) [13, 14, 21-23]. The present results confirm that HDL facilitates the efflux of sperm cholesterol, but we also demonstrated

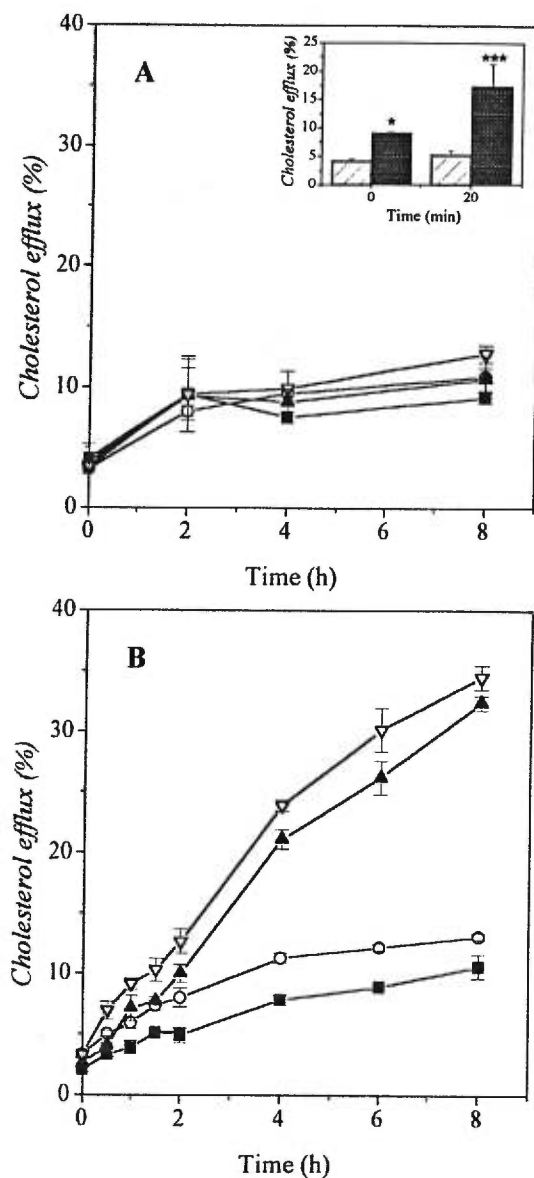


FIG. 5. Cholesterol efflux from bovine epididymal sperm in the presence of BSP-A1/-A2 and capacitating agents. Labeled (^3H)cholesterol epididymal sperm were incubated for 20 min with 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of BSP-A1/-A2 (inset: black) or culture medium (inset: control, white), washed twice ($350 \times g$, 10 min), and incubated for 8 h with or without heparin (A) or HDL (B). A) Medium alone (control, squares); BSP-A1/-A2 alone (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, circles); heparin alone (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, solid triangles), and BSP-A1/-A2 (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and heparin (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inverted triangles). Significant differences vs. control (without BSP-A1/-A2, inset: $*p < 0.05$; $***p < 0.005$). No significant difference vs. control (medium alone) were observed. B) Medium alone (control, squares); BSP-A1/-A2 alone (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, circles); HDL alone (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, solid triangles), and BSP-A1/-A2 (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and HDL (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inverted triangles). Results represent the mean \pm SEM of two (A) or three (B) independent experiments performed in triplicate. The cholesterol efflux in the presence of HDL alone or in the presence of HDL and BSP-A1/-A2 was significantly different vs. control (medium alone; $p < 0.005$).

for the first time that the BSP proteins stimulate cholesterol efflux from the bovine sperm membranes. At the higher concentration of whole bovine seminal plasma used (2%, 8 h), $42.0 \pm 2.3\%$ of sperm ^3H cholesterol was removed from the sperm compared to control ($11.5 \pm 0.7\%$; Fig. 1A). Our results also indicate that the BSP proteins are responsible for this efflux stimulation (Fig. 2 and Table 2). The cholesterol efflux mediated by BSP proteins (120 $\mu\text{g}/$

ml) and 0.25–0.5% of whole seminal plasma (which contains approximately the same amount of BSP proteins) after 8 h were similar (31–35%, Figs. 1A and 2). The efflux curves obtained in the presence of whole seminal plasma and BSP proteins were also similar; the rate of cholesterol efflux was rapid in the first 2 h and then reached a plateau after 4 h. Comparable results were obtained when we preincubated the sperm for 20 min with whole seminal plasma or with BSP proteins, washed twice and then incubated with medium alone. In these experiments, the whole seminal plasma and the BSP proteins stimulated the cholesterol efflux only weakly when sperm were washed, i.e., when whole seminal plasma or BSP proteins in the media were removed (Fig. 1B and Fig. 5). All of these results confirm that the BSP proteins are the major elements of bovine seminal plasma responsible for the stimulation of sperm cholesterol efflux.

The efflux particles obtained in the presence of BSP proteins were homogeneous particles with a density comparable to that of HDL [22] (Fig. 3). These particles contained BSP proteins associated with [³H]cholesterol (Fig. 4). Therefore, the BSP proteins can form a complex with cholesterol, but only a small portion of BSP proteins participated in the formation of the efflux particles. A previous study has shown that BSP proteins cannot bind to immobilized cholesterol [32]. However, we [27] and others [47] have reported that the BSP proteins form aggregates (60 000–150 000 daltons). These aggregates may exhibit hydrophobic cavities in which cholesterol could be trapped. Further studies are required to characterize the nature of the efflux particles and to determine the proportion of BSP proteins and cholesterol present in the efflux particles.

To evaluate unambiguously that BSP proteins stimulate cholesterol efflux, we used two different methods: labeled sperm with [³H]cholesterol (Fig. 2) and direct determination of the amount of sperm cholesterol before and after incubation with BSP-A1/-A2 (Table 2). Labeled sperm incubated for 8 h in the presence of 120 µg/ml of BSP-A1/-A2 stimulated up to $32.4 \pm 1.3\%$ of cholesterol efflux compared to the control sample (medium alone, $10.8 \pm 0.4\%$). By direct determination of sperm cholesterol, those sperm that were incubated with BSP-A1/-A2 lost 19.1% of their cholesterol compared to control (5.4%). The percentage of cholesterol efflux obtained with labeled sperm was higher than that of direct determination. However, when we compared the amount of cholesterol efflux induced by BSP-A1/-A2 to that found in the control sample, the two methods provided similar results: a 3-fold stimulation in the presence of BSP-A1/-A2 compared to control when labeled sperm were used, and a stimulation of 3.5-fold compared to the control when direct determination of sperm cholesterol was used.

Our previous results [37] have shown that bovine epididymal sperm incubated for 20 min with BSP-A1/-A2, washed twice, and then incubated for 8 h with medium alone did not capacitate sperm. In the present study, when we performed similar experiments and determined cholesterol efflux, we observed that during the first 20 min, BSP-A1/-A2 stimulated cholesterol efflux ($17.3 \pm 4.0\%$, Fig. 5A, inset). This result indicates that the cholesterol efflux that occurred during the 20 min of incubation with BSP-A1/-A2 was probably not sufficient to stimulate sperm capacitation, but continuous exposure of sperm to BSP proteins led to 30–33% of cholesterol efflux, and this resulted in a 2-fold higher capacitation than that observed in the control sample (Table 1). Therefore, BSP proteins alone

would appear to be sufficient to capacitate bovine epididymal sperm when incubated with them for longer periods, but this situation is not physiological, since seminal plasma that contains BSP proteins is gradually diluted and lost during sperm transit through the female genital tract [48].

The environment of the female genital tract provides conditions that also promote efflux of cholesterol from the sperm membrane. In the bovine species, HDL, probably derived from plasma, is the only class of lipoprotein present in follicular and oviductal fluids [22, 24, 25]. Oviductal HDL is elevated during the estrous period and remains low throughout the rest of the estrous cycle [7]. Compared to plasma HDL, follicular fluid HDL contains a higher proportion of pre- β -HDL [25], which has been demonstrated to play a major role as first cholesterol acceptor [49, 50]. Our previous studies have shown that BSP proteins stimulate epididymal sperm capacitation induced by heparin and HDL [36, 37]. In these studies, epididymal sperm incubated for 20 min with BSP proteins, washed twice, and incubated for 5 h with heparin capacitated 2- to 3-fold more spermatozoa compared to control without incubation with BSP proteins [36]. When HDL was used instead of heparin, HDL alone stimulated capacitation of epididymal sperm after 8 h, but the preincubation with BSP proteins (20 min) increased the percentage of sperm capacitation and decreased the time required to 5 h for a significant increase in capacitation [37]. Here, we report that HDL alone continuously stimulated sperm cholesterol efflux (Fig. 5B), and this efflux was not affected by the presence of BSP-A1/-A2. Therefore, HDL and BSP-A1/-A2 probably stimulate cholesterol efflux independently. However, the total sperm cholesterol efflux was higher in the presence of BSP-A1/-A2 (20 min) and HDL (8 h, $51.8 \pm 5.0\%$) than when HDL alone (20 min with medium alone, then 8 h with HDL) was used ($39.3 \pm 1.2\%$). Thus, these results suggest that the mechanism by which HDL and BSP proteins stimulate capacitation involves cholesterol efflux. BSA represents the second cholesterol acceptor present in the bovine female genital tract, and it constitutes more than 90% of the total oviductal fluid protein [22]. The concentration of albumin in oviductal fluid changes during the estrous cycle and varies between 6.2 and 19.2 mg/ml [22]. Our results with BSA confirm the result obtained previously by Ehrenwald et al. [22] that HDL is the most efficient acceptor of cholesterol in oviductal fluid.

When heparin was used instead of HDL, heparin in the presence or absence of BSP-A1/-A2 did not stimulate sperm cholesterol efflux (Fig. 5A). These results confirm that the capacitation induced by heparin in the presence of BSP proteins proceeds by a different mechanism than that mediated by HDL alone or BSP proteins alone. The mechanism underlying the heparin-induced capacitation is unknown. Handrow et al. [51] have shown that heparin binds to bull sperm in a typical receptor-ligand interaction. Heparin stimulates the uptake of Ca^{2+} and an intracellular alkalization of bovine sperm [52, 53]. Moreover, recent studies have shown that heparin-induced bovine sperm capacitation is associated with an increase in protein phosphorylation [54]. Further work is required to determine whether or not the BSP proteins play a role in the protein phosphorylation events that are reported to occur during capacitation.

We showed that BSP proteins interact with HDL [35]. We also showed that BSP proteins bind to choline phospholipids of the sperm membrane [32]. On the basis of these results, we previously postulated that after ejacula-

tion, BSP proteins coat the sperm membrane and that sperm-bound BSP proteins interact with HDL, resulting in sequestration of phospholipids and cholesterol. This would result in the modification of the sperm membrane lipid composition (decrease in cholesterol/phospholipid ratio) or capacitation. In view of the current results, we now propose a modified mechanism for sperm capacitation. After ejaculation of the spermatozoa and a brief exposure (about 20–30 min) to seminal fluid (BSP proteins), there is a small but significant cholesterol efflux. At the same time, sperm are coated with BSP proteins. The first cholesterol efflux induced by the BSP proteins may slightly destabilize the sperm membrane. This binding of the BSP proteins may induce a reorganization of the membrane, which could result in the appearance of new receptors (for heparin-like glycosaminoglycan or HDL) at the sperm surface. The sperm, which are now coated with BSP proteins, then travel through the female genital tract, where they may be capacitated by two different mechanisms. 1) In heparin-induced capacitation, the binding of BSP proteins to the sperm membrane increases the number of heparin-binding sites on the sperm surface. Heparin binds to these sites and induces capacitation. Indeed, bovine epididymal sperm have few binding sites for heparin and are unable to undergo capacitation within the same time period as ejaculated sperm exposed to heparin [55, 56]. However, a 20-min exposure of epididymal sperm to seminal plasma reduces the time required for heparin-induced capacitation to 4 h [56, 57]. This stimulatory effect is due to a group of heparin-binding proteins (14–18-, 24-, and 31-kDa) that are the same as BSP proteins [34, 36, 56]. 2) Alternatively, in HDL-induced capacitation, BSP protein-coated sperm could interact with HDL, which could stimulate the second sperm cholesterol efflux in the female genital tract. This may result in a further decrease in the cholesterol:phospholipid ratio, leading to capacitation. Since cholesterol is recognized to have a stabilizing effect on membranes [58], its efflux would be expected to provoke further reorganization or destabilization of the membrane. This could regulate the surface expression of sperm zona pellucida receptors [20]. The adhesion to the zona pellucida would then trigger the AR.

In summary, we have found for the first time that the BSP proteins and HDL stimulate epididymal sperm cholesterol efflux. The efflux of sperm cholesterol appears to occur at two levels. The first efflux is mediated by BSP proteins during ejaculation when sperm are exposed to seminal fluid for a brief period; the second efflux, which appears to be more significant, is mediated by HDL in the female genital tract. These two events complete sperm capacitation. Our results also indicate that the mechanisms of capacitation induced by heparin and HDL are different. Further work is underway to delineate the differences between these two mechanisms.

ACKNOWLEDGMENT

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

REFERENCES

- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* 1951; 168:697–698.
- Austin CR. Observations on the penetration of sperm into mammalian egg. *Aust J Sci Res* 1951; 4:581–596.
- Austin CR. The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 1952; 170:326.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. New York: Raven Press; 1994: 189–317.
- 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.
- Langlais J, Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 1985; 12:183–224.
- 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: Sero Symposia; 1990: 155–167.
- Kopf GS, Gerton GL. The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: Wassarman PM (ed.), *Elements of Mammalian Fertilization*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991: 153–203.
- Parks JE, Arion JW, Foote RH. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 1987; 37:1249–1258.
- Davis BK. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch Androl* 1980; 5:249–254.
- Fleming AD, Yanagimachi R. Effects of various lipids on acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Res* 1981; 4:253–273.
- Davis BK. Uterine fluid proteins bind sperm cholesterol during capacitation in the rabbit. *Experientia* 1982; 38:1063–1064.
- Davis BK, Byrne R, Bedigian 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.
- Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 1985; 32:145–153.
- Moubasher AED, Wolf DP. The effect of exogenous cholesterol on human sperm function in vitro [Abstract]. *J Androl* 1986; 7:22.
- 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. Cholesterol efflux from bovine sperm: II. Effect of reducing sperm cholesterol on penetration of zona-free hamster and in vitro matured bovine ova. *Gamete Res* 1988; 20: 413–420.
- Davis BK. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. *Symp Pharmacol Effect Lipids* 1978; 145–157.
- 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.
- 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.
- Davis BK, Byrne R, Hungund B. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation. *Biochim Biophys Acta* 1979; 558:257–266.
- 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.
- 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.
- Brantmeier SA, Grummer RR, Ax RL. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J Dairy Sci* 1987; 70:2145–2149.
- 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.
- 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.
- Manjunath P, Sairam MR. Purification and biochemical characteriza-

- tion of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 1987; 241:685-692.
28. 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.
 29. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: Chretien M, McKerns KW (eds.), *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems*. New York: Plenum Publishing Corp.; 1988: 259-273.
 30. Desnoyers L, Therien 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.
 31. Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Ying SY, Guillemin R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113:861-867.
 32. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 1992; 267: 10149-10155.
 33. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38:1171-1180.
 34. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26:313-318.
 35. Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 1989; 264:16853-16857.
 36. Therien I, Bleau G, Manjunath P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 1995; 52:1372-1379.
 37. Therien I, Soubeyrand S, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod* 1997; 57:1080-1088.
 38. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 1970; 227:680-685.
 39. Towbin H, Stehelin 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.
 40. Desnoyers L, Manjunath P. Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305:341-349.
 41. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37:911-917.
 42. 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; 106:4:1092-1098.
 43. 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.
 44. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
 45. Müller P, Erlemann K-R, Müller K, Calvete JJ, Töpfer-Petersen E, Marienfeld K, Herrmann A. Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *Eur Biophys J* 1998; 27:33-41.
 46. Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50:27-37. Erratum: *Biol Reprod* 1994; 50:977.
 47. Gasset M, Saiz JL, Laynez J, Sanz L, Gentzel M, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ. Conformational features and thermal stability of PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *Eur Biophys J* 1997; 250:735-744.
 48. Williams-Ashman HG. Perspectives in the male sexual physiology of eutherian mammals. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1988: 727-751.
 49. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high density lipoprotein. *Biochemistry* 1988; 27:25-29.
 50. Huang Y, von Eckardstein A, Assman G. Cell-derived cholesterol cycles between different HDLs and LDL for its effective esterification in plasma. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:445-458.
 51. Handrow RR, Boehm SK, Lenz RW, Robinson JA, Ax RL. Specific binding of the glycosaminoglycan 3H-heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa in vitro. *J Androl* 1984; 5:51-63.
 52. 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.
 53. Handrow RR, Parrish JJ, First NL. Heparin stimulates calcium uptake by bovine sperm in vitro. *J Androl* 1986; 7(suppl):23 (abstract).
 54. 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.
 55. Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res* 1985; 12:345-355.
 56. 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.
 57. Florman H, First NL. The regulation of acrosomal exocytosis. II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Dev Biol* 1988; 128:464-473.
 58. Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane (Review). *Biochim Biophys Acta* 1985; 822:267-287.

2.5. HEPARIN AND HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN MEDIATE BOVINE SPERM CAPACITATION BY DIFFERENT MECHANISMS. M.-E.

Lane, I. Thérien, R. Moreau, and P. Manjunath. *Biology of Reproduction*, **60**, 169-175, 1999.

Préambule:

D'après nos études précédentes, il semblait que les mécanismes de capacitation induits par l'héparine et les HDL en présence des protéines BSP étaient différents. En effet, l'héparine agit plus rapidement que les HDL et contrairement aux HDL ne stimule aucunement un efflux de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes. De plus, la présence des protéines BSP semble être essentielle pour l'induction de la capacitation par l'héparine (dans des temps raisonnables) tandis que pour les HDL, la présence des protéines BSP ne semble qu'accélérer le processus de capacitation. Cette étude a été entreprise afin de clarifier le mécanisme de capacitation induit par l'héparine et les HDL en présence des protéines BSP. Dans cet article, nous démontrons que lorsque les spermatozoïdes éjaculés sont incubés en présence d'héparine et des anticorps anti-BSP, les spermatozoïdes perdent leur capacité à subir la réaction de l'acrosome suite à l'ajout de lyso-PC, tandis que lorsque les HDL sont utilisées comme agents capacitants, l'ajout d'anticorps anti-BSP ne semble pas du tout affecter la réponse et les spermatozoïdes subissent la réaction de l'acrosome. De plus, nous démontrons que la capacitation induite par l'héparine est accompagnée d'une augmentation de la phosphorylation d'un groupe de protéines spermatiques. Cet effet n'est cependant pas retrouvé lors de la capacitation induite par les HDL. Ces résultats, nous permettent de confirmer que l'héparine et les HDL stimulent la capacitation des spermatozoïdes par des mécanismes différents.

Lors de la réalisation de cet article, Mme Marie-Eve Lane s'est chargée du travail technique et a rédigé l'article. Pour ma part (Mme Isabelle Thérien), j'ai montré à Mme Marie-Eve Lane toutes les techniques de laboratoire relatives à la manipulation des spermatozoïdes, à la capacitation et à la réaction de l'acrosome. De plus, moi et M. Robert Moreau avons participé aux discussions scientifiques entourant

l'élaboration et l'exécution de ce projet, en plus de participer à la rédaction de cet article en prodiguant différents conseils scientifiques. L'ensemble des travaux a été exécuté sous la supervision du Dr. P. Manjunath.

Heparin and High-Density Lipoprotein Mediate Bovine Sperm Capacitation by Different Mechanisms¹

M.-E. Lane, I. Thérien, R. Moreau, and P. Manjunath²

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

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 BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kDa (collectively called BSP proteins) bind to the sperm surface upon ejaculation 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 µg/ml) or HDL (10–160 µg/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 µg/ml), the AR level was not significantly different from control levels (16.8 ± 0.9% vs. 12.9 ± 0.9%). In contrast, incubation of sperm for 8 h with HDL and anti-BSP proteins did not inhibit the AR (42.4 ± 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 significantly stimulate protein phosphorylation. The increase in phosphorylation was 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 Ca²⁺, a change in internal pH, and 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) 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 cattle, heparin binds to sperm [22] and induces changes in the intracellular environment of the sperm. This results in Ca²⁺ uptake and an increase in intracellular free calcium and intracellular pH [9, 10]. Another change 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] induces sperm capacitation [33]. HDL is the only lipoprotein found in the female genital tract [30–32]. Some studies have shown variations in HDL concentration in the oviduct and follicular fluids during the estrous cycle [11, 30, 34]. 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 facilitate the efflux of cholesterol that occurs during the early steps of capacitation [30, 34]. A recent study shows that the phosphorylation of many sperm proteins is important during heparin-induced bovine sperm capacitation [23]. However, no such studies have been reported using HDL as capacitating agent.

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, BSP-A3, and BSP-30 kDa (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.

Accepted September 1, 1998.

Received July 8, 1998.

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

²Correspondence: P. Manjunath, Centre de recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boul. l'Assomption, Montreal, PQ, Canada H1T 2M4. FAX: 514 252 3430;

MATERIALS AND METHODS

Materials

BSA (fraction V, fatty acid-free), taurine, L-epinephrine, erythrosin B, flavianic acid (naphthol), heparin (purified from porcine intestinal mucosa), lyso-PC (purified from egg yolk), 3-iso-butyl-1-methylxanthine (IBMX), dibutyryl cAMP (dbcAMP), and Freund's adjuvant were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO); penicillin G and streptomycin sulfate were from Gibco (Burlington, ON, Canada). L-Cysteine, mercuripapain, and iodoacetamide were from ICN (Aurora, OH). Anti-phosphotyrosine antibody (clone 4G10) was obtained from Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY). Orthovanadate was from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). ECL (enhanced chemiluminescence) reagent kit was from Mandel Scientific (Boston, MA). Sephadex G-50 and Protein A-Sepharose were from Pharmacia Biotech Inc. (Baie d'Urfé, PQ, Canada). 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, PQ, 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]. Human plasma HDL has been used in human [34] and bovine sperm capacitation studies [33, 44]. HDL isolated from bovine oviductal fluid and plasma has been used in bovine sperm capacitation studies [11, 30]. It should be noted that bovine and human HDL behave similarly and therefore there is no potential problem with interpretation of results [33, 34].

BSP Protein Purification

The BSP was first subjected to alcohol precipitation, and the BSP-A1/A2, -A3, and -30 kDa 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 further on.

Polyclonal Antibodies

The polyclonal antibodies against BSP proteins were raised in male rabbits as described previously [45, 46]. 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 [47]. 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, 48]. Ejaculated sperm were washed twice ($375 \times g$, 10 min) with modified Tyrode's albumin lactate pyruvate 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 various conditions: with or without heparin (12 μ g/ml) or HDL (10–160 μ g/ml) for capacitation; with or without antibodies against BSP-A1/A2, -A3, -30 kDa, or PAF-AH (1.25–160 μ g/ml) or Fabs against BSP-A1/A2, -A3, -30 kDa, or PAF-AH (1.25–40 μ g/ml) for inhibition studies; and with or without IBMX (100 μ M) and dbcAMP (1 mM) for phosphorylation studies. The incubation was carried out in 11×75 -mm culture tubes for 5 h with heparin or 8 h with HDL at 39°C in a humidified environment of 5% CO₂ [49]. At the end of incubation, lyso-PC was added at 100 μ g/ml, and the sperm were incubated for an additional 15 min. This concentration of lyso-PC had been previously shown to induce 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 [50]. The viability of sperm was determined by staining the cells with eosine-nigrosine [51] and observation under the microscope. In all of our studies on capacitation, sperm viability was between 65% and 70%.

Phosphorylation Studies

After capacitation, 100- μ l aliquots of the sperm suspensions were subjected to centrifugation ($10\,000 \times g$, 3 min) at room temperature, and the sperm pellet was 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 [52]. After centrifugation ($10\,000 \times g$, 3 min) the supernatant was removed and boiled in the presence of 5% mercaptoethanol in sample buffer for 5 min; it was then subjected to SDS-PAGE as described below.

SDS-PAGE and Immunoblotting

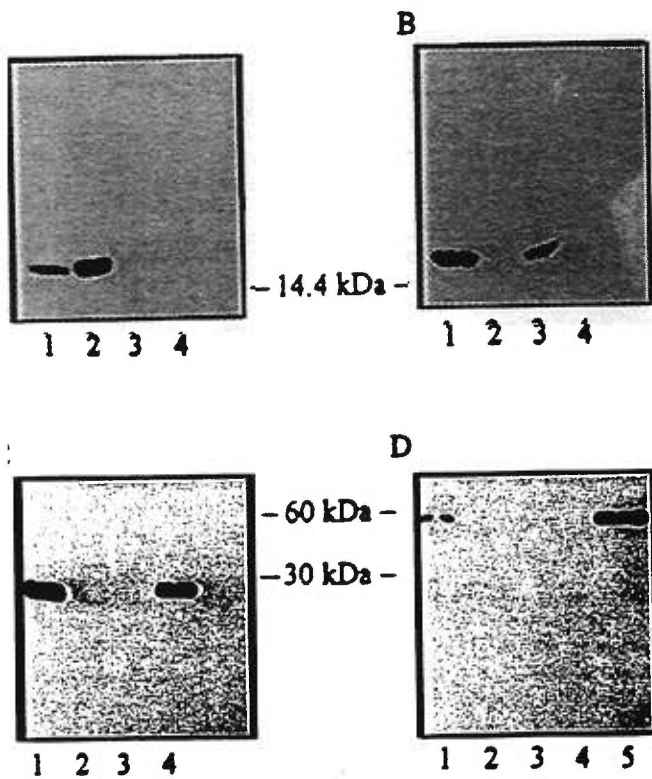
The SDS-PAGE was performed on a 10% gel for the phosphorylation studies and on a 15% gel for the verification of polyclonal antibodies. The proteins were transferred to Immobilon-P (Mandel Scientific) as described by Towbin et al. [53] and submitted to immunodetection [39] using ECL reagent (Mandel Scientific).

Protein Assay

The protein content of the sample was measured by the Bradford method [54] or by weighing of 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's *t*-test on paired observations or by the Friedman nonparametric test.



G. 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-30 kDa, and D) anti-PAF-AH. Lane 1, cBSP; lane 2, purified BSP-A1/A2; lane 3, purified BSP-A3; lane 4, purified BSP-30 kDa; lane 5, purified PAF-AH.

RESULTS

Specificity of Antibodies

We first established the specificity of the polyclonal antibodies. The alcohol-precipitated BSP proteins (crude BSP 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, not the other types of BSP proteins (-A3 and -30 kDa). Similarly, anti-BSP-A3 recognized only BSP-A3 protein, and anti-30 kDa recognized only the BSP-30 kDa protein (Fig. 1, A-C). In these studies we used the antibodies against PAF-AH [45] as a negative control. The PAF-AH is another protein found in BSP in large concentrations (~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, -30 kDa 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 capacitation agents. We determined the levels of AR induced by lyso-PC when ejaculated sperm were incubated with heparin (12 µg/ml) and increasing concentrations of polyclonal antibodies (0-40 µg/ml) raised against the three different purified BSP proteins. In the absence of antibodies and in the presence of heparin, 38.4 ± 1.1% of sperm underwent the AR (Fig. 2A, outside bars), which correlated

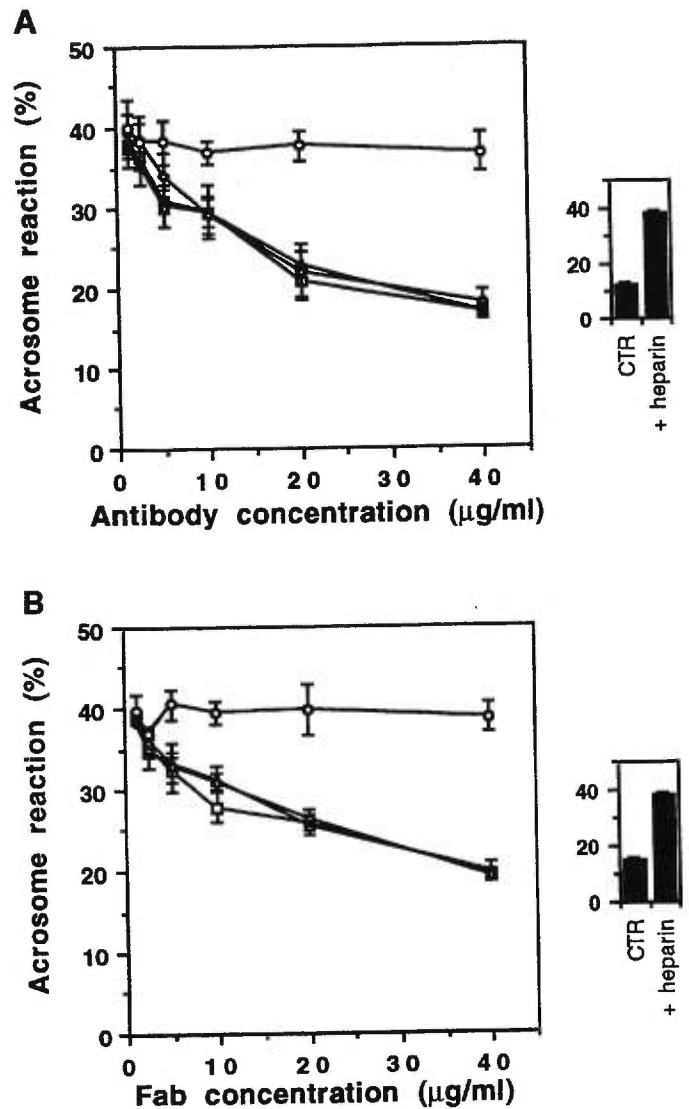


FIG. 2. Effect of polyclonal antibodies or Fabs raised against BSP proteins on sperm capacitation with heparin. Ejaculated sperm (1×10^6 /ml) were incubated in the presence or absence of heparin alone (12 µg/ml; outside bars) or in the presence of heparin and antibodies or Fabs against BSP proteins (0-40 µg/ml) for 5 h at 39°C. The sperm were then incubated with lyso-PC (100 µg/ml) for 15 min, and AR was assessed as described in Materials and Methods. A) With antibodies, B) with Fabs. Squares, anti-BSP-A1/A2; triangles, anti-BSP-A3; diamonds, anti-BSP-30 kDa; circles, anti-PAF-AH. The values represent the mean ± SEM of three independent experiments with 200 sperm assayed per sample. Nonsignificant differences for anti-BSP-A1/A2, -A3, -30 kDa vs. control (without heparin).

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 with increased concentrations of antibodies against BSP-A1/A2, -A3, -30 kDa (Fig. 2A). At a concentration of 40 µg/ml, 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 µg/ml) also inhibited the AR (19.5

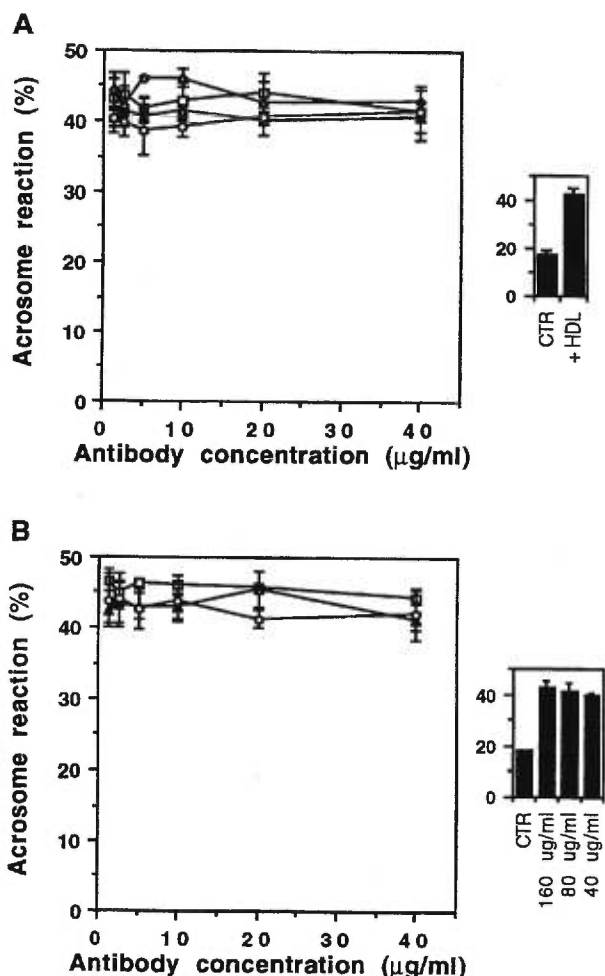


FIG. 3. Effect of antibodies raised against BSP proteins on capacitation with HDL; the same protocol as described for Figure 2 using HDL instead of heparin and incubation for 8 h. **A**) HDL alone (160 $\mu\text{g/ml}$); outside bars) or with antibodies; squares, anti-BSP-A1/A2; triangles, anti-BSP-A3; diamonds, anti-BSP-30 kDa; circles, anti-PAF-AH. **B**) With different concentrations of HDL only (40, 80, 160 $\mu\text{g/ml}$); outside bars) or HDL (40, 80, 160 $\mu\text{g/ml}$) with anti-BSP-30 kDa (0–40 $\mu\text{g/ml}$). Circles, 40 $\mu\text{g/ml}$; triangles, 80 $\mu\text{g/ml}$; squares, 160 $\mu\text{g/ml}$. The values represent the mean \pm SEM of three independent experiments with 200 sperm assayed per sample. Significant differences for all antibodies (40 $\mu\text{g/ml}$) vs. control (without HDL): $p < 0.05$.

$\pm 0.4\%$), 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 utilization of Fabs instead of complete antibodies allowed us to eliminate possible interactions between the antibodies. The antibodies and the Fabs yielded essentially the same results (Fig. 2).

Effect of Polyclonal Antibodies Against BSP-A1/A2, -A3, and -30 kDa 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 com-

TABLE 1. Assessment of the acrosome reaction (%) with HDL (160 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of different concentrations of antibodies against BSP-30-kDa.^a

Antibody concentration (mg/ml)	Acrosome reaction ^b (%)
0	42.9 ± 0.8
80	44.8 ± 1.5
160	46.6 ± 1.6

^a After 8-h incubation, lyso-PC was added to induce the AR.

^b Mean \pm SEM of three independent experiments; results for all concentrations are not significant compared to control (without antibodies; 17.1 ± 1.6).

pared to $17.1 \pm 1.6\%$ for the control (Fig. 3A, outside bars). 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 differing 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 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 purpose of 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 μM) and dbcAMP (1 mM). As previously reported [23], IBMX (inhibitor of phosphodiesterase) and dbcAMP 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 dbcAMP and IBMX (Fig. 4A). Concomitant AR studies were done for 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 observed increase in phosphorylation occurred after the addition of IBMX and dbcAMP 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). It should be noted that previous studies [23, 55, 56] have shown that the tyrosine phosphorylation of proteins during capacitation occurs very slowly (2–4 h), in contrast to rapid phosphorylation (< 30 min) in other cell-signaling systems.

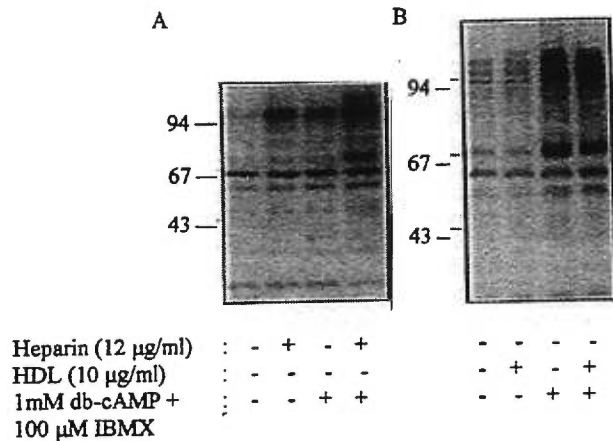


FIG. 4. The effects of heparin, HDL, and dbcAMP plus IBMX on protein tyrosine phosphorylation. Ejaculated sperm were incubated in the presence of heparin (0 or 12 $\mu\text{g/ml}$) or HDL (0 or 160 $\mu\text{g/ml}$) for 5 or 8 h at 39°C. After these incubations, an aliquot was submitted to SDS-PAGE, 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.

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, 50, 57, 58]. Other studies have shown that the cholesterol efflux mediated by HDL may be an important step in sperm capacitation [34, 58, 59]. BSP 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 [59]. 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 indicating 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 due not to the aggregation of sperm but 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

TABLE 2. Assessment of the acrosome reaction (%) during phosphorylation studies.^a

Conditions	Acrosome reaction (%) ^b
Control (-heparin)	12.0 \pm 1.2
+ Heparin	42.6 \pm 3.3 ^c
+ IBMX, dbcAMP	17.1 \pm 1.2
+ Heparin, IBMX, dbcAMP	39.6 \pm 2.7 ^c
Control (-HDL)	13.8 \pm 0.6
+ HDL	36.4 \pm 1.2 ^c
+ IBMX, dbcAMP	22.3 \pm 1.4
+ HDL, IBMX, dbcAMP	40.6 \pm 2.3 ^c

^a Ejaculated sperm were incubated with heparin (1 or 12 μM) or HDL (0 or 10 $\mu\text{g/ml}$) and with or without IBMX (100 μM) and the dbcAMP (1 mM); after incubation with heparin (5 h) or HDL (8 h), lyso-PC was added to induce the AR.

^b Mean \pm SEM of three independent experiments.

^c Significantly different vs. control (without agent): $p < 0.05$.

to note that the ejaculated sperm are coated with all three BSP proteins [60] 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 inhibited heparin-induced capacitation in ejaculated sperm in comparison 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 hindrance.

The second finding of this study was that anti-BSP proteins do not inhibit 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 [59]. 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 capacitates sperm to levels induced in the presence of heparin [33, 59]; 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. It should be noted that in contrast to epididymal sperm, ejaculated sperm require low concentrations of HDL (160 $\mu\text{g/ml}$ vs. 40 $\mu\text{g/ml}$) for induction of capacitation. This could be the case for the following reason. In the present study, the sperm used were ejaculated, and they were exposed to a higher concentration of BSP proteins (20–40 mg/ml) for a longer period (~1 h; time required for transport of semen from Artificial Insemination Center and sperm preparation). In our previous study, epididymal sperm exposed to 40 $\mu\text{g/ml}$ BSP proteins for 20 min were used. Alternatively, there may be other factors in

seminal plasma that also contribute to promotion of capacitation induced by HDL.

The third finding of this investigation was that 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] showing that heparin-induced capacitation is associated with tyrosine phosphorylation. However, it should be noted that while that group reported a significant change in the levels of AR in the presence of IBMX or cAMP, no such changes were observed in our experiments. Cross talk between the protein kinase A pathways and tyrosine phosphorylation has been reported [23]. Parrish et al. [61] 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. The increase in tyrosine phosphorylation associated with capacitation has been reported in various species: humans [55, 56], cattle [23, 61], and mice [62]. These studies did not reveal sharp differences between species; however, they suggest similar cascade events in sperm capacitation. Our results were in line with these studies when we used heparin as an inductor. To date, a tyrosine phosphorylation study has not been carried out using HDL as an inductor of capacitation. The current study is the first to show no effect of tyrosine phosphorylation in HDL-induced bovine sperm capacitation. Also, it has never been demonstrated that phosphorylation of tyrosine could be activated in other cells. Studies in many species show that BSA could act as a cholesterol acceptor [5, 8, 62]. The efflux of cholesterol has been shown to increase tyrosine phosphorylation [62]. It is possible that BSA, in addition to stimulating cholesterol efflux, may trigger other pathways that involve tyrosine phosphorylation.

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 after further interaction with either heparin-like GAG or HDL in the oviduct. A portion of the BSP proteins also coat 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 protein kinase A [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. After 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 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, after 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.

REFERENCES

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; Serono Symposia; 1990: 155-167.
12. Florman HM, Babcock DF. Progress toward understanding the molecular basis of capacitation. In: Wassarman PM (eds.), *Elements 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.), *Elements 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 Corp.; 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. 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; 59:768-776.
45. Soubeyrand S, Lazure C, Manjunath P. Phospholipase A2 from bovine seminal plasma is a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Biochem J* 1998; 329:41-47.
46. Harlow E, Lane D. *Immunization*. In: *Antibodies, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988: 92-120.
47. 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 Lett* 1996; 389:195-198.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
53. 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.
54. 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.
55. Emiliozzi C, Fenichel P. Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm in vitro but is not sufficient for its completion. *Biol Reprod* 1997; 56:674-679.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50:27-37.
61. 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.
62. Leclerc P, Kopf GS. Mouse sperm adenylate cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida. *Biol Reprod* 1995; 52:1227-1233.

2.6. TYPE II DOMAINS OF BSP-A1/-A2 PROTEINS: BINDING PROPERTIES, LIPID EFFLUX, AND SPERM CAPACITATION POTENTIAL.

POTENTIAL. R. Moreau, I. Thérien, Claude Lazure, and P. Manjunath. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **246**, 148-154, 1998.

Préambule:

Les études précédentes nous ont démontré que les protéines BSP stimulaient la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins. Jusqu'à maintenant, le mécanisme par lequel les protéines BSP stimulent la capacitation reste encore obscur. On sait que les protéines BSP semblent augmenter le nombre de sites de liaison pour l'héparine à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation et qu'elles participent à l'efflux de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes, une des premières étapes de la capacitation. Par contre, on ne sait strictement rien sur les éléments structuraux et les mécanismes moléculaires impliqués dans la capacitation par les protéines BSP. La structure des protéines BSP renferme deux domaines de type II similaires arrangés en tandem. Il s'avérait donc intéressant de déterminer la relation entre la structure et la fonction des domaines de type II des protéines BSP. Dans cet article, nous préparons par protéolyse le deuxième domaine de type II des protéines BSP-A1/-A2 et nous démontrons que ce domaine peut lier les phospholipides contenant un groupement choline ainsi que l'héparine. De plus, nous démontrons que malgré ces propriétés de liaisons, le second domaine de type II des protéines BSP est incapable de stimuler l'efflux de cholestérol des fibroblastes humains ainsi que des spermatozoïdes épидидymaires bovins et est aussi incapable de stimuler la capacitation des spermatozoïdes bovins induite par les HDL ou l'héparine. Ces résultats nous indiquent que la présence des deux domaines de type II des protéines BSP est essentielle pour l'expression des fonctions biologiques des protéines BSP soit l'efflux de cholestérol et la capacitation des spermatozoïdes.

Lors de la réalisation de cet article, j'ai (Mme Isabelle Thérien) participé à la préparation et à la purification du second domaine de type II des protéines BSP-A1/-A2. J'ai aussi effectué et planifié toutes les expériences concernant les spermatozoïdes

(efflux de cholestérol, capacitation). Pour sa part, M Robert Moreau a effectué les expériences de liaison, a effectué toutes les expériences sur les fibroblastes humains et a rédigé le texte de l'article. Claude Lazure a séquencé le second domaine de type II. Le tout s'est déroulé sur la supervision du Dr. P. Manjunath.

Type II Domains of BSP-A1/-A2 Proteins: Binding Properties, Lipid Efflux, and Sperm Capacitation Potential

Robert Moreau, Isabelle Thérien, Claude Lazure,* and Puttaswamy Manjunath¹

*Guy-Bernier Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Department of Medecine, University of Montreal, 5415 boul de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada, H1T 2M4; and *Neuropeptide Structure and Metabolism Laboratory, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Avenue West, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7*

Received March 6, 1998

Bovine seminal plasma contains a family of major proteins (collectively called ¹BSP proteins) that potentiate sperm capacitation by binding to capacitation factors such as heparin and by stimulating sperm membrane cholesterol efflux. Here, we investigated the structure-function relationship of type II domains of BSP proteins. We isolated from a tryptic digest of citraconylated BSP-A1/-A2 proteins the intact second type II domain (domain b or Db). Similar to native protein, Db bound to heparin-Sepharose, p-aminophenylphosphorylcholine-Agarose and liposomes containing phosphatidylcholine. When assessed for biological function, Db did not stimulate cholesterol efflux from human fibroblasts, a cell model for lipid efflux studies, and from bovine spermatozoa, or potentiate bovine sperm capacitation induced by heparin and high-density lipoproteins. Therefore, type II motifs of BSP proteins represent binding units for sperm membrane choline phospholipids and heparin but the second type II domain of BSP-A1/-A2 alone is not sufficient to stimulate lipid efflux nor is sufficient to potentiate bovine sperm capacitation. Thus, the presence of both type II domains in BSP proteins is essential for the expression of functional properties, namely lipid efflux and sperm capacitation. © 1998 Academic Press

Key Words: phospholipid-binding proteins; heparin; type II structure; lipid efflux; sperm capacitation.

A number of proteins are mosaics assembled from a variety of module-types defining structural elements

¹To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: (514) 252-3569. E-mail: [REDACTED]

Abbreviations: DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; mTALP, Tyrode's medium; FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate-buffered saline; TBS, Tris-buffered saline; BSP, bovine seminal plasma; BSA, bovine serum albumine; Db, the second type II domain of BSP-A1/-A2; HDL, high-density lipoprotein; lyso-PC, lysophosphatidylcholine; PPC, p-aminophenylphosphorylcholine; SDS, sodium dodecylsulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

[1, 2]. One type of module, designated type II structure, is characterized by a double cystine polypeptide loop pattern distinguished by disulfide bridges connecting Cys residue pairs 1-3 and 2-4. As shown in Table 1, they are found as a single unit, as two collinear domains or as three head-to-tail repeats in numerous proteins. The type II domains of fibronectin are collagen-binding sites [12]. In gelatinases A and B, the three tandem type II repeats contribute to form a single collagen-binding site [20]. Unfortunately, the functional role of this module in other proteins is unknown. The observed homology of amino acids and the gene organization of fibronectin, the two type II repeats are present on exons separate from the other portions of the gene, suggests that this domain has been incorporated into several proteins as a result of exon shuffling [2]. However, substitutions of amino acid side chains on the protein surface appear to lead to distinct binding specificity and different roles. Furthermore, the type II structures have been reported to be related to protease Kringle-modules [1, 21], the latter corresponding to autonomous structural/functional units abundantly present in blood clotting and fibrinolytic proteins [22, 23]. Kringle units are also found in lipoprotein (a), Lp(a) [24].

Among the type II motif containing proteins, BSP-A1/-A2 (also called PDC-109 [17]), BSP-A3 and BSP-30-kDa (collectively called BSP proteins) represent a family of closely related proteins found in bovine seminal fluid [25]. They are secretory products of the seminal vesicles and constitute the major protein fraction of bovine seminal plasma (>60%). With the exception of BSP-A3, all members of this family are glycoproteins. Each protein contains two similar type II domains arranged in tandem fashion [17–19] and a N-terminal portion that is variable between each protein. BSP homologous proteins have been isolated from stallion (HSP-1 and HSP-2; [14]) and boar (pB1; [15, 16]) seminal plasma.

The BSP proteins exhibit multiple binding and functional properties. Upon ejaculation, the BSP proteins

TABLE I
Proteins Containing Type II Structures

Protein	Number of type II domains	Function	References
Factor XII	1	?	[3]
IGF-IIR/CIMan6PR	1	?	[4-6]
PLA ₂ receptor	1	?	[7]
ManR	1	?	[8]
HGFA	1	?	[9]
DEC-205R	1	?	[10]
Fibronectin	2	Collagen binding	[11-13]
HSP-1, HSP-2	2	?	[14]
pB1/LAR	2	?	[15, 16]
BSP-A1/-A2	2	Choline binding	[17]
BSP-A3	2	Choline binding	[17]
BSP-30-kDa	2	Choline binding	[19]
Gelatinase A	3	Collagen binding	[20]
Gelatinase B	3	Collagen binding	[20]

Note. Factor XII, human coagulation factor XII; IGF-II, insulin-like growth factor II; CIMan6PR, cation-independent mannose-6-phosphate receptor; PLA₂, phospholipase A₂; ManR, mannose receptor; HGFA, hepatocyte growth factor activator; DEC-205R, dendritic cell receptor; HSP, horse seminal plasma; pB1, porcine heparin-binding protein; LAR, leukocyte adhesion regulator; BSP, bovine seminal plasma.

bind to choline phospholipids of the sperm surface [26, 27]. By equilibrium dialysis, we showed that BSP-A1/-A2 proteins contain two choline binding sites per mole of protein [28]. Our studies also indicate a structure-dependent hydrophobic interaction of the ligand with BSP proteins [28]. In addition to displaying choline-binding activity, BSP proteins bind to sperm capacitation factors namely, heparin [29] and high-density lipoproteins (HDL) [30]. Furthermore, BSP proteins potentiate bovine epididymal sperm capacitation induced by heparin [31] and HDL [32]. The mechanism how whereby BSP proteins capacitate sperm is unknown but they appear to increase binding of heparin to the sperm surface and also participate in removal of cholesterol from the sperm membrane [33], one of the earliest steps believed to occur in capacitation [34]. Our recent results show that the BSP proteins stimulate cholesterol and phospholipid efflux from fibroblasts [35]. This lipid efflux was inhibited by choline suggesting the involvement of choline-binding sites in this process. Although the BSP proteins modulate capacitation induced by heparin and participate in lipid efflux during sperm capacitation, the structural elements and molecular mechanisms involved are unknown.

In this study, we prepared the second type II domain (Db) of BSP-A1/-A2 using limited proteolysis and have studied its binding properties and biological function. The results indicated that type II domains of BSP proteins are binding units for choline phospholipids and heparin. However, the domain b (Db) alone is not suffi-

cient to stimulate lipid efflux from human fibroblasts and bovine epididymal spermatozoa, or potentiate heparin/HDL-mediated bovine sperm capacitation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin solution (10,000 units/ml and 10,000 µg/ml respectively), L-glutamine, trypsin (porcine), phosphate-buffered saline (PBS) and plastic culture dishes (100 mm diameter, Nunc) were from Gibco. Twelve-well culture plates were from Fisher. [1,2-³H]-cholesterol (50 Ci/mmol) were from Dupont NEN. Fatty acid-poor bovine serum albumin (BSA), heparin, choline chloride, lysophosphatidylcholine (lyso-PC), citraconic acid and cholesterol were from Sigma (St. Louis, MO). Phosphatidylcholine was from Serdary Research Laboratories (NJ). p-Aminophenylphosphorylcholine immobilized on Agarose (PPC-Agarose) was from Pierce Chemical Company (Rockford, IL). Heparin-Sepharose and Sephadex G-50 were from Pharmacia Biotech. The liquid scintillation mixture (UniverSol) was obtained from ICN Biomedicals. All other chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

Bovine testes were obtained from Abattoir Les Cèdres (St-Lazare, PQ) and semen was obtained from the Centre d'insémination artificielle du Québec (CIAQ, St-Hyacinthe, PQ). BSP-A1/-A2 proteins were isolated as described earlier [25]. High-density lipoproteins (HDL) were isolated from human plasma as described earlier [32].

Domain b (Db) preparation. The preparation of the second type II domain of BSP-A1/-A2 proteins was accomplished following the procedure described by Banyai et al [13]. Briefly, lyophilized BSP-A1/-A2 proteins (50 mg) were citraconylated and digested with 1 mg of trypsin for 15 min at 25 °C. The reaction was stopped with 10% acetic acid and the solution was incubated for 24 h at 37 °C. The decitraconylated protein fragments were purified by gel filtration on a Sephadex G-50 column (2.5 × 92 cm) equilibrated in acetic acid (10%) and the purity was verified by SDS-electrophoresis on a 15% gel.

Affinity chromatography. Chromatographic analysis was performed at room temperature using an FPLC System (Pharmacia Fine Chemicals, Dorval, Québec). Native BSP-A1/-A2 proteins and tryptic fragments corresponding to the second type II domain of BSP-A1/-A2 proteins were solubilized in a Tris-buffered saline (TBS: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0) and applied to a PPC-Agarose column (1 × 4 cm) which were previously equilibrated in the same buffer. Bound proteins were eluted with a linear gradient of choline chloride. The Heparin-Sepharose column (1 × 4 cm) was equilibrated in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4 and the solubilized BSP-A1/-A2 proteins and Db fragment, in the same buffer, were applied to the column. The elution was performed with a linear gradient of NaCl.

Efflux studies with fibroblasts. The efflux studies with the fibroblasts were performed following the procedure described previously [35]. Human fibroblasts were seeded in 12-well plates for 36 h and incubated with [1,2-³H]-cholesterol in 1 ml DMEM (20 µCi/well) containing 5% FBS for 48 hours. The radioactivity released into the incubation medium in the presence of BSP proteins and Db was measured by using a standard liquid scintillation LKB counter. For each well, the radioactivity remaining in cellular extract was measured. The efflux of lipids was expressed as the percentage of the total radioactivity released into the medium.

Cholesterol efflux from spermatozoa. The cholesterol efflux studies with spermatozoa were performed as described previously [33]. Briefly, washed epididymal spermatozoa (500 × 10⁶ cells) were radio-labeled for 1 h with [³H]-cholesterol (45.5 µCi) in 2.5 ml of Tyrode's medium (mTALP) as described by Langlais et al [34]. Labeled spermatozoa (50 × 10⁶ cells) were resuspended in 1 ml mTALP and incubated at 37 °C for 6 h in the presence of BSP-A1/-A2 proteins,

Db fragment or in mTALP (control). The cholesterol efflux was expressed as the percentage of the total radioactivity released into the medium.

Capacitation of spermatozoa. Capacitation of cauda epididymal sperm was evaluated as described previously [31]. Briefly, washed epididymal sperm (25×10^6 cells) were preincubated at 37 °C for 20 min with BSP-A1/-A2 proteins and Db fragment in mTALP. After preincubation, the cells were washed twice ($300 \times g$, 10 min), resuspended in mTALP containing 12 $\mu\text{g/ml}$ of heparin or 160 $\mu\text{g/ml}$ of HDL, and incubated for 8 h in $11 \times 75\text{-mm}$ culture tubes at 37 °C. The acrosome reaction was induced by adding 100 $\mu\text{g/ml}$ of lyso-PC for 15 min. This concentration of lyso-PC was previously shown to induce the acrosome reaction in capacitated sperm while having no effect on noncapacitated sperm [32]. The lyso-PC-induced acrosome reaction is a well-defined method that has been correlated with the *in vitro* fertilization rate and validated by electron micrograph studies. The percentage of sperm that were acrosome-reacted was determined on air-dried sperm smears with a naphthol yellow-erythrosin B staining procedure [36].

Analytical methods. Liposomes of cholesterol/PC (30:70%) were prepared as described previously [27]. After 30 min of incubation with proteins, the liposomes were sedimented at $100,000 \times g$ for 45 min and the proteins present in the supernatant were precipitated with trichloroacetic acid (TCA). The pellet was incubated with 200 mM choline (15 min) and centrifuged. The BSP proteins released into the supernatant by the addition of choline were precipitated with TCA and analysed by SDS-PAGE. The apparent molecular mass was determined by using the low-molecular weight calibration kit of Pharmacia Biotech (Dorval, PQ, Canada). Amino acid composition and polypeptide sequencing were performed as described by Basak et al [37].

Statistical analysis. Statistical differences were evaluated by the two-tailed Student's *t*-test. A level of 0.05 was considered as significant.

RESULTS

Isolation and Biochemical Characterization of the Domain b

BSP-A1/-A2 proteins contain two type II structures arranged in a tandem fashion (Fig. 1A). In order to determine the choline- and heparin-binding sites more precisely as well as to define the mechanism of lipid efflux and sperm capacitation mediated by BSP proteins, we prepared a tryptic fragment corresponding to the second type II domain of BSP-A1/-A2 proteins (Fig. 1B) following a reported procedure [13]. Citraconylated protected tryptic digestion yielded an intact fragment of 5 kDa whereas the first domain was cleaved at multiple sites. The amino acid composition and sequence analysis confirmed that the purified fragment corresponded to the second type II domain (domain b or Db) of BSP-A1/-A2 proteins (data not shown).

Ligand-Binding Properties of Domain b

We then compared the binding properties of Db and BSP-A1/-A2 proteins. The Db bound to *p*-aminophenylphosphorylcholine (PPC)-Agarose column (Fig. 2A). When compared to BSP-A1/-A2, the molar choline required to elute Db from the column was lower (90 mM

vs 45 mM). As observed with BSP-A1/-A2 proteins, Db bound to phosphatidylcholine liposomes (data not shown). In a similar manner to BSP-A1/-A2, Db bound to the heparin-Sepharose column (Fig. 2C). The concentration of NaCl required to elute Db was lower than for BSP-A1/-A2 (0.5 M vs 0.25 M). The material that did not bind to either column represented degradation products as judged by SDS-PAGE analysis (data not shown). Furthermore, the Db fragment bound to a gelatin-Agarose column and elution was achieved either with a linear gradient of urea or choline (data not shown).

Cholesterol Efflux Potential of Domain b

Our previous studies indicated that BSP-mediated cholesterol efflux was inhibited by choline suggesting the involvement of BSP type II domains in their cholesterol efflux potential [35]. We thus investigated the functional properties of Db. At concentrations from 9 to 50 $\mu\text{g/ml}$, the Db fragment failed to stimulate the efflux of cholesterol from human fibroblasts after 3 h of incubation (Table 2). However, under similar conditions, 9 $\mu\text{g/ml}$ of BSP-A1/-A2 proteins stimulated cholesterol efflux by 2.6-fold after 3 h of incubation as previously reported [35]. Longer period of incubation (6 h) in the presence of the Db fragment did not result in cholesterol efflux from fibroblasts (data not shown).

As observed with the fibroblasts, BSP proteins also stimulated cholesterol efflux from [^3H]cholesterol labeled epididymal spermatozoa (Table 3). In contrast, Db fragment, up to 120 $\mu\text{g/ml}$, failed to stimulate the cholesterol efflux from epididymal spermatozoa (Table 3).

Effect of Domain b on Sperm Capacitation

We have previously demonstrated that preincubation of bovine epididymal spermatozoa with BSP proteins potentiate subsequent heparin-mediated [31] and HDL-mediated [32] capacitation. However, incubation of bovine epididymal sperm with 50 $\mu\text{g/ml}$ of Db fragment did not enhance heparin-mediated or HDL-mediated capacitation (Table 4). After the incubation, the percentage of acrosome-reacted spermatozoa preincubated with Db fragment was not significantly different from the control without BSP-A1/-A2 proteins.

DISCUSSION

Upon ejaculation, spermatozoa are mixed with secretions of the accessory sex glands and certain seminal plasma proteins bind to the sperm surface. Subsequently, sperm cells acquire fertilization potential in the female genital tract in a process called capacitation. This is a multistep process including interactions of sperm with capacitation factors of the female genital tract as well as a loss of sperm membrane cholesterol

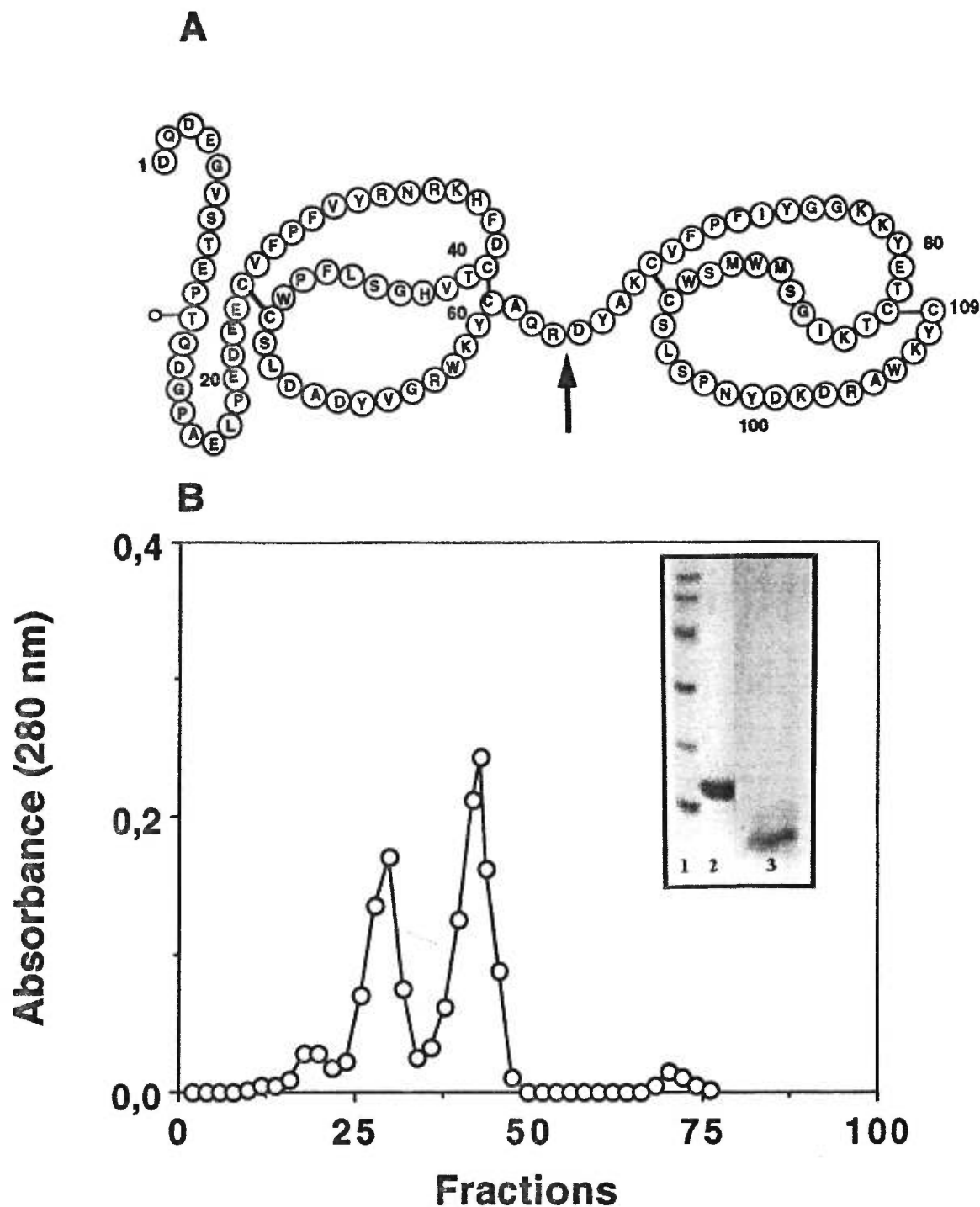


FIG. 1. Secondary structure of BSP-A1/A2 proteins and purification of domain b fragment. A) Secondary structure of BSP-A1/A2 proteins. The arrow indicates the tryptic cleavage site under limited proteolytic digestion as described under the Experimental Procedure section. The site of glycosylation of BSP-A1/A2 proteins is indicated. B) The size-exclusion chromatographic profile of tryptic fragments of BSP-A1/A2 proteins on a Sephadex G-50 column (fraction size of 4.1 ml with a wait of 380 min). Inset: reduced and denaturated BSP-A1/A2 proteins (5 μ g) and Db fragment (5 μ g, pool from tubes 39 to 53) were submitted to electrophoresis on a 15% polyacrylamide gel. Low molecular weight standards (lane 1), BSP-A1/A2 (lane 2) and Db (lane 3) were stained with Coomassie Brilliant.

that render these cells responsive to inducers of the acrosome reaction [33, 34]. Many studies suggest that factors present in the seminal fluid are important for

the acquisition of fertility [31–33, 38]. In bovine, a family of proteins secreted by the seminal vesicles represent the major protein fraction (20–40 mg/ml) of semi-

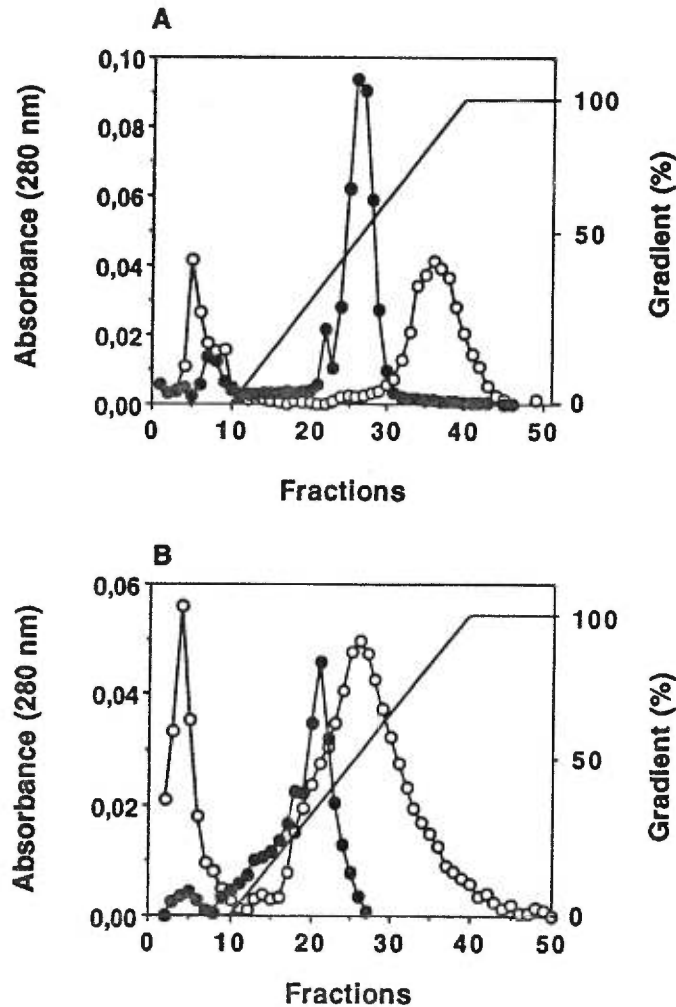


FIG. 2. Choline- and heparin-binding of Db fragment. A) BSP-A1/A2 proteins (○) and Db fragment (●) (200 μg) solubilized in TBS were applied to a PPC-Agarose column. Fractions of 1 ml were collected and elution of proteins was assessed with a linear gradient of choline chloride (0–100 mM). B) BSP-A1/A2 proteins (○) and Db fragment (●) (200 μg) solubilized in 50 mM phosphate buffer were applied to heparin-Sepharose column. Fractions of 1 ml were collected and elution of proteins was assessed with a linear gradient of NaCl (0–1 M).

nal fluid. These bovine seminal plasma proteins (BSP proteins) bind to sperm membrane choline phospholipids and potentiate *in vitro* capacitation induced by heparin and HDL [27, 29–32]. In this regard, we demonstrated that BSP proteins bind to heparin [29] and stimulate cholesterol and phospholipid efflux from spermatozoa [33] and human fibroblasts [35].

In the present investigation we report for the first time that the second type II domain of BSP-A1/A2 proteins is an autonomous unit that binds choline phospholipids and heparin. Previously, Banyai et al [13] have reported that Db binds to gelatin. Our experiments with affinity chromatography showed that gelatin-Agarose bound BSP-A1/A2 proteins and Db frag-

TABLE 2
Cholesterol Efflux from Fibroblasts in the Presence of BSP-A1/A2 Proteins and Db Fragment

Conditions	Cholesterol efflux (%)
Control	3.43 \pm 0.49
BSP-A1/A2 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8.89 \pm 1.18 ^a
Domain b 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2.47 \pm 0.43
27 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2.86 \pm 0.48
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3.04 \pm 0.14

Note. Labeled (^3H)cholesterol cells were incubated with Db, BSP-A1/A2 or in culture medium (control). The values represent the mean \pm S.E.M. of the cholesterol efflux at 3 h for 3 independent experiments.

^a $P < 0.001$, compared to condition without protein.

ment could be eluted by choline chloride (data not shown). Our unpublished observations also indicate that gelatin and choline binding sites are the same or are at least in proximity. Furthermore, heparin- and choline-binding sites are likely to be the same since HSP-1 and pB1 [39] that are analogs of BSP-A1/A2 proteins bound to heparin-Sepharose and are eluted with choline or phosphorylcholine. Therefore, BSP-type II domains bind gelatin, choline phospholipids and heparin. In line with this, the tertiary structure determination and NMR analysis of the second type II domain of BSP-A1/A2 proteins revealed a flexible structure that may bind various ligands [40, 41]. Indeed, data is available which indicate multiple protein-binding properties of the BSP proteins. In particular, BSP proteins interact with different genetic types of collagens (types I, II, IV, V), fibrinogen [25], heparin [29], calmodulin [42], insulin-like growth factor II [43], apoA-I and apoA-I associated with HDL [30]. The present results reinforce the hypothesis that the type II domains of BSP-A1/A2 proteins are multifunctional binding sites for a variety of ligands.

Using equilibrium dialysis, we previously estimated

TABLE 3
Cholesterol Efflux from Epididymal Spermatozoa in the Presence of Db Fragment

Conditions	Cholesterol efflux (%)
Control	6.50 \pm 1.49
BSP-A1/A2 (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	17.46 \pm 2.01 ^a
Domain b (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	7.46 \pm 2.68

Note. Labeled (^3H)cholesterol spermatozoa (50×10^6 cells) were incubated for 6 h in the presence of BSP-A1/A2 proteins, Db or in mTALP medium (control). The cholesterol efflux was determined by measuring the radioactivity in the medium following centrifugation of the cell suspension. The values represent the mean \pm S.E.M. of 3 experiments.

^a $P < 0.001$, compared with control condition.

TABLE 4
Epididymal Sperm Capacitation in the Presence
of Db Fragment

Conditions	Percentage acrosome reaction		
	Control	HDL	Heparin
mTALP	12.5 ± 0.8	17.2 ± 0.8 ^a	15.0 ± 0.6
BSP-A1/-A2	11.8 ± 1.0	28.8 ± 1.1 ^b	32.8 ± 1.3 ^c
Domain b	12.8 ± 0.8	17.3 ± 0.7	14.2 ± 0.8

Note. Cauda epididymal sperm (25×10^6 cells) were preincubated for 20 min with 40 $\mu\text{g/ml}$ of BSP-A1/-A2 proteins, 50 $\mu\text{g/ml}$ of Db fragment or in protein-free mTALP medium (mTALP). Then the cells were washed and incubated for 5 h with 12 $\mu\text{g/ml}$ of heparin or for 8 h with 160 $\mu\text{g/ml}$ of HDL. The values represent the mean \pm S.E.M. of percentage of sperm that were acrosome-reacted from 3 individual experiments.

^a $P < 0.01$, compared with sperm incubated without capacitation factor.

^b $P < 0.001$, compared with sperm incubated without BSP-A1/-A2 proteins and with HDL.

^c $P < 0.001$, compared with sperm incubated without BSP-A1/-A2 proteins and with heparin.

that BSP-A1/-A2 protein have two binding sites for choline [28]. Since each BSP protein contains two similar tandem type II structures, it is more likely that each type II motif of BSP proteins constitutes a choline-, gelatin- and heparin-binding site. By affinity chromatography, we observed that concentrations of choline required to elute Db fragment were less than that required for BSP-A1/-A2 proteins. This is expected since there are two competing binding sites in BSP-A1/-A2 proteins for eluting agent whereas Db contains only one binding site.

Our results indicate that both type II structures are essential for the expression of the biological function of BSP proteins. The second type II domain of BSP-A1/-A2 per se is not sufficient to promote lipid efflux or potentiate bovine sperm capacitation induced by heparin and HDL. The preincubation of epididymal spermatozoa with BSP proteins potentiate the capacitation induced by heparin by increasing the number of binding sites for heparin at the sperm surface [44]. The present studies indicate that the second type II domain of BSP-A1/-A2 proteins bind to choline phospholipids and to heparin. However, simultaneous binding of these two ligands to one type II domain seems unlikely since heparin-Sepharose bound proteins can be eluted by phosphorylcholine [39]. Therefore, Db bound to the sperm surface cannot bind simultaneously to heparin and is unable to potentiate heparin-induced capacitation. Thus, the presence of two type II domains in BSP proteins confer the ability to BSP proteins to bind to the surface of the spermatozoa by one domain and leave the second domain accessible to heparin binding. In this process, BSP proteins serve as an anchoring pro-

teins for heparin. It should be noted that high concentration of heparin inhibit sperm capacitation [44]. It is possible in this case that heparin displaces BSP proteins from the sperm membrane by binding to both type II domains.

The absence of stimulation of cholesterol efflux from fibroblasts and spermatozoa by Db fragment along with the lack of potentiation of HDL-induced spermatozoa capacitation suggest that BSP proteins enhance sperm capacitation by favouring membrane cholesterol efflux. Our previous results indicate that preincubation of BSP proteins with choline inhibits cholesterol efflux suggesting that type II domains of BSP proteins are involved in this process [35]. The present results indicate that the Db exhibited binding ability for choline but did not, however, stimulate cholesterol efflux. This apparent discrepancy indicates that both type II domains are necessary for cholesterol efflux. Furthermore, we and other investigators [45, 46] have reported the aggregation tendency of BSP-A1/-A2 proteins into multiple oligomers (60,000–150,000 daltons). Dissociation of BSP-A1/-A2 oligomers occurs upon increasing the concentration of choline or phosphorylcholine suggesting that type II domains of BSP proteins are implicated in the formation of oligomers. The choline inhibition of BSP-mediated cholesterol efflux may reside in the prevention of protein oligomerization. The importance of oligomerization of apoA-I in cholesterol efflux has been demonstrated previously. In aqueous solution, apoA-I forms several oligomers, including dimers, trimers, etc and Jis et al. [47] have reported that the C-terminal domain of apoA-I is crucial for self-association and initial lipid binding for liposome formation. Mendez et al [48] reported that cooperativity between two or more helical repeats is required to remove cellular cholesterol. Synthetic amphipathic helical peptides with a single helix has little or no ability to induce cholesterol efflux but peptides containing two tandem repeats promote efficient lipid efflux from cells. As in apoA-I, the aggregation tendency of BSP proteins may be implicated in cholesterol efflux.

In summary, the type II domains of BSP-A1/-A2 proteins are autonomous binding sites for choline phospholipids and heparin, and are involved in sperm capacitation by anchoring heparin to the sperm surface and by stimulating sperm cholesterol efflux. The oligomerization tendency of BSP-A1/-A2 proteins may be important in their lipid efflux potential.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Kenneth D. Roberts for proofreading the manuscript. This work was supported by funds from the Medical Research Council of Canada (MT-13194 to P.M. and MA-13967 to C.L.).

REFERENCES

1. Patthy, L., Trexler, M., Vali, Z., Banyai, L., and Varadi, A. (1984) *FEBS Lett.* **171**, 131–136.

2. Patthy, L. (1985) *Cell* **41**, 657–663.
3. McMullen, B. A., and Fujikawa, K. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 5328–5341.
4. Morgan, D. O., Edman, J. C., Standring, D. N., Fried, V. A., Smith, M. C., Roth, R. A., and Rutter, W. J. (1987) *Nature* **329**, 301–307.
5. Oshima, A., Nolan, C. M., Kyle, J. W., Grubb, J. H., and Sly, W. S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2553–2562.
6. Lobel, P., Dahms, N. M., and Kornfeld, S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2563–2570.
7. Ishizaki, J., Hanasaki, K., Higashino, K., Kishino, J., Kikuchi, N., Ohara, O., and Arita, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5897–5904.
8. Taylor, M. E., Conary, J. T., Lennartz, M. R., Stahl, P. D., and Drickamer, K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12156–12162.
9. Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10024–10028.
10. Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (1995) *Nature* **375**, 151–155.
11. Kornbliht, A. R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K., and Barelle, F. E. (1985) *EMBO J.* **4**, 1755–1759.
12. Baker, M. E. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**, 1010–1014.
13. Banyai, L., Trexler, M., Koncz, S., Gyenes, M., Sipos, G., and Patthy, L. (1990) *Eur. J. Biochem.* **193**, 801–806.
14. Calvete, J. J., Mann, K., Schäfer, W., Sanz, L., Reinert, M., Nesaou, S., Raida, M., and Töpfer-Petersen, E. (1995) *Biochem. J.* **310**, 615–622.
15. Sanz, L., Calvete, J. J., Mann, K., Gabius, H.-J., and Töpfer-Petersen, E. (1993) *Mol. Reprod. Dev.* **35**, 37–43.
16. Calvete, J. J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L., and Töpfer-Petersen, E. (1997) *FEBS Lett.* **407**, 201–206.
17. Esch, F. S., Ling, N. C., Bohlen, P., Ying, S. Y., and Guillemin, R. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 861–867.
18. Seidah, N. G., Manjunath, P., Rochemont, J., Sairam, M. R., and Chrétien, M. (1987) *Biochem. J.* **243**, 195–203.
19. Calvete, J. J., Mann, K., Sanz, L., Raida, M., and Töpfer-Petersen, E. (1996) *FEBS Lett.* **399**, 147–152.
20. Banyai, L., Tordai, H., and Patthy, L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 12003–12008.
21. Holland, S. K., Harlos, K., and Blake, C. C. F. (1987) *EMBO J.* **6**, 1875–1880.
22. Trexler, M., and Patthy, L. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2457–2461.
23. Cleary, S., Mulkerin, M. G., and Kelley, R. F. (1989) *Biochemistry* **28**, 1884–1891.
24. McLean, J. W., Tomlinson, J. E., Kuang, W.-J., Eaton, D. L., Chen, E. Y., Fless, G. M., Scanu, A. M., and Lawn, R. M. (1987) *Nature* **330**, 132–137.
25. Manjunath, P., Baillargeon, L., Marcel, Y. L., Seidah, N. G., Chrétien, M., and Chapdelaine, A. (1988) in *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems* (K. W. McKerns and M. Chrétien, Eds.), pp. 259–273, Plenum, New York.
26. Manjunath, P., Chandonnet, L., Leblond, E., Desnoyers, L. (1994) *Biol. Reprod.* **50**, 27–37.
27. Desnoyers, L., Manjunath, P. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10149–10155.
28. Desnoyers, L., and Manjunath, P. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 341–349.
29. Chandonnet, L., Roberts, K. D., Chapdelaine, A., and Manjunath, P. (1990) *Mol. Reprod. Dev.* **26**, 313–318.
30. Manjunath, P., Marcel, Y. L., Uma, J., Seidah, N. G., Chrétien, M., and Chapdelaine, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16853–16857.
31. Thérien, I., Bleau, G., and Manjunath, P. (1995) *Biol. Reprod.* **52**, 1372–1379.
32. Thérien, I., Soubeyrand, S., and Manjunath, P. (1997) *Biol. Reprod.* **57**, 1080–1088.
33. Thérien, I., Moreau, R., and Manjunath, P. (1998) submitted to *Biol. Reprod.*
34. Langlais, J., Kan, F. W. K., Granger, L., Raymond, L., Bleau, G., and Roberts, K. D. (1988) *Gamete Res.* **20**, 185–201.
35. Moreau, R., Frank, P., Perreault, C., Marcel, Y. L., and Manjunath, P. (1998) submitted to *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
36. Lenz, R. W., Ball, G. D., Lohse, J. K., and First, N. L. (1983) *Biol. Reprod.* **28**, 683–690.
37. Basak, A., Boudreault, A., Chen, A., Chrétien, M., Seidah, N. G., and Lazure, C. (1995) *J. Peptide Sci.* **1**, 385–395.
38. Miller, D. J., and Ax, R. L. (1988) *Proc. 12th Tech. Conf. Art. Insem. Reprod.*, 97–107.
39. Calvete, J. J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L., and Töpfer-Petersen, E. (1997) *Andrologia* **29**, 179–186.
40. Constantine, K. L., Ramesh, V., Banyai, L., Trexler, M., Patthy, L., and Llinas, M. (1991) *Biochemistry* **30**, 1663–1672.
41. Constantine, K. L., Madrid, M., Banyai, L., Trexler, M., Patthy, L., and Llinas, M. (1992) *J. Mol. Biol.* **223**, 281–298.
42. Manjunath, P., Chandonnet, L., Baillargeon, L., and Roberts, K. D. (1993) *J. Reprod. Fertil.* **97**, 75–81.
43. Desnoyers, L., and Manjunath, P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5776–5780.
44. Lee, C. N., Handrow, R. R., Lenz, R. W., and Ax, R. L. (1985) *Gamete Res.* **12**, 345–355.
45. Manjunath, P., and Sairam, M. R. (1987) *Biochem. J.* **241**, 685–692.
46. Gasset, M., Saiz, J. L., Laynez, J., Sanz, L., Gentzel, M., Töpfer-Petersen, E., and Calvete, J. J. (1997) *Eur. Biophys. J.* **250**, 735–744.
47. Ji, Y., and Jonas, A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 11290–11297.
48. Mendez, A. J., Anantharamaiah, G. M., Segrest, J. P., and Oram, J. F. (1994) *J. Clin. Invest.* **94**, 1698–1705.

3. DISCUSSION

Afin de pouvoir féconder l'oocyte, les spermatozoïdes doivent d'abord subir une série d'événements au niveau des tractus génitaux mâle et femelle qui les rendent matures. À leur sortie des testicules, les spermatozoïdes débutent leur maturation au niveau de l'épididyme où ils acquièrent leur pouvoir fécondant et leur motilité (section 1.2.4.). Suite à cette maturation, les spermatozoïdes sont mélangés avec le plasma séminal lors de l'éjaculation dans le tractus génital femelle.

3.1. EFFLUX DE CHOLESTÉROL MEMBRANAIRE STIMULÉ PAR LES PROTÉINES BSP LORS DE L'ÉJACULATION

Nos études indiquent que l'éjaculation des spermatozoïdes s'accompagne d'un efflux de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes. En effet, nous démontrons pour la première fois que le plasma séminal bovin stimule l'efflux de cholestérol des spermatozoïdes (article 2.4.). Nos résultats permettent aussi de déterminer que les protéines BSP sont responsables de cet effet. En effet, les efflux de cholestérol médiés par les protéines BSP (120 µg/ml) et celui médié par 0,25-0,5% de plasma séminal (lequel contient approximativement la même quantité de BSP) après 8 h sont très similaires (31-35%). Les courbes d'efflux sont aussi très similaires; dans les deux cas, nous obtenons un efflux rapide de cholestérol dans les deux premières heures pour atteindre un plateau après 4 h d'incubation. De plus, des résultats comparables sont obtenus lorsque les spermatozoïdes sont incubés pendant 20 min avec le plasma séminal ou les protéines BSP, lavés puis incubés dans le milieu seul. Dans les deux cas, un très faible efflux de cholestérol est obtenu suite aux lavages des spermatozoïdes, c'est-à-dire lorsque le plasma séminal ou les protéines BSP sont enlevés du milieu d'incubation et qu'il ne reste que les protéines BSP liées aux spermatozoïdes. Donc, il apparaît que seulement les protéines BSP non-liées aux spermatozoïdes sont capables de stimuler un efflux de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes.

Nos résultats démontrent aussi que les spermatozoïdes épидидymaires incubés pendant 20 min en présence des protéines BSP-A1/-A2, lavés, puis incubés pendant 8 h dans le milieu seul sont incapables de subir la capacitation (article 2.3.). Nous

observons que pendant les 20 min d'incubation, les protéines BSP-A1/-A2 stimulent un efflux de cholestérol de 17,3% (2,5 fois la stimulation du contrôle, article 2.4.). Ces résultats indiquent que l'efflux de cholestérol qui se produit pendant ces 20 min est probablement insuffisant pour stimuler la capacitation des spermatozoïdes. Par contre, une exposition continue des spermatozoïdes aux protéines BSP entraîne un efflux de cholestérol de 30-33%, et ceci résulte en une augmentation de deux fois du taux de capacitation comparativement à celui du contrôle. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Zarintash et al. (1996) qui ont démontré que les spermatozoïdes humains devaient perdre du cholestérol afin de répondre à un inducteur de la réaction de l'acrosome. Leurs études de cinétiques d'acquisition de la réaction de l'acrosome en fonction de l'efflux de cholestérol suggèrent qu'un seuil d'efflux de cholestérol peut exister. En effet, lorsque l'efflux de cholestérol des spermatozoïdes est inférieur à 20%, l'acquisition de la réaction de l'acrosome est faible tandis que lorsque l'efflux de cholestérol varie entre 20 et 40%, l'acquisition de la réaction de l'acrosome augmente de plus de 90% par rapport à la capacitation maximale. Ainsi, il est possible qu'un seuil d'efflux de cholestérol doive être atteint pour qu'il y ait capacitation.

Les protéines BSP seules peuvent stimuler la capacitation des spermatozoïdes lorsqu'elles sont incubées pour une longue période avec ces derniers, mais cette situation n'est pas physiologique, puisque le plasma séminal qui contient les protéines BSP est graduellement dilué et éliminé lors du transit des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle. Donc, après un certain laps de temps, il est très probable qu'il ne reste que les protéines BSP liées à la surface des spermatozoïdes qui sont incapables de stimuler l'efflux de cholestérol. Donc, physiologiquement, les protéines BSP ne peuvent pas stimuler la capacitation seules et les spermatozoïdes nécessitent la présence d'autres facteurs présents dans le fluide oviductal pour capaciter. De cette façon, les spermatozoïdes capacitent au bon moment, seulement au niveau du tractus génital femelle, demeurant non capités jusqu'à ce qu'ils atteignent le bon endroit.

L'analyse des particules d'efflux générées en présence des protéines BSP (article 2.4.) démontrent que les particules d'efflux obtenues sont des particules

homogènes de densité comparable aux HDL (Ehrenwald et al., 1990) qui contiennent des protéines BSP associées au cholestérol. Donc, les protéines BSP peuvent former un complexe avec le cholestérol, bien que seulement une faible portion des protéines BSP participe à la formation des particules d'efflux. Une étude antérieure nous avait révélé que les protéines BSP ne pouvaient pas lier le cholestérol immobilisé (Desnoyers et Manjunath, 1992). Par contre, d'autres études (Manjunath et Sairam, 1987; Gasset et al., 1997) ont rapporté que les protéines BSP peuvent former des agrégats (60-150 kDa). Ces agrégats pourraient former des cavités hydrophobes dans lesquelles le cholestérol pourrait être séquestré. L'importance de l'oligomérisation des protéines dans l'efflux de cholestérol a été démontrée précédemment pour l'apoA-I (Ji et Jonas, 1995; Mendez et al., 1994). D'autres études sont nécessaires pour caractériser la nature des particules d'efflux et pour déterminer les proportions de protéines BSP et de cholestérol présentes dans les particules d'efflux.

Les protéines BSP sont composées de deux domaines de type II arrangés en tandem (Esch et al., 1983a; Seidah et al., 1987; Calvete et al., 1996). Contrairement aux protéines BSP, le second domaine de type II ne stimule pas l'efflux de cholestérol de la membrane des fibroblastes et des spermatozoïdes ni la capacitation des spermatozoïdes (article 2.6.). Ces études démontrent aussi que le second domaine de type II peut lier la choline. De plus, il a été démontré que la dissociation des agrégats de protéines BSP est possible lorsque la concentration de choline ou de phosphorylcholine dans le milieu est élevée ce qui suggère que les domaines de type II sont impliqués dans la formation de ces agrégats. Le second domaine de type II seul est donc probablement incapable de former des agrégats et stimuler l'efflux de cholestérol. Donc, les deux motifs du type II des protéines BSP sont essentiels pour promouvoir l'efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes.

3.2. DIMINUTION DE LA CHARGE NETTE DES SPERMATOZOÏDES PAR LES PROTÉINES BSP

Pendant cette même période, les protéines BSP tapissent la surface des spermatozoïdes éjaculés, en se liant aux phospholipides contenant un groupement choline (Manjunath et al., 1994; Desnoyers et Manjunath, 1992). Plusieurs études ont

démontré qu'après l'éjaculation, la charge nette des spermatozoïdes est diminuée par l'ajout de composantes acides sécrétées par les glandes accessoires se fixant à leur surface et qui seront enlevées au cours de la capacitation (section 1.9.).

À cette époque, le point isoélectrique exact ainsi que l'hétérogénéité moléculaire des protéines BSP étaient encore inconnus. L'analyse électrophorétique des protéines BSP (article 2.1.), nous démontre que la protéine BSP-A1 possède une M_r plus élevée (16,5 kDa) que la protéine BSP-A2 (16 kDa) et est plus acide (pI 4,7-5,0) que cette dernière (pI 4,9-5,2). Puisque ces deux protéines possèdent la même séquence en acides aminés, leurs différences ne devraient résider que dans leur contenu en sucre (Manjunath et Sairam, 1987). Puisque la protéine BSP-A1 possède une quantité plus grande d'acide sialique (1,6-2,5 g/ 100 g) que la protéine BSP-A2 (0,6-1,0 g/100 g), il est attendu que la protéine BSP-A1 soit plus acide (Manjunath et al., 1988). La protéine BSP-A3 possède un pI similaire aux protéines BSP-A1/-A2 (pI 4,8-5,2) mais une M_r plus faible de 15 kDa. N'étant pas glycosylée, l'acidité et l'hétérogénéité de sa charge ne peuvent être attribuées à la présence d'acide sialique. Pour sa part, la protéine BSP-30-kDa s'est révélée comme étant la protéine la plus acide du plasma séminal bovin (pI 3,9-4,6) et avait une M_r de 28 kDa.

Donc, puisque les protéines BSP constituent les glycoprotéines majeures du plasma séminal bovin et sont parmi les protéines les plus acides du plasma séminal bovin, elles peuvent très bien correspondre aux composantes acides qui sont ajoutées à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation. À cette époque nous avons émis l'hypothèse que les protéines BSP se fixeraient à la surface des spermatozoïdes puis seraient enlevées au cours de la capacitation. Toutefois, des études parallèles de Calvete et al. (1994) ont démontré que la quantité de protéines BSP à la surface des spermatozoïdes ne diminuait que très légèrement durant la capacitation des spermatozoïdes venant réfuter notre hypothèse. Donc, les protéines BSP peuvent très bien correspondre aux composantes acides ajoutées à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation mais ne correspondent probablement pas aux composantes acides enlevées lors de la capacitation. D'autres composantes acides sont donc enlevées au cours de la capacitation provenant soit du plasma séminal ou qui sont déjà présentes à la surface des spermatozoïdes avant l'éjaculation. Une protéine acide de 12,9 kDa, la

protéine acide du fluide séminal (aSFP) a été identifiée au niveau du plasma séminal bovin (1,7 mg/ml, Einspanier et al., 1993; Dostalova et al., 1994). Il a été démontré que cette protéine était sécrétée par l'ampoule et les vésicules séminales et était retrouvée à la surface des spermatozoïdes suite à l'éjaculation ($\sim 1,8 \times 10^6$ molécules/spermatozoïde). En milieu capacitant, la quantité de aSFP diminuait considérablement ($\sim 2,2 \times 10^3$) après 1,5 h d'incubation et n'était plus détectable à la surface des spermatozoïdes après 18 h. Donc, cette protéine pourrait aussi contribuer aux protéines acides ajoutées lors de l'éjaculation. De plus, il est très probable, due à ces propriétés, que la protéine aSFP contribuerait à la majeure partie des protéines acides enlevées au cours de la capacitation.

3.3. CAPACITATION INDUITE PAR L'HÉPARINE EN PRÉSENCE DES PROTÉINES BSP

Les spermatozoïdes couverts de protéines BSP parcourent ensuite le tractus génital femelle. Durant ce périple, des milliers de spermatozoïdes seront éliminés et détruits. Les spermatozoïdes traversent premièrement le mucus cervical qui sépare les spermatozoïdes du plasma séminal, jusqu'à l'épithélium du col de l'utérus auquel ils s'associeront transitoirement (Yanagimachi, 1994). Les spermatozoïdes seront relâchés progressivement de l'épithélium du col de l'utérus vers l'utérus qu'ils traverseront rapidement pour se rendre à l'oviducte. Les spermatozoïdes s'arrêteront au niveau de l'isthme où ils s'attacheront par la tête à l'épithélium au niveau de cryptes. De cette façon, les spermatozoïdes sont protégés et peuvent terminer leur maturation. C'est à ce niveau, au contact avec le fluide oviductal que les spermatozoïdes rencontrent les GAGs semblables à l'héparine ainsi que les HDL, les deux facteurs capacitants les plus importants retrouvés chez le bovin.

Des études précédentes ont déjà démontré que chez le bovin, l'héparine ainsi que d'autres GAGs induisent la capacitation plus rapidement chez les spermatozoïdes éjaculés que ceux épидидymaires (Parrish et al., 1988; Miller et al., 1990; Florman et First, 1988). En effet, les spermatozoïdes épидидymaires bovin possèdent seulement quelques sites de liaisons pour l'héparine et sont incapables de subir la capacitation dans le même laps de temps que les spermatozoïdes éjaculés exposés à l'héparine

(Lee et al., 1985; Miller et al., 1990). Par contre, une courte exposition des spermatozoïdes épидидymaires au plasma séminal bovin leur redonne la capacité de subir la capacitation dans le même temps que les spermatozoïdes éjaculés (Florman et al., 1988; Miller et al., 1990). Nos expériences de capacitation en présence des CBSP confirment ces résultats (article 2.2.). En effet, nos études révèlent qu'une pré-incubation de 20 min des spermatozoïdes épидидymaires en présence des CBSP avant une incubation pendant 5 h avec l'héparine, est suffisante pour capaciter les spermatozoïdes épидидymaires (2,9 fois le contrôle). Ces résultats suggèrent fortement que les spermatozoïdes épидидymaires sont modifiés par les sécrétions des glandes accessoires. L'effet du plasma séminal sur la capacitation induite par l'héparine est probablement dû à l'ajout de plusieurs protéines liant l'héparine (ayant des poids moléculaires de 14-18, 24 et 31 kDa) à la surface des spermatozoïdes lors du contact avec le plasma séminal (section 1.7.6.). Ces protéines correspondent aux protéines BSP (Chandonnet et al., 1990; Miller et al., 1990). Lors de l'éjaculation, les protéines BSP augmenteraient donc le nombre de protéines liant l'héparine à la surface des spermatozoïdes, ce qui permettrait à ces derniers de répondre à l'héparine au niveau de l'oviducte. Nos résultats confirment cette hypothèse. En effet, nos résultats démontrent (article 2.2.) que toutes les protéines BSP stimulent la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires, en présence d'héparine, de manière dose-dépendante (3 à 5 fois le contrôle). Les protéines BSP purifiées sont légèrement plus efficaces pour stimuler la capacitation que les CBSP. Cependant, il est normal que l'activité spécifique suite à la purification est relativement identique à celles des protéines totales puisque les protéines BSP constituent plus de 60% des CBSP. De plus, lorsque les protéines du plasma séminal dépourvues des protéines BSP sont utilisées, aucune activité significative est retrouvée. Les résultats démontrent aussi que les protéines BSP agissent spécifiquement au niveau de la capacitation et non pas au niveau de la réaction de l'acrosome. En effet, en absence de lyso-PC qui dans nos expériences est utilisée pour mesurer le taux de capacitation dû à sa capacité d'induire la réaction de l'acrosome seulement chez les spermatozoïdes capités, les protéines BSP ne peuvent aucunement stimuler la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes. Tous ces résultats indiquent que les protéines BSP sont les facteurs les plus

importants du plasma séminal bovin responsables de la stimulation de la capacitation induite par l'héparine.

Afin de clarifier le mécanisme de capacitation induit par l'héparine en présence des protéines BSP, nous avons, tout d'abord, vérifié si l'héparine pouvait stimuler un efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes. Nos études démontrent que l'héparine seule, contrairement aux protéines BSP, ne peut pas stimuler un efflux de cholestérol des spermatozoïdes (article 2.4.). Puis, nous avons procédé à des études de capacitation sur des spermatozoïdes éjaculés en présence d'héparine et d'anticorps polyclonaux contre les protéines BSP purifiées (anticorps anti-BSP). Lorsque les spermatozoïdes éjaculés sont lavés puis incubés 5 h en présence d'héparine et d'anticorps anti-BSP, les spermatozoïdes perdent leur capacité à subir la réaction de l'acrosome suite à l'ajout de lyso-PC. Ces résultats corrélerent les résultats obtenus précédemment lesquels indiquaient que les protéines BSP jouaient un rôle important dans la capacitation induite par l'héparine. L'utilisation de Fabs au lieu des anticorps polyclonaux nous a confirmé que l'inhibition observée est spécifique, qu'elle n'est pas due à une agrégation de spermatozoïdes par les anticorps mais bien due à l'interaction des anticorps avec les protéines BSP liées aux spermatozoïdes. De plus, les analyses d'immunobuvardage indiquent que les anticorps anti-BSP n'interagissent pas avec l'héparine. Tous ces résultats nous indiquent que les anticorps anti-BSP préviennent la liaison de l'héparine aux protéines BSP liées à la surface des spermatozoïdes. Donc, ces résultats confirment que lors de la capacitation des spermatozoïdes induite par l'héparine, l'héparine doit interagir avec les protéines BSP liées aux spermatozoïdes pour produire son effet.

Les deux domaines de type II sont essentiels pour l'expression des fonctions biologiques des protéines BSP. En effet, le second domaine de type II est incapable de stimuler la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovin induite par l'héparine (article 2.6.). Nos résultats indiquent que le second domaine de type II lie l'héparine ainsi que la choline. Par contre, le second domaine de type II ne semble pas pouvoir lier ces deux molécules en même temps. En effet, des études précédentes ont révélé que les protéines BSP liées à une colonne héparine-Sepharose pouvaient être éluées par la phosphorylcholine (Calvete et al., 1997). Donc, le second domaine

de type II des protéines BSP, une fois lié à la surface des spermatozoïdes ne pourrait plus interagir avec l'héparine et stimuler la capacitation. La présence de deux domaines dans la protéine native pourrait permettre aux protéines BSP d'interagir par l'un de ces domaines avec la surface des spermatozoïdes et par l'autre avec l'héparine.

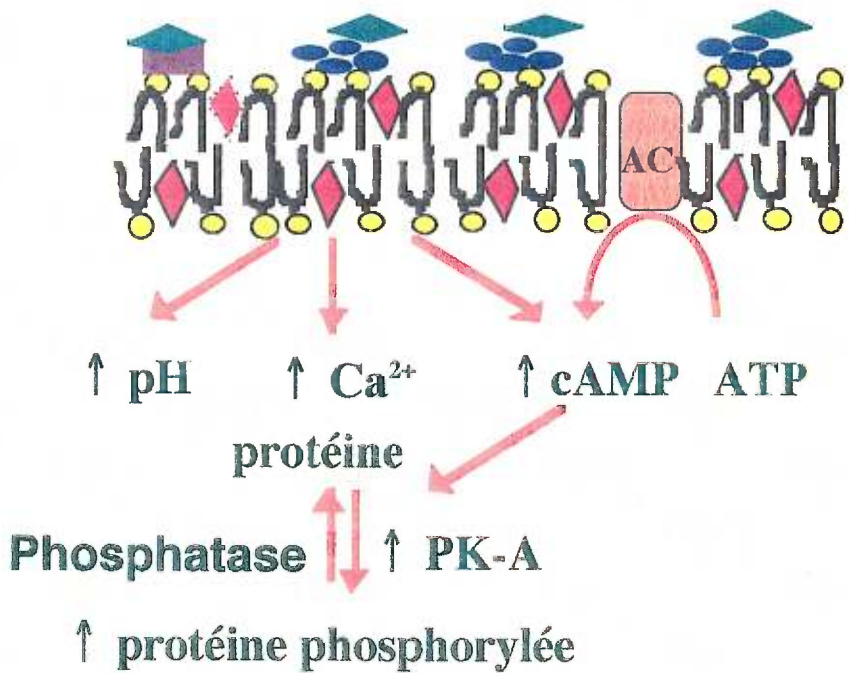
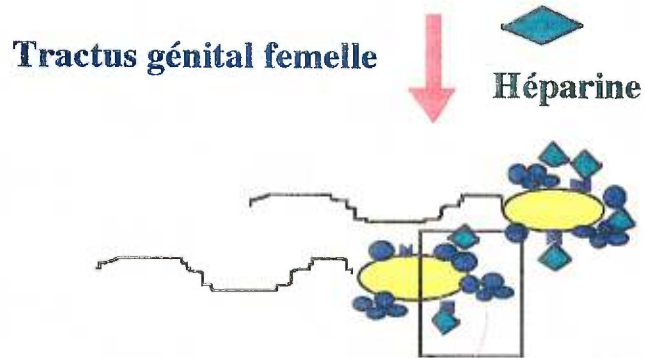
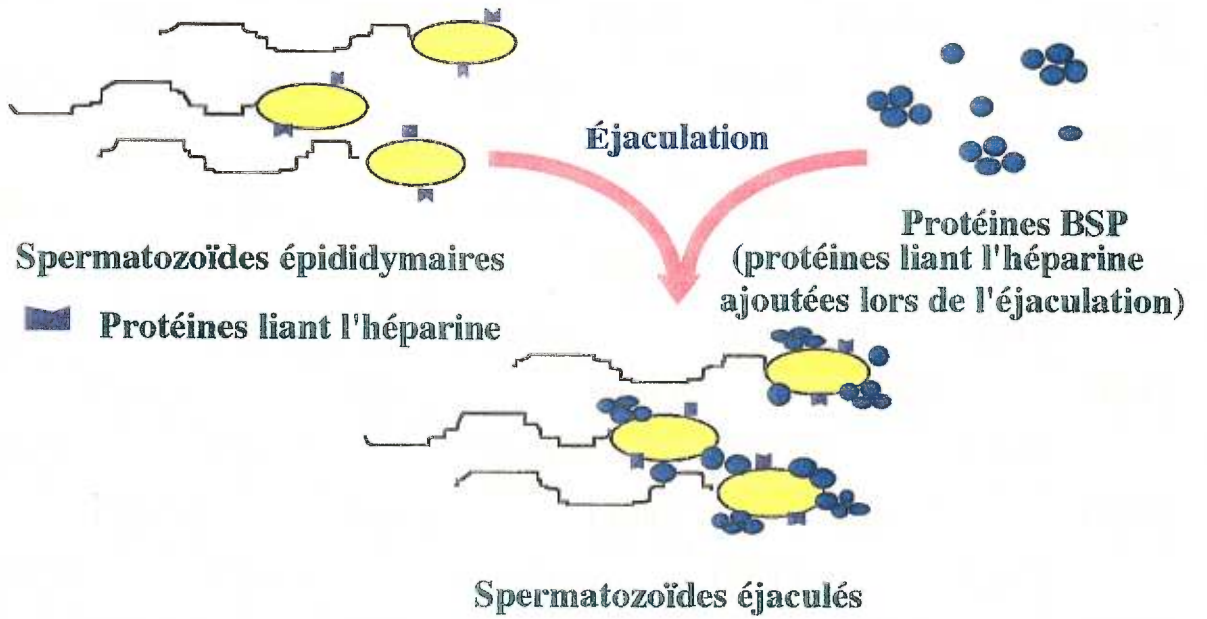
Au cours de ces études, nous avons aussi vérifié l'effet de l'héparine sur la phosphorylation sur tyrosine des protéines associées à la capacitation. Nos résultats confirment les résultats obtenus précédemment par l'équipe de Galantino-Homer (1997) indiquant que la capacitation induite par l'héparine est accompagnée d'une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine d'un groupe de protéines spermatiques.

On sait depuis longtemps que les spermatozoïdes sont exposés aux GAGs dès l'éjaculation (section 1.7.2.). En effet, le plasma séminal possède une forte concentration de GAGs (1,6 mg/ml, Lee et al., 1985). Par contre, cette concentration de GAGs est incapable de stimuler la capacitation (Lee et al., 1985). Durant, le parcours des spermatozoïdes à travers le tractus génital femelle, la concentration en GAGs diminue graduellement. Les études précédentes ont révélé que seul le fluide oviductal bovin au moment de l'oestrus contient des proportions adéquates de GAGs semblables à l'héparine pour stimuler la capacitation des spermatozoïdes (section 1.7.2.). Donc, encore une fois le système est régulé pour que la capacitation se produise à l'endroit et au moment adéquats, évitant toute capacitation précoce.

Le mécanisme exact de capacitation par l'héparine est encore inconnu. L'héparine semble se lier aux spermatozoïdes par son interaction aux protéines BSP liées à la surface des spermatozoïdes et stimuler une augmentation intracellulaire du Ca^{2+} , du pH et de l'AMPc (figure 6, section 1.7.7.). Cette augmentation provoquerait une série d'événements résultant en l'activation/l'inactivation de protéines cellulaires cibles par l'action de protéines kinases (phosphorylation sur tyrosine des protéines spécifiques).

FIGURE 6**INDUCTION DE LA CAPACITATION PAR L'HÉPARINE**

La figure ci-après illustre les différentes étapes de la capacitation induite par l'héparine. Les spermatozoïdes épидидymaires bovin possèdent seulement quelques sites de liaisons pour l'héparine et sont incapables de subir la capacitation dans un même laps de temps que les spermatozoïdes éjaculés. Lors de l'éjaculation, plusieurs protéines liant l'héparine (les protéines BSP) sont ajoutées à la surface des spermatozoïdes augmentant ainsi le nombre de sites de liaisons pour l'héparine. Par la suite, au niveau de l'oviducte, les spermatozoïdes interagissent avec l'héparine. La liaison de l'héparine à la surface des spermatozoïdes stimule une augmentation de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} et de l'AMPc et une augmentation du pH (figure 6, section 1.7.7.). Cette augmentation provoque une série d'événements résultant en l'activation/l'inactivation de protéines cellulaires cibles par l'action de protéines kinases (phosphorylation des tyrosines des protéines spécifiques).



3.4. CAPACITATION INDUITE PAR LES HDL

D'un autre côté chez le bovin, les spermatozoïdes au niveau de l'oviducte peuvent aussi interagir avec les accepteurs de cholestérol présents dans le fluide oviductal et subir la capacitation (section 1.8.). En effet, les HDL et la BSA sont aussi impliquées au niveau de la capacitation comme accepteurs de cholestérol dans les modifications lipidiques de la membrane des spermatozoïdes se produisant lors de la capacitation. Nos résultats (article 2.3.) démontrent que les HDL seules peuvent après 8 h d'incubation stimuler la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires, mais en présence des protéines BSP-A1/-A2, le temps requis pour avoir une stimulation significative est de seulement 5 h. Donc, les protéines BSP peuvent accélérer le processus de capacitation stimuler par les HDL.

Nos études subséquentes (article 2.4.) confirment les résultats obtenus précédemment par d'autres équipes (Langlais et al., 1988; Ehrenwald et al., 1990) soit que les HDL stimulent la capacitation en facilitant l'efflux de cholestérol des spermatozoïdes. De plus, nos résultats indiquent que l'efflux de cholestérol stimulé par les HDL n'est pas du tout affecté par la présence des protéines BSP-A1/-A2 à la surface des spermatozoïdes. Par contre, l'efflux de cholestérol total des spermatozoïdes ainsi que le taux de capacitation est plus élevé lorsque les spermatozoïdes épидидymaires sont pré-incubés 20 min avec les protéines BSP-A1/-A2, lavés puis incubés avec les HDL pendant 8 h, que lorsque les HDL seules sont utilisées. Donc, le premier efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes stimulé par les protéines BSP lors de l'éjaculation prépare déjà les spermatozoïdes à subir la capacitation. Par la suite, un deuxième efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes est stimulé lors de la rencontre des spermatozoïdes avec les HDL au niveau de l'oviducte ce qui entraîne la capacitation des spermatozoïdes.

Les résultats obtenus lors de l'utilisation de spermatozoïdes éjaculés et d'anticorps anti-BSP, nous ont permis de mieux étayer notre hypothèse (article 2.5.). En effet, l'ajout d'anticorps anti-BSP, même à des concentrations élevées, n'affecte pas du tout la réponse des spermatozoïdes éjaculés incubés pendant 8 h en présence de HDL. Dans ces expériences, des spermatozoïdes éjaculés sont utilisés, donc qui

sont en contact depuis un certain temps avec le plasma séminal et ainsi avec les protéines BSP. Il est fort probable que pendant cette période, les protéines BSP stimulent un efflux de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Donc, il semble normal que l'ajout subséquent d'anticorps anti-BSP ne semble pas affecter ou diminuer la stimulation par les HDL puisque les protéines BSP ont déjà fait leur travail. Ces nouveaux résultats confirment aussi que l'efflux de cholestérol des spermatozoïdes stimulé par les HDL est indépendant de la présence des protéines BSP puisque les anticorps anti-BSP n'affectent aucunement la capacitation induite par les HDL. Donc, il semble que les HDL exercent leurs effets en interagissant directement avec la membrane plasmique des spermatozoïdes.

Nous démontrons aussi que l'apoA-I présente dans les HDL semble être un facteur important pour la stimulation de la capacitation. Les liposomes d'apoA-I stimulent la capacitation, plus rapidement que les HDL. En effet après seulement 2 h d'incubation, la stimulation obtenue est deux fois celle du contrôle. Cet effet est aussi augmenté par une pré-incubation en présence des protéines BSP. D'un autre côté, les autres lipoprotéines (LDL, VLDL), le sérum dépourvu de lipoprotéines ainsi que les liposomes sans apoA-I sont incapables de stimuler la réaction de l'acrosome en présence ou en absence de protéines BSP. Toutes ces particules contiennent des phospholipides similaires aux HDL, mais ne contiennent pas d'apoA-I. Donc, la présence d'apoA-I semble nécessaire pour l'induction de la capacitation. À l'époque où ces résultats ont été obtenus, nous avons émis l'hypothèse que puisque les protéines BSP pouvaient interagir avec l'apoA-I ainsi qu'avec l'apoA-I associée au HDL (Manjunath et al., 1989), l'interaction entre les protéines BSP et l'apoA-I pourrait jouer un rôle important dans le processus de capacitation. Nos nouveaux résultats indiquant que l'efflux de cholestérol stimulé par les HDL n'est pas affecté par la présence des protéines BSP-A1/-A2 liées à la surface des spermatozoïdes, nous permettent maintenant de réfuter cette hypothèse. Plusieurs études ont d'ailleurs déjà démontré que l'apoA-I seule (non incorporé dans les liposomes) est un très bon accepteur de cholestérol (Hara et Yokoyama, 1991). Jusqu'à maintenant aucune étude n'a démontré que les spermatozoïdes possédaient un récepteur pour l'apoA-I mais il est presque certain que malgré la propriété de liaison des protéines BSP à

l'apoA-I, l'apoA-I n'interagirait probablement pas avec les spermatozoïdes via son interaction avec les protéines BSP.

Le second accepteur de cholestérol retrouvé au niveau du fluide oviductal est la BSA. La concentration de BSA dans le fluide oviductal varie entre 6,2 et 19,2 mg/ml ce qui représente plus de 90% des protéines totales du fluide oviductal (Ehrenwald et al., 1990). Malgré cette abondance, nos résultats confirment les résultats obtenus précédemment (Langlais et al., 1988; Ehrenwald et al., 1990) que la BSA ne peut pas stimuler l'efflux de cholestérol et que les HDL sont donc l'accepteur le plus efficace de cholestérol dans le fluide oviductal.

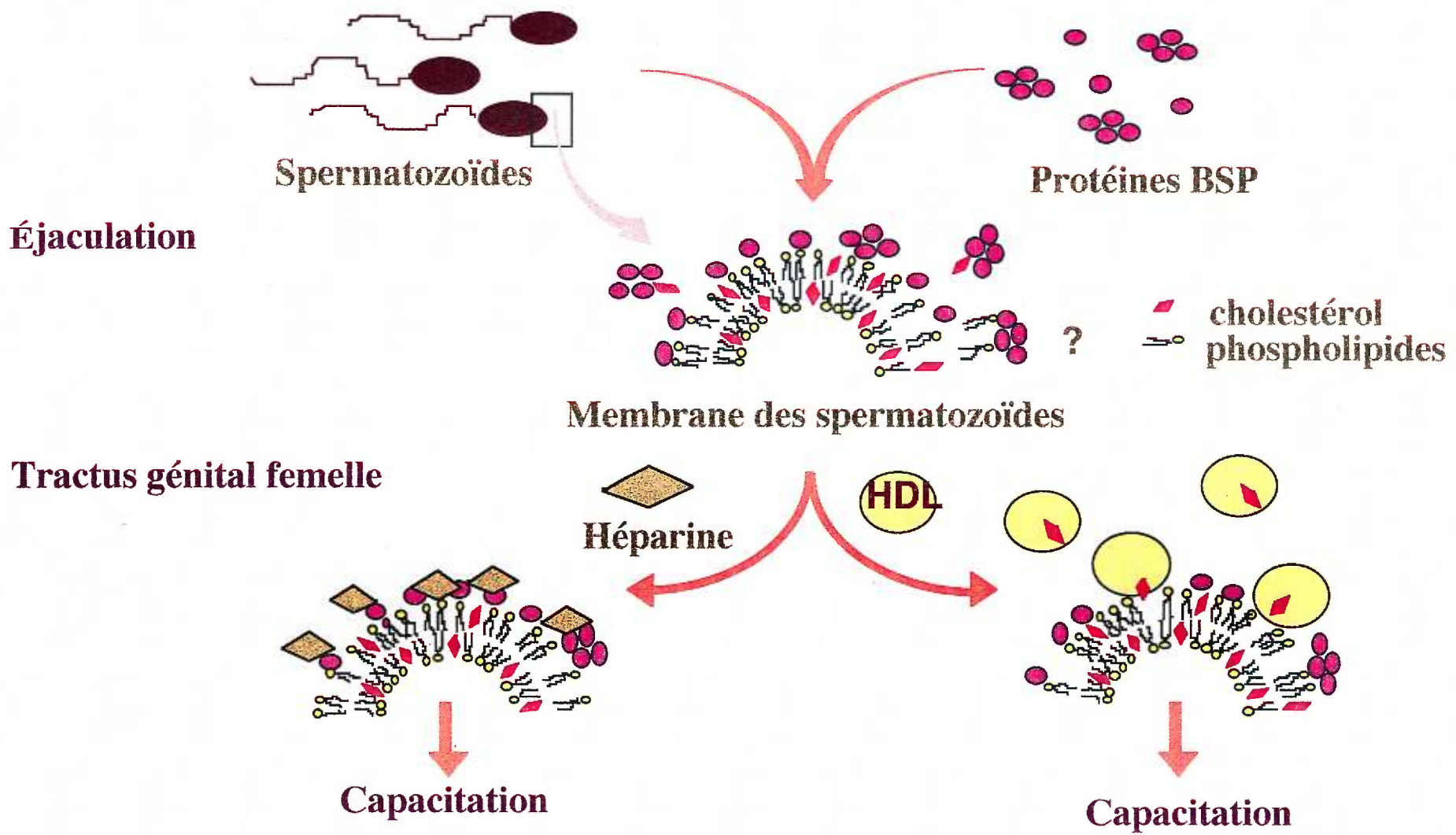
Le mécanisme exact de capacitation par les HDL reste encore un mystère. Nous savons maintenant que la capacitation induite par les HDL, contrairement à celle induite par l'héparine, n'impliquait pas une cascade de phosphorylation de protéines cellulaires cibles par l'action de protéines kinases (article 2.5.). Donc, nous croyons que les HDL au niveau de l'oviducte stimulent un second efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes indépendant de la présence des protéines BSP. Cet efflux résulterait en une diminution du ratio cholestérol/phospholipides nécessaire pour induire la capacitation des spermatozoïdes. Puisque le cholestérol est reconnu pour avoir un effet stabilisant sur les membranes (Yeagle, 1985), cet efflux produirait probablement une réorganisation ou une déstabilisation de la membrane. Ceci pourrait entraîner l'expression à la surface des spermatozoïdes de nouveaux récepteurs pour la zone pellucide (Benoff et al., 1993a-c, sections 1.4.1. et 1.4.3.1.).

3.5. MODÈLE DE CAPACITATION DES SPERMATOZOÏDES BOVIN

L'ensemble des résultats réunis ici attribue pour la première fois un rôle physiologique aux protéines BSP; les protéines BSP auraient un rôle important au niveau de la capacitation des spermatozoïdes bovin. Basé sur tous nos résultats ainsi que sur ceux obtenus précédemment, nous avons élaboré un modèle démontrant le rôle des protéines BSP dans la capacitation des spermatozoïdes (figure 7). La capacitation des spermatozoïdes bovin débute dès l'éjaculation, au moment où les spermatozoïdes sont mélangés avec le plasma séminal (les protéines BSP). Durant

FIGURE 7**MODÈLE DE CAPACITATION IMPLIQUANT LES PROTÉINES BSP**

La capacitation des spermatozoïdes bovin débute dès l'éjaculation, au moment où les spermatozoïdes sont mélangés avec le plasma séminal (les protéines BSP). Durant cette brève exposition du plasma séminal (environ de 20 à 30 min), les protéines BSP produisent un faible mais significatif efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes. Le premier efflux de cholestérol produit par les protéines BSP pourrait déstabiliser légèrement la membrane des spermatozoïdes. Cette légère déstabilisation pourrait entraîner une réorganisation de la membrane laquelle pourrait résulter en l'apparition de nouveaux récepteurs à la surface des spermatozoïdes (pour les HDL ou les GAGs semblables à l'héparine). Pendant cette même période, les protéines BSP tapissent la surface des spermatozoïdes éjaculés, en se liant aux phospholipides contenant un groupement choline. Les spermatozoïdes couverts de protéines BSP, arrivent ensuite dans le tractus génital femelle où ils rencontrent au niveau de l'oviducte les GAGs semblables à l'héparine ainsi que les HDL. L'interaction avec l'un ou l'autre de ces deux molécules permet aux spermatozoïdes de subir la capacitation par deux mécanismes différents. Dans le mécanisme de capacitation induite par l'héparine (où les GAGs semblables à l'héparine), la liaison des protéines BSP à la membrane des spermatozoïdes augmente le nombre de sites de liaisons pour l'héparine à la surface des spermatozoïdes. L'héparine lie ces sites et induit la capacitation des spermatozoïdes. Alternativement, les spermatozoïdes peuvent interagir avec les HDL. Les HDL stimulent alors un second efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes au niveau de l'oviducte. Cet efflux est indépendant de la présence des protéines BSP. Cet efflux résulterait en une diminution du ratio cholestérol/phospholipides nécessaire pour induire la capacitation des spermatozoïdes.



cette brève exposition du plasma séminal (environ de 20 à 30 min), les protéines BSP produisent un faible mais significatif efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes. Le premier efflux de cholestérol produit par les protéines BSP pourrait déstabiliser légèrement la membrane des spermatozoïdes. Cette légère déstabilisation pourrait entraîner une réorganisation de la membrane et engendrerait l'apparition de nouveaux récepteurs à la surface des spermatozoïdes (pour les HDL ou les GAGs semblables à l'héparine). Pendant cette même période, les protéines BSP tapissent la surface des spermatozoïdes éjaculés, en se liant aux phospholipides contenant un groupement choline. C'est par ce phénomène que la charge nette du spermatozoïde serait diminuée, les protéines BSP comptant parmi les protéines les plus acides du plasma séminal bovin. Les protéines BSP possèdent deux sites de liaison pour la choline (les deux domaines de type II), il est fort probable qu'un seul des deux sites de liaison pour la choline soit utilisé pour fixer les protéines BSP à la membrane plasmique l'autre pouvant ainsi interagir avec d'autres molécules. Les spermatozoïdes couverts de protéines BSP arrivent ensuite dans le tractus génital femelle où ils rencontrent au niveau de l'oviducte les GAGs semblables à l'héparine ainsi que les HDL. L'interaction avec l'une ou l'autre de ces deux molécules permet aux spermatozoïdes de subir la capacitation par deux mécanismes différents. 1) Dans le mécanisme de capacitation induite par l'héparine (ou les GAGs semblables à l'héparine), la liaison des protéines BSP à la membrane des spermatozoïdes augmente le nombre de sites de liaisons pour l'héparine à la surface des spermatozoïdes. L'héparine lie ces sites et déclenche une cascade de signalisation cellulaire menant à la capacitation des spermatozoïdes (figure 6, section 1.7.7.). 2) Alternativement, les spermatozoïdes peuvent interagir avec les HDL. Les HDL stimulent alors un second efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes au niveau de l'oviducte. Cet efflux produirait de nombreux changements dans l'organisation lipidique de la membrane et des protéines membranaires menant à la capacitation (section 3.4.).

Au moment de la dernière étape de la capacitation, les spermatozoïdes subissent un changement au niveau de leur motilité et deviennent hyperactivés (section 1.4.6.). Cette hyperactivation permet aux spermatozoïdes de se détacher de

l'épithélium où ils sont attachés. Les spermatozoïdes matures quittent alors par vagues l'isthme vers le site de fécondation, l'ampoule ou la jonction ampoulo-isthmique de l'oviducte. C'est à ce niveau que les spermatozoïdes rencontrent l'oocyte. L'interaction des spermatozoïdes avec la zone pellucide permet aux spermatozoïdes de subir la réaction de l'acrosome. Cette dernière permet aux spermatozoïdes de traverser la zone pellucide entourant l'oocyte. Au contact avec la membrane plasmique, un seul spermatozoïde se fusionnera avec l'oocyte et participera à la création d'une nouvelle vie.

Donc, au niveau du fluide oviductal bovin on retrouve deux facteurs capacitants majeurs soient les HDL et l'héparine. Ces deux facteurs stimulent la capacitation indépendamment et de manière complètement différente. De plus, chez le bovin, les protéines BSP, les HDL et l'héparine ne sont pas les seuls facteurs capacitants déjà identifiés. On retrouve aussi une protéine associée à l'oestrus spécifique à l'oviducte (EAP), une glycoprotéine de 95 kDa qui peut stimuler la capacitation des spermatozoïdes éjaculés (Boice et al., 1990; Wegner et Killan, 1992), et la BSA dont nous avons discuté précédemment. La capacitation des spermatozoïdes est un phénomène très complexe et beaucoup d'autres études devront être effectuées pour déterminer son mécanisme exact. Le fait que le fluide oviductal possède plusieurs agents capacitants différents, fonctionnant par des mécanismes différents pourrait permettre aux spermatozoïdes d'avoir toutes les chances de leur côté afin d'être certain qu'au moins un des spermatozoïdes atteindra son but et fécondera l'oocyte. On sait que parmi les millions de spermatozoïdes seulement quelques uns atteindront l'oocyte au bon moment. De plus, on sait que la stimulation de la capacitation induite par l'héparine en présence des BSP est plus rapide que celle induite par les HDL. De cette façon, différentes populations de spermatozoïdes vont être capacitées dans des périodes de temps différents dépendant si elles interagissent avec les GAGs semblables à l'héparine où avec les HDL, donc de cette façon on assurerait qu'au moins une population de spermatozoïdes capacite au moment approprié.

Les HDL et l'héparine ne semblent pas des facteurs capacitants exclusifs au bovin. L'héparine a été reconnue pour influencer la reproduction du hamster (Meizel et Turner), du cochon (Reyes et al., 1984), du cheval (Varner et al., 1993), du lapin

(Lenz et al., 1983b) et de l'humain (Delgano et al., 1988). Chez trois de ces espèces soit chez le cochon, l'hamster et l'humain, la capacitation semble aussi occasionner des changements au niveau du métabolisme de l'AMPc et de la phosphorylation sur tyrosine de protéines (Berger et Clegg, 1983; Visconti et Tezon, 1989; Leclerc et al., 1996). Bien que l'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-BSP, nous ait permis de détecter des analogues aux protéines BSP dans le plasma séminal de hamster, de souris, de porc et de rat, il n'y a que chez le porc (pB1) et le cheval (HSP-1 et -2) que des analogues ont été séquencés. Donc, chez ces deux espèces (le porc et le cheval), les protéines analogues aux protéines BSP pourraient jouer un rôle identique à celui des protéines BSP et stimuler la capacitation induite par l'héparine via une cascade de phosphorylation. Chez les autres espèces où des analogues des protéines BSP n'ont pas été séquencés, il se peut très bien que leur plasma séminal contiennent des analogues aux protéines BSP non encore identifiés ou d'autres protéines pouvant lier l'héparine et les spermatozoïdes pouvant jouer le même rôle que les protéines BSP.

Jusqu'à maintenant, la présence des HDL au niveau du fluide oviductal n'a été démontré que chez le bovin et l'humain. Chez l'humain, aucune protéine homologue aux protéines BSP n'a été identifiée en concentration importante au niveau du plasma séminal. Par contre chez l'humain, des particules lipidiques de densités comparables aux HDL ont été identifiées dans la plasma séminal (Grizard et al., 1992). Bien que ces particules ne semblent pas contenir d'apolipoprotéines, elles pourraient jouer un rôle semblable aux protéines BSP au niveau de l'éjaculation et stimuler un premier efflux de cholestérol. Des particules semblables pourraient se retrouver dans le plasma séminal de plusieurs autres espèces et remplacer ainsi les protéines BSP mais jusqu'à maintenant aucune équipe n'a porté son attention sur le sujet. Le fluide oviductal humain contient, tout comme le fluide oviductal bovin, des HDL et de la BSA qui peuvent servir d'accepteurs de cholestérol et stimuler le deuxième efflux de cholestérol nécessaire à la capacitation. Le fluide folliculaire humain est aussi reconnu pour contenir la protéine de transfert lipidique I (LTP-I) qui semble faciliter l'échange des esters de cholestérol, des triglycérides et des phospholipides. Cette protéine stimule aussi la capacitation (Ravnik et al., 1992; 1995). Même si l'effet de LTP-I semble très similaire à celui des protéines BSP aucune homologie de

séquences existe entre ces deux protéines.

Bien que le rôle physiologique des protéines BSP au sein de la capacitation soit maintenant bien établi, le mécanisme exact de capacitation par les protéines BSP comporte encore des étapes très obscures. Le point saillant restant à démontrer est probablement celui de déterminer comment les protéines BSP interagissent avec le cholestérol et stimulent son efflux puisque les protéines BSP ne semblent pas pouvoir lier ce dernier. La première hypothèse formulée précédemment serait que les agrégats formés par les BSP pourraient former des cavités hydrophobes dans lesquelles le cholestérol pourrait être séquestré. D'un autre côté, nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que les protéines BSP pourraient stimuler l'efflux de cholestérol de façon indirecte par son action sur les phospholipides. En effet les protéines BSP lient très fortement les phospholipides et des études préliminaires ont démontré que les protéines BSP stimulent aussi l'efflux de phospholipides de la membrane des spermatozoïdes bovin ainsi que des fibroblastes humain. Donc, cet efflux de phospholipides par les protéines BSP pourrait entraîner en même temps un efflux de cholestérol qui resterait coller aux phospholipides. Nous nous appliquons présentement à vérifier ces deux hypothèses et nous croyons que ces travaux nous permettront de mieux comprendre les mécanismes de capacitation impliquant les protéines BSP.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos études ont permis pour la première fois d'attribuer un rôle physiologique aux protéines BSP. Les protéines BSP jouent un rôle important au niveau de la capacitation des spermatozoïdes bovins. Nos résultats démontrent que les protéines BSP amorcent la capacitation des spermatozoïdes dès l'éjaculation en stimulant un efflux significatif de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Pendant cette même période une partie des protéines BSP se fixe à la surface des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes couverts de protéines BSP arrivent ensuite dans le tractus génital femelle où ils rencontrent au niveau de l'oviducte les GAGs semblables à l'héparine ainsi que les HDL. Comme l'indique l'article 2.2, les protéines BSP liées à la membrane des spermatozoïdes stimulent la capacitation induite par l'héparine. L'héparine semble se lier aux spermatozoïdes et stimuler une cascade de signalisation cellulaire menant à la capacitation. Alternativement, les spermatozoïdes peuvent interagir avec les HDL. Les HDL stimulent la capacitation de spermatozoïdes en provoquant un second efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes indépendant de la présence des protéines BSP entraînant ainsi une réorganisation ou une déstabilisation de la membrane menant à la capacitation.

À la lumière de ces nouveaux résultats, nous pouvons affirmer que les protéines BSP chez le bovin sont des éléments très importants dans la capacitation. L'industrie de l'insémination artificielle bovine étant un secteur très développé au Québec, toutes les études pouvant améliorer et rentabiliser cette industrie pourrait être très intéressantes. L'amélioration des connaissances au niveau de la capacitation, pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies tant pour régler les causes d'infertilité bovine que pour améliorer la cryopréservation des spermatozoïdes. On sait que lors de la cryopréservation des spermatozoïdes la viabilité et la motilité des spermatozoïdes diminuent. Donc, en améliorant les conditions de cryopréservation, la motilité et la viabilité des spermatozoïdes pourraient être augmentées. De cette façon, moins de spermatozoïdes seraient nécessaires pour l'insémination *in vivo* ce qui permettrait de féconder plus d'oocytes avec la même quantité de spermatozoïdes. On sait maintenant que les protéines BSP sont capables de stimuler un efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes. Lors de la cryopréservation cet

efflux pourrait être très néfaste puisqu'il fragilise les spermatozoïdes. Donc, il serait très intéressant d'entreprendre des études dans cette voie. De plus, puisque les protéines BSP sont des facteurs capacitants, les protéines BSP pourraient aussi être utilisées dans le cas de fécondation *in vivo* où le taux de fécondation est moindre. L'ajout de protéines BSP dans le milieu pourrait permettre à plus de spermatozoïdes de subir la capacitation ce qui augmenterait les chances de fécondation et permettrait aussi d'utiliser moins de spermatozoïdes.

Puisque les protéines BSP semblent des facteurs très importants au niveau de la capacitation, des études pourraient aussi être entreprises pour vérifier si les protéines BSP pourraient servir comme marqueur de fertilité, en vérifiant s'il y a une corrélation entre le niveau de protéines BSP dans le plasma séminal et le pouvoir fécondant de l'animal. De cette façon, on pourrait développer une méthode rapide et non couteuse pour déterminer le niveau de fécondation des bovins.

D'autres études pourraient aussi être effectuées dans le but de mieux comprendre le mécanisme de capacitation induit par les protéines BSP. Nos études ont démontré que les protéines BSP pouvaient stimuler un efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes. Lorsque les protéines BSP étaient incubées en présence des spermatozoïdes pendant un court laps de temps (20 min), elles entraînaient un efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes de 17,3%, ce qui était insuffisant pour stimuler la capacitation des spermatozoïdes. Par contre, une exposition continue (8 h) des spermatozoïdes aux protéines BSP entraînait un efflux de cholestérol de 30-33%, et ceci résultait en une augmentation de deux fois le taux de capacitation comparativement à celui du contrôle. Donc, les protéines BSP seules sont capables de capaciter les spermatozoïdes. Il serait donc très intéressant de déterminer par quels mécanismes les protéines BSP seules peuvent stimuler la capacitation des spermatozoïdes. Il est peu probable que les protéines BSP puissent stimuler directement la capacitation via un récepteur ou via l'activation d'une voie signalitique (activation d'une protéine G, de la PK-A ou de la protéine kinase C) comme peut le faire l'héparine, puisque jusqu'à maintenant aucun résultat nous porte à croire que les protéines BSP peuvent stimuler une telle voie. Par contre, des études devraient être effectuées afin de vérifier cette hypothèse. Il semble plus probable que

les protéines BSP exercent leur activité capacitante via leur propriété d'extraction du cholestérol membranaire. Donc, il serait très intéressant de vérifier le seuil d'efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes nécessaire pour que ces derniers capacitent. On sait que le cholestérol est impliqué dans la stabilisation des membranes (Yeagle, 1985) et que toutes modifications au niveau du contenu lipidique des membranes altèrent les propriétés de ces dernières. Il a déjà été démontré que le cholestérol limite l'insertion de protéines dans la bicouche lipidique, restreint la motilité latérale de récepteurs enfouis dans le corps lipidique et module l'activité de protéines membranaires en changeant leur conformation (Muller et Kruger, 1986; Yeagle, 1989). On sait que plusieurs ions sont impliqués dans la capacitation des spermatozoïdes (HCO_3^- , Ca^{2+} , K^+) et que la variation de la concentration de ces ions est très importante pour la stimulation de la capacitation (figure 3, section 1.4.). Donc l'efflux de cholestérol de la membrane pourrait augmenter la perméabilité membranaire directement (diffusion passive), ou soit en modifiant l'activité des canaux ioniques (en altérant les protéines de la membrane). En effet, plusieurs études ont démontré que l'efflux de cholestérol des membranes peut moduler l'activité de plusieurs canaux ainsi que celle de quelques récepteurs (Gleason et al., 1991; Gregg et Reithmeir, 1983; Ng et al, 1993; Sen et al., 1992; Whetton et al., 1983; Brasitus et al., 1988; Fernandez-Ballester et al., 1994)

Au niveau du spermatozoïde, on retrouve plusieurs canaux différents impliqués dans la capacitation (canaux calciques, l'échangeur $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, antiporteur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, échangeur $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, Ca^{2+} -ATPase, etc). Donc, la modification de l'activité de l'un ou l'autre de ces canaux pourrait entraîner une alcalinisation intracellulaire ou une activation d'une voie signalitique entraînant la capacitation des spermatozoïdes. Donc, au niveau des spermatozoïdes il serait très intéressant d'étudier l'effet de l'efflux de cholestérol sur l'activité de ces canaux.

5. BIBLIOGRAPHIE

- Acott, T. S., et Hoskins, D. D. Bovine sperm forward motility protein: binding to epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 24: 234-240, 1981.
- Acott, T. S., Katz, D. F., et Hoskins, D. D. Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 29: 389-399, 1983.
- Adeoya-Osiguwa, S. A., et Fraser, L. R. A biphasic pattern of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by mouse spermatozoa in vitro correlates with changing functional potential. *J. Reprod. Fert.* 99: 187-194, 1993.
- Adeoya-Osiguwa, S. A., et Fraser, L. R. Evidence for Ca^{2+} -dependent ATPase activity, modulated by decapacitation factor and calmodolin, in mouse spermatozoa. *Reprod. Fertil. Abstr. Ser.* 14: 9-10, 1994.
- Aitken, R. J., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D. W., et Van Duin, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J. Cell Sci.* 108:2017-2025, 1995.
- Allison, A.C., et Hartree, E. F. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod. Fert.* 21: 501-515, 1970.
- Anderson, S. H., et Killian, G. J. Effect of macromolecules from oviductal conditioned medium on bovine sperm motion and capacitation. *Biol. Reprod.* 51: 795-799, 1994.
- Aonuma, S., Mayumi, T., Suxuki, K., Noguchi, T., Iwai, M., Okabe, M. Studies on sperm capacitation. *J. Reprod. Fert.* 35: 425-433, 1973.
- Aoyagi, Y., Fujii, K., Iwazumi, Y., Furudate, M., Fukui, Y., et Ono, H. Effects of two treatments on semen from different cells on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology* 30: 973-976, 1988.
- Arnoult, C., Zeng, Y. et Florman, H. M. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell. Biol.* 134: 637-645, 1996.
- Austin, C. R. Observations on the penetration of sperm into mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.* 4: 581-596, 1951.
- Austin, C. R. Capacitation of spermatozoa. *Int. J. Fertil.* 12: 25-31, 1967.
- Ax, R. L., Bellin, M. E., et Grimek, H. J. Properties and regulation of synthesis of glycosaminoglycans by the ovary. Dans: "Proc. Fifth Ovarian Workshop" (éds Toft, D. O., et Ryan, R. J., Ovarian Workshops, Champaign, IL). 451, 1985.
- Ax, R. L., Handrow, R. R., Lee, C. N., Dickson, K., et Lenz, R. W. New developments in the understanding of fertilization. Dans: "Proc. 10th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod." (Natf. Assoc. Anim., Breeders, Columbia, MO). 93, 1984.
- Ax, R. L., et Lenz, R. W. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. *J. Dairy Sci.* 70: 1477-1486, 1987.

- Baker, M. E. The PDC-109 protein from bovine seminal plasma is similar to the gelatin-binding domain of bovine fibronectin and as kringle domain of human tissue-type plasminogen activator. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 130:1010-1014, 1985.
- Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, C., Maggi, M., et Forti, G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl.* 12: 323-330, 1991.
- Ball, G. D., Bellin, M. E., Ax, R. L., et First, N. L. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: Morphology and chemistry. *Mol. Cell. Endocrinol.* 28: 113-122, 1982.
- Bangham, A. D. Electrophoretic characteristics of ram and rabbit spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* 155: 292-305, 1961.
- Bányai, L., Tordai, H., et Patthy, L. Structure and domain-domain interactions of the gelatin binding site of human 72-kilodalton type IV collagenase (gelatinase A, matrix metalloproteinase 2). *J. Biol. Chem.* 271: 12003-12008, 1996.
- Bányai, L., Trexler, M., Koncz, S., Gyenes, M., Sipos, G., et Patthy, L. The collagen-binding site of type II units of bovine seminal fluid protein PDC-109 and fibronectin. *Eur. J. Biochem.* 193: 801-806, 1990.
- Bardin, C. W., Cheng, C. Y., Musto, N. A., et Gunsalus, G. L. The sertoli cell. Dans: "Physiology of Reproduction" (2^e édés Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 1291-1334, 1994.
- Bartholow, L. C., et Geyer, R. P. Sterol release in mammalian cells: the role of liposomal-free albumin-phospholipid complex. *Biochem. Biophys. Acta* 665: 40-47, 1981.
- Bedford, J. M., et Hoskins, D. D. The mammalian spermatozoa: morphology, biochemistry, and physiology. Dans: "Marshall's Physiology of Reproduction" (éd Lamming, G. E., Edinburgh, Churchill Livingstone). Vol. 2, 379-568, 1990.
- Beier, H. M. Oviductal and uterine fluids. *J. Reprod. Fertil.* 37: 221-237, 1974.
- Bernal, A., Torres, J., Reyes, A., et Rosado, A. Presence and regional distribution of sialyl transferase in the epididymis of the rat. *Biol. Reprod.* 23: 290-293, 1980.
- Benoff, S., Cooper, G. W., Hurley, I., Napolitano, B., Rosenfeld, D. L., Scholl, G. M., et Hershlag, A. Human sperm fertilizing potential in vitro is correlated with differential expression of a head-specific mannose-ligand receptor. *Fert. Steril.* 59: 854-862, 1993a.
- Benoff, S., Cooper, G. W., Hurley, I., Mandel, F. S., et Rosenfeld, D. L. Antisperm antibody binding to human sperm inhibits capacitation-induced changes in the levels of plasma membrane sterols. *Am. J. Reprod. Immunol.* 30: 113-130, 1993d.
- Benoff, S., Hurley, I., Cooper, G. W., Mandel, F. S., Hershlag, A., Scholl, G. M., et Rosenfeld, D. L. Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Hum Reprod.* 8: 2155-2166, 1993c.

- Benoff, S., Hurley, I., Cooper, G. W., Mandel, F. S., Rosenfeld, D. L., et Hershlag, A. Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. *Hum Reprod.* 8: 2141-2154, 1993b.
- Berger T., et Clegg, E. D. Adenylate cyclase activity in porcine sperm in response to female reproductive tract secretions. *Gamete Res.* 7: 169-177, 1983.
- Bishop, D. W. Sperm motility. *Physiol. Rev.* 42: 1-59, 1962.
- Bize, I., Santander, G., Cabello, P., Driscoll, D., et Sharpe, C. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol. Reprod.* 44:398-403, 1991.
- Blondin, P., Coenen, K., Sirard, M. A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J. Androl.* 18: 454-460, 1997.
- Boatman, D. E., et Robbins, R. S. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol. Reprod.* 44:806-813, 1991.
- Boice, M. L., Geisert, R. D., Blair, R. M., et Verhage, H. G. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol. Reprod.* 43: 457-465, 1990.
- Brantmeier, S. A., Grummer, R. R., Ax, R. L. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J. Dairy Sci.* 70: 2145-2149, 1987.
- Brasitus, T. A., Dahiya, R., Dudeja, P. K., et Bisonnette, B. M. Cholesterol modulates alkaline phosphatase activity of rat intestinal microvillus membrane. *J. Biol. Chem.* 263: 8592-8597, 1988.
- Braun, T. The effect of divalent cations on bovine spermatozoal adenylate cyclase activity. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 1: 271-281, 1975
- Brooks, D. E. Epididymal function and their hormonal regulation. *Aust. J. Biol. Sci.* 36: 205-221, 1983.
- Calvete, J. J., Mann, K., Sanz, L., Raida, M. et Töpfer-Petersen, E. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett.* 399: 147-152, 1996.
- Calvete, J. J., Mann, K., Schäfer, W., Sanz, L., Reinert, M., Nessau, S., Raida, M., et Topfer-Petersen, E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem. J.* 310: 615-22, 1995.
- Calvete, J. J., Raida, M., Gentzel, M. Urbanke, C., Sanz, L., et Töpfer-Petersen, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. *FEBS Lett.* 407: 201-206, 1997.
- Castro, G. R., Fielding, C. J. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high density lipoprotein. *Biochemistry* 27: 25-29, 1988.

- Chandonnet, L., Roberts, K. D., Chapdelaine, A., et Manjunath, P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 313-318, 1990.
- Chang, M. C. Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature* 175: 1036-1037, 1955.
- Chang, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698, 1951.
- Chang, S. C. S., Jones, J. D., Ellefson, R. D., et Ryan, R. J. The porcine ovarian follicle: I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biol. Reprod.* 15: 321-328, 1976.
- Clark, E. N., Corron, M. E., et Florman, H. M. Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida. *J. Biol. Chem.* 268: 5309-5316, 1993.
- Clegg, E. G. Mechanism of mammalian sperm capacitation. Dans: "Mechanism and Control of Animal Fertilization" (éd Hartmann, J. F., Academic Press, New York). 177-212, 1983.
- Cohen-Dayag, A., et Eisenbach, M. Potential assays for sperm capacitation in mammals. *Am. Phys. Soc. C1167-C1176*, 1994.
- Cooper, T. G. Dans: "The epididymis, sperm maturation and fertilization" Berlin, Springer-Verlag, 281 pages, 1986.
- Cross, N. L. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive: cholesterol is the major inhibitor. *Biol. Reprod.* 54: 138-145, 1996.
- Cross, N. L., et Razy-Faulkner, P. Control of human intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol. Reprod.* 56: 1169-1174, 1997.
- DasGupta, S., Mills, C.L., et Fraser, L. R. A possible role for Ca^{2+} -ATPase in human sperm capacitation. *J. Reprod. Fert.* 102: 107-116, 1994.
- Davies, D. C., Hall, G., Hibbitt, K. G., et Moore, H. D. The removal of the seminal vesicles from the boar and the effects on the semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 43: 305-312, 1975.
- Davis, B. K. Influence of serum albumin on the fertilizing ability in vitro of rat spermatozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151: 240-243, 1976.
- Davis, B. K. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. *Symp. Pharmacol. Effect Lipids* 145-157, 1978.
- Davis, B. K. Interacion of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch. Androl.* 5:249-254, 1980.
- Davis, B. K. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7560-7564, 1981.

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

Davis, B. K., Byrne, R., et Bedigian, 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* 77: 1546-1550, 1980.

Davis, B. K., Byrne, R., et Hungund, B. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation. *Biochim. Biophys. Acta* 558: 257-266, 1979.

de Lamirande, E., et Gagnon, C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 16:21-21, 1993.

de Lamirande, E., et Gagnon, C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.* 18:487-495, 1995.

de Lamirande, E., Harakat, A., et Gagnon, C. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J. Androl.* 19:215-225, 1998.

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

Delgado, N. M., Reyes, R., Galindo, J. M., et Rosado, A. Size-uniform heparin fragments as nuclear decondensation and acrosome reaction inducers in human spermatozoa. *Life Sci.* 42: 2177-2183, 1988.

Delgado, N. M., Reyes, R., Huacuja, L., Merchant, H., et Rosado, A. Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. *Arch. Androl.* 8: 87-95, 1982.

Demott, R. P., et Suarez, S. S. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol. Reprod.* 46: 779-785, 1992.

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

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

Dostalova, Z., Calvete, J. J., Sanz, L., Hettel, C., Riedel, D., Schoneck, C., Einspanier, R., et Töpfer-Petersen, E. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 375: 457-461, 1994.

Dym, M., et Fawcett, D. W. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 4: 195-215, 1971.

Eddy, E. M., et O'Brien, D. A. The spermatozoon. Dans: "Physiology of Reproduction" (2^e éds Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 29-77, 1994.

- Ehrenwald, E., Foote, R. H., et Parks, J. E. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol. Reprod. Dev.* 25: 195-204, 1990.
- Ehrenwald, E., Parks, J. E., et Foote, R. H. Cholesterol efflux from bovine sperm: I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Res.* 20:145-157, 1988a.
- Ehrenwald, E., Parks, J. E., et Foote, R. H. Cholesterol efflux from bovine sperm: II. Effect of reducing sperm cholesterol on penetration of zona-free hamster and in vitro matured bovine ova. *Gamete Res.* 20:413-420, 1988b.
- Einspanier, R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Henle, T., Ropke, R., et Schams, D. Localization and concentration of a new bioactive acetic seminal fluid protein (aSFP) in bull (*Bos taurus*). *J. Reprod. Fert.* 98: 241-244, 1993.
- Ellington, J. E. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet.* 81: 313-328, 1991.
- Esch, F. S., Ling, N. C., Ying, S. Y., Guillemin, R. Peptides of gonadal origin involved in reproduction biology. Dans: "Role of Peptides and Proteins in Control of Reproduction" (éd McCann et Dhindsa, Elsevier Science Publishing Co., inc.). 275-290, 1983a.
- Esch, F. S., Ling, N. C., Bohlen, P., Ying, S. Y., Guillemin, R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113: 861-867, 1983b.
- Espinosa, F., et Darszon, A. Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca^{2+} . *FEBS Lett.* 372: 119-125, 1995.
- Farooqui, A. A. Biochemistry of sperm capacitation. *Int. J. Biochem.* 15: 463-468, 1983.
- Fawcett, D. W., Ito, S. et Slautterback, D. B. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5: 453-458, 1959.
- Fernandez-Ballester, G., Castresana, J., Fernandez, A. M., Arrondo, J. L., Ferragut, J. A., et Gonzalez-Ros, J. M. A role of cholesterol as a structural effector of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 33: 4065-4071, 1994.
- Fielding, C. J., et Fielding, P. Dans: "Biochemistry of Lipids and Membrane" (éds Vance, D. E., et Vance, J. E., Benjamin/Cummings, Amsterdam). 404-474, 1985.
- Fleming, A. D., et Yanagimachi, R. Effects of various lipids on acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Res.* 4:253-273, 1981.
- Florman, H. M., Lemos, J. R., Arnoult, C., Kazam I., Li, C., et O'Toole, C. M. A tale of two channels: a perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm. *Biol. Reprod.* 59: 12-16, 1998.

- Florman, H. M., Tombers, R. M., First, N. L., et Babcock, D. F. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevation of internal calcium and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 135: 133-136, 1989.
- Florman, H., et First, N. L. The regulation of acrosomal exocytosis. II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Dev. Biol.* 128: 464-473, 1988.
- Fraser, L. R. Accelerated mouse sperm penetration *in vitro* in the presence of caffeine. *J. Reprod. Fertil.* 57: 377-384, 1979.
- Fraser, L. R. Mechanisms regulating capacitation and the acrosome reaction. Dans: "Human sperm acrosome reaction" (éds P. Fénichel, J. Parinaud, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd) Vol. 236, 17-33, 1995.
- Fraser, L. R. Sperm capacitation and its modulation. Dans: "Mammalian Fertilization" (éds Bavister, B. D., Cummins, J., Roldan, E. R. S., Serono Symposia, Norwell, MA). 141-153, 1990.
- Fraser, L. R., Abeydeera, L. R., et Niwa, K. Ca^{2+} -regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 40: 233-241, 1995.
- Fraser, L. R., et McDermott, C. A. Ca^{2+} -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca^{2+} -ATPase. *J. Reprod. Fert.* 96: 363-377, 1992.
- Fraser, L. R., et Monks, N. J. Cyclic nucleotides and mammalian sperm capacitation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 42: 9-21, 1990.
- Fusi, F. M., et Bronson, R. A. Sperm surface fibronectin expression following capacitation. *J. androl.* 13: 28-35, 1992.
- Galantino-Homer, H. L., Visconti, P. E., et Kopf, G. S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* 56: 707-719, 1997.
- Gallagher, J. T., et Hampson, I. N. Proteoglycans in cellular differentiation and neoplasia. *Biochem. Soc. Trans.* 12: 541-543, 1984.
- Garbers, D. L., First, N. L., et Lardy, H. A. Properties of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases isolated from bovine epididymal spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 248: 875-879, 1973.
- Garty, N. B., et Salomon, Y. Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Lett.* 218: 148-152, 1987.
- Garty, N. B., Galiani, D., Aharonhem, A., Ho, Y. K., Phillips, D. M., Dekel, N., et Salomon, Y. G-proteins in mammalian gametes: an immunocytochemical study. *J. Cell. Sci.* 91: 21-31, 1988.

- Gasset, M., Saiz, J. L., Laynez, J., Sanz, L., Gentzel, M., Töpfer-Petersen, E., et Calvete, J. J. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *Eur. Biophys. J.* 250: 735-744, 1997.
- Gleason, M. M., Medow, M. S., et Tulenko, T. N. Excess membrane cholesterol alters calcium movements, cytosolic calcium levels, and membrane fluidity in arterial smooth muscle cells. *Circ. Res.* 69: 216-227, 1991.
- Go, K. J., et Wolf, D. P. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.* 32:145-153, 1985.
- Go, K. J., et Wolf, D. P. The role of sterols in sperm capacitation. *Adv. Lipid. Res.* 20: 317-330, 1983.
- Goh, P. P., et White, I. G. Control of ram sperm adenylate cyclase by divalent cations. *Aust. J. Biol. Sci.* 41: 377-385, 1988.
- Gregg, V. A., et Reithmeir, R. A. F. Effect of cholesterol on phosphate uptake by human red blood cells. *FEBS Lett.* 157: 159-164, 1983.
- Grimes, S. R. Jr. Nuclear proteins in spermatogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 495-500, 1986.
- Grippio, A. A., Way, A. L., et Killian, G. J. Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 105: 57-64, 1995.
- Griveau, J. F., Renard, P., et Le Lannou, D. An *in vitro* promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int. J. Androl.* 17:300-307, 1994.
- Grizard, G., Bauchart, D., Jouannel, P., Nouailles, C., Jimenez, C., et Boucher, D. Distribution et composition chimique des lipoprotéines du liquide séminal chez l'homme fertile. *Contracept. Fert. Sex.* 20: 815-817, 1992.
- Grizard, G., Sion, B., Jouanel, P., Benoit, P., et Boucher, D. Cholesterol, phospholipids and markers of the function of the accessory sex glands in the semen of men with hypercholesterolaemia. *Int. J. Androl.* 18: 151-156, 1995.
- Gross, M. K., Toscano, D. G., et Toscano, W. A. Jr. Calmoduline-mediated adenylate cyclase from mammalian sperm. *J. Biol. Chem.* 262: 8672-8676, 1987.
- Hamilton, D. W. Evidence for alpha-lactoalbumin-like activity in reproductive tract fluids of the male rat. *Biol. Reprod.* 25: 385-392, 1981.
- Hamilton, D. W. Steroid function in the mammalian epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 13(Suppl): 89-97, 1971.
- Hamilton, D. W. UDP-galactose: N-acetylglucosamine galactosyltransferase in fluids from rat testis and epididymis. *Biol. Reprod.* 23:377-385, 1980.
- Hamilton, D. W., et Fawcett, D. W. *In vitro* synthesis of cholesterol and testosterone from acetate by rat epididymis and vas deferens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133: 693-695, 1970.

- Hamilton, D. W., et Gould, R. P. Galactosyltransferase activity associated with rat epididymis. *Anat. Rec.* 196: 71a, 1980.
- Hamilton, D. W., Wenstrom, J. C., et Baker, J. B. Membrane glycoproteins from spermatozoa: partial characterization of an integral Mr = 24,000 molecule from the rat spermatozoa that is glycosylated during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 34: 925-936, 1986.
- Handrow, R. R., Boehm, S. K., Lenz, R. W., Robinson, J. A., et Ax, R. L. Specific binding of the glycosaminoglycan ³H-heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa *in vitro*. *J. Androl.* 5: 51-63, 1984.
- Handrow, R. R., First, N. L., et Parrish, J. J. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J. Exp. Zool.* 252: 174-182, 1989.
- Handrow, R. R., Parrish, J. J., et First, N. L. Heparin stimulates calcium uptake by bovine sperm *in vitro*. *J. Androl.* 7(suppl): 23, 1986.
- Handrow, R., Lenz, R. W., et Ax, R. L. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 107: 1326-1332, 1982.
- Hanson, F. W., et Overstreet, J. W. The interaction of human spermatozoa with cervical mucus *in vivo*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 140: 173-178, 1981.
- Hara, H., Yokoyama, S. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J. Biol. Chem.* 266: 3080-3086, 1991.
- Harrison, R. A. P. Hyaluronidase in ram semen. *Biochem. J.* 252: 865-874, 1988.
- Hecht, N. B. Mammalian protamines and their expression. Dans: "Histones and other basic nuclear proteins" (éds Hnilica, L., Stein, G., et Stein, J., CRC Press, Boca Raton). 347-373, 1989.
- Hildebronth, J. D., Codina, J., Tash, J. S., Kirchick, H. S., Lipschultz, L., Sekure, R. D., Binboumer, L. The membrane-bound spermatozoal adenylate cyclase system does not share coupling characteristics with somatic cell adenylate cyclase. *Endocrinology* 116: 1357-1366, 1985.
- Hinsch, K. D., Hinsch, E., Aumuller, G., Tychowiecka, Schultz, G., et Schill, W. B. Immunological identification of G-protein alpha- and beta-subunits in tail membranes of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 47: 337-346, 1992.
- Hochereau, M. T. Étude des divisions spermatogoniales et du renouvellement de la spermatogonie souche chez le taureau. *Int. Cong. Anim. Reprod.* 1: 149-152, 1968.
- Hoshi, K., Aita, T., Yanagida, K., Yoshimatsu, N., et Sato, A. Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in the human spermatozoa and its relationship with capacitation. *Hum. Reprod.* 5: 71-74, 1990.

- Hoskins, D. D., et Vijayaraghavan, S. A new theory on the acquisition of sperm motility during epididymal transit. Dans: "Controls of Sperm motility : Biological and Clinical Aspects" (éd. C. Gagnon, CRC Press, Boca Raton, Florida), 53-62, 1990.
- Hoskins, D. D., Casillas, E. R., et Stephens, D. T. Cyclic AMP-dependent protein kinases of bovine epididymal spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 1331-1338, 1972.
- Huang, Y., von Eckardstein, A., Assman, G. Cell-derived cholesterol cycles between different HDLs and LDL for its effective esterification in plasma. *Arterioscler. Thromb.* 13: 445-458, 1993.
- Huckins, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 169: 533-558, 1971.
- Hunter, R. H. F. Physiology and technology of reproduction in female domestic animals. Academic Press, New York, 1980.
- Hurst, R.E., Bynum, R. L., Einfeldt, S. E., et Roy, J. The identification of a heparin-binding protein on the surface of bovine sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 289-293, 1988.
- Infante, J. P., et Huszagh, V. A. Synthesis of highly unsaturated phosphatidylcholine in the development of sperm motility: a role for epididymal glycerol-3-phosphorylcholine. *Mol. Cell. Biochem.* 69: 3-9, 1985.
- Ishizaki, J., Hanasaki, K., Higashino, K., Kishino, J., Kikuchi, N., Ohara, O., et Arita, H. Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A2 receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 5897-5904, 1994.
- Jansen, R. P. S., et Bajpai, V. K. Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: Ultrastructure and histochemistry. *Biol. Reprod.* 26: 155-168, 1982.
- Jaspard, B., Collet, X., Barbaras, R., Manent, J., Vieu, C., Parinaud, J., Chap, H., et Perret, B. Biochemical characterization of pre- β_1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. *Biochemistry* 35: 1352-1357, 1996.
- Jaspard, B., Fournier, N., Vieitez, G., Atger, V., Barbaras, R., Vieu, C., Manent, J., Chap, H., Perret, B., et Collet, X. Structural and functional comparison of HDL from homologous human plasma and follicular fluid. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1605-1613, 1997.
- Ji, Y., Jonas, A. Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein AI in solution and in reconstituted high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 270: 11290-11297, 1995.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., et Nussenzweig, M. C. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375: 151-155, 1995.

- Jones, R, et Brown, C. R. Association of epididymal secretory proteins showing α -lactoalbumin-like activity with plasma membrane of rat spermatozoa. *Biochem. J.* 206: 161-164, 1982.
- Katz, D. F., et Yanagimachi, R. Mouvement characteristics of hamster and guinea-pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol. Reprod.* 25: 785-791, 1981.
- Katz, D. F., Drobnis, E., et Overstreet, J. W. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestements. *Gamete Res.* 22: 443-469, 1989.
- Kemme, M., Madiraju, M. V. V. S., Krauhs, E., Zimmer, M., et Scheit, K. H. The major protein of bull seminal plasma is a secretory product of seminal vesicle. *Biochem. Biophys. Acta.* 884: 282-290, 1986.
- Kitamura, K., Ito, A., Mori, Y., et Hirakawa, S. Glycosaminoglycans of human uterine cervix: heparan sulfate increase with reference to cervical ripening. *Biochem. Med.* 23: 159-166, 1980.
- Klemm, U., Muller-Esterl, W., et Engel, W. Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease. *Hum. Genet.* 87: 635-641, 1991.
- Koehler, J. K. Lectins as probes of the spermatozoa surface. *Arch. Androl.* 6: 197-217, 1981a.
- Koehler, J. K. Surface alterations during the capacitation of mammalian spermatozoa. *Am. J. Primatol.* 1: 131-141, 1981b.
- Kopf, G. S., et Gerton, G. L. The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. Dans: "Elements of Mammalian Fertilization" (éd Wassarman, P. M. CRC Press, Boca Raton, FLA). 153-203, 1991.
- Kornblihtt, A. R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K. et Baralle, F. E. Primary structure of human fibronectin : differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J.* 4: 1755-1759, 1985.
- Lakoski, K. A., Carron, C. P., Cabot, C. L., et Saling, P. M. Epididymal maturation and the acrosomal reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with motification of M42 antigen. *Biol. Reprod.* 38: 221-233, 1988.
- Langlais, J., et Roberts, K. D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12: 183-224, 1985.
- Langlais, J., Kan, F. W. K., Granger, L., Raymond, L., Bleau, G., et Roberts, K. D. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res.* 20: 185-201, 1988.
- Lardy, H. A., et San Agustin, J. T. Caltrin and calcium regulation of sperm activity. Dans: "The cell biology of fertilization" (éds Schatten H, Schatten G, Academic Press, New York). 29-39, 1989.

- Le Goff, D. Follicular fluid lipoproteins in the mare: evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid. *Biochem. Biophys. Acta* 1210: 226-232, 1994.
- Leblond, E., Desnoyers, L., et Manjunath, P. Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 443-449, 1993.
- Leclerc, P., de Lamirande, E., et C. Gagnon. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol. Reprod.* 55: 684-692, 1996.
- Leclerc, P., de Lamirande, E., et Gagnon, C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* 22:643-656, 1997.
- Lee, C. N., Clayton, M. K., Bushmeyer, S. M., First, N. L., et Ax, R. L. Glycosaminoglycans in eye reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 63: 861-867, 1986.
- Lee, C. N., et Ax, R. L. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine tract. *J. Dairy Sci.* 67: 2006-2009, 1984.
- Lee, C. N., Handrow, R. R., Lenz, R. W., et Ax, R. L. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa *in vitro*. *Gamete Res.* 12: 345-355, 1985.
- Lee, M. A., et Storey, B. T. Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs; mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 34: 349-356, 1986.
- Lenz, R. W., Ax, R. L., Grimek, H. J., et First, N. L. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 106: 1092-1098, 1982.
- Lenz, R. W., Ball, G. D., Lohse, J. K., First, N. L., et Ax, R. L. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidence by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 28: 683-690, 1983a.
- Lenz, R. W., Bellin, M. E., et Ax, R. L. Rabbit spermatozoa undergo an acrosome reaction in the presence of glycosaminoglycans. *Gamete Res.* 8: 11-19, 1983b.
- Leyton, L., et Saling, P. 95 kD sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57: 1123-1130, 1989.
- Lobel, P., Dahms, N. M., et Kornfeld, S. Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 2563-2570, 1988.
- Mahanes, M. S., Ochs, D. L., et Eng, L. A. Cell calcium of ejaculated rabbit spermatozoa before and following *in vitro* capacitation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 664-670, 1986.

- Manjunath, P. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. Dans: "Gonadal Proteins and Peptides and their Biological Significance", 49-61, 1984.
- Manjunath, P., Baillargeon, L., Marcel, Y. L., Seidah, N. G., Chrétien, M., et Chapdelaine, A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. Dans: "Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems", 259-273, 1988.
- Manjunath, P., Chandonnet, L., Leblond, E., et Desnoyers, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa [erratum apparaît dans Biol. Reprod. 1994 Apr;50:977]. Biol. Reprod. 50: 27-37, 1994.
- Manjunath, P., et Sairam, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. Biochem. J. 241: 685-692, 1987.
- Manjunath, P., Marcel, Y. L., Uma, J., Seidah, N. G., Chretien, M., et Chapdelaine, A. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. J. Biol. Chem. 264: 16853-16857, 1989.
- Manjunath, P., Sairam, M. R., et Uma, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. Biosci. Rep. 7: 231-238, 1987.
- Maried, E. N. Anatomie et Physiologie Humaines (Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., Québec). 1993.
- Marks, J. L., et Ax, R. L. Relationship of nonreturn rates of dairy bulls to binding affinity of heparin to sperm. J. Dairy Sci. 68: 2078-2082, 1985.
- Marquant-Le Guienne, B., De Almeida, M. Role of guinea-pig sperm autoantigens in capacitation and the acrosome reaction. J. Reprod. Fertil. 77: 337-345, 1986.
- McMullen, B. A., et Fujikawa, K. Amino acid sequence of the heavy chain of human α -factor XIIa (activated Hageman factor) J. Biol. Chem. 260: 5328-5341, 1985.
- McNutt, T. L., et Killian, G. J. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation *in vitro*. J. Androl. 12: 244-252, 1991.
- Meizel, S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. Am. J. Anat. 174: 285-302, 1985.
- Meizel, S., et Turner, K. O. Glycosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of golden hamster sperm *in vitro*. J. Exp. Zool. 237: 137-139, 1986.
- Mendez, A. J., Anantharamaiah, G. M., Segrest, J. P., et Oram, J. F. Synthetic amphipathic helical peptides that mimic apolipoprotein A-I in clearing cellular cholesterol. J. Clin. Invest. 94: 1698-1705, 1994.
- Miller, D. J., et Ax, R. L. Seminal plasma: what is it and why is it important. Proceeding of the 12th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction 97-107, 1988.

- Miller, D. J., Winer, M. A., et Ax, R. L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol. Reprod.* 42: 899-915, 1990.
- Miller, N. E., La Ville, A., et Crook, D. Direct evidence that reverse cholesterol transport is mediated by high density lipoprotein in the rabbit. *Nature* 314: 109-111, 1985.
- Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., et Kitamura, N. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J. Biol. Chem.* 268: 10024-10028, 1993.
- Molenaar, A., Forrester, I. T., et Bradley. The localization of cyclic AMP-dependent protein kinase activity in ram spermatozoa. *Proc. Univ. Otago Med. School.* 59: 50-51, 1981.
- Morgan, D. O., Edman, J. C., Standring, D. N., Fried, V. A., Smith, M. C., Roth, R. A., et Rutter, W. J. Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329: 301-307, 1987.
- Mori, K., Daitoh, T., Irahara, M., Kamada, M., et Aono, T. Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161: 207-211, 1989.
- Mortimer, D. Sperm transport in the human female reproductive tract. Dans: "Oxford Review of Reproductive Biology" (éd. Finn, C. A., Oxford University Press, Oxford). Vol. 5, 30-61, 1983.
- Moubasher, A. E. D., et Wolf, D. P. The effect of exogenous cholesterol on human sperm function in vitro [Résumé]. *J. Androl.* 7:22, 1986.
- Muller, C. P., et Krueger, G. R. F. Modulation of membrane proteins by vertical phase separation and membrane lipid fluidity. Basis for new approach to tumor immunotherapy. *Anticancer Res.* 6: 1181-1194, 1986.
- Nass, S. J., Miller, D. J., Winer, M. A., et Ax, R. L. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Mol. Reprod. Dev.* 25: 237-246, 1990.
- Neill, J., et Olds-Clarke P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrated that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res.* 18: 121-140, 1987.
- Nevo, A. C., Michaeli, I. et Schindler, H. Electrophoretic properties of bull and of rabbit spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 23: 69-83, 1961.
- Ng, L. L., Delva, P, Davies, J. E. Intracellular pH regulation of SV-40 transformed human MRC-5 fibroblasts cell membrane cholesterol. *Am. J. Physiol.* 264: C789-C793, 1993.

- Nikolopoulou, M., Soucek, D.A. Vary, J. C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochem. Biophys. Acta.* 815: 486-498, 1985.
- Noyes, R. W. Fertilizing capacity of spermatozoa. *Western J. Surg. Obstet. Gynecol.* 61: 342-349, 1953.
- O'Flaherty, C., Beconi, M., et Beorlegui, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia.* 29:269-275, 1997.
- Okamura, N., Tajima, Y., Soejimas, A., Masuda, I. L., et Sugita, Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 260: 9699-9705, 1985.
- Okamura, N., Tanba, M., Fukuda, A., Sugita, Y., et Nagai, T. Forskolin stimulates porcine sperm capacitation by increasing calcium uptake. *FEBS Lett.* 316: 283-286, 1993.
- Oliphant, G. Removal of sperm bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of the acrosomal reaction. *Fertil. Steril.* 27: 28-38, 1976.
- Oliphant, G., et Brackett, B. G. Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol. Reprod.* 9: 404-414, 1973.
- Oliphant, G., Reynolds, A.B., et Thomas, T. S. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat.* 174: 269-283, 1985.
- Oliva, R. et Dixon, G. H. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. Dans: "Progress in nucleic acid research and molecular biology, vol 40" (éds Cohn, M. E., et Moldave, K., Academic Press, New York). 25-94, 1991.
- Oshima, A., Nolan, C. M., Kyle, J. W., Grubb, J. H., et Sly, W. S. The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 2553-2562, 1988.
- Overstreet, J. D., et Cooper G. W. Effect of ovulation and sperm motility on the migration of rabbit spermatozoa to the site of fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 55: 53-59, 1979.
- Overstreet, J. W. Transport of gametes in the reproductive tract of the female mammal. Dans: "Mechanism Controlling Animal Fertilization" (éd Hartmann, J. F., Academic Press, New York). 499-543, 1983.
- Parisel, C. C., Weinman, J. S., Escaig, F. T., Guyot, M. Y., Iftode, F. C., Weinman, S. J. et Damaille, J. G. Analytical subcellular distribution of cAMP-dependent kinase activity in bull spermatozoa. *Gamete Res.* 10: 433-444, 1984.
- Parks, J. E., Arion, J.W., et Foote, R.H. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 37: 1249-1258, 1987.
- Parks, J. E., et Ehrenwald, E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. Dans: "Fertilization in Mammals" (éds Bavister, B. D., Cummins, J., Roldan, E. R. S., Sero Symposia, Norwell, MA). 155-167, 1990.

- Parks, J. E., et Hammerstedt, R. H. Developmental changes occurring in the lipid of ram epididymal sperm plasma membranes. *Biol. Reprod.* 32: 653-668, 1985.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., et First, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.* 41: 683-699, 1989b.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., et First, N. L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 24: 537-549, 1985.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Handrow, R. R., Sims, M. M., et First, N. L. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 40: 1020-1025, 1989a.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Winer, M. A., et First, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38: 1171-1180, 1988.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J.L., Uguz, C., et First, N. L. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 51: 1099-1108, 1994.
- Parrish, J. J., Vrendenburgh W. I., et Lavin, C. A. Increase in bovine sperm intracellular calcium (Ca_i) and pH (pH_i) during capacitation. *Biol. Reprod.* 48 (suppl. 1): 106, 1993.
- Patthy, L., Trexler, M., Vali, Z., Bányai, L., et Varadi, A. Kringle: Module specialized for protein binding. Homology of the gelatin-binding region of fibronectin with the kringle structures of proteases. *FEBS Lett.* 171: 131-136, 1984.
- Peitz, B., et Olds-Clarke, P. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol. Reprod.* 35: 608-617, 1986.
- Phelps, B. M., et Myles, D. G. The guinea pig sperm plasma membrane protein, pH-20, reaches the surface via two transport pathways and becomes localized to a domain after an initial uniform distribution. *Dev. Biol.* 123: 63-72, 1987.
- Phelps, B. M., Koppel, D. E., Primakoff, P., et Myles, D. G. Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *J. cell. Biol.* 111: 1839-1847, 1990.
- Piko, L. Immunological phenomena in the reproductive process. *Int. J. Fertil.* 12: 377-383, 1967.
- Quenn, K., Dhabuwala, C. B., et Pierrepoint, C. G. The effect of removal of the various accessory sex glands on the fertility of male rats. *J. Reprod. Fertil.* 62: 423-426, 1981.
- Ravnik, S. E., Zarutskie, P. W., et Muller, C. H. Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 47:1126-1133, 1992.
- Ravnik, S. E., Albers, J. J, et Muller, C. H. Stimulation of human sperm capacitation by purified lipid transfer protein. *J. Exp. Zool.* 272:78-83, 1995.

- Reyes, R., Caarranco, A., Hernandez, O., Rosado, A., Merchant, H., et Delgado, N. M. Glycosaminoglycan sulfate as acrosomal reaction-inducing factor of follicular fluid. *Arch. Androl.* 12: 203-209, 1984.
- Reynolds, A. B., Thomas, T. S., Wilson, W. L., et Oliphant G. Concentration of acrosome stabilizing factor (ASF) in rabbit epididymal fluid and species-specificity of anti-ASF antibodies. *Biol. Reprod.* 40: 673-680, 1989.
- Rochwerger, L., et Cuasnicu, P. Redistribution of a rat epididymal glycoprotein after *in vitro* and *in vivo* capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 34-41, 1992.
- Rotem, R., Paz, G. F., Homonnai, Z. T., Kalina, M., et Naor, Z. Protein kinase C is present in human sperm: possible role in flagellar motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7305-7308, 1990.
- San Agustin, J. T. , et Lardy, H. A. Bovine seminal plasma constituents modulate the activity of caltrin, the calcium-transport regulating protein of bovine spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 265: 6860-6867, 1990.
- Sánchez-Prieto, J., González, J., Illera, M. J., Lorenzo, P. L., et Orensanz, L. M. [³H]heparin binding in boar spermatozoa: characterization and correlation with routine semen quality parameters. *Biol. Reprod.* 55: 860-867, 1996.
- Sanz, L., Calvete, J. J., Mann, K., Gabius, H., et Töpfer-Petersen, E. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 37-43, 1993.
- Savion, N., Laherty R., Cohen, D., Lui, G. et Gospodarowicz, D. Role of lipoprotein and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in progesterone production by cultured bovine granulosa cells. *Endocrinology* 110: 13-22, 1982.
- Schlegel, R. A., Hammerstedt, R., Cofer, G. P., Kozarsky, K. Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 34: 379-391, 1986.
- Seidah, N. G., Manjunath, P., Rochemont, J., Sairam, M. R., et Chretien, M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem. J.* 243: 195-203, 1987.
- Seki, N., Toyama, Y., et Nagano, T. Changes in the distribution of filipin-sterol complexes in the boar sperm head plasma membrane during epididymal maturation and in the uterus. *Anat. Rec.* 232: 221-230, 1992.
- Setchell, B. P. Male reproductive organs and semen. Dans: "Reproduction in Domestic Animals" (4^e éds Perry T. Cupps, Academic Press, San Diego). 221-249, 1991.
- Setchell, B. P., Maddocks, S., et Brooks, D. E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. Dans: "Physiology of Reproduction" (2^e éds Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 1063-1176, 1994.

- Sen, L., Bialecki, R. A., Smith, E., Smith, T. W., et Colucci, W. S. Cholesterol increase L-type voltage sensitive calcium channel current in arterial smooth muscle cells. *Circ. Res.* 71: 1008-1014, 1992.
- Shalgi, R., Matityahu, A., Gaunt, S. J., et Jones, R. Antigens on rat spermatozoa with a potential role in fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 25: 286-296, 1990.
- Shi, Q-X., et Roldan, E. R. S. Bicarbonate/CO₂ is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biol. Reprod.* 52: 540-546, 1995.
- Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S., et Hanada, A. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. *Theriogenology* 30: 489-496, 1988.
- Sidhu, K. S., et Guaraya, S. S. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int. Rev. Cytol.* 118: 231-280, 1989.
- Simpson, E. R., Rochelle, D. B., Carr, B. R., et MacDonald, P. C. Plasma lipoproteins in follicular fluid of human ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51: 1469-1471, 1980.
- Smith, T. T., et Yanagimachi, R. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 91: 567-573, 1991.
- Stephens, D. T., Acott, T. S., et Hoskins, D. D. A cautionary note on the determination of forward motility protein activity with bovine epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 25 : 945-949, 1981.
- Suarez, S. S., Drost, M., Redfern, K., et Gottfried, W. Sperm motility in the oviduct. Dans: "Fertilization in Mammals" (éds. Bavister, B. D., Cumming, J., Roldan, E. R. S., Norwell, Massachusetts). 155-167, 1990.
- Suarez, S. S., et Dai, X. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol. Reprod.* 46: 686-691, 1992.
- Suarez, S. S., Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B., et Powell, R. L. Evidence for the function of hyperactivated motility of sperm. *Biol. Reprod.* 44: 375-381, 1991.
- Suarez, S. S., Varosi, S. M., et Dai, X. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4660-4664, 1993.
- Sugkraroek, P., Kates, M., Leader, A., et Tanphaichitr, N. Levels of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. *Fertil. Steril.* 55: 820-827, 1991.
- Suzuki, F. Changes in the distribution of intramembranous particles and Filipin-sterol complexes during epididymal maturation of golden hamster spermatozoa. *J. Ultrastr. Mol. Struct. Res.* 100: 39-54, 1988.
- Suzuki, F. Morphological aspects of sperm maturation. Dans: "Fertilization in Mammals" (éds. Bavister, B. D., Cummins, J., et Roldan, E. R. S., Norwell, Massachusetts: Serono Symposia USA) 65-75, 1990.

- Tajima, Y., et Okamura, N. The enhancing effects of anion channel blockers on sperm by bicarbonate. *Biochem. Biophys. Acta.* 1034: 326-332, 1990.
- Tajima, Y., Okamura, N., et Sugita, Y. The activating effects of bicarbonate on sperm motility and respiration at ejaculation. *Biochem. Biophys. Acta.* 924: 519-529, 1987.
- Taylor, M. E., Conary, J. T., Lennartz, M. R., Stahl, P. D. et Drickamer, K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J. Biol. Chem.* 265: 12156-12162, 1990
- Thomas, T. S., Reynolds, A. B., et Oliphant G. Evaluation of the site of synthesis of rabbit sperm acrosome stabilizing factor using immunocytochemical and metabolic labeling techniques. *Biol. Reprod.* 30: 693-705, 1984.
- Töpfer-Petersen, E., Friess, A. E., Stoffel, M., et Schill, W.-B. Boar sperm membrane antigens. II. Reorganization of an integral membrane antigen during capacitation and acrosome reaction. *Histochemistry* 93: 491-495, 1990.
- Tulsiani, D. R. P., Skudlarek, M. D., Holland, M. K., et Orgebin-Crist, M.-C. Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 48: 417-428, 1993.
- Turley, E. A., Proteoglycans and cell adhesion. *Cancer Metast. Rev.* 3: 325-339, 1984.
- Uguz, C., Vrendenburgh, W. L., et Parrish, J. J. Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3',5'-cyclic monophosphothioate. *Biol. Reprod.* 51: 1031-1039, 1994.
- Urch, U. A. Biochemistry and function of acrosin. Dans: "Elements of Mammalian Fertilization" (éd Wassarman, P. M., CRC Press, Boca Raton). 233-248, 1991.
- Varner, D. D., Bowen, J. A., et Johnson, L. Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm. *Arch. Androl.* 31: 199-207, 1993.
- Vernon, R. B., Hamilton, M. S., et Eddy, E. M. Effects of in vivo and in vitro fertilization environments on the expression of a surface antigen of the mouse sperm tail. *Biol. Reprod.* 32: 669-680, 1985.
- Vijayaraghavan, S., Critchlow L. M., et Hoskins D. D. Evidence for a role for cellular alkalinization in the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated initiation of motility in bovine caput spermatozoa. *Biol. Reprod.* 32: 489-500, 1985.
- Vijayaraghvan, S., et Hoskins, D. D. Changes in the mitochondrial calcium influx and efflux properties are responsible for the decline in sperm calcium during epididymal maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 25: 186-194, 1990.
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P. et Kopf, G. S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121: 1129-1137, 1995a.
- Visconti, P. E., et Kopf, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 1-6, 1998.

- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., Olds-Clarke, P. et Kopf, G. S. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121: 1139-1150, 1995b.
- Visconti, P., et Tezon, J. G. Phorbol esters stimulate cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in hamster spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Biol. Reprod.* 40: 223-231, 1989.
- Ward C. R., et Kopf, G. S. Molecular events mediating sperm activation. *Dev. Biol.* 158: 9-34, 1993.
- Wegner, C. C., et Killan, G. J. Origin of oestrus-associated glycoproteins in bovine oviductal fluid. *J. Reprod. Fertil.* 95: 841-854, 1992.
- Weinman, D. E., et Williams, W. L. Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa. *Nature* 203: 423-424, 1961.
- Whetton, A. D., Gordon, L. M., et Housley, M. D. Elevated membrane cholesterol concentrations inhibit glucagon-stimulated adenylate cyclase. *Biochem. J.* 210: 437-449, 1983.
- Wolf, D. E., et Voglmayr, J. K. Diffusion and regionalization in membranes of maturing ram spermatozoa. *J. Cell. Biol.* 98: 1678-1684, 1984.
- Wolf, D. E., Lipscomb, A. C., et Maynard, V. M. Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biochemistry* 27: 860-865, 1988.
- Wooten, M. W., Voglmayr, J. K., et Wrenn, R. W. Characterization of cAMP-dependent protein kinase and its endogenous substrate proteins in ram testicular, cauda epididymal, and ejaculated spermatozoa. *Gamete Res.* 16: 57-68, 1987.
- Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. Dans: "Physiology of Reproduction" (2^e éds Knobil, E., et Neill, J., Raven Press, New York). 189-317, 1994.
- Yanagimachi, R. Mechanisms of fertilization in mammals. Dans: "Fertilization and Embryonic Development *In Vitro*" (éds Mastroianni, L. et Biggers, J. D., Plenum Press, New York). 81-187, 1981.
- Yeagle, P. L. Cholesterol and the cell membrane (Revue). *Biochim. Biophys. Acta* 822:267-287, 1985.
- Yeagle, P. L. Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J.* 3: 1833-1842, 1989.
- Zachariae, F., et Thorsoe, H. Hormonal control of acid mucopolysaccharides in the female genital tract. Dans: "Hormones and connective tissue" (éd Hansen, G. A., Munksgaard, Denmark). 257, 1966.
- Zaneveld, L. J. D., et De Jonge, C. J. Mammalian sperm acrosomal enzymes and the acrosome reaction. Dans: "A Comparative Overview of Mammalian Fertilization" (éds Dunbar, B. S., et O'Rand, M. G. Plenum Press, New York). 63-79, 1991.

Zarintash, R.J., et Cross, N. L. Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biol. Reprod.* 55:19-24, 1996.

Zeng, Y., Clark, E. N., et Florman H. M. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* 171: 554-563, 1995.

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

Zini, A., de Lamirande, E., et Gagnon, C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J. Androl.* 16:424-431, 1995.