

2m11.2671.4

Université de Montréal

**Clonage et distribution tissulaire des protéines majeures du plasma
séminal bovin**

par

DOMINIC SALOIS

**Département de biochimie
Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biochimie**

Décembre 1998

©Dominic Salois, 1998



W

4

U58

1999

V.030

Université de Montréal

Étude et distribution des parasites des poissons
de l'Estuaire du Saguenay

par

BOURNEAU SAOIR

Département de Biologie
Université de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté des études
de premier cycle en vue de l'obtention du grade de
Baccalauréat en Biologie (B.Sc.)
en 1999

1999

Université de Montréal



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Clonage et distribution tissulaire des protéines majeures du plasma
séminal bovin**

présenté par :

DOMINIC SALOIS

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Normand Brisson
Puttaswamy Manjunath
Gilles Bleau
François Lang

Mémoire accepté le : 99-04-01

SOMMAIRE

Une famille de quatre protéines acides (BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 et BSP-30kDa) représente la fraction protéique majeure du plasma séminal bovin (20-40 mg/ml). Ces protéines sont sécrétées par les vésicules séminales et lient les phospholipides ayant un groupement choline à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation. Les protéines BSP augmentent la capacitation des spermatozoïdes en présence d'héparine et/ou de HDL. De plus, ces protéines stimulent l'efflux de cholestérol membranaire de fibroblastes humains et de spermatozoïdes bovins. Ainsi, on suppose que s'il y a des protéines BSP dans le sang, celles-ci pourraient jouer un rôle au niveau du métabolisme lipidique. Donc, nous nous sommes intéressés à trouver des indices nous laissant supposer que ces protéines sont présentes dans la circulation sanguine.

Deux approches ont été utilisées afin de vérifier la présence de protéines BSP sériques. La première approche, basée sur la biologie moléculaire, consistait à analyser l'expression des ARNm des protéines BSP par la technique de protection à la RNase dans différents tissus bovins. Ceci dans le but de trouver un ou plusieurs organes qui pourraient produire et sécréter ces protéines dans le sang, car les vésicules séminales ne sont pas reconnues pour y sécréter leurs produits de synthèse. Puisque chaque expérience nécessitait une sonde d'ARN antisens spécifique, nous avons tout d'abord cloné par PCR les ADNc codant pour les protéines BSP-A3, BSP-30kDa et un fragment de l'ADNc de BSP-A1/A2. La deuxième approche (immunologique) consistait à isoler par une colonne d'affinité, les protéines du sérum bovin liant la phosphorylcholine et à les soumettre à une immunodétection avec l'anticorps spécifique anti-BSP-A1/A2.

La première approche s'est avérée infructueuse, car selon les résultats des protections à la RNase, les protéines BSP sont exprimées seulement dans les vésicules séminales et dans les ampoules, deux glandes sexuelles accessoires qui ne sécrètent pas de

protéines dans le sang. Cependant, l'approche immunologique s'est avérée plus profitable puisqu'une protéine peu abondante mais ayant plusieurs caractéristiques biochimiques communes avec la protéine BSP-A1/A2 a été détectée dans le sérum. Donc, selon ces résultats, il y aurait des protéines BSP (du moins BSP-A1/A2) dans le sérum bovin, mais l'origine tissulaire des protéines BSP sériques demeure inconnue. La découverte probable de protéines BSP sériques va conduire au développement de nouvelles avenues de recherche puisque l'on soupçonne que ces protéines seraient impliquées dans plusieurs processus physiologiques, notamment aux niveaux du transport inverse du cholestérol (prévention de l'athérosclérose) et de la modulation de l'action de l'IGF-II.

Un fait intéressant a été noté suite au séquençage des ADNc de BSP-A3 et BSP-30kDa. Des différences d'acides aminés ont été trouvées dans les séquences déduites par rapport aux séquences primaires publiées des protéines. Certains résultats suggèrent que les substitutions d'acides aminés de BSP-A3 seraient causé par un polymorphisme au niveau de son gène. Finalement, lors d'analyses Southern à des conditions d'hybridation à forte stringence, un gène similaire a été détecté dans l'ADN génomique de l'humain, du rat, du hamster et du lapin, avec une sonde d'ADNc codant pour BSP-30kDa. Même en utilisant des conditions d'hybridation à faible stringence, aucun gène n'a été détecté avec les sondes BSP-A3 et BSP-A1/A2, malgré le fait que des protéines apparentées à ces deux dernières aient été détectées chez ces mammifères. Ce qui nous laisse croire qu'une région de la protéine BSP-30kDa est très conservée entre les espèces, suggérant un rôle important pour cette protéine au niveau de la reproduction de plusieurs mammifères. Par contre les protéines analogues aux protéines BSP-A3 et BSP-A1/A2 chez ces mêmes espèces comporteraient de nombreuses différences au niveau de leur séquence primaire. Un haut taux de mutations pourrait suggérer que ces protéines ont un rôle important à jouer au niveau de l'empêchement de la fécondation entre des espèces différentes de mammifères ou que la séquence primaire soit peu importante pour la fonction de ces protéines.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xv
REMERCIEMENTS	xiv
DÉDICACE	xx
1. INTRODUCTION	1
1.1. Aspects généraux de la reproduction chez les mammifères	1
1.2. Anatomie du système reproducteur mâle	1
1.2.1. Origine embryonnaire des glandes sexuelles accessoires mâles	4
1.3. Le spermatozoïde	4a
1.3.1. Morphologie du spermatozoïde	4a
1.3.2. La spermatogénèse	9
1.3.3. Maturation épидидymaire	10
1.3.4. La capacitation	13
1.3.4.1. Anatomie du tractus génital femelle	13
1.3.4.2. Généralités sur la capacitation	13
1.3.4.3. Biochimie de la capacitation	15

1.3.5. Hyperactivation des spermatozoïdes	16
1.3.6. Réaction de l'acrosome	17
1.4. Le plasma séminal	21
1.4.1. Composition du plasma séminal	21
1.4.2. Rôles probables du plasma séminal dans la fécondation	24
1.5. Les protéines BSP	28
1.5.1. Historique	28
1.5.2. Caractéristiques biochimiques	30
1.5.2.1. Masse moléculaire	30
1.5.2.2. Composition en sucres	31
1.5.2.3. Charge des BSP	32
1.5.3. Structure	33
1.5.4. Similarité de structure avec d'autres protéines	36
1.5.5. Biologie moléculaire	36
1.5.6. Immunologie et distribution	40
1.5.7. Présence de protéines analogues chez d'autres espèces	41
1.5.8. Rôles physiologiques	43
1.5.8.1. Introduction	43
1.5.8.2. Propriétés de liaison	43
1.5.8.3. Liaison à l'héparine	44
1.5.8.4. Liaison aux HDL	44
1.5.8.5. Liaison à la spPLA ₂	45
1.5.8.6. Liaison au facteur de croissance de type II ressemblant à l'insuline (IGF-II)	47
1.5.8.7. Liaison au collagène et à la gélatine	47
1.6. Aperçu du projet de recherche	48

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	50
2.1 Matériel biologique	50
2.1.1. Tissus bovins	50
2.2. Acides nucléiques	50
2.2.1. Quantification des acides nucléiques	50
2.2.2. Purification des plasmides	51
2.2.3. Purification de l'ADN génomique	51
2.2.4. Purification de l'ARN total	51
2.2.5. Digestions enzymatiques et électrophorèse	52
2.2.6. Transferts Southern et Northern	53
2.2.7. Marquage de l'ADN et hybridations	53
2.2.8. Réaction de polymérase en chaîne (PCR) et clonage des produits de PCR	54
2.2.9. Transformation de cellules compétentes	55
2.2.10. Séquençage	56
2.3. Protéines	56
2.3.1. Produits chimiques	56
2.3.2. Extractions des protéines	57
2.3.2.1. Méthode usuelle	57
2.3.2.2. Autre méthode d'extraction des protéines	57
2.3.3. Purification de protéines analogues aux protéines BSP à partir du sérum bovin	58
2.3.3.1. Préparation du sérum	58
2.3.3.2. Purification sur colonne PPC-agarose	59

3.2. Résultats complémentaires	99
3.2.1. Amplification des ADNc codant pour les protéines BSP-A3 et BSP-30kDa	99
3.2.2. Analyse de l'expression de l'ARNm de BSP-A3 par Northern blot	99
3.2.3. Analyse de l'expression des protéines BSP par immunodétection	105
3.2.4. Purification des protéines liant la phosphorylcholine à partir du sérum bovin	108
3.2.5. Électrophorèse sur deux dimensions des protéines sériques bovines liant la phosphorylcholine	111
4. DISCUSSION	114
4.1. Approche basée sur la biologie moléculaire	114
4.2. Approche immunologique	121
4.3. Conclusion	124
4.4. Perspectives futures	125
4.4.1. Vérification de la présence des autres protéines BSP dans le sérum bovin	125
4.4.2. Vérification de l'association des protéines BSP sériques avec les HDL	125
4.4.3. Expression de différentes régions de l'ADNc codant pour la protéine BSP-30kDa tronquée dans <i>E. coli</i>.	126
5. BIBLIOGRAPHIE	128

LISTE DES TABLEAUX

1. INTRODUCTION

<u>Tableau I</u>	Quelques détails sur la composition du plasma séminal de différentes espèces de mammifères	23
<u>Tableau II</u>	Protéines du plasma séminal	25
<u>Tableau III</u>	Concentration des protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3 dans des extraits tissulaires et liquides physiologiques de différents mammifères	42

3. RÉSULTATS

<u>Tableau IV</u>	Oligonucleotide sequences used for PCR amplifications, RACE experiments and sequencing	90
<u>Tableau V</u>	Percentage of nucleotide identities between the complete sequences of the cDNA encoding for the different BSP proteins and between the BSP cDNA probes used in Southern blots and the different BSP cDNAs	90a
<u>Tableau VI</u>	Alignment of the two BSP-A3 peptide regions containing the amino acid differences (arrows) with the corresponding similar peptide regions from the previously reported BSP-A3 and from the other members of the BSP protein family	91

LISTE DES TABLEAUX (suite)

<u>Tableau VII</u> Liste des oligonucléotides utilisés, ainsi que la longueur des produits obtenus pour chaque réaction de PCR	102
---	------------

LISTE DES FIGURES

1. INTRODUCTION

<u>Figure 1.1</u>	Représentation générale des organes reproducteurs du taureau	2
<u>Figure 1.2</u>	Morphologie générale d'un spermatozoïde mammalien	5
<u>Figure 1.3</u>	Structure de la tête d'un spermatozoïde humain	7
<u>Figure 1.4</u>	Les étapes de la fécondation se déroulant à la surface de l'ovocyte chez les mammifères	18
<u>Figure 1.5</u>	Représentation schématique de la structure secondaire des protéines BSP	34
<u>Figure 1.6</u>	Séquence nucléotidique de l'ADNc codant pour le précurseur de la protéine BSP-A1/A2	38

3. RÉSULTATS

<u>Figure 3.1</u>	Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of BSP-A3 cDNA	92
<u>Figure 3.2</u>	Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of BSP-30kDa cDNA	93

LISTE DES FIGURES (suite)

<u>Figure 3.3A</u>	Aligned sequences of the cDNA encoding for the different BSP proteins and the sequences of each probe used in Southern blots or in RNase protection assays	93a
<u>Figure 3.3B</u>	Alignment of the putative signal peptide amino acid sequences of bovine BSP-A3 and BSP-30kDa with those of BSP-A1/A2 and boar pB1	94
<u>Figure 3.4</u>	Expression of BSP-A3 mRNA by RNase protection assay	95
<u>Figure 3.5</u>	Expression of BSP-30kDa mRNA by RNase protection assay	96
<u>Figure 3.6</u>	Expression of BSP-A1/A2 mRNA by RNase protection assay	97
<u>Figure 3.7</u>	Southern blot analysis of the BSP protein genes	98
<u>Figure 3.8</u>	Amplification par PCR des différentes régions des ADNc codant pour les protéines BSP	100
<u>Figure 3.9</u>	Analyse de l'expression de l'ARNm de BSP-A3 par Northern blot	103
<u>Figure 3.10</u>	Immunodétection des fractions protéiques solubles provenant de différents tissus bovins à l'aide des anticorps anti-BSP	106

LISTE DES FIGURES (suite)

- Figure 3.11** Purification des protéines sériques du taureau liant la phosphorylcholine et leur immunodétection à l'aide de l'anticorps anti-BSP-A1/A2 **109**
- Figure 3.12** Séparation par une électrophorèse bidimensionnelle des protéines éluées de la colonne PPC-agarose avec la choline **112**

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

N.B. Cette liste inclut également les abréviations anglaises utilisées dans l'article.

°C	degré Celsius
%	pourcentage
Ac	anticorps
ADN	acide déoxyribonucléique
AMPC	adénosine 3', 5'monophosphate cyclique
ADNc (cDNA)	ADN complémentaire (<i>complementary DNA</i>)
ApoA-I	apolipoprotéine A-I
ARNm (mRNA)	ARN messager (<i>messenger RNA</i>)
ATP	adénosine triphosphate
pb (bp)	paire de base(s) [<i>base pair(s)</i>]
BSA	albumine sérique bovine (<i>bovine serum albumin</i>)
BSP	plasma séminal bovin (<i>bovine seminal plasma</i>)
Ca²⁺	ion calcium
cBSP	précipité protéique du plasma séminal bovin (<i>crude bovine seminal plasma proteins</i>)
Da	dalton
dCTP	déoxycytidine triphosphate
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
DNase	déoxyribonucléase
DRIA	analyse par immunodiffusion radiale double (<i>Double-Radial-Imunodiffusion Analysis</i>)
dTTP	déoxythymidine triphosphate

EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
FSH	hormone folliculo-stimulante (<i>Follicle-stimulating hormone</i>)
g	gramme
H₂O	molécule d'eau
HDL	lipoprotéines de haute densité (<i>high density lipoprotein</i>)
IGF-II	facteur de croissance de type II ressemblant à l'insuline (<i>insulin-like growth factor II</i>)
IgG	immunoglobuline de type G
IPTG	isopropyl thio-β-galactoside
k	kilo (10 ³)
kDa	kilodalton
kb	kilobase(s)
KCl	chlorure de potassium
LH	hormone lutéinisante (<i>Luteinizing hormone</i>)
LHRH	facteur libérant l'hormone lutéinisante (<i>Luteinizing hormone-releasing hormone</i>)
lyso-PC	lysophosphatidylcholine
μ	micro (10 ⁻⁶)
μg	microgramme
μl	microlitre
μM	micromolaire
M	molaire
m	milli (10 ⁻³)
mA	milliampère
Mg²⁺	ion magnésium
MgSO₄.7H₂O	sulfate de magnésium heptahydrate
ml	millilitre

mm	millimètre
mM	millimolaire
MOPS	acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique
M_r	masse moléculaire relative
n	nano (10 ⁻⁹)
NaCl	chlorure de sodium
NaH₂PO₄	phosphate de sodium dibasique
NaOH	hydroxyde de sodium
ng	nanogramme
NH₄HCO₃	bicarbonate d'ammonium
³²P	isotope 32 du phosphore
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PB	tampon phosphate (<i>phosphate buffer</i>)
PBS	tampon phosphate salin (<i>phosphate buffer saline</i>)
PC	phosphatidylcholine
PCR	réaction de polymérase en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	potentiel hydroélectrique
pI	point isoélectrique
PLA₂	phospholipase A ₂
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyle (<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PPC-Agarose	p-aminophényl phosphorylcholine-Agarose
PVDF	polyvinylidène difluorure
RACE	Amplification rapide des extrémités 3' et 5' des ADNc (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>)
RIA	essai radioimmunologique (<i>radioimmunoassay</i>)

RNA	acide ribonucléique
RNase	ribonucléase
rpm	révolution par minute
SDS	sodium dodécyl sulfate
SSC	citrate de sodium salin (<i>sodium citrate/sodium chloride</i>)
TCA	acide trichloroacétique
TE	tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyléthylènediamine
Tris	tris (hydroxyméthyle) aminométhane
U	unité d'activité
V	volts
X g	accélération gravitationnelle
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le docteur P. Manjunath pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je remercie également le docteur Gilles Bleau qui m'a autorisé à utiliser de nombreux appareils dans son laboratoire. J'aimerais exprimer ma vive reconnaissance au docteur Yves Paquette pour ses judicieux conseils en biologie moléculaire, sa grande disponibilité et sa patience. N'eût été de mes nombreuses conversations avec lui mes connaissances en biochimie et en biologie moléculaire ne seraient sans doute pas les mêmes! Je le remercie infiniment puisque malgré son départ du centre de recherches, il a bien voulu m'aider lors de la rédaction de mon article.

Merci aussi à tous mes amis de l'hôpital et surtout à mes collègues de travail Robert Moreau, Martin Ménard, Isabelle Thérien, Marie-Eve Lane et Sébastien Soubeyrand pour leur soutien technique, psychologique et pour avoir créé une ambiance de travail exceptionnelle. Grâce à eux ma maîtrise aura été une expérience académique inoubliable.

Finalement, je désire exprimer toute ma gratitude à mon frère Patrick (il m'a aidé également pour la rédaction de ce mémoire) et à mes parents qui grâce à leurs encouragements et surtout par leur soutien financier m'ont permis de terminer ma maîtrise.

À mes parents

1. INTRODUCTION

1.1. ASPECTS GÉNÉRAUX DE LA REPRODUCTION CHEZ LES MAMMIFÈRES

La fécondation représente l'union de deux cellules haploïdes, un gamète mâle et un gamète femelle, afin de créer un zygote. Cette nouvelle cellule diploïde va se développer afin de former un nouvel individu qui possédera un bagage génétique différent de ses deux parents. Ce mode de reproduction sexué a émergé au cours de l'évolution et a été maintenu chez la plupart des métazoaires, incluant les mammifères. La variabilité génétique qui entre en jeu représente un avantage pour l'espèce si l'environnement se modifie car la progéniture peut alors être mieux adaptée au nouvel environnement que chacun des parents (Michod et Levin, 1987). La physiologie de la reproduction est très vaste et inclut plusieurs sujets; pour n'en nommer que quelques uns, mentionnons entre autres, la différenciation sexuelle, la synthèse et la maturation des gamètes mâle et femelle, le transport des gamètes et du zygote, l'embryogénèse, l'implantation, les hormones sexuelles, la puberté, la lactation, etc. Dans le cadre de ce mémoire, nous nous attarderons principalement, et ce d'une manière générale, sur le système reproducteur mâle et sur les différentes étapes de maturation que doivent subir les gamètes mâles (les spermatozoïdes) afin qu'ils soient aptes à féconder le gamète femelle mature (l'ovocyte ou ovule).

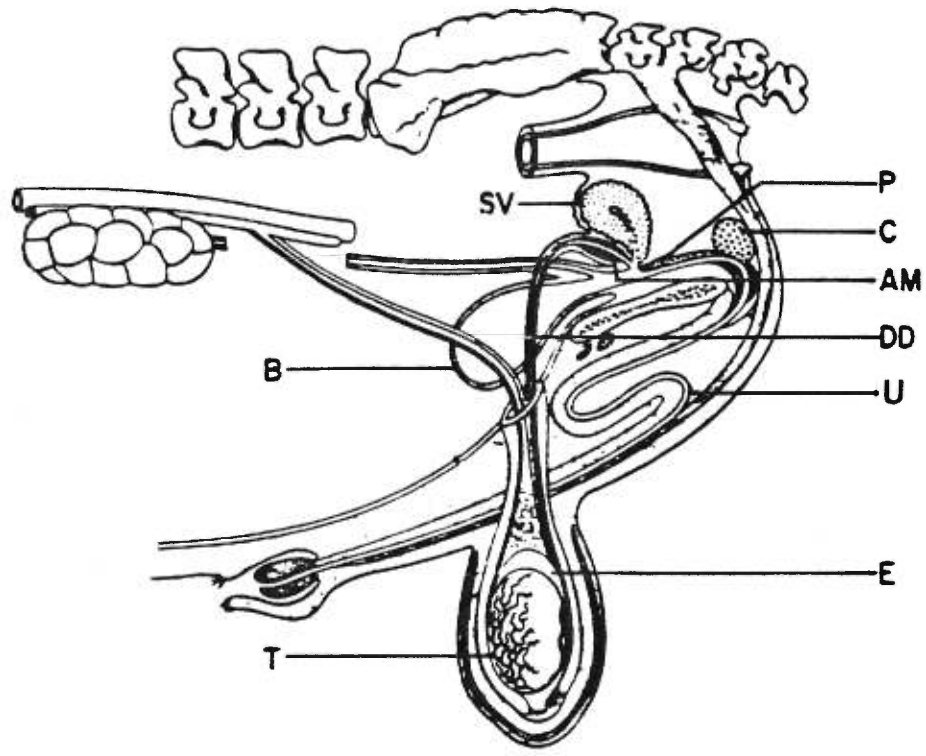
1.2. ANATOMIE DU SYSTÈME REPRODUCTEUR MÂLE

Le tractus reproducteur des mammifères mâles comprend deux testicules, deux épидидymes (chacun relié à un canal déférent) ainsi que les glandes sexuelles accessoires. La figure 1.1 représente les organes reproducteurs mâles chez le bovin.

Figure 1.1 Représentation générale des organes reproducteurs du taureau

Les principaux organes reproducteurs retrouvés normalement chez les mammifères mâles sont présentés ci-contre. On retrouve les testicules (T), les épидидymes (E), les ampoules (AM), les vésicules séminales (SV), la prostate (P) et les glandes de Cowper (C). On y retrouve également les canaux déférents (*ductus deferens*, DD) et l'urètre (U).

Tiré de Setchell, 1991



Les glandes sexuelles accessoires normalement présentes chez le mâle sont: la prostate, les deux vésicules séminales, les deux ampoules (les ampoules sont un élargissement de la partie terminale des canaux déférents (Setchell et Brooks, 1988)) et les deux glandes bulbo-urétrales, aussi nommées glandes de Cowper. Cependant, de tous les différents types d'organes présents chez les mammifères, la plus grande variation entre les espèces est observée surtout dans l'anatomie, dans la biologie et dans la fonction des glandes accessoires (Coffey, 1988). Par exemple chez l'humain, le taureau et le rat, les vésicules séminales sont très proéminentes, elles sont absentes chez le chat et le chien et sont très petites chez le bélier (Coffey, 1988; Setchell, 1991). Quoique la prostate soit universelle chez les mammifères mâles, elle présente de nombreuses variations lorsqu'on la compare entre les espèces, soit aux niveaux anatomique, biochimique et pathologique (Coffey, 1988).

Les testicules produisent les spermatozoïdes et également les hormones sexuelles mâles, dont la plus importante est la testostérone. Ensuite, les spermatozoïdes vont rejoindre les épидидymes où ils acquerront leur motilité et leur capacité de féconder l'ovocyte. D'ailleurs, les spermatozoïdes matures sont entreposés dans la queue de l'épididyme. Suite à une stimulation sexuelle, le pénis entre en érection et lors de l'éjaculation, le fluide et les spermatozoïdes des épидидymes se rendent par le canal déférent jusqu'à l'urètre. Ceux-ci vont se mélanger avec les sécrétions des glandes accessoires et vont constituer le sperme éjaculé (Setchell, 1991).

1.2.1. Origine embryonnaire des glandes sexuelles accessoires mâles

Lors de la différenciation sexuelle, ce sont les chromosomes sexuels qui sont responsables de la détermination du sexe des gonades et c'est le sexe des gonades qui va déterminer le phénotype sexuel (Jost, 1972). Chez l'humain, un minimum de 19 gènes sont impliqués dans la différenciation sexuelle (Wilson et Goldstein, 1975).

Certains de ces gènes sont situés sur les chromosomes sexuels, d'autres sur les autosomes. Chez l'humain, pendant les huit premières semaines du développement de l'embryon, le tractus urogénital est identique chez les deux sexes (George et Wilson, 1988). On y retrouve les gonades indifférenciées et deux systèmes (Mullerian et Wolffian) chacun constitué de deux canaux à partir desquels se développeront les glandes sexuelles accessoires. Le sinus urogénital primitif est situé à la base des canaux Wolffian. L'expression de gènes situés sur le chromosome Y va faire en sorte que les gonades indifférenciées vont se développer en testicules. Par la suite, deux hormones sécrétées par les testicules foetaux (la testostérone et la substance inhibitrice du canal Mullerian) vont transformer le tractus urogénital indifférencié en un tractus caractéristique aux mâles. La substance inhibitrice du canal Mullerian, sécrétée par les cellules de Sertoli, cause la régression des canaux Mullerian (femelles), tandis que la testostérone, sécrétée par les cellules de Leydig, est responsable du développement des caractéristiques sexuelles mâles, incluant la stabilisation et la différenciation des canaux Wolffian en organes sexuels accessoires mâles et la différenciation des organes génitaux externes. Les épидидymes dérivent des segments des canaux Wolffian adjacents aux testicules, les canaux déférents et les ampoules dérivent des segments centraux de ces canaux, tandis que les vésicules séminales et les canaux éjaculateurs proviennent de la région terminale de ces canaux (George et Wilson, 1988 et Byskov et Hoyer, 1988). La prostate dérive du sinus urogénital (Kellokumpo-Lehtinen et coll., 1980).

1.3. LE SPERMATOZOÏDE

1.3.1. Morphologie du spermatozoïde

La figure 1.2 représente la physionomie générale d'un spermatozoïde de mammifère. La figure 1.3 montre également la structure de la tête d'un spermatozoïde humain. Le spermatozoïde mammalien possède deux composantes principales: la tête et la queue ou flagelle (Eddy, 1988). La tête est constituée principalement de l'acrosome

Figure 1.2 Morphologie générale d'un spermatozoïde mammalien

La structure externe d'un spermatozoïde mammalien est représentée ci-contre. 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. Les mitochondries sont situées au niveau de la pièce intermédiaire, tandis que la pièce principale contient la gaine fibreuse. L'axonème se prolonge de la pièce connectrice jusqu'à la fin de la pièce terminale.

Tiré de Eddy, 1988

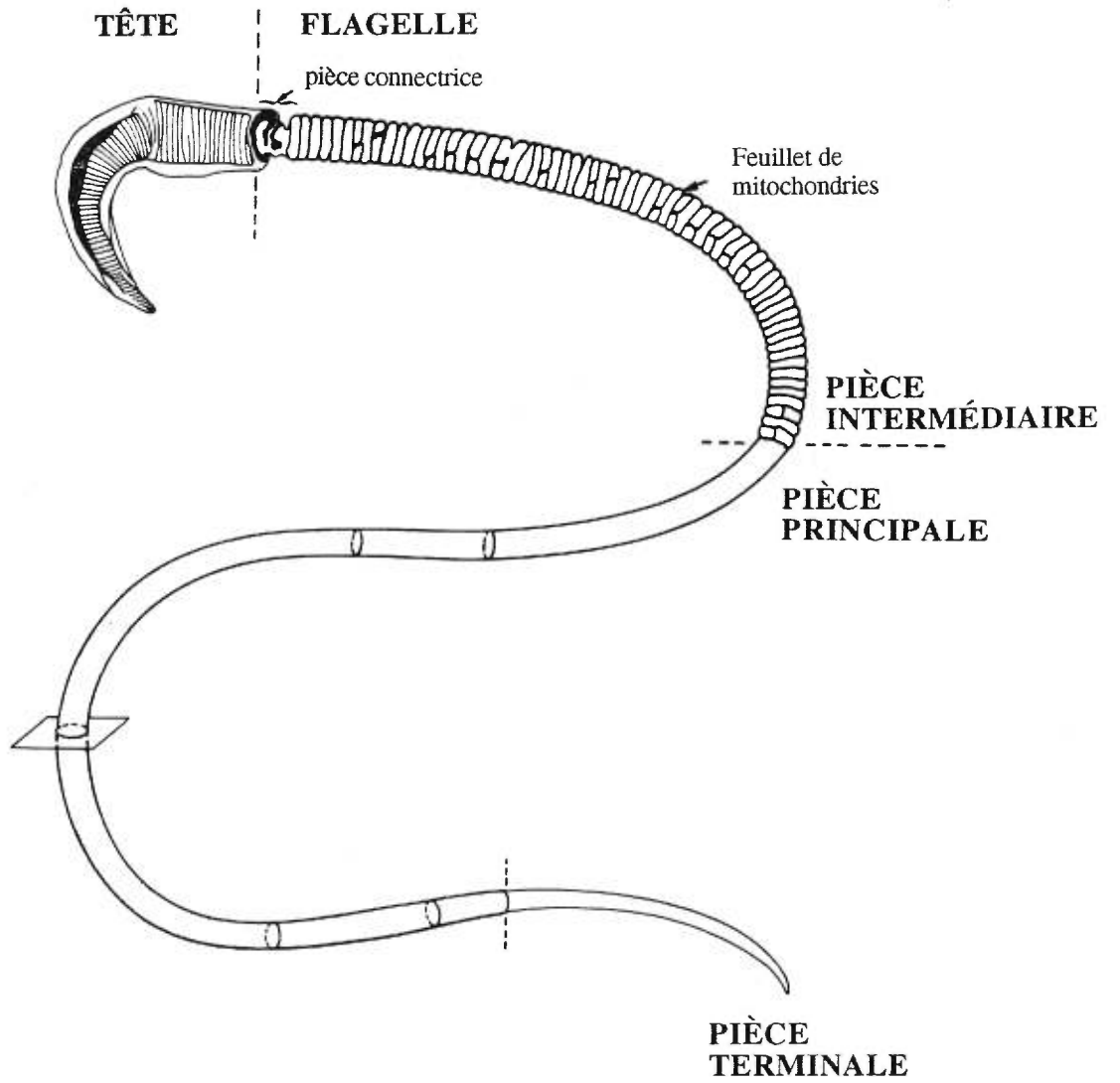
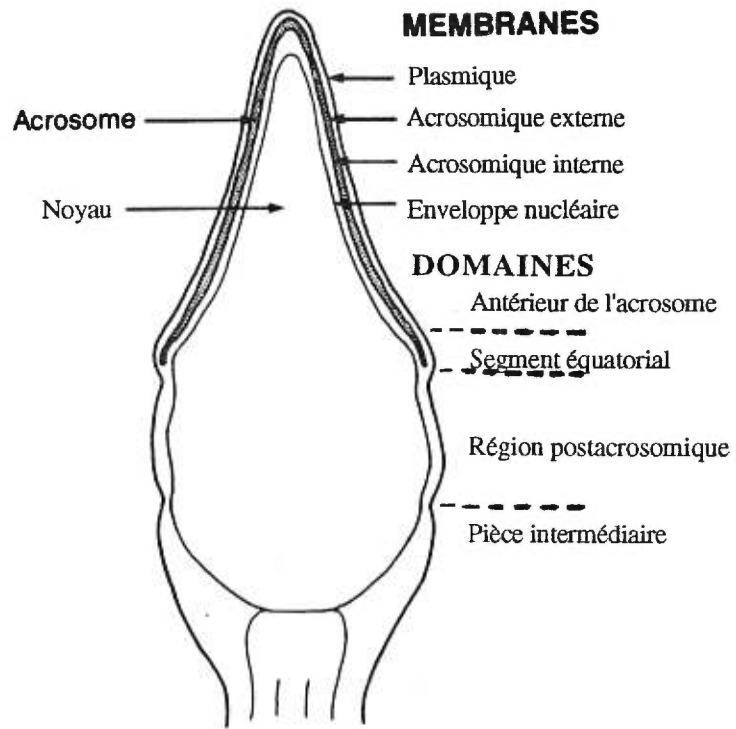


Figure 1.3 Structure de la tête d'un spermatozoïde humain.

La structure de la tête d'un spermatozoïde humain est représentée ci-contre. La membrane plasmique au niveau de la portion antérieure de l'acrosome et du segment équatorial recouvre la membrane acrosomique externe. De plus, dans ces régions, la membrane acrosomique interne entoure la membrane nucléaire. L'acrosome est plus mince au niveau du segment équatorial que dans sa portion antérieure.

Tiré de Eddy, 1988



et du noyau. Elle contient également de petites quantités de structures cytosquelettiques ainsi que du cytoplasme. Le volume du noyau spermatique est plus petit que celui des cellules somatiques et sa chromatine est hautement condensée. Son génome est haploïde, contenant une seule copie de chaque chromosome. L'acrosome est un large granule de sécrétion qui entoure l'extrémité antérieure du noyau, juste en dessous de la membrane plasmique. Il contient les enzymes nécessaires pour que le spermatozoïde puisse pénétrer et/ou fusionner avec la membrane plasmique de l'ovocyte. L'acrosome a été décrit comme étant un lysosome spécialisé (Allison et Hartree, 1970; Mann et Lutwak-Mann, 1981). Le flagelle contient en son centre un axonème, qui est un complexe très ordonné de microtubules entourés de fibres très denses et qui s'étend d'un bout à l'autre du flagelle. De plus, on retrouve des mitochondries dans la partie médiane de celui-ci. En fait, la queue contient les sources d'énergie et la machinerie nécessaire à la motilité du spermatozoïde afin que celui-ci puisse atteindre l'ovocyte (Eddy, 1988). Une membrane plasmique entoure étroitement la tête et la queue du spermatozoïde. La composition et la fonction de cette membrane plasmique varient selon les différentes régions du spermatozoïde. L'hétérogénéité de la membrane plasmique est causée par des différences aux niveaux de la composition et/ou de la distribution de plusieurs facteurs tels que: la charge, les sucres, les antigènes, et les lipides (Eddy, 1988).

1.3.2. La spermatogénèse

Les spermatozoïdes sont formés dans les testicules à partir de cellules germinales non-différenciées, appelées les spermatogonies (Kretser et Kerr, 1988). Ces cellules souches sont situées dans la paroi interne des tubules séminifères et se divisent par mitose, produisant sans cesse de nouvelles spermatogonies. Certaines spermatogonies s'éloignent de la paroi tubulaire et augmentent de volume pour se transformer en spermatocytes primaires qui entreront en méiose. Ces cellules contenant

au départ un génome diploïde se divisent pour donner des spermatocytes secondaires contenant chacun un génome haploïde. Ces derniers se diviseront à leur tour pour donner des spermatides haploïdes qui, après différenciation, deviendront des spermatozoïdes. La transformation des spermatides en spermatozoïdes implique une série d'événements complexes qui constituent le processus de spermiogénèse. Cette étape n'implique aucune division cellulaire et consiste plutôt en une métamorphose durant laquelle une cellule conventionnelle est convertie en une structure mobile hautement ordonnée. Il est possible de regrouper les changements cytologiques subits par les spermatides lors de la spermiogénèse en une série d'étapes impliquant le développement des différentes organelles cellulaires. Ces étapes sont (a) la formation de l'acrosome, (b) les changements au niveau du noyau, (c) le développement du flagelle, (d) la réorganisation du cytoplasme et des organelles cellulaires et (e) l'élimination des ponts cytoplasmiques entre les cellules de Sertoli et les spermatides. Suite à cette dernière étape, chaque spermatozoïde commence à vivre d'une manière indépendante.

Les spermatozoïdes mammaliens sortant des testicules sont hautement différenciés. Par contre, ils sont très peu motiles (Yanagimachi, 1994). De plus, ils sont incapables de féconder l'ovocyte et ce, même pour une insémination *in vitro* (Setchell, 1991; Setchell et coll., 1969; Voglmayr, 1975; Voglmayr et coll., 1978). Les spermatozoïdes acquerront leur motilité et leur pouvoir d'interagir avec l'ovocyte dans l'épididyme.

1.3.3. Maturation épидидymaire

L'épididyme consiste en un organe contenant un long canal hautement convoluté et accolé à chaque testicule (Harper, 1988). Il est normalement divisé anatomiquement en trois régions: la tête, le corps et la queue (*caput, corpus* et la *cauda*). Le transport des spermatozoïdes le long de l'épididyme n'est pas relié à la

faible motilité de ceux-ci, mais serait plutôt un processus passif dû aux sécrétions provenant des testicules. La migration des spermatozoïdes est également assistée par le battement de cils situés sur l'épithélium luminal et par la contraction d'éléments musculaires présents sur les parois du canal efférent (Bedford, 1975). Le transit moyen d'un spermatozoïde humain dans l'épididyme est estimé à environ 12 jours (Rowley et coll., 1970). La région de l'épididyme où les spermatozoïdes commencent à acquérir leur pouvoir fécondant varie selon les espèces (Yanagimachi, 1994). Les spermatozoïdes matures sortant de la queue de l'épididyme sont motiles lorsqu'ils sont exposés à des concentrations physiologiques de sels. L'inhabilité des spermatozoïdes testiculaires à se mouvoir et à interagir avec l'ovocyte serait due en majeure partie à l'immaturité de la membrane plasmique. En effet, ces mêmes spermatozoïdes peuvent bouger quasi-exactement comme les spermatozoïdes épididymaires matures de la queue de l'épididyme, pourvu qu'ils soient dépourvus de leur membrane plasmique et en présence d'adénosine triphosphate (ATP), d'adénosine 3', 5'monophosphate cyclique (AMPC) et d'ions magnésium (Mg^{2+}) (Ishijima et coll., 1985; Mohri et Ishijima, 1989; Mohri et Yanagimachi, 1980; White et Voglmayr, 1986). Notons que l'habileté des spermatozoïdes à adhérer à la zone pellucide (enveloppe glycoprotéique entourant l'ovocyte) augmente au fur et à mesure que ceux-ci passent à travers l'épididyme (Cuasnicu, et coll., 1984; Orgebin-Crist et Fournier-Delpech, 1982; Peterson et coll., 1986; Saling, 1982).

La membrane plasmique serait altérée étape par étape au fur et à mesure que les spermatozoïdes franchissent les différents segments de l'épididyme, puisque l'osmolarité (D'Addario, 1980) et la composition chimique (Brooks, 1979; Howards et coll., 1979; Lechene, 1982; Legault et coll., 1979) du fluide sécrété par l'épididyme varient d'une région à l'autre. Les spermatozoïdes testiculaires possèdent dans et sur leur membrane plasmique plusieurs protéines (Bellve et O'Brien, 1983; Dacheux et coll., 1989; O'Rand, 1985; Romrell et coll., 1982). Durant leur transit dans

l'épididyme, quelques protéines intrinsèques des spermatozoïdes changent de situation à l'intérieur ou sur la membrane plasmique et sont altérées, masquées ou remplacées par de nouvelles protéines originant de l'épididyme (Kohane et coll., 1980a; Kohane et coll., 1980b; Kopečný et coll., 1984; Vreeburg et coll., 1992). Durant la maturation, il se produit également une glycosylation des composantes de la surface membranaire des spermatozoïdes (Hamilton et coll., 1986). Ces changements au niveau des glycoprotéines, intégrées ou adsorbées sur la membrane plasmique de différentes régions de la tête du spermatozoïde mature, stabiliseraient la membrane plasmique et préviendraient la réaction prématurée de l'acrosome (voir section 1.3.6.) (Reynolds et coll., 1989; Thomas et coll., 1984). D'autres glycoprotéines seraient médiatrices des interactions avec la zone pellucide (Lakoski, 1988; Phelps et coll., 1990) ou avec la membrane plasmique de l'oeuf (Primakoff et coll., 1987) lors de la fécondation. La composition lipidique de la membrane plasmique est également modifiée lors de la maturation épидидymaire (Nikolopoulou et coll., 1985; Rana et coll., 1991; Schlegel et coll., 1986). Une des modifications lipidiques majeures semble être l'ajout de cholestérol synthétisé par l'épididyme dans la membrane plasmique des spermatozoïdes (Seki et coll., 1992). La stabilisation de la membrane par le cholestérol serait bénéfique pour les spermatozoïdes, car ceux-ci doivent traverser plusieurs microenvironnements variés (et souvent hostiles) avant d'atteindre l'ovocyte (Yanagimachi, 1994). Notons que l'altération membranaire n'est pas seulement réservée à la membrane plasmique de la tête du spermatozoïde. Il y a également adsorption et / ou intégration de peptides et de glycoprotéines spécifiques dans et sur la membrane plasmique du flagelle (Yanagimachi, 1994). Certaines glycoprotéines du flagelle serviraient à prévenir une hyperactivation précoce du spermatozoïde.

Les spermatozoïdes qui ont mûri dans l'épididyme sont mobiles, mais ils n'ont pas la capacité immédiate de féconder l'ovocyte. Ils acquerront cette habileté suite à un séjour dans le tractus génital femelle. Ces changements physiologiques

(fonctionnels) qui donnent aux spermatozoïdes leur pouvoir fécondant sont regroupés en un processus nommé la capacitation (Yanagimachi, 1994).

1.3.4. La capacitation

1.3.4.1. Anatomie du tractus génital femelle

Le tractus génital femelle des mammifères est composé d'un vagin, d'un utérus, de deux oviductes chacun relié à un ovaire. L'oviducte, qui consiste en un long conduit, va assurer le transport de l'ovocyte jusqu'au site de la fécondation. Il est anatomiquement séparé en trois segments. En partant de l'utérus, on retrouve l'isthme, l'ampoule et l'*infundibulum*. La fécondation a lieu dans l'ampoule ou à la jonction ampoulo-isthmique de l'oviducte (Suarez et coll., 1990). Suite à la fécondation, le zygote va descendre dans l'utérus où il continuera son développement. Indépendamment des espèces, seulement quelques spermatozoïdes sur plusieurs dizaines de millions vont atteindre l'ampoule. La majorité des spermatozoïdes sont éliminés du tractus femelle par l'écoulement rétrograde à l'intérieur du vagin et/ou par phagocytose par les leucocytes (Anderson, 1991).

1.3.4.2. Généralités sur la capacitation

Chez la majorité des mammifères (incluant la vache, le lapin et les primates), le sperme est déposé dans le vagin au moment de l'éjaculation. C'est à partir de ce moment que l'ascension des spermatozoïdes vers l'ampoule va commencer. Avant de se rendre dans l'utérus, les spermatozoïdes doivent passer à travers le mucus du cervix (communément appelé le col de l'utérus). Ce mucus cervical protège les spermatozoïdes contre les leucocytes vaginaux, prévient l'entrée du plasma séminal dans l'utérus et élimine les spermatozoïdes anormaux (Elstein, 1978; Katz et coll., 1989; Overstreet, 1983). Ce mucus est composé de glycoprotéines formant une microstructure à travers laquelle les spermatozoïdes vont "nager" afin de se rendre

jusqu'à l'épithélium sécrétoire où ils s'y lieront (Katz et coll., 1989). Le cervix va retenir et conserver les spermatozoïdes durant une certaine période de temps (Yanagimachi, 1994). Les spermatozoïdes vont graduellement se dissocier de l'épithélium du cervix et vont se déplacer à travers les sillons de l'épithélium pour atteindre l'utérus (Mullins et Seake, 1989). Ce relâchement progressif des spermatozoïdes pourrait durer plusieurs jours chez l'humain (Overstreet, 1983). Selon des études *in vitro*, la capacitation des spermatozoïdes pourrait débuter pendant leur séjour dans le liquide cervical et/ou sur l'épithélium cervical (Gould et coll., 1985; Katz et coll., 1989).

Par la suite, les spermatozoïdes vont remonter à travers le liquide tapissant l'épithélium de l'utérus. Il semble que cette ascension ait lieu grâce au mouvement de contraction de la paroi utérine et non seulement via la motilité des spermatozoïdes (White et Kar, 1973). Les spermatozoïdes vont finalement atteindre l'isthme de l'oviducte et vont y être entreposés jusqu'au moment de l'ovulation. Les spermatozoïdes sont attachés par la tête à l'épithélium de l'isthme (Lefebvre et coll., 1995). Au moment de l'ovulation, qui peut survenir après plusieurs jours ou même des mois après la copulation chez certaines espèces, les spermatozoïdes vont se dissocier de l'épithélium de l'isthme pour aller rencontrer et féconder l'ovocyte dans l'ampoule (Hunter, 1980; Ward et Kopf, 1993). Le mécanisme responsable du relâchement des spermatozoïdes de l'isthme au moment de l'ovulation n'est pas clair, mais il correspondrait à la fin de la capacitation (Lefebvre et Suarez, 1996; Yanagimachi, 1994). La capacitation se produirait aussi bien dans l'utérus que dans l'oviducte puisque le liquide utérin (Brackett et Server, 1970; Chang, 1959), tout comme le fluide oviductal (Adams et Chang, 1962; Parrish et coll., 1989) induisent la capacitation *in vitro*. Selon Yanagimachi (1994), la capacitation *in vivo* n'est pas strictement réalisée par un seul organe. Le but physiologique du tractus femelle au

niveau de la capacitation serait de délivrer une quantité suffisante et continue de spermatozoïdes capables à tous les ovocytes, avant que ceux-ci dépérissent.

1.3.4.3. Biochimie de la capacitation

La plupart des changements associés à la capacitation se situent sur la membrane plasmique du spermatozoïde. Celle-ci va subir des modifications aux niveaux de sa composition protéique et lipidique. Plusieurs protéines fixées à la membrane plasmique et originant des glandes accessoires ou de l'épididyme vont être enlevées ou altérées (Volgmayr et Sawyer, 1986; Yanagimachi, 1994). De nouvelles protéines provenant des fluides utérin et oviductal vont aussi s'y ajouter (Volgmayr et Sawyer, 1986). Il y a également une redistribution de certaines protéines situées à l'intérieur ou à la surface de la membrane du spermatozoïde (Suzuki, 1990; Suzuki et Yanagimachi, 1989). De plus, des changements se produisent au niveau des sucres des glycoprotéines de surface (Cross et Overstreet, 1987; Singer et coll., 1985; Talbot et Chacon, 1981). L'enlèvement des résidus d'acide sialique a été suggéré (Srivastava, 1988).

En ce qui concerne les modifications lipidiques, il semble que l'efflux de cholestérol membranaire soit une étape très importante de la capacitation (Davis, 1981; Ehrenwald, 1988; Go et Wolf, 1985; Langlais et coll., 1988; Parks et Ehrenwald, 1990). L'efflux consiste en le transfert du cholestérol de la membrane du spermatozoïde vers un accepteur dans le milieu extracellulaire. Les lipoprotéines de haute densité (HDL) et/ou l'albumine, qui sont toutes deux présentes dans le tractus génital femelle, seraient des accepteurs de cholestérol (Davis et coll., 1979; Ehrenwald et coll., 1990; Go et Wolf, 1985; Langlais et coll., 1988). Récemment, Zarintash et Cross (1996) ont démontré que plus les spermatozoïdes humains perdent leur cholestérol, plus ils vont répondre facilement à l'action de la progestérone (la progestérone induit la réaction de l'acrosome chez le spermatozoïde humain).

D'ailleurs, de nombreuses études ont démontré qu'un ajout de cholestérol au milieu d'incubation retardait ou inhibait la capacitation chez plusieurs espèces (Davis, 1982; Ehrenwald, 1988; Flemming et Yanagimachi, 1981; Go et Wolf, 1985). Lors de la capacitation, il y aurait également une redistribution (Lin et Kan, 1996) et une altération des lipides formant la couche même de la membrane (Llanos et Meizel, 1983).

Une série de changements va également se produire à l'intérieur du cytoplasme des spermatozoïdes lors de la capacitation. Par exemple chez le bovin, on remarque une augmentation du potentiel hydroélectrique (pH) intracellulaire et de la concentration cytosolique d'ions calcium (Ca^{2+}) (Parrish et coll., 1989; Vredenburg-Wilberg et Parrish, 1995). Chez l'humain, on note aussi une importante phosphorylation de plusieurs protéines du spermatozoïde, phosphorylation qui serait influencée par les niveaux intracellulaires d'AMPc (Emiliozzi et Fenichel, 1997; Leclerc et coll., 1996).

Chez le bovin, les HDL (Ehrenwald et coll., 1990; Parks et Ehrenwald, 1990) et les glycosaminoglycans semblables à l'héparine (Lenz et coll., 1982; Parrish et coll., 1988 et 1989) présents dans le fluide oviductal sont majoritairement responsables de la capacitation des spermatozoïdes. De plus, selon nos travaux, le plasma séminal bovin favorise la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires (voir les sections 1.4.2. et 1.5.7.) (Thérien et coll., 1995; Thérien et coll., 1997).

1.3.5. Hyperactivation des spermatozoïdes

Suite à l'achèvement de la capacitation, les spermatozoïdes vont se mettre à bouger très activement. Ce phénomène est nommé hyperactivation du spermatozoïde. Cette soudaine augmentation de la propulsion des spermatozoïdes leur faciliterait le passage à travers le fluide visqueux de l'oviducte et à travers les différentes couches périphériques entourant l'ovocyte (particulièrement la zone pellucide) afin de se rendre jusqu'à la membrane plasmique ovocytaire (Yanagimachi, 1994). L'hyperactivation de

la motilité faciliterait également le départ des spermatozoïdes de l'isthme de l'oviducte lors de l'ovulation (Demott et Suarez, 1992). Il y a une forte corrélation entre cette hypermotilité et l'habilité des spermatozoïdes à féconder les ovocytes ayant une zone pellucide intacte (Flemming et Yanagimachi, 1982; Fraser et Quinn, 1981; Jinno et coll., 1987). Les mécanismes causant l'hyperactivation sont assez peu connus, mais consisteraient au moins en la perte ou l'altération de protéines situées au niveau du flagelle pendant ou à la fin de la capacitation, ce qui exposerait ou activerait des récepteurs. Une fois activés, ces derniers stimuleraient une protéine G qui serait à l'origine du déroulement d'une cascade d'événements qui vont ultimement conduire à l'hyperactivation (Yanagimachi, 1994).

1.3.6. Réaction de l'acrosome

Les spermatozoïdes capités qui rencontrent la zone pellucide (épaisse couche glycoprotéique entourant l'ovocyte) procèdent à la réaction de l'acrosome (Yanagimachi, 1994). La figure 1.4 illustre les six différentes étapes de l'interaction spermatozoïde-oeuf chez les mammifères, incluant la réaction de l'acrosome. La réaction de l'acrosome implique une multitude de fusions entre la membrane acrosomique externe et la membrane plasmique adjacente, créant ainsi plusieurs ouvertures dans celles-ci. Ceci permet le relâchement des différentes enzymes hydrolytiques contenues dans l'acrosome des spermatozoïdes. Ces enzymes, en dégradant la zone pellucide, vont permettre aux spermatozoïdes de se frayer un passage à l'intérieur de celle-ci, afin d'atteindre ultimement la membrane plasmique ovocytaire.

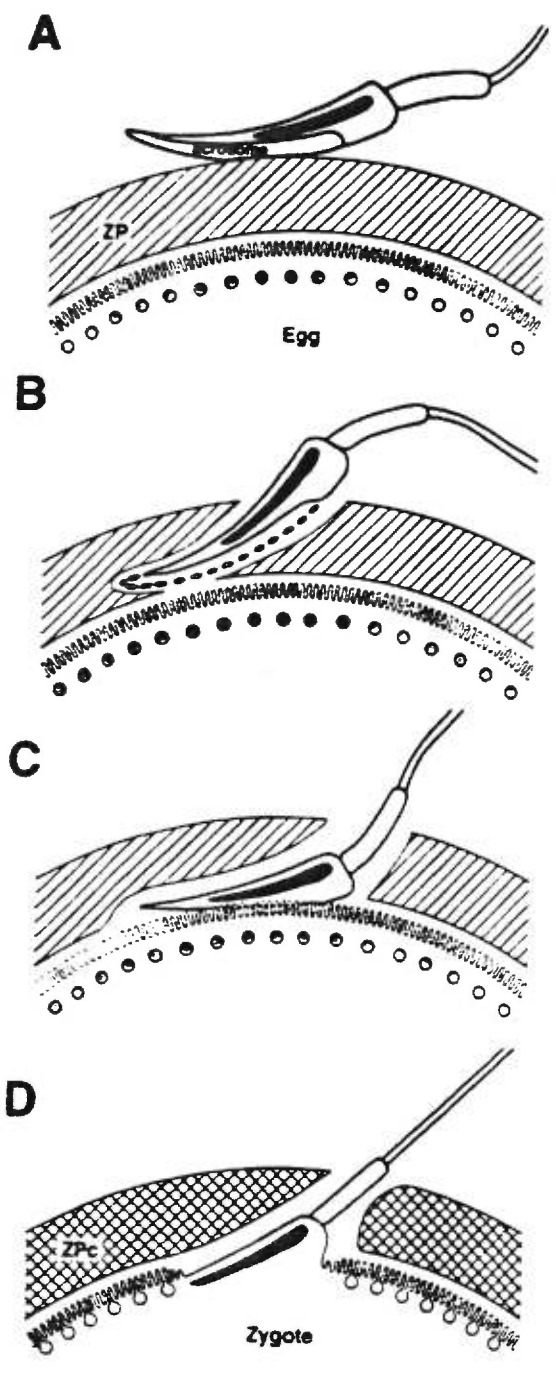
Chez la souris, parmi les trois glycoprotéines majeures de la zone pellucide (ZP1, ZP2 et ZP3), c'est la ZP3 qui est essentielle dans la liaison des spermatozoïdes capités à cette zone (Liu et coll., 1996; Tong et coll., 1995). Des protéines analogues sont présentes dans la zone pellucide des autres espèces de mammifères. Chez certaines espèces, l'analogue de la ZP3 est la glycoprotéine essentielle dans

Figure 1.4 Les étapes de la fécondation se déroulant à la surface de l'ovocyte chez les mammifères.

Les six étapes de l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovocyte chez les mammifères sont représentées ci-contre.

- (A) Liaison du spermatozoïde ayant un acrosome intact à la zone pellucide (ZP) **(étape 1)**.
- (B) L'interaction avec la zone pellucide va signaler au spermatozoïde de procéder à la réaction de l'acrosome **(étape 2)**, ensuite celui-ci va pénétrer la zone pellucide **(étape 3)**.
- (C) Liaison du spermatozoïde à la membrane plasmique ovocytaire **(étape 4)**.
- (D) Fusion du spermatozoïde avec la membrane plasmique ovocytaire **(étape 5)** et activation du développement du zygote **(étape 6)**.

Tiré de Snell et White, 1996



l'adhésion (Snell et White, 1996), tandis que pour d'autres, c'est plutôt l'analogue de la ZP2 qui jouerait un rôle dominant (Töpfer-Petersen et coll., 1993). Cette liaison zone pellucide-spermatozoïdes serait spécifique à chaque espèce (Wassarman et Litscher, 1995). La protéine ZP3 lierait différents types de récepteurs situés à la surface du spermatozoïde capacité (Snell et White, 1996; Yanagimachi, 1994). Certains de ces récepteurs répondent aux stimuli via leur agrégation (Leyton et Saling, 1989a et 1989b), tandis que pour d'autres la réponse aux stimuli s'effectuerait via la stimulation de protéines G (Kopf et Gerton, 1991) et/ou par l'ouverture de canaux calciques (Roldan et Harrison, 1990). Une fois activés, ces récepteurs vont initier une cascade d'événements complexes et mal connus qui conduisent à la réaction de l'acrosome. Parmi ces derniers, il y aurait notamment un influx de Ca^{2+} , une augmentation du pH intracellulaire ainsi que la production de composés fusogènes (Yanagimachi, 1994).

Les spermatozoïdes qui ne sont pas capacités sont incapables de procéder à la réaction de l'acrosome. Le modèle suivant a été proposé pour expliquer la relation entre la capacitation et la réaction de l'acrosome (Saling, 1989). Les spermatozoïdes non-capacités sont caractérisés par une membrane plasmique non-fluide qui ne réagit pas en présence de zone pellucide. Cette stabilité membranaire est due à une grande concentration de cholestérol dans la membrane et à la présence de facteurs décapacitants qui se lient aux récepteurs de la zone pellucide présents sur la membrane et les empêchent de bouger. Une fois capacités, la membrane des spermatozoïdes est devenue plus fluide à cause d'un efflux de cholestérol membranaire et la dissociation des facteurs décapacitants permet maintenant le déplacement des récepteurs dans la membrane. Ainsi, en permettant aux récepteurs de se déplacer dans la membrane, ceux-ci peuvent maintenant amorcer la réaction de l'acrosome lorsqu'ils seront en contact avec la protéine ZP3, car ils peuvent maintenant s'agréger (Leyton et Saling, 1989).

En plus de permettre aux spermatozoïdes de se rendre jusqu'à la membrane plasmique de l'ovocyte, la réaction de l'acrosome permet également l'exposition de nouvelles protéines associées à la surface de la membrane acrosomiale interne qui seront nécessaires dans l'adhésion et dans la fusion du spermatozoïde avec la membrane plasmique de l'oeuf (Myles, 1993, Yanagimachi, 1994). Plusieurs protéines impliquées dans la liaison et la fusion intercellulaire ont été identifiées à la surface des spermatozoïdes (Allen et Green, 1995; Myles, 1993). Selon Snell et White (1996), le meilleur candidat serait une protéine appelée fertiline chez la souris. Plusieurs observations supportent l'hypothèse que cette protéine transmembranaire lierait une protéine, nommée intégrine, qui est située sur la membrane plasmique de l'ovocyte (Almeida et coll., 1995; Bronson et coll., 1995; Evans et coll., 1995). Le mécanisme de fusion entre le spermatozoïde et l'oeuf demeure encore un mystère (Snell et White, 1996).

Les agents utilisés pour induire la réaction de l'acrosome *in vitro* sont la zone pellucide (Florman et First, 1988) ou la lysophosphatidylcholine (lyso-PC) (Parrish et coll., 1988) ou la progestérone (Meizel et Turner, 1991). D'ailleurs, l'induction de la réaction de l'acrosome est utilisée pour évaluer la capacitation des spermatozoïdes *in vitro* (Thérien et coll., 1995 et 1997).

1.4. LE PLASMA SÉMINAL

1.4.1. Composition du plasma séminal

Le plasma séminal est la partie liquide du sperme éjaculé duquel on a enlevé les spermatozoïdes par centrifugation ou par filtration. Ce fluide est constitué en majorité par les sécrétions des glandes sexuelles accessoires. Par exemple chez le bovin, les sécrétions provenant des vésicules séminales et de la prostate constituent respectivement 30 à 60% et 25 à 40% du volume total du plasma séminal (Miller et Ax,

1988). Les sécrétions des ampoules et des glandes bulbo-uréthrales occupent une plus petite proportion du volume du plasma séminal. Normalement chez les mammifères, moins de 1% seulement du volume final du plasma séminal est constitué par les sécrétions provenant des testicules et des épидидymes (Coffey, 1988).

Le volume et la composition du plasma séminal varient entre les espèces (Miller et Ax, 1988). Chez la plupart des mammifères, le plasma séminal contribue pour la majeure partie du volume et du poids sec de l'éjaculat. Il est isotonique et a un pH basique se situant entre 7,2 et 7,8 (il est légèrement acide chez le taureau et le bélier). Il contient de nombreuses substances organiques, souvent à des concentrations supérieures par rapport à celles retrouvées dans les autres liquides physiologiques. Le tableau I illustre les concentrations de diverses composantes retrouvées dans le plasma séminal de différentes espèces. Le plasma séminal humain contient des concentrations élevées de potassium, de zinc, de fructose, de phosphorylcholine, de spermine, d'acide citrique, de prostaglandines, et d'acides aminés libres (Coffey, 1988). On retrouve également dans le plasma séminal des mammifères, de l'ergothioneine (surtout chez le porc et le cheval), de l'inositol, du sorbitol, de l'épinéphrine, de l'hypotaurine, du cholestérol, des phospholipides, de la carnitine et des immunoglobulines (chez l'humain) (Coffey, 1988; Miller et Ax, 1988).

Le plasma séminal contient également de nombreuses protéines dont la plupart seraient des protéines intracellulaires provenant des cellules épithéliales des glandes sexuelles accessoires. Ces glandes sont partiellement apocrines (i.e. le relâchement de matériel sécrétoire via des protubérances de la membrane apicale en absence de granules de sécrétion) (Aumüller et Seitz, 1990; Miller et Ax, 1988). Plusieurs de ces protéines vont être impliquées dans la coagulation et la liquéfaction du sperme (Coffey, 1988). Par exemple chez l'humain, le sperme va coaguler en un gel semi-solide à l'intérieur d'une période de 5 minutes suite à l'éjaculation. Après une certaine période de temps,

TABLEAU I

QUELQUES DÉTAILS SUR LA COMPOSITION DU PLASMA SÉMINAL DE
DIFFÉRENTES ESPÈCES DE MAMMIFÈRES

	TAUREAU	BÉLIER	PORC	ÉTALON	CHIEN	HUMAIN
SPERME						
Volume (ml)	2-10	0.5-2	150-500	20-300	2-15	2-6
Concentration de spermatozoïdes (X 10 ⁶ /ml)	300-2000	2000-5000	25-350	30-800	60-300	50-150
pH	6.48-6.99	5.9-7.3	6.85-7.9	7.2-7.8	6.1-7.0	7.4*
PLASMA SÉMINAL						
Protéines (mg/ml)	55*	50*	30*	10*	24*	35-50
Fructose (mg/ml)	4.6-6.0	2.5*	0.09	0.02*	0.01	2.0-3.0
Sorbitol	0.6-7.5	1.4-6.6	0.4	1.1-3.3	<0.05	0.6
Zinc	-	-	-	-	-	2.1*
Sodium	65-161	77	125-252	112	72-180	43-112
Potassium	13-97	23	17-46	26	8	14-28
Calcium	6-15	1.6-2.3	1.5-4.6	6.5	0.2-1.2	5-7
Magnésium	3.3	2.4	2.5-24	3.7	0.15-1.5	1.2-5
Chlorure	42-110	51	85-105	23-113	152	28-56
Acide citrique	18-52	16-42	2.6-10.4	0.5-2.6	-	5.2-73
Inositol	1.3-2.6	0.6-0.8	28	1.1-2.6	-	3-3.5
Phosphorylcholine	0	0	0	0	0	14-21
Glycérophosphoryl-choline	4-18	58-73	4	1.4-4	6.6	2.0-3.3
Spermine	0.1	-	-	-	-	3
Arginine	0.2	0.53-1.2	0.01	-	0.11	5.2
Acide glutamique	1-8	4.5-5.2	2	-	-	6.5
Prostaglandines (µg/ml)	présent	40	présent	présent	-	100-300
Ergothioneine	trace	trace	0.7	0.2-0.7	-	trace
Carnitine	-	4.5	-	-	-	0.2-1.3
Cholestérol (mg/ml)	-	-	-	-	-	1.03
Phospholipides (mg/ml)	-	-	-	-	-	0.83
Hypotaurine	présent	présent	présent	-	présent	-
IgG (mg/ml)	-	-	-	-	-	0.07-0.22
IgA (mg/ml)	-	-	-	-	-	0.00-0.06

Les données sont en mM, sauf si indiqué autrement.
(* : valeur moyenne) (- : indéterminé)

Tiré de Coffey, 1988; Miller et Ax, 1988; Setchell, 1991 et Setchell et Brooks, 1988.

celui-ci va commencer à se liquéfier et va devenir un liquide plutôt visqueux (Huggins et Neal, 1942; Mann et Lutwak-Mann, 1981; Tauber et Zaneveld, 1976). Notons que le processus de la coagulation et de la liquéfaction du sperme ainsi que la nature des protéines qui en sont responsables varient énormément entre les espèces (Coffey, 1988). C'est pourquoi la fonction biologique exacte de ce processus n'est pas encore résolue. Par contre, certains cas d'infertilité chez l'homme seraient attribués à un problème au niveau de la liquéfaction du sperme (Amelar et Dublin, 1977; Bunge, R.G., 1970).

Plusieurs autres types de protéines auxquelles on attribue diverses fonctions au niveau de la fécondation sont présentes dans le plasma séminal (Miller et Ax, 1988). Quelques unes de celles-ci sont énumérées au tableau II avec leur fonction hypothétique sur la fécondation. Notons que plusieurs d'entre-elles vont interagir directement avec le spermatozoïde. En fait, une plus grande quantité de protéines est ajoutée à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation que lors de la maturation épидидymaire (Russell et coll., 1984).

1.4.2. Rôles probables du plasma séminal dans la fécondation

Plusieurs fonctions importantes au niveau de la fécondation sont attribuées au plasma séminal. Le plasma séminal sert avant tout de véhicule de transport pour les spermatozoïdes épидидymaires (Coffey, 1988; Miller et Ax, 1988; Peitz et Olds-Clarke, 1986). En fait, il est constitué en grande majorité d'eau et il n'y a pas de doute qu'il joue un rôle hydrodynamique afin de s'assurer que le sperme soit efficacement éjaculé dans le tractus génital femelle (Williams-Ashman, 1988).

Le plasma séminal fournit divers produits qui permettent la survie des spermatozoïdes (Coffey, 1988; Miller et Ax, 1988). Par exemple, le fructose et le sorbitol sont des sources d'énergie métabolique pour les spermatozoïdes, l'inositol

TABLEAU II

PROTÉINES DU PLASMA SÉMINAL

Type de protéine	Fonction hypothétique
Fibronectine	• Interactions cellule-cellule et cellule-matrice
Inhibine	• Capacitation
Peptides de type LHRH	• Régulation de la sécrétion de FSH
α -lactalbumine	• ?
Protéine liant le zinc	• Capacitation et liaison spermatozoïde-ovule
Caltrine (séminalplasmine)	• Maintien de la motilité
	• Rôle antibactérien
	• Régulation de l'entrée de calcium (affecte la capacitation et la fécondation).
	• Rôle antibactérien
Antiséminalplasmine	• Inhibiteur de la caltrine (séminalplasmine)
Calmoduline	• Intermédiaire dans les événements impliquant le calcium.
Calcitonine	• ?
Facteur décapacitant	• Prévention d'une capacitation prématurée
Facteur stabilisant de l'acrosome	• Prévention d'une capacitation prématurée
Protéines immunosuppressives	• Diminution du rejet immunologique du spermatozoïde
Inhibiteurs de protéases	• Inhibition de la protéolyse au niveau des tractus reproducteurs mâle et femelle.
	• Prévention de l'activation prématurée des enzymes nécessaires à la pénétration de l'oeuf
Protéines liant l'héparine	• Régulation de la capacitation

serait important pour le maintien de l'isotonicité du sperme et l'ergothioneine servirait d'anti-oxidant afin de maintenir les spermatozoïdes en vie (Miller et Ax, 1988). Le plasma séminal active également la motilité des spermatozoïdes épидидymaires (Miller et Ax, 1988; Wong et Lee, 1983). Une baisse progressive de la motilité des spermatozoïdes est observée *in vitro* et *in vivo* chez les souris et les taureaux ayant subi une ablation des vésicules séminales (Hess et coll., 1960; Peitz et Olds-Clarke, 1986).

Le plasma séminal possède des protéines qui inhibent et/ou stimulent la fécondation. Certaines protéines ont des propriétés décapacitantes et ainsi inhibent la fécondation (Chang, 1984; Dukelow, et coll., 1967; Eng et Oliphant, 1978; Reddy, 1982). Elles préviendraient une réaction précoce de l'acrosome chez le spermatozoïde. Le cholestérol et les phospholipides du plasma séminal produisent des effets similaires (Davis, 1980; Davis et Hungund, 1976). Le plasma séminal contient également des protéines qui stimulent la capacitation (Florman et First, 1988; Lee et coll., 1985; Miller et coll., 1990, Therien et coll., 1995; Therien et coll., 1997). Nous discuterons plus loin d'une famille de protéines stimulatrices se retrouvant dans le fluide séminal bovin et qui ont la particularité de lier les phospholipides et l'héparine.

Il est possible que le plasma séminal joue un rôle au niveau de l'immunosuppression dans le tractus génital femelle (Bouvet et coll., 1987; James and Hargreave, 1984; Metafora et coll., 1989; Fahmi et coll., 1985). En fait, plusieurs protéines inhibant la division mitotique des lymphocytes et l'activation du système complément (Bischoff et coll., 1983; Price et coll., 1984; Tarter et Alexander, 1984), ou détruisant les leucocytes (Matousek et Stanek, 1993) sont présentes dans le plasma séminal. Les prostaglandines pourraient aussi être impliquées dans l'immunosuppression (Bratanov et coll., 1986). Le spermatozoïde est considéré comme un corps étranger chez la femelle. Ainsi le fluide séminal en inhibant la réponse

immunitaire au niveau du tractus génital féminin empêcherait le rejet des spermatozoïdes (Miller et Ax, 1988).

Malgré toutes les fonctions attribuées au plasma séminal, plusieurs personnes doutent de son importance dans la fécondation. Des grossesses chez le bétail ont été obtenues par l'insémination de spermatozoïdes épидидymaires matures (sans qu'ils aient été en contact avec le plasma séminal) (Miller et Ax, 1988). De plus, le rôle des glandes accessoires dans la fécondation demeure obscur puisque que l'ablation de celles-ci produit différents résultats sur la fertilité (i.e. le taux de grossesse), comme une diminution, une infertilité complète ou tout simplement aucun effet (Davies et coll., 1975; Pang et coll., 1979; Peitz et Olds-Clarke, 1986; Queen et coll., 1981). Lors d'un accouplement naturel chez la souris, le taux de fécondation est grandement diminué s'il y a absence de plasma séminal comme diluant et transporteur des spermatozoïdes épидидymaires dans le tractus femelle (Peitz et Olds-Clarke, 1986). De plus, plusieurs études *in vitro* suggèrent que des facteurs présents dans le fluide séminal bovin sont importants pour l'acquisition de la fertilité (Florman et First, 1988; Lee et coll., 1985; Miller et coll., 1990, Therien et coll., 1995, 1997 et 1998). Des études comparatives *in vivo* tendent également à confirmer l'importance du plasma séminal dans la fécondation. Des différences au niveau de la composition protéique du plasma séminal entre des taureaux fertiles et moins fertiles ont été observées (Gerena et coll., 1998; Killian et coll., 1993) et la liaison à la surface des spermatozoïdes de protéines ayant une affinité pour l'héparine, lors de l'éjaculation, correspond à une augmentation de la fertilité chez le bovin (Bellin et coll., 1994, 1996 et 1998).

1.5. LES PROTÉINES BSP

1.5.1. Historique

Dès le milieu des années 80, Manjunath (1984) de même que Manjunath et Sairam (1987), à la recherche de nouvelles protéines ayant une fonction semblable au facteur libérant l'hormone lutéinisante (LHRH), ont purifié trois protéines acides (nommées : BSP-A1, BSP-A2 et BSP-A3) à partir du plasma sérial bovin. Ces protéines appartiennent à une même famille (la famille des protéines BSP "Bovine seminal plasma proteins"). Ces dernières, lorsqu'elles étaient ajoutées au milieu de culture de cellules hypophysaires de rat, et ce même à des concentrations plus faibles que 20 µg/ml, stimulaient le relâchement des gonadotrophines (hormone lutéinisante, LH et de l'hormone folliculo-stimulante, FSH) (Manjunath, 1984). Toutefois, lorsque ces protéines BSP étaient incubées simultanément avec du LHRH, une sécrétion bimodale des deux gonadotrophines se produisaient, i.e. une inhibition de leur sécrétion en présence d'une concentration allant jusqu'à 50 µg/ml de protéines BSP et une stimulation de leur sécrétion en présence d'une concentration plus élevée (> 50 µg/ml) (Esch. et coll., 1983b; Manjunath, 1984). De plus, lorsqu'il y avait ajout de sérum bovin ou équin (7%) dans le milieu de culture, seule une concentration de protéines BSP supérieure à 200 µg/ml permettait la reprise de la sécrétion de LH et de FSH. Ainsi, les protéines BSP ont déjà été désignées comme étant les protéines qui stimulaient et inhibaient la sécrétion des gonadotrophines (Manjunath, 1984). Par contre, ces effets obtenus *in vitro* n'ont aucune signification physiologique puisqu'ils sont observés seulement avec des concentrations relativement élevées de protéines (de l'ordre du micromolaire) (Esch et coll., 1983a; Seidah et coll., 1987; Manjunath et coll., 1988).

La détermination de la composition en acides aminés des trois protéines BSP (Manjunath et Sairam, 1987) a permis de conclure que celles-ci étaient identiques aux gonadostatines isolées de la même source par Esch et coll. (1983a). Les protéines BSP-A1, BSP-A2 et BSP-A3 correspondent respectivement aux gonadostatines BSP-III, BSP-II et BSP-I. Ces gonadostatines ont déjà été considérées comme étant des inhibines puisqu'elles montraient un effet antagoniste versus le LHRH (Ward et coll., 1983). Des études ont par la suite clairement démontré que les inhibines ovariennes possèdent une structure totalement différente de celle des protéines BSP (Masson et coll., 1985 et 1986).

L'étude de la composition en acides aminés des protéines BSP-A1 et BSP-A2 a démontré que les deux protéines étaient en réalité une seule et même entité biochimique (Esch et coll., 1983a; Manjunath et Sairam, 1987). Esch et coll. (1983a) ont nommé cette protéine PDC-109 et ont établi sa séquence primaire (PDC-109: P pour protéine, D pour l'acide aspartique à l'extrémité amino-terminale, C pour la cystéine à l'extrémité carboxy-terminale et 109 pour le nombre d'acides aminés). Ces auteurs expliquaient alors que les deux formes de cette protéine provenaient de différences au niveau de l'oxydation des résidus méthionines lors de la purification. Plus tard, Manjunath et Sairam (1987) ont démontré que les deux différentes formes de cette protéine provenaient plutôt de différences au niveau de la glycosylation, BSP-A1 ayant un degré de glycosylation plus élevé que BSP-A2. Ils ont nommé cette protéine BSP-A1/A2.

En utilisant une nouvelle méthode de purification des protéines BSP, Manjunath et coll. (1987) ont isolé une quatrième protéine (nommée BSP-30k) faisant parti de la famille des protéines BSP. Elle possède plusieurs propriétés biochimiques apparentées aux trois protéines BSP purifiées auparavant (Manjunath et coll., 1988). La protéine BSP-A1/A2 (PDC-109) est la protéine majeure du plasma séminal bovin et

est synthétisée dans les vésicules séminales (Kempe et coll., 1986; Manjunath et coll., 1987; 1988) ainsi que dans l'ampoule (Aumüller et coll. 1988; Scheit et coll., 1988). Les protéines BSP-A3 et BSP-30k sont également synthétisées dans les vésicules séminales (Manjunath et coll., 1987; 1988). La synthèse semble être androgéno-dépendante puisque la protéine majeure n'est pas détectée dans les vésicules séminales du veau (Aumüller et coll., 1988; Scheit et coll., 1988). Les protéines BSP constituent à elles seules approximativement 60% du total protéique du plasma séminal bovin (Manjunath et coll., 1987).

1.5.2. Caractéristiques biochimiques

1.5.2.1. Masse moléculaire

L'électrophorèse en condition dénaturante et réductrice (SDS-PAGE) des protéines BSP montre leur migration à des positions bien distinctes. Elles ont les poids moléculaires suivant: BSP-A1, 16 500 Da; BSP-A2, 16 000 Da; BSP-A3, 15 000 Da; tandis que BSP-30K a un poids moléculaire de 28 000 Da (Manjunath et coll., 1988; Manjunath et Sairam, 1987; Desnoyers et coll., 1994). Dans le plasma seminal bovin, la protéine BSP-A3 se retrouverait seulement sous forme monomérique (Manjunath et Sairam, 1987). Cependant, BSP-A1/A2 s'associerait avec d'autres molécules de BSP-A1/A2 afin de former différents agrégats de poids moléculaires variant entre 60 000 et 120 000 Da (Manjunath et Sairam, 1987). Notons qu'à pH acide ou en présence d'urée 8M, les molécules se dissocient. Selon Calvete et coll. (1996b; 1996c), PDC-109 existerait dans le plasma séminal sous forme d'homodimère et d'homo-oligomère de 60-120 kDa. PDC-109 existerait également sous forme de multimères en s'associant avec la protéine BSP-30K. BSP-30K s'associerait avec PDC-109 d'une façon stoechiométrique afin de former un complexe de haut poids moléculaire (Calvete et coll., 1996c).

1.5.2.2. Composition en sucres

À l'exception de BSP-A3, toutes les protéines BSP sont des glycoprotéines (Manjunath et coll., 1988). BSP-A1/A2 existe majoritairement sous une forme glycosylée. Seule une faible proportion de protéines BSP-A1/A2 est non-glycosylée (Calvete et coll., 1994). BSP-A1/A2 possède un seul trisaccharide qui est liée via un lien O-glycosylé à la thréonine 11. Ce trisaccharide est composé d'une molécule d'acide sialique, de galactose et de *N*-acétylgalactosamine (Calvete et coll., 1994). Il a un poids moléculaire d'environ 650 Da, ce qui explique par le fait même la différence de poids moléculaire observée sur SDS-PAGE entre la forme glycosylée et la forme non-glycosylée de BSP-A1/A2. La structure du trisaccharide de BSP-A1/A2 est la suivante: acide sialique $\alpha(2-3)$ -galactose $\beta(1-3)$ -*N*-acétyl-galactosamine (Gerwig et coll., 1996).

La protéine BSP-30K est la plus glycosylée (Manjunath et coll., 1988; Desnoyers et coll., 1994). L'analyse des sucres démontre que BSP-30K contient 11 ± 1 moles de galactosamine, 9 ± 1 moles de galactose et 11 ± 1 moles d'acide sialique par mole de protéine (Calvete et coll., 1996a). Elle possède six acides aminés non-identifiés aux positions 11, 21, 32, 33, 34 et 39 (probablement des thréonines) et l'absence de glucosamine laisse croire que ces résidues non-identifiés seraient O-glycosylées. Des poids moléculaires de BSP-30K variant entre 25 800 et 26 400 Da ont été calculés par spectrométrie de masse (Calvete et coll., 1996a), indiquant que BSP-30K existe probablement sous un mélange de différentes glycoformes. Ceci avait également été noté par Manjunath (1988). Ce dernier mentionne que différents lots de mêmes protéines BSP montrent régulièrement un contenu variable en sucres. Entre 7200 et 7800 Da du poids moléculaire total de BSP-30K proviendraient des sucres (Calvete et coll., 1996a).

1.5.2.3. Charge des BSP

Les protéines BSP sont acides et démontrent de l'hétérogénéité au niveau de leur charge (Desnoyers et coll., 1994). Le point isoélectrique (pI) de BSP-A1 s'étend de 4,7-5,0; BSP-A2 de 4,9-5,2; BSP-A3 de 4,8-5,2 et BSP-30K de 3,9-4,6. L'acidité plus élevée de BSP-A1 par rapport à celle de BSP-A2 serait causée par la présence d'acide sialique. Cependant, la présence d'acide sialique ne serait pas la cause de l'hétérogénéité de charge de BSP-A1 et A2 puisqu'un traitement des protéines à la neuraminidase n'altère ni le poids moléculaire, ni le point isoélectrique et ni le nombre d'isoformes de ces protéines. De plus cette hétérogénéité de charge des protéines BSP-A1, A2 et A3 ne serait également pas causée par la présence de sulfates ou de phosphates puisqu'aucun changement n'est observé dans les profils de migration de ces protéines suite à un traitement à l'arylsulfatase ou à la phosphatase acide. Par contre, Desnoyers et coll. (1994) n'écartent pas complètement la présence d'acide sialique (seulement dans le cas de BSP-A1/A2), de sulfates et de phosphates, car il se peut que dans les conditions de réaction utilisées, les enzymes n'avaient pas accès à leur substrat.

BSP-30K est la protéine la plus acide de la famille et ceci est due à son haut contenu en acide sialique. De plus, les acides sialiques seraient une des causes de l'hétérogénéité de charge de cette protéine. Lorsque la protéine est traitée à la neuraminidase, le nombre d'isoformes diminue, son poids moléculaire passe de 28 kDa à 25 kDa et son point isoélectrique augmente de pH 3,9-4,6 à 4,8-5,0. Un traitement de BSP-30K à l'arylsulfatase ou à la phosphatase acide n'affecte pas son nombre d'isoformes (Desnoyers et coll., 1994).

1.5.3. Structure

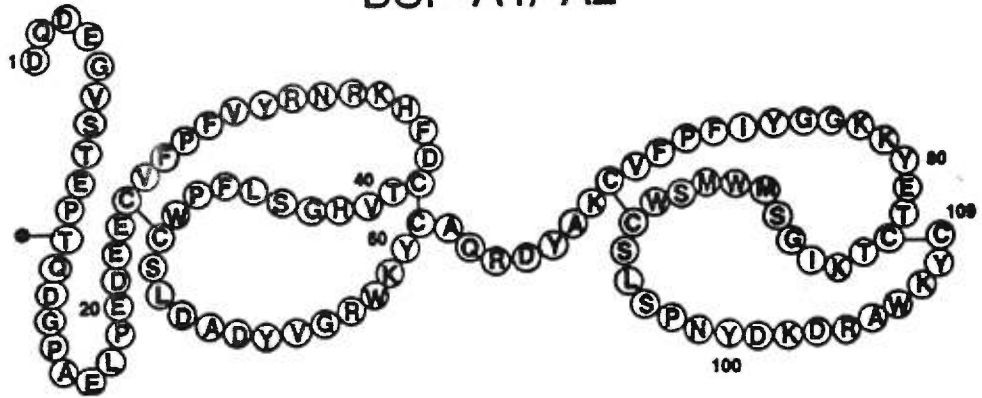
La figure 1.5 présente la structure secondaire des protéines BSP. La structure primaire de PDC-109 qui est identique à celle de BSP-A1/A2 a été déterminée par Esch et coll. (1983a). La chaîne polypeptidique contient 109 acides aminés et a un poids moléculaire de 12 744 Da (Manjunath et coll., 1988). BSP-A3 possède une séquence primaire de 115 acides aminés et démontre 66% de similarité avec BSP-A1/A2 (Seidah et coll., 1987). Le poids moléculaire de sa chaîne polypeptidique est estimé à 13 403 Da (Manjunath et coll., 1988). BSP-30K est constituée de 158 acides aminés et démontre une forte similarité avec les autres protéines BSP, mais elle se distingue par sa région N-terminale allongée (Calvete et coll., 1996a). Le poids moléculaire calculé à partir des acides aminés est de 18 612 Da (en assumant que les six résidus non-identifiés sont des thréonines) (Calvete et coll., 1996a). Chaque protéine BSP comprend 4 ponts disulfures formant deux domaines de type II disposés en tandem, analogues à ceux retrouvés dans la fibronectine (Constantine et coll., 1992; Banyai et coll., 1990) et une région N-terminale qui varie entre chaque protéine.

La structure tridimensionnelle du domaine b (acides aminés 65-109) de PDC-109 a été analysée par résonance magnétique nucléaire des protons (^1H) sur deux dimensions (Constantine et coll., 1991). L'analyse des structures secondaires a révélé que le domaine b contient deux feuillets β antiparallèles qui sont perpendiculaires l'un par rapport à l'autre. De plus, le domaine b adopte une conformation globulaire constituée majoritairement de tours ainsi que de boucles irrégulières (ces régions seraient hautement mobiles) dessinant à la surface de la protéine une dépression peu profonde et à caractère hydrophobe qui se retrouve essentiellement sur un seul côté de la molécule. Cette dépression serait responsable de l'agrégation de PDC-109 en solution aqueuse. De plus, elle constitue un site de liaison au collagène et plus particulièrement les

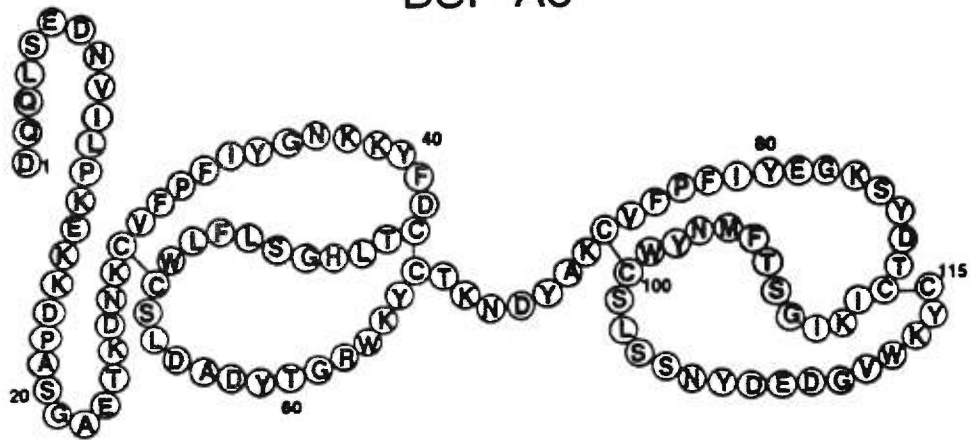
FIGURE 1.5 Représentation schématique de la structure secondaire des protéines BSP

La structure secondaire des protéines BSP est représentée ci-contre. Chaque protéine BSP comprend 4 ponts disulfures formant deux domaines similaires disposés en tandem, analogues aux domaines de type II retrouvés dans la fibronectine. La région N-terminale est variable entre chaque protéine. BSP-30K se distingue des autres protéines BSP par sa longue queue N-terminale unique. Les sites de glycosylation sont indiqués par des ovals.

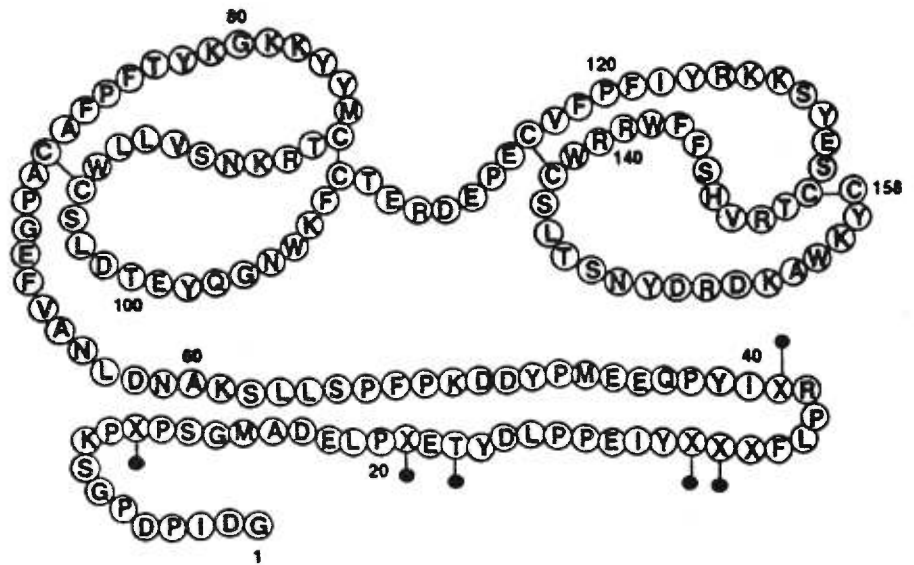
BSP-A1/-A2



BSP-A3



BSP-30-kDa



résidues Tyr75, Trp93, Tyr100, Asp101 et Trp106 interagiraient directement avec le ligand (le collagène) (Constantine et coll., 1992).

1.5.4. Similarité de structure avec d'autres protéines

Les structures de type II sont retrouvées dans une variété de types de protéines dont la plupart ont une fonction inconnue (Moreau et coll., 1998b). On retrouve au moins une structure de type II dans les protéines suivantes: la fibronectine (Baker, 1985; Banyai et coll., 1990), le récepteur au mannose-6-phosphate cation indépendant / IGF-II ("insulin like growth factor II") (Lobel et coll., 1987; Morgan et coll., 1987; MacDonald et coll., 1988; Roth, 1988), les gélatinases de type A et B (Banyai et coll., 1996), le facteur XII du plasma humain (McMullen et Fujikawa, 1985), le récepteur de la phospholipase A₂ (PLA₂) (Ishizaki et coll., 1994), le récepteur du mannose (Taylor et coll., 1990), l'activateur du facteur de croissance hépatocytaire (Miyazawa et coll., 1993) et le récepteur des cellules dendritiques (Jiang et coll., 1995). De ces protéines, seule la fonction des structures de type II qui est de lier le collagène chez la fibronectine et les gélatinases est connu (Baker, 1985; Banyai et coll., 1996). Par contre, les domaines de type II ont une certaine similarité avec les structures "Kringle" retrouvées dans plusieurs protéases impliquées dans la cascade de réaction de la coagulation (Patthy et coll., 1984; Holland, 1987; Banyai et coll., 1990) ainsi que dans l'apolipoprotéine a (McLean et coll., 1987). Il est maintenant bien établi que les structures kringle des protéases correspondent à des unités structurales/fonctionnelles qui agissent comme médiateurs des interactions protéine-protéine régulant ainsi l'activité de ces protéines (Trexler et Patthy, 1983; Cleary et coll., 1989).

1.5.5. Biologie moléculaire

La traduction des ARN messagers (ARNm) isolés à partir des vésicules séminales à l'aide d'un système acellulaire (*in vitro*) a conduit à la formation d'une

protéine majeure ayant un poids moléculaire de 18 000 Da sur SDS-PAGE (Kemme et coll., 1986). Cette protéine majeure s'est avérée être le précurseur de PDC-109, confirmant par le fait même que cette protéine est synthétisée par les vésicules séminales.

L'ADN complémentaire (ADNc) de PDC-109 a été cloné (Kemme et Scheit, 1988a et 1988b). La figure 1.6 présente la séquence nucléotidique de l'ADNc codant pour BSP-A1/A2. Elle possède un cadre de lecture ouvert («open reading frame») de 400 pb débutant avec une méthionine. D'ailleurs cette méthionine initiatrice survient dans la séquence CTACCATGG, qui est similaire à la séquence consensus CCA(G)CCATGG contrôlant l'efficacité de la traduction des ARNm chez les mammifères (Kozak, 1984a; Kozak, 1984b; Lütcke et coll., 1987). L'ARNm possède une queue poly(A) précédée du signal de polyadénylation AATAAA 13 nucléotides en amont (Proudfoot et Brownlee, 1976). L'ARNm de PDC-109 code pour un précurseur polypeptidique ayant 134 acides aminés (25 acides aminés supplémentaires à son extrémité amino-terminale). La chaîne polypeptidique de ce précurseur a un poids moléculaire de 15 480 Da (Scheit, 1990). Cette séquence de 25 acides aminés a un caractère hydrophobe et constituerait un peptide signal qui dirigerait la protéine vers le milieu extracellulaire (Austen, 1979). Une analyse par Northern blot des ARNm de vésicules séminales a permis de déterminer la longueur de l'ARNm codant pour BSP-A1/A2 qui est de 750 pb (Kemme et Scheit, 1988b). Seidah et coll. (1987) avaient spéculé que les protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3 pourraient provenir d'un précurseur polypeptidique commun ou qu'elles seraient des produits de la traduction de deux ARNm différents. Le clonage de l'ADNc de BSP-A1/A2 a permis de déterminer que l'ARNm code pour une seule protéine prouvant ainsi que les protéines BSP originent d'ARNm différents (Kemme et Scheit, 1988b). Cependant, Seidah et coll. (1987) indiquent que les protéines BSP-A3 et BSP-A1/A2 pourraient provenir de la

FIGURE 1.6 Séquence nucléotidique de l'ADNc codant pour le précurseur de la protéine BSP-A1/A2

La figure ci-contre représente la séquence nucléotidique codant pour le précurseur de la protéine BSP-A1/A2 ainsi que sa séquence en acides aminés déduite à partir de celle-ci. Les nombres à droite représentent la séquence en nucléotides. La séquence en acides aminés de la protéine mature débute au chiffre +1. L'ARNm de PDC-109 code pour un précurseur polypeptidique ayant 134 acides aminés. Les 25 acides aminés supplémentaires à son extrémité amino-terminale, vu leur caractère hydrophobe, servent probablement de peptide signal. Les séquences consensus pour le site d'initiation et le signal de polyadénylation sont soulignées.

Tiré de Scheit, 1990.

GAGAGCAAGCTACCATGGCACTGCAGTTGGGGCTCTTTCTCATTGGGGCTGGCGTGTCTG 60
 M A L Q L G L F L I W A G V S V
 -25 -20 -10
 TGTTTCTACAACCTGGACCCTGTGAATGGAGATCAGGACGAAGGTGTTTCTACTGAACCTA 120
 F L Q L D P V N G D Q D E G V S T E P T
 -1 +1 10
 CCCAAGACGGTCCTGCTGAATTACCTGAAGACGAAGAATGCGTTTTCCCATTCGTCTATA 180
 Q D G P A E L P E D E E C V F P F V Y R
 20 30
 GAAACAGAAAGCATTGACTGCACAGTGCATGGTTCCTTATTCCCGTGGTGTCCCTCG 240
 N R K H F D C T V H G S L F P W C S L D
 40 50
 ATGCAGACTATGTAGGAAGATGGAAATACTGTGCTCAGAGAGACTATGCTAAATGTGTCT 300
 A D Y V G R W K Y C A Q R D Y A K C V F
 60 70
 TCCCCTTTATCTATGGAGGCAAGAAATATGAGACTTGACAAAAAATTGGGAGTATGTGGA 360
 P F I Y G G K K Y E T C T K I G S M W M
 80 90
 TGTCTTGGTGCTCACTCTCTCCAAACTACGACAAGGACAGAGCTTGAAGTATTGCTAGC 420
 S W C S L S P N Y D K D R A W K Y C *
 100
 CATAAAAAGAGCTATGTTTCAGTCACTGTCCAGTGCATCCACCCTTGGCCATGGATGCAAT 480
 CCAGCCTTTGAAACCTCAGTGAAGAAAATCAAGAACTCTCAAGCATGAAGATGATGCTCT 540
 GAAAGCCAGAGGTGAAATCCTTTCCCTACATCTCCACCATGTTCCCCCTATGCGTGGATC 600
 CAATCAATAAACCACTTTCTCAGCAAAAAAAAAAAAA 636

duplication d'un gène ancestral commun car les deux protéines démontrent un haut degré de similarité.

De plus, l'ADN génomique d'un seul taureau a été analysé par Southern blot suite à une digestion par plusieurs enzymes de restriction. Ceci a permis de détecter la présence d'une seule copie du gène codant pour BSP-A1/A2 par génome haploïde (Scheit, 1990; Kemme et Scheit, 1988a; Kemme et Scheit, 1988b). Le gène codant pour BSP-A1/A2 mesure 6,1 kb et comprend 5 exons séparés relativement par 4 petits introns (Bräuer et Scheit, 1991). Aucune séquence consensus, activatrice de la transcription, et élément de réponse aux hormones stéroïdiennes ou aux oestrogènes n'a été détecté par analyse de séquence (Beato, 1989; Evans, 1988) dans la région (623 pb) située en amont du site d'initiation de la transcription. Cependant, on note deux aspects intéressants quant à l'organisation du gène de BSP-A1/A2. Premièrement, l'exon 1 code complètement pour le peptide signal du précurseur de BSP-A1/A2. Deuxièmement, l'exon 4 code entièrement pour un domaine de type II retrouvé notamment dans la fibronectine et qui serait important pour les interactions protéine-protéine (Banyai et coll., 1990). L'organisation de ce gène supporte l'hypothèse que les exons pourraient être des motifs de construction des protéines au niveau fonctionnel (Pathy, 1991; Dorit et coll., 1990).

1.5.6. Immunologie et distribution

Les protéines BSP-A1/A2, A3 et 30K purifiées avaient été injectées séparément à des lapins afin d'obtenir des anticorps polyclonaux anti-BSP spécifiques. La spécificité de ces anticorps avait été démontrée à l'aide d'analyses par immunodiffusion radiale double (DRIA) (Manjunath et Sairam, 1987), par des essais radioimmunologiques (RIA) (Manjunath et coll., 1988) et ainsi que par des immunodétections (Chandonnet et coll., 1990). En fait, aucune réaction croisée avec les autres protéines BSP n'est observée avec chaque anticorps.

La concentration des protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3 a été mesurée dans le plasma séminal ainsi que dans différents liquides physiologiques et extraits tissulaires de plusieurs espèces par des RIA, en utilisant les anticorps hautement spécifiques (Manjunath et coll., 1988). Les résultats sont présentés au tableau III. La concentration de BSP-A1/A2 dans le plasma séminal bovin est de 28-36 mg/ml et de 6-8 mg/ml pour BSP-A3. Notons que la concentration de BSP-30K dans le plasma séminal bovin est d'environ 9-11 mg/ml (donnée non-publiée). Les protéines BSP-A1/A2 et A3 sont présentes en très faibles concentrations dans d'autres fluides physiologiques (notamment dans le sérum) et extraits tissulaires de plusieurs espèces (boeuf, humain, porc, cheval, mouton, rat et singe). Ces résultats indiquent que les protéines BSP (ou leurs analogues) seraient ubiquitaires chez les mammifères (Manjunath et coll., 1988). Aucune donnée n'existe dans les autres fluides bovins et chez les autres espèces pour BSP-30K.

1.5.7. Présence de protéines analogues chez d'autres espèces

Des protéines liant la phosphorylcholine (voir section 1.5.8.2.) et ayant des propriétés antigéniques communes avec BSP-A1/A2, BSP-A3 et BSP-30kDa ont été détectées dans le plasma séminal de d'autres espèces (l'humain, le porc, le hamster, la souris et le rat) (Leblond et coll., 1993). Récemment, à partir du plasma séminal du cheval, deux protéines désignées HSP-1 et HSP-2 (Calvete et coll., 1995), et à partir du plasma séminal du porc, une protéine nommée pB1 (Sanz et coll., 1993; Calvete et coll., 1997), ont été isolées. Elles ont en commun plusieurs caractéristiques structurales (dont les deux domaines de type II) et propriétés de liaison (héparine, phosphorylcholine, gélatine) (voir section 1.5.8.2.) avec les protéines BSP bovines (Calvete et coll., 1997). De plus, ces protéines analogues lieraient la surface du spermatozoïde lors de l'éjaculation et pourraient ainsi jouer un rôle au niveau de la capacitation (voir sections 1.5.8.3. et 1.5.8.4.) (Calvete et coll., 1995; Calvete et coll.,

TABLEAU III

CONCENTRATION DES PROTÉINES BSP-A1/A2 ET BSP-A3 DANS DES
EXTRAITS TISSULAIRES ET LIQUIDES PHYSIOLOGIQUES DE DIFFÉRENTS
MAMMIFÈRES

Source	/mL ou /g de tissu humide	
	BSP-A1/A2	BSP-A3
BOVIN		
sécrétions des vésicules séminales	16-24 mg	3,55-5,55 mg
plasma séminal (normal)	28-36 mg	6,20-8,20 mg
plasma séminal (vasectomisé)	26-32 mg	3,50-4,70 mg
sérum	0,06-2,82 µg	0,03-1,80 µg
liquide folliculaire	0,04-0,80 µg	0,04-0,43 µg
testicules	0,03-0,80 µg	0,03-0,30 µg
HUMAIN		
sérum	0,05-0,10 µg	0,02-0,06 µg
plasma	0,05-0,12 µg	0,03-0,06 µg
plasma séminal	1,00-4,00 µg	0,20-0,80 µg
liquide folliculaire	0,05-0,11 µg	0,03-0,21 µg
RAT		
sérum	0,02-0,14 µg	0,02-0,08 µg
vésicules séminales	0,10-0,51 µg	0,06-0,31 µg
testicules	0,02-0,11 µg	0,02-0,08 µg
PORC		
sérum	0,02-0,17 µg	0,02-0,06 µg
liquide folliculaire	0,05-0,13 µg	0,02-0,07 µg
Sérum de cheval	0,12-0,60 µg	0,10-0,42 µg
Sérum de mouton	0,02-0,06 µg	0,03-0,06 µg
Sérum de singe	0,04-0,22 µg	0,02-0,21 µg

Tiré de Manjunath et coll., 1988.

1996b). Ces protéines analogues appartiennent à la même famille de protéines que les protéines BSP bovines (Calvete et coll., 1997).

1.5.8. Rôles physiologiques

1.5.8.1. Introduction

Tel que mentionné à la section 1.5.1., la quantité de protéines BSP nécessaire pour contrôler la sécrétion *in vitro* des gonadotrophines de cellules hypophysaires est trop élevée pour que cet effet soit considéré comme physiologique (Esch et coll., 1983a; Seidah et coll., 1987). De plus, des expériences similaires effectuées *in vivo* chez le rat n'ont conduit à aucun effet (Manjunath et coll., 1988). Ainsi, le rôle physiologique de ces trois protéines du plasma séminal restait à être déterminé.

1.5.8.2. Propriétés de liaison

Les protéines BSP exhibent plusieurs propriétés de liaison, ce qui suggère que les BSP seraient des protéines multifonctionnelles. L'affinité des protéines BSP pour différents ligands pourrait être due à la grande flexibilité au niveau de la structure tertiaire. Ceci a été démontré notamment au niveau du second domaine de type II (Constantine et coll., 1991 et 1992; Moreau et coll., 1998b). Ces protéines interagissent particulièrement avec la gélatine (Manjunath et coll., 1987), le fibrinogène, différents types de collagène (types I, II, IV et V) (Manjunath et coll., 1988), l'IGF-II (Desnoyers et Manjunath, 1994), la phospholipase A₂ du plasma séminal bovin (spPLA₂) (Soubeyrand et Manjunath, 1997), l'héparine (Chandonnet et coll., 1990), l'apolipoprotéine A-I (apoA-I) et l'apoA-I associée aux lipoprotéines de haute densité (HDL) (Manjunath et coll., 1989), ainsi que les phospholipides ayant un groupement choline (Desnoyers et Manjunath, 1992). Lors de l'éjaculation, une faible proportion des protéines BSP se lie à la surface des spermatozoïdes (Manjunath et

coll., 1994), à raison d'une dizaine de millions de molécules par cellule (Calvete et coll., 1994). La liaison des protéines BSP à la surface des spermatozoïdes s'effectue via les phospholipides (Desnoyers et Manjunath, 1992). Des expériences d'immunofluorescence ont démontré que chaque protéine BSP est présente sur toute la surface du spermatozoïde, mais elles sont plus abondantes au niveau de la tête des spermatozoïdes (Manjunath et coll., 1994).

1.5.8.3. Liaison à l'héparine

Les protéines BSP ont la propriété de lier l'héparine (Chandonnet et coll., 1990). Des glycosaminoglycans similaires sont présents dans le fluide oviductale (Lenz et coll., 1982). Ces glycosaminoglycans seraient majoritairement responsables du pouvoir capacitant du fluide oviductal (Parrish et coll., 1989). Des travaux ont démontré que les protéines BSP stimulaient la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires induite par l'héparine (Thérien et coll., 1995; Miller et coll., 1990). Le mécanisme de capacitation des spermatozoïdes par les protéines BSP en présence d'héparine n'est pas entièrement connu. Thérien et coll. (1995) ont proposé que les protéines BSP, en se liant à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation, potentialiseraient la capacitation de ceux-ci en augmentant le nombre de sites de liaison à l'héparine. Ainsi, le facteur capacitant (l'héparine) pourrait accomplir son rôle plus efficacement.

1.5.8.4. Liaison aux HDL

Comme il a été mentionné à la section 1.5.1., l'effet des protéines BSP sur la sécrétion de gonadotrophines par les cellules hypophysaires de rat était abolie lorsqu'il y avait ajout de sérum bovin ou équin dans le milieu de culture. En fait, Manjunath et coll. (1989) ont purifié des sérums bovin et humain, une protéine de 26-28 kDa liant les protéines BSP. Cette protéine a été identifiée comme étant l'apolipoprotéine A-I

(apoA-I), la principale composante protéique des HDL. Il a également été démontré que les protéines BSP lient l'apoA-I associée aux HDL.

Les HDL sont impliqués dans le transport inverse du cholestérol, c'est-à-dire le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie (principal organe impliqué dans la dégradation du cholestérol) (Fielding et Fielding, 1995; Pieters et coll., 1994). Les HDL est la seule classe de lipoprotéines présente dans le fluide oviductal chez le bovin (Brantmeier et coll., 1987; Ehrenwald et coll., 1990; Jaspard et coll., 1996). Des travaux ont suggéré que les HDL présents dans le tractus génital femelle facilitent l'efflux de cholestérol des spermatozoïdes, une des étapes de la capacitation (Ehrenwald et coll., 1990; Langlais et coll., 1988). Thérien et coll. (1997) ont démontré que les protéines BSP accélèrent le processus de capacitation des spermatozoïdes épидидymaires en présence de HDL. Des résultats récents suggèrent que le mécanisme par lequel les protéines BSP et les HDL stimulent la capacitation implique un efflux de cholestérol au niveau de la membrane du spermatozoïde (Thérien et coll., 1998).

Les protéines BSP seules ne stimulent pas la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires. Elles nécessitent d'autres facteurs présents dans le liquide oviductale (héparine et/ou HDL) pour produire un effet. Ainsi, les spermatozoïdes demeurent non-capacités jusqu'à ce qu'ils se retrouvent dans les oviductes où ils rencontrent les HDL et/ou l'héparine et terminent leur capacitation (Thérien et coll., 1997). Récemment, Lane et coll. (1998) ont prouvé que l'héparine et les HDL en présence des protéines BSP capacitaient les spermatozoïdes bovins par des mécanismes différents.

1.5.8.5. Liaison à la spPLA₂

Compte tenue de la grande abondance des protéines BSP dans le plasma séminal et de leurs propriétés de liaison non seulement avec les phospholipides cholines

(Desnoyers et Manjunath, 1992) mais en plus avec plusieurs autres protéines (Manjunath et coll., 1988; Desnoyers et Manjunath, 1994; Soubeyrand et Manjunath, 1997), on peut supposer que ces protéines BSP ne seraient pas seulement des facteurs de capacitation dépendants des HDL et de l'héparine. Leurs rôles au niveau de la reproduction seraient plus larges.

Récemment, Soubeyrand et coll. (1997) ont isolé une nouvelle phospholipase A₂ à partir du plasma séminal bovin (spPLA₂). Les PLA₂ forment un groupe très varié d'enzymes ubiquitaires et ont toutes la propriété d'hydrolyser la position *sn*-2 des phospholipides (Scott et Sigler, 1994; Dennis, 1994). La PLA₂ et ses produits d'hydrolyse (les lysophospholipides et les acides gras) jouent probablement un rôle dans les événements de maturation des spermatozoïdes qui se déroulent juste avant la fécondation (Llanos et coll., 1982; Singleton et Killian, 1983; Yanagimachi et Suzuki, 1985; Fry et coll., 1992; Roldan et Fragio, 1993).

Soubeyrand et Manjunath (1997) ont démontré que les protéines BSP inhibaient l'activité de la spPLA₂. L'inhibition de l'enzyme est produite via une liaison directe entre les protéines BSP et la spPLA₂ et par la séquestration de son substrat, la phosphatidylcholine (PC) par ces mêmes protéines. Le modèle suivant avait été suggéré pour expliquer l'effet au niveau de la reproduction de l'inhibition de la spPLA₂ par les protéines BSP (Soubeyrand et Manjunath, 1997). Les protéines BSP joueraient un rôle dans le métabolisme lipidique des spermatozoïdes en empêchant l'hydrolyse précoce des phospholipides de la membrane par la spPLA₂. Lors de l'éjaculation, la majorité des spPLA₂ serait liée par les protéines BSP. La faible quantité de spPLA₂ qui réussirait tout de même à se lier à la surface des spermatozoïdes serait inhibée par les protéines BSP liées aux spermatozoïdes. Au fur et à mesure que les spermatozoïdes voyagent dans le tractus génital femelle, les protéines BSP quitteraient la surface cellulaire à cause de leur affinité préférentielle pour les lipoprotéines du fluide oviductal

(Manjunath et coll., 1989). Ainsi, la spPLA₂ commencerait à couper les phospholipides de la membrane des spermatozoïdes ce qui génèrerait des acides gras et des lysophospholipides qui vont ultimement déstabiliser les membranes des spermatozoïdes et engendrer la réaction de l'acrosome. Toutefois, ce mécanisme semble très peu probable puisque les dernières études de Soubeyrand et coll., (données non-publiées) n'ont pu prouver une quelconque association de la spPLA₂ à la surface des spermatozoïdes. Ainsi, la fonction des protéines BSP au niveau de l'inhibition de la spPLA₂ demeure inconnue.

1.5.8.6. Liaison au facteur de croissance de type II ressemblant à l'insuline (IGF-II)

Le facteur de croissance de type II ressemblant à l'insuline (IGF-II) est un polypeptide ayant des similarités de structures avec l'insuline et le facteur de croissance de type I (Rinderknecht et Humbel, 1978a et 1978b). Cependant, contrairement à ces deux autres peptides, le rôle physiologique de l'IGF-II est inconnu. Des études *in vitro* ont démontré que les protéines BSP liaient l'IGF-II d'une manière spécifique (Desnoyers et coll., 1994). Compte tenue de la liaison des protéines BSP à la surface des cellules et que des protéines immunologiquement reliées sont ubiquitaires chez les mammifères, incluant l'humain, Desnoyers et coll., (1994) suggèrent que les protéines BSP moduleraient l'action de l'IGF-II en servant de transporteurs aussi bien que de sites de liaison de l'hormone à la surface des cellules. Cependant des études *in vivo* devront être faites dans le but de vérifier cette hypothèse.

1.5.8.7. Liaison au collagène et à la gélatine

Comme décrit à la section 1.5.3., les protéines BSP contiennent deux domaines de type II similaires à ceux retrouvés dans la fibronectine (Manjunath et coll., 1988). Chez la fibronectine, les structures de type II lient le collagène (Bányai et coll.,

1990; Baker, 1985). Des travaux ont prouvé que les protéines BSP liaient la gélatine, qui est une forme dénaturée du collagène (Manjunath et coll., 1987) ainsi que divers types de collagène (I, II, IV et V) (Manjunath et coll., 1988). De plus, une méthode de purification des BSP sur colonne d'affinité de gélatine-agarose a été développée (Manjunath et coll., 1987). La liaison de PDC-109 à la gélatine se ferait via des interactions hydrophobes (Constantine et coll., 1991; 1992; Bányai et coll., 1990). Cependant la signification physiologique de l'affinité des protéines BSP pour le collagène/gélatine est pour le moment inconnue. Mais on sait que la fibronectine (surnommée "l'organisateur biologique des cellules") est importante notamment dans l'interaction cellule-cellule, dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire ainsi que dans la migration cellulaire (Hynes, 1986; Hynes et Yamada, 1982). Ainsi Manjunath et coll., (1988) ont supposé que les protéines BSP pourraient accomplir un rôle semblable au niveau des spermatozoïdes du plasma séminal.

1.6. APERÇU DU PROJET DE RECHERCHE

Les essais radioimmunologiques suggèrent la présence de protéines BSP dans le sérum bovin ou de protéines immunologiquement reliées chez d'autres espèces de mammifères (voir le tableau III à la section 1.5.6.). Cependant aucune référence n'indique que les vésicules séminales pourraient être des glandes endocrines (i.e. des glandes pouvant sécréter leurs produits directement dans le sang). En conséquence, on a émis l'hypothèse suivante: un ou plusieurs autres organes pourraient synthétiser et relâcher ces protéines dans le sang.

Ainsi, l'objectif principal du projet consistait à analyser l'expression des protéines BSP dans différents tissus bovins, dans le but de vérifier si ces protéines sont bel et bien produites par un ou plusieurs autres organes qui pourraient ensuite sécréter ces mêmes protéines dans le sang. Pour ce faire, nous avons tout d'abord cloné les ADNc codant pour les protéines BSP-A3, BSP-30kDa et un fragment de l'ADNc de

BSP-A1/A2, dans le but principalement de pouvoir analyser l'expression de leurs ARNm dans différents tissus bovins par la technique de protection à la RNase.

La découverte d'un ou de plusieurs organes endocrines synthétisant les protéines BSP serait une preuve indirecte de la présence de ces protéines dans le sang. C'est pourquoi nous avons tenté également d'isoler la protéine BSP-A1/A2 à partir du sérum bovin, afin d'obtenir une preuve directe de la présence de ces protéines dans le sang. L'obtention d'indices directs et indirects démontrant la présence des protéines BSP ou d'analogues dans la circulation sanguine est très importante, puisque ces preuves pourraient conduire au développement de nombreuses voies de recherche. Ces protéines lient les HDL et les phospholipides de la membrane plasmique et provoquent l'efflux de cholestérol membranaire des spermatozoïdes (voir section 1.5.8.4.). Notons que ces protéines provoquent aussi l'efflux de cholestérol membranaire de fibroblastes humains (Moreau et coll., 1998a). Donc, il est raisonnable d'imaginer que les protéines BSP sériques ou des protéines analogues chez d'autres espèces pourraient participer au métabolisme lipidique, notamment au niveau du transport inverse du cholestérol. Ainsi, elle pourraient être impliquées dans la prévention de l'athérosclérose. Les protéines BSP sériques pourraient également jouer un rôle au niveau de l'action de l'IGF-II (voir section 1.5.8.6.) ou accomplir toute autre fonction vu leurs nombreuses propriétés de liaison (voir section 1.5.8.2.).

Finalement, dans le but de vérifier la présence de gènes similaires aux gènes BSP bovins dans le génome de l'humain, du rat, du hamster et du lapin, des analyses Southern ont été effectuées en utilisant des conditions d'hybridation à forte stringence et en se servant comme sonde d'un fragment d'ADNc codant spécifiquement pour chaque protéine BSP.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

On trouvera ici les versions un peu plus détaillées de quelques méthodes mentionnées dans l'article annexé (section 3.1), ainsi que la description complète des méthodes utilisées à la section 3.2.

2.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE

2.1.1 Tissus bovins

Les tissus bovins (vésicule séminale, ampoule, prostate, testicule, épидидyme, intestin grêle, petit intestin, artère, cerveau, coeur, foie, rein, tissu adipeux et le poumon) ont été prélevés sur des taureaux fraîchement abattus dans un abattoir local. Un fragment de chaque tissu a rapidement été congelé sur place dans de l'azote liquide, puis entreposé à -80°C jusqu'à son utilisation pour l'extraction de l'ARN total, de l'ADN génomique ou des protéines. Environ deux litres de sang d'un taureau ont directement été prélevés à l'abattoir. Nous avons laissé coaguler le sang pendant quatre heures à la température de la pièce. Par la suite, il a été centrifugé à 3500 révolutions par minute (rpm) pendant dix minutes (à cette vitesse, il y a peu d'hémolyse). Nous avons prélevé le sérum et l'avons centrifugé une seconde fois. Nous avons récupéré un total de 600 ml de sérum. Le sérum a été conservé à - 80°C.

2.2. ACIDES NUCLÉIQUES

2.2.1. Quantification des acides nucléiques

Les quantifications des acides nucléiques (ARN et ADN) se font à l'aide d'un spectrophotomètre de type Beckman modèle Du 640 (Beckman Instruments Inc, USA). Les faibles concentrations d'ADN sont estimées sur gel d'agarose par une coloration au bromure d'éthidium. L'intensité du fragment d'ADN d'une concentration inconnue est

comparée à l'intensité de différentes concentrations connues d'un fragment d'ADN ayant environ le même poids moléculaire.

2.2.2. Purification des plasmides

Les minipréparations d'ADN plasmidique («minipreps») par la méthode de lyse alcaline sont effectuées selon un protocole établi (Sambrook *et al.*, 1989). Les maxipréparations («maxipreps») d'ADN plasmidiques se font à l'aide de la trousse «Plasmid MIDI Kit™» (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) selon les instructions du fabricant.

2.2.3. Purification de l'ADN génomique

L'ADN génomique des différentes espèces a été isolé tel que décrit précédemment (Ausubel *et coll.*, 1991) avec de légères modifications au protocole. Le volume de tampon d'extraction d'ADN utilisé par milligramme de tissu a été doublé. Puis, l'ADN a été purifié par deux extractions consécutives au phénol-chloroforme. Suite au lavage avec 70% éthanol, le culot a été séché puis dissous dans 500 µl de TE (Tris/EDTA) pH 8,0 en chauffant plusieurs heures à 65°C. L'ADN a été conservé à 4°C.

2.2.4. Purification de l'ARN total

Afin d'inactiver les ribonucléases (RNases) exogènes, toute la vaisselle non-jetable, les instruments ainsi que l'eau utilisée pour l'extraction d'ARN étaient traités pendant environ 16 heures avec une solution de diéthyl pyrocarbonate (DEPC) à 0.2% (Sambrook *et coll.*, 1989), pour être ensuite autoclavés. Par la suite, les solutions nécessaires étaient préparées avec cette eau traitée au DEPC. L'appareil à électrophorèse ainsi que les peignes furent pour leur part immergés dans une solution

de sodium dodécyl sulfate (SDS) 1%, puis ensuite rincés à fond avec de l'eau traitée au DEPC.

La méthode utilisée pour isoler l'ARN totale des différents tissus bovins était essentiellement celle décrite par Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et Sacchi, 1987). À la toute dernière étape, l'ARN fut resuspendu dans du formamide 100% en chauffant à 65°C pendant plusieurs minutes et entreposé à -80°C.

2.2.5. Digestions enzymatiques et électrophorèse

Les enzymes de restriction utilisées provenaient de chez Gibco BRL (Burlington, Ontario, Canada) ou de chez New England Biolabs (Mississauga, Ontario, Canada). Notons que toutes les digestions ont été effectuées en suivant les conditions suggérées par le fabricant et ce, pour chaque enzyme. Pour ce qui est des digestions d'ADN génomique des différentes espèces, 25 µg d'ADN ont été digérés pendant environ 16 heures dans un volume final allant de 500 à 1200 µl (selon la concentration de l'ADN). Environ 8 unités d'enzyme par microgramme d'ADN génomique ont été utilisées. Suite à la digestion, de l'EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique) était ajoutée (concentration finale de 12.5 mM) afin d'inhiber toutes nucléases. Finalement, l'ADN a été concentré à l'aide d'un concentrateur sous-vide («Speedvac») jusqu'à un volume d'environ 20 µl.

L'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose fut effectuée telle que décrit précédemment (Sambrook et coll., 1989) dans du tampon 1X TTE (Tris 89 mM, Taurine 29 mM, EDTA 0,54 mM). L'ADN était visualisé avec du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml; ajouté directement dans le tampon de migration au moment de l'électrophorèse) sous une lampe à rayons ultra-violet (312 nm Transilluminator, Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Un marqueur de poids moléculaire était toujours

ajouté (habituellement le «DNA Molecular Weight Marker XIV (100 base pairs Ladder)» de Boehringer Mannheim (Laval, Québec, Canada).

L'électrophorèse de l'ARN sur gel d'agarose en présence de formaldéhyde (2,2 M) a été également réalisée tel que décrit précédemment (Sambrook et coll., 1989) dans du tampon 1X MOPS (acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique). Les ARN étaient visualisés avec du bromure d'éthidium.

2.2.6. Transferts Southern et Northern

Le transfert de l'ADN génomique sur les membranes de nylon (Duralon™, Stratagene, La Jolla, Californie, USA) a été effectué tel que décrit précédemment (Ausubel et coll., 1991). Le même protocole et le même type de membrane ont été utilisés pour le transfert de l'ARN, sauf que les conditions variaient quelque peu. La membrane de nylon a préalablement été traitée au DEPC, autoclavée et le gel a été trempé dans du SSC 20X (citrate de sodium salin), afin d'éliminer le formaldéhyde. Les acides nucléiques sont fixés à la membrane par une exposition aux rayons ultraviolets.

2.2.7. Marquage de l'ADN et hybridations

Les sondes d'ADN ont été préalablement purifiées sur gel d'agarose 1%, à l'aide de la trousse «Qiaquick Gel Extraction Kit™» de Qiagen. Les ADN (25 ng) furent marqués radioactivement avec de l'alpha ³²P dCTP (déoxycytidine triphosphate), selon la méthode développée par Feinberg et Vogelstein (Feinberg et Vogelstein, 1983), en utilisant la trousse «Ready-to-Go™» de Pharmacia (Baie d'Urfé, Québec, Canada). Les directives du fabricant ont été suivies sauf pour la période d'incubation qui était en général allongée à 3 heures. La sonde d'ADN utilisée pour le Northern était le produit de 307 pb de l'ADNc de BSP-A3 amplifié par PCR avec les

oligonucléotides dégénérés. Les nucléotides non-incorporés furent enlevés par deux précipitations successives à l'acétate de sodium (0,3 M final) (Ausubel et coll., 1991). Environ 2 ng d'ADN marqué étaient utilisés par millilitre de solution d'hybridation.

Les préhybridations et les hybridations ont été effectuées dans un four à hybridation (modèle H010115, de TEK STAR, Greensboro, Caroline du Nord, USA). Pour les Southern et le Northern, les membranes étaient préhybridées dans des tubes cylindriques en verre à 68°C, avec un tampon SSPE 4X (SSPE 20X: 3,6 M NaCl (chlorure de sodium) / 0,2 M NaH₂PO₄ (phosphate de sodium dibasique) / 0,02 M EDTA, pH 7,7), sodium pyrophosphate 0,1%, SDS 5% et 100 µg/ml d'héparine. Les membranes étaient préhybridées durant 3 à 5 heures et ensuite la sonde préalablement dénaturée était ajoutée. Les membranes furent hybridées pendant environ 16 heures sous agitation. Les lavages à faible, moyenne et forte stringence ont été effectués selon les procédures standards (Ausubel et coll., 1991). Notons que le Northern a été lavé seulement à forte stringence. Les autoradiographies ont été effectués à -80°C dans des cassettes en utilisant des films MS de Kodak avec l'écran MS de Kodak.

2.2.8. Réaction de polymérase en chaîne (PCR) et clonage des produits de PCR

Toutes les réactions de PCR ont été effectuées à l'aide d'un appareil de type PTC-100 de MJ Research, Inc (Watertown, Massachusset, USA) et la polymerase Taq provenait de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada) ou de Boehringer Mannheim. On voudra bien se référer à l'article annexé pour plus de détails sur les conditions des réactions et pour la liste des oligonucléotides utilisés. L'ADN est purifié par une extraction au phénol-chloroforme ou sur gel d'agarose par la trousse GeneClean II (Bio 101 Inc, La Jolla, Californie, USA) ou par la trousse «Qiaquick gel extraction Kit™» de Qiagen selon les recommandations du fabricant.

Tous les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur pGEM3zf de Promega (Madison Wisconsin, USA) selon la méthode de clonage T-A (« T-A cloning») (Ausubel et coll., 1991). Un cycle supplémentaire de 20 minutes à 72°C à la fin de la procédure du PCR permettait l'ajout d'une adénine à chacune des extrémités des produits de PCR (Ausubel et coll., 1991). Le vecteur était préalablement digéré avec l'enzyme SmaI qui produit des extrémités franches, puis ensuite incubé avec du dTTP (déoxythymidine triphosphate) et de la polymérase Taq (permet l'ajout d'une thymine à chacune des extrémités du vecteur). Un ratio molaire de 1/10 (fragments à cloner/plasmide) était utilisé. Les ligations ont été effectuées avec 200 ng de vecteur et les réactions furent incubées pour toute la nuit à 15°C dans un volume final de 10 µl.

2.2.9. Transformation de cellules compétentes.

Quarante microlitres de cellules compétentes DH5α (Gibco BRL) ont été transformés avec les constructions plasmidiques selon le protocole fourni par la compagnie. Cependant, le milieu LB a été remplacé par le milieu SOB (par litre: 20g de tryptone, 5g d'extrait de levures, 0,5g NaCl et 5g MgSO₄.7H₂O) de Bio 101 Inc. L'identification des recombinants a été effectuée principalement par une hybridation moléculaire et rarement par la sélection bleu/blanc (alpha-complémentation de la protéine β-galactosidase codée par le gène *LacZ*). Quatre cents microlitres d'ampiciline 5mg/ml (pour la sélection des transformants), 4 µl d'une solution d'IPTG (isopropyl thio-β-galactoside) à 100 mM et 40 µl d'une solution de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) à 20 mg/ml étaient étalés sur chaque boîte de pétri (contenant environ 40 ml de milieu SOB-agar) environ une heure avant leur utilisation. La présence d'insertions était vérifiée par des minipréparations plasmidiques.

2.2.10. Séquençage

Les réactions de séquençage furent effectuées à l'aide de la trousse «Fidelity DNA Sequencing kit™» (Oncor, Gaithersburg, Maryland, USA). Les directives du fabricant ont été suivies et les oligonucléotides SP6 et T7 ont été utilisés. Également, la préparation et la migration des gels d'acrylamide ont été effectuées selon le protocole de la trousse. Au moins 5 µg d'ADN plasmidique double-brin ont été utilisés par réaction de séquençage; ces derniers étaient préparés à l'aide de la trousse «Plasmid MIDI Kit™» de Qiagen. Les recherches de similarités avec d'autres séquences ont été effectuées dans la banque de données GENBANK, en utilisant l'algorithme BLAST (Altschul et coll., 1990).

2.3. PROTÉINES

2.3.1. Produits chimiques

Le TEMED (*N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine), le SDS, le β-mercaptoéthanol, le bleu de Coomassie R-250, le bleu de bromophénol, le Tween-20, les ampholytes (pH 3-10) ainsi que les IgG (immunoglobuline de type G) de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase provenaient de la compagnie Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada). L'acrylamide, le *N,N'*-méthylène-bis-acrylamide, l'urée, le Tris, le persulfate d'ammonium et la glycine étaient de ICN (Montréal, Québec, Canada). La BSA (albumine sérique bovine), la choline, la leupeptine, l'hydrochlorure de benzamidine, et le PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) ont été obtenus chez Sigma (Oakville, Ontario, Canada). La résine PPC-Agarose (p-aminophényl phosphorylcholine-Agarose), et le PVDF (polyvinylidène difluorure) proviennent respectivement de Pierce (Rockford, IL, U.S.A.) et de Millipore (Bedford, MA, U.S.A.). La résine Sépharose CL6B provenait de Pharmacia (Baie d'Urfé,

Québec, Canada). La trousse Renaissance™ provenait de Mandel (Guelph, Ontario, Canada) ainsi que les films autoradiographiques Fuji de type RX (bleu). Les autres produits utilisés étaient de qualité analytique et provenaient pour la plupart de chez Fisher Scientific (Nepean, Ontario, Canada).

2.3.2. Extractions de protéines

2.3.2.1. Méthode usuelle

Les protéines des tissus bovins (vésicules séminales, ampoules, testicules, épидидymes, coeur, foie, reins, cerveau et poumons) ont été extraites. De petits morceaux de chacun de ces tissus ont été décongelés et pesés. Ceux-ci ont été homogénéisés à l'aide d'un mortier à 4°C dans 10 volumes du tampon suivant: Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contenant de l'EDTA 2 mM, de l'hydrochlorure de benzamidine 5 mM, de la leupeptine 10 µM, du PMSF 100 µM, 500U (Unité d'activité) de RNase T1 et 25U de DNase 1 (déoxyribonucléase 1). Les homogénats ont été centrifugés à 12 000 X g pendant 10 minutes. Les surnageants ont été centrifugés une seconde fois (12 000 X g, 10 min.) afin d'éliminer toute particule insoluble. Ceux-ci ont été conservés à -20°C. Les protéines ont été quantifiées selon la méthode classique de Markwell (Markwell et coll., 1978).

2.3.2.2. Autre méthode d'extraction des protéines

L'extraction des protéines des vésicules séminales, de la prostate, de l'intestin grêle, du petit intestin, des tissus adipeux et de l'artère s'est déroulée selon le protocole décrit par Chomczynski et coll., (1993) avec quelques modifications. À la suite de l'isolation de l'ARN de chacun de ces tissus (voir section 2.2.4.), la phase organique et l'interphase obtenues ont été congelée à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Nous avons ajouté à la phase organique et à l'interphase 0,3 ml d'éthanol 100% pour chaque 1 ml de la solution guanidinium-phénol-chloroforme requise pour l'homogénéisation initiale.

Nous avons incubé le tout 3 minutes à la température de la pièce, puis centrifugé l'échantillon à 2000 X g, pendant 5 minutes à 4°C. Nous avons récupéré le surnageant (contient le phénol, l'éthanol et les protéines; le culot correspond à l'ADN génomique) et nous y avons ajouté 1,5 ml d'isopropanol pour chaque 1 ml de la solution guanidinium-phénol-chloroforme requise pour l'homogénéisation initiale. Nous avons incubé l'échantillon à 4°C pendant au moins une heure, puis centrifugé à 12 000 X g et ce 15 minutes à 4°C. Dans la troisième étape, le culot a été resuspendu dans une solution d'éthanol 95% contenant 0,3 M d'hydrochlorure de guanidinium (2 ml de cette solution pour chaque 1 ml de la solution guanidinium-phénol-chloroforme requise pour l'homogénéisation initiale). Nous avons incubé l'échantillon dans un bain sonificateur à la température de la pièce pour une période de 30 minutes et centrifugé à 10 000 X g pour 5 minutes à 4°C (le supernageant n'a pas été conservé). Nous avons recommencé la troisième étape deux autres fois. Afin de se débarrasser du sel résiduel, nous avons ajouté au culot 10 ml d'éthanol 100%, vortexé, incubé 20 minutes à la température de la pièce, puis centrifugé à 10 000 X g, pendant 5 minutes à 4°C. Finalement, le culot fut séché, puis redissous à 60°C dans une solution de 1% SDS et 0,3% β -mercaptoéthanol. Une centrifugation à 10 000 X g était nécessaire afin d'enlever les particules insolubles. Les surnageants ont été conservés à -20°C. Les protéines ont été quantifiées selon la méthode classique de Markwell (Markwell et coll., 1978).

2.3.3. Purification de protéines analogues aux protéines BSP à partir du sérum bovin

2.3.3.1. Préparation du sérum

On ajoute au sérum du NaCl à une concentration finale de 0,5 M afin d'éliminer les interactions ioniques non spécifiques des protéines avec la PPC-agarose. Pour éliminer toutes particules insolubles, ce sérum a été centrifugé à 12 000 X g, pendant 15 minutes.

2.3.3.2. Purification sur colonne PPC-agarose

Une colonne contenant environ 3 ml de résine PPC-agarose et une colonne contenant 2 ml de résine Sépharose CL6B (cette colonne servira seulement de filtre) ont été préalablement lavées avec 25 volumes d'une solution de PBS (tampon phosphate salin) contenant 9 M urée et 0,2 M de choline. Celles-ci ont ensuite été lavées avec 20 volumes de PB (tampon phosphate) contenant 0,5 M NaCl. Ensuite, environ 50 ml de sérum bovin (300 ml dans le cas de l'électrophorèse sur deux dimensions) ont été passés sur la colonne CL6B (précolonne) qui était reliée directement à la colonne PPC-agarose. Par la suite, les colonnes ont été lavées avec une solution de PB contenant 0,5 M NaCl jusqu'à ce que l'absorbance (280 nm) descende à zéro. Les protéines liées à la PPC ont été éluées une première fois en utilisant une solution de PB contenant 0,3 M NaCl et 0,2 M choline, jusqu'à ce que l'absorbance descende à zéro. Finalement, les protéines qui étaient encore liées à la PPC furent éluées en utilisant un tampon PB contenant de l'urée 8 M et de la choline 0,2 M. Les fractions protéiques de chaque élution ont été combinées, puis dialysées au moins quatre fois dans du NH_4HCO_3 50 mM (bicarbonate d'ammonium) et lyophilisées.

2.3.4. Techniques électrophorétiques

2.3.4.1. Électrophorèse en milieu dénaturant (SDS-PAGE)

Les électrophorèses sur une dimension (SDS-PAGE) ont été effectuées selon le protocole classique élaboré par Laemmli (Laemmli, 1970) en utilisant le système PROTEAN II (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario). L'épaisseur des gels était de 1,5 mm et leur composition était la suivante : gel de séparation (acrylamide 15 % et N, N'-méthylène-bis-acrylamide 0,4 % dans un tampon Tris-HCL 370 mM (pH 8,8), SDS 0,1 %, TEMED 0,05 % et persulfate d'ammonium 0,05 %), gel de concentration

(acrylamide 3,9 % et N, N'-méthylène-bis-acrylamide 0,1 % dans un tampon Tris-HCL 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1 %, TEMED 0,1 % et persulfate d'ammonium 0,1 %). De l'isobutanol préalablement saturé en eau était ajouté à la surface du gel de séparation afin d'en favoriser la polymérisation en empêchant l'accès à l'oxygène et pour permettre la formation d'une interface de migration bien droite. Lorsque le gel était complètement polymérisé (environ après 30 minutes), l'isobutanol était alors retiré et la surface du gel était rincée avec de l'eau distillée. Ensuite, le gel de concentration était coulé à la surface du gel de séparation et le peigne était inséré afin de former les puits de chargement. Suite à la polymérisation (environ 30 minutes), les puits étaient lavés avec de l'eau distillée.

Les protéines des surnageants obtenues précédemment (sections 2.3.2.1. et 2.3.2.2.) ont été concentrées par une précipitation à 4°C durant au moins une heure suite à l'ajout de TCA (acide trichloroacétique) à une concentration finale de 15%, puis centrifugées à 14 000 X g à la température de la pièce pendant 15 minutes. Nous avons ajouté 2-3 µl de Tris 1M afin d'amener le pH à neutralité. Par la suite, les échantillons étaient dénaturés pendant 10 minutes à 100°C dans un tampon réducteur composé de Tris-HCl 4 mM (pH 6,8), de glycérol 16 %, de SDS 4,4 %, de β-mercaptoéthanol 10 % et de bleu de bromophénol 0,003 % (afin de visualiser la migration lors de l'électrophorèse). La migration des gels s'effectue à courant constant de 85 mA/gel dans du tampon 1X TGS (Tris 25 mM, glycine 192 mM et SDS 0,1 %) pendant environ 2,5 heures. Notons que 5 µl d'un marqueur contenant des protéines de poids moléculaires connus («Low range molecular weight protein standard» de Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec) étaient ajoutés, afin d'estimer le poids moléculaire (M_r) des protéines séparées sur SDS-PAGE. Ces protéines standards étaient : la phosphorylase b (94 kDa), la BSA (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'inhibiteur tryptique de la fève de soja (20,1 kDa) et l'α-lactalbumine (14,4 kDa).

2.3.4.2. Électrophorèse sur deux dimensions

L'électrophorèse sur deux dimensions a été effectuée selon le protocole de O'Farrell (O'Farrell, 1975) avec quelques modifications. Le gel cylindrique (0,3 X 14 cm) était constitué d'acrylamide 4%, d'ampholytes (pH 3-10) 2%, de Triton X-100 2% et d'urée 5 M. Du glycérol, des ampholytes (pH 3-10) et du bleu de bromophénol ont été ajoutés à l'échantillon préalablement dissous dans du NH_4HCO_3 50 mM pour des concentrations finales respectives de 20%, 2% et de 0,003%. La focalisation isoélectrique a été effectuée à 11 500 volts/heures (600 V pendant 19 heures) à une température constante de 15°C. À l'anode, nous avons utilisé une solution de 0,085% d'acide phosphorique, tandis qu'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,02 M se trouvait à la cathode. Afin de mesurer le gradient de pH final, le gel cylindrique (boudin) servant de témoin (ne contenant aucun échantillon) a été coupé en morceaux de un centimètre. Ceux-ci ont été trempés séparément pour une heure dans 500 μl d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 10 mM. Le pH de chacun des segments a été mesuré par une électrode conventionnelle. Le gradient de pH final se situait entre 4,12 et 8,46. Immédiatement après la focalisation, le gel cylindrique a été équilibré deux fois (10 minutes à chaque fois) dans un tampon réducteur composé de Tris-HCL 4 mM (pH 6,8), de glycérol 16 %, de SDS 4,4 %, de β -mercaptoéthanol 10 % et de bleu de bromophénol 0,003%. Le boudin équilibré a été scellé avec une solution d'agarose 1% sur un gel SDS-PAGE ayant un gel de séparation d'une concentration en polyacrylamide de 15% (tel que décrit à la section 2.3.4.1.). Notons, que le gel de concentration a été coulé jusqu'au bord des vitres et qu'un "spacer" a été inséré à une profondeur d'environ 3 mm du côté gauche afin de servir de puit pour le marqueur de poids moléculaires (décrit à la section 2.3.4.1.). Suite à l'électrophorèse de la seconde dimension, le gel a été coloré au bleu de Coomassie (voir section suivante).

2.3.4.3. Coloration au bleu de Coomassie

Lorsqu'il n'y avait pas d'électro-transfert, les protéines étaient visualisées à l'aide de bleu de Coomassie. Le gel était trempé pour toute la nuit dans une solution contenant 0,25% de bleu de Coomassie R-250 et de l'acide acétique : méthanol : H₂O selon un ratio de 9,2 : 4,6 : 86,2. Les gels étaient ensuite décolorés dans une solution d'acide acétique : méthanol : H₂O (7,5 : 12 : 80,5). Ceux-ci étaient conservés à 4°C dans des sacs scellés dans lesquels nous ajoutons un peu de solution de décoloration.

2.3.5. Transferts Western

Les protéines séparées sur SDS-PAGE devant être soumises à une immunodétection étaient transférées sur une membrane de PVDF selon la méthode de Towbin et coll. (Towbin et coll, 1979) en utilisant le système Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario). La membrane était d'abord trempée dans du méthanol durant 5 minutes. Ensuite, la membrane et le gel étaient préalablement équilibrés dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM et méthanol 20 % [v/v], pH 8,3) pendant 15 minutes. Dans un réservoir rempli de tampon de transfert, le gel équilibré était déposé sur deux épaisseurs de papier filtre 3M (Whatman) puis recouvert de la membrane. Les bulles d'air étaient enlevées en roulant une pipette pasteur sur la membrane, puis une seconde couche de papiers filtres 3M était déposée sur la membrane. Le tout était inséré entre deux éponges dans un support («sandwich») et était plongé dans le réservoir à transfert, la membrane faisant face à l'anode. Les conditions de transfert étaient de 700 mA pour toute la nuit à 4 °C. Afin d'évaluer la qualité du transfert, les gels étaient colorés au bleu de Coomassie (voir section 2.3.4.3.).

2.3.6. Immunodétection avec les anticorps anti-BSP

Les anticorps polyclonaux dirigés soit contre la protéine BSP-A1/A2, BSP-A3 ou BSP-30K ont été obtenus tel que décrit par Manjunath et Sairam (1987). Ceux-ci ont été purifiés sur une colonne protein-A-Sepharose selon le protocole décrit par Chandonnet et coll. (1990). Les anticorps étaient conservés dans du PBS à -80°C. La spécificité de chacun de ces anticorps a été vérifiée par des immunodétections.

Toutes les étapes suivantes se déroulaient à la température de la pièce avec agitation constante. Suite au transfert, les membranes de PVDF contenant les protéines étaient saturées pendant deux heures dans un tampon PBS 50 mM contenant de la BSA 1% et du Tween-20 0,05%. Ensuite, les membranes étaient incubées en présence d'un des trois Ac primaires anti-BSP pour une heure dans un tampon PBS 50 mM contenant de la BSA 0,1% et du Tween-20 0,05% (dilution de 1/3000 pour les trois Ac anti-BSP). L'excès d'anticorps était enlevé par quatre lavages successifs de cinq minutes à l'aide du même tampon. Par la suite, les membranes étaient incubées avec le second anticorps (i.e. les IgG de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase) dans le même tampon pour une heure. Finalement, les membranes étaient lavées quatre fois avec le même tampon, puis les anticorps étaient détectés par chemiluminescence suivant les indications de la trousse Renaissance™ (Mandel). Les membranes étaient exposées à des films autoradiographiques Fuji de type RX pendant différents temps (entre cinq secondes et cinq minutes).

Afin de visualiser les protéines du marqueur de poids moléculaires suite à l'immunodétection, les membranes de PVDF étaient colorées pendant 10 minutes dans une solution "d'Amido Black 10B" 0,1% dans de l'isopropanol : acide acétique : H₂O (25:10:65). Elles étaient décolorées dans une solution d'isopropanol : acide acétique : H₂O (25:10:65) puis séchées à la température de la pièce.

3. RÉSULTATS

3.1. cDNA cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30kDa: phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. Dominic Salois, Martin Ménard, Yves Paquette et Puttaswamy Manjunath, sous presse dans *Biology of Reproduction*.

Résumé:

BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 et BSP-30kDa sont quatre membres des protéines majeures du plasma séminal bovin (la famille des protéines BSP). Ces protéines lient l'héparine et la phosphatidylcholine et stimulent la capacitation des spermatozoïdes. Au cours de ce travail, nous avons déterminé la séquence nucléotidique complète des deux ADNc codant respectivement pour la protéine BSP-A3 et pour la protéines BSP-30kDa. Des oligonucléotides dégénérés construits en se basant sur les séquences primaires des protéines furent utilisés comme amorces dans des réactions de RT-PCR. Celles-ci ont été effectuées sur des préparations d'ADNc simple brin synthétisées à partir d'ARN total d'une vésicule séminale bovine, afin d'amplifier un fragment interne de chaque ADNc codant pour une protéine BSP. Des oligonucléotides spécifiques construits en se basant sur les séquences nucléotidiques de ces fragment internes furent utilisés pour cloner les extrémités 5' et 3' des ADNc en utilisant les techniques de RACE 3' et de RACE 5'. Également, nous avons vérifié, par des protections à la RNase, l'expression des ARNm de chaque protéine BSP dans plusieurs tissus bovins. Les résultats indiquent que les ARNm de chaque protéine BSP sont exprimés seulement dans les vésicules séminales et dans les ampoules. Des gènes similaires ont également été détectés dans l'ADN génomique de l'humain, du rat, du hamster et du lapin, lors d'une hybridation Southern à forte stringence et avec une sonde d'ADNc de BSP-30kDa.

Contribution des auteurs:

Dominic Salois (écriture de l'article et toutes les manipulations, sauf si indiqué ci-dessous), **Martin Ménard** (amplification et clonage du fragment interne de l'ADNc de BSP-A1/A2 et BSP-30K), **Yves Paquette** (conseiller en biologie moléculaire et correction de l'article), **Puttaswamy Manjunath** (directeur de recherche).

**cDNA cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30kDa:
phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal
plasma**

Dominic SALOIS, Martin MÉNARD, Yves PAQUETTE and Puttaswamy
MANJUNATH§

Departments of Medicine and of Biochemistry, University of Montreal, Guy-
Bernier Research centre, 5415 Boul. de l'Assomption, Montreal, Quebec,
Canada, H1T 2M4

Key words: cDNA, mRNA, bovine seminal plasma protein, seminal vesicles,
expression

§To whom correspondence should be addressed:

P. Manjunath, Ph.D.

Guy-Bernier Research Centre

5415 Boul. de l'Assomption

Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

Tel: (514) 252-3562

Fax: (514) 252-3430

Email: manjunap@ere.umontreal.ca

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

ABSTRACT

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

INTRODUCTION

BSP-30kDa and BSP-A3 proteins belong to the same protein family as BSP-A1 and BSP-A2 [1-5]. These four closely related proteins (collectively called BSP proteins) are found in bovine seminal plasma (BSP) and are secretory products of the seminal vesicles [3,6]. BSP-A1, -A2, and -A3 have molecular masses of 15 000-16 500, while BSP-30kDa has a molecular mass of 28 000-30 000 [2, 5 ,7]. Since BSP-A1 and BSP-A2 have an identical amino acid sequence, with their difference residing only in the degree of glycosylation, they are considered as a single chemical entity called BSP-A1/A2 (also called PDC-109 [8]). These proteins constitute the major protein fraction of bovine seminal plasma (> 60%). With the exception of BSP-A3, all members of this family are glycoproteins. All the members of the BSP proteins family display a mosaic structure composed of two tandemly arranged and largely conserved type II domains and unique N-terminal extensions of variable length that are O-glycosylated to different extent [4, 6, 8-10]. The amino terminal sequence of BSP-30kDa does not display discernible similarity with any known protein sequence, which make BSP-30kDa unique among this family [6].

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

surface [15-17]. Recent results suggest that the mechanism by which HDL and BSP proteins stimulate sperm capacitation involves cholesterol efflux [17].

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

MATERIALS AND METHODS

Tissues

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

RNA Isolation and cDNA synthesis

Total RNA from seminal vesicles and tissues was isolated following the acid guanidinium-phenol-chloroform (AGPC) method [26]. Ten microgrammes of total RNA from seminal vesicles were reverse-transcribed using a poly(T) primer [RACE-dT, (5'-GCTAAGCTAGCGCTAAGAGCGGCCGCAAGC(T)₁₅-3')] and the Superscript II enzyme (GibcoBRL, Burlington, Ont., Canada). Reverse-transcribed samples were purified using the GeneClean Kit II (BIO 101, La Jolla, CA, USA) and kept at -20°C before the amplification reactions. One tenth of each reaction was used in the PCR amplifications.

Amplification of Partial cDNA Sequences Encoding BSP proteins

Degenerate polymerase chain reaction (PCR) primers (Table IV) for BSP-A3 and BSP-30k were designed on the basis of the primary sequence of the protein [4, 6], in regions where the amino acids showed less degeneracy in their genetic codons. For BSP-A3, primers A3deg.for. and the A3deg.rev. were based on amino acid regions 12-19 and 106-114 respectively [4]; the predicted length of the amplified fragment is 308 nucleotides. For BSP-30kDa, primers 30Kdeg.for and 30Kdeg.rev

were based on amino acid regions 2-7 and 152-158 respectively [6]; the predicted length of the amplified fragment is 471 nucleotides. PCR primers for BSP-A1/A2 were designed on the basis of the published cDNA sequence [24]. The sequence of the forward primer (A1/A2for.) corresponds to the beginning of the 5' untranslated region and the reverse primer (A1/A2rev.) is located 328 nucleotides downstream of the 5' untranslated region primer. The predicted length of the amplified fragment is 371 nucleotides.

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

RACE experiments

To perform 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE), we used cDNA synthesized from total seminal vesicles RNA with the RACE-dT primer. Subsequently, for BSP-A3, a touchdown PCR [27] was performed using the RACE-2A primer and the gene specific primer A3-pos34. The annealing temperature began at 55°C (minus 1°C per cycle during 8 cycles), followed by 30 cycles at 47°C. A DNA fragment at about 450bp was isolated from a 1% agarose gel and melted at 95°C in 300 µl of water. Then, 2 µl of this dilution were used to perform a nested PCR with the primer pair RACE-2A + A3-pos57 with the same cycling conditions. For

BSP-30kDa, PCR was performed using the RACE-2A primer and the gene specific primer 30k-pos109 with the cycling conditions described for BSP-A3 3'RACE experiment. A small piece of agarose gel containing a DNA fragment at about 400bp was isolated and melted at 95°C in 300 µl of water. Then, 2 µl of this dilution were used to perform a nested PCR with the primer pair RACE-2A and 30k-pos143 with the same cycling conditions.

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

For BSP-30kDa, the dC-tailed cDNA was amplified using the Abridged Anchor Primer (AAP) and primer 30k-Apos146. The annealing temperature began at 60°C (minus 1°C per cycle during 9 cycles), followed by 28 cycles at 51°C. As no product was visible on an ethidium bromide stained gel, 1 µl of the first PCR was diluted 100 fold with water and 5 µl of this dilution were reamplified using Abridged Universal Amplification Primer (AUAP) and the nested primer 30k-Apos77. The

annealing temperature began at 60°C (minus 1°C per cycle during 8 cycles), followed by 30 cycles at 52°C. In both RACE 3' and RACE 5' experiments, control reactions without reverse transcriptase or without RNA were performed. For 5' RACE, additional control reactions without terminal transferase were performed.

Cloning and sequencing

All PCR products were cloned into the SmaI site of the pGEM3zf vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA) via the T-A overhangs method [28]. The sequencing was performed on both strands with the Fidelity DNA Sequencing kit (Oncor, Gaithersburg, Maryland, USA) and [$\alpha^{35}\text{S}$]dATP (Amersham, Oakville, Ontario, Canada) using either SP6 or T7 primers (Table IV).

RNase Protection Assays

The pGEM3zf vectors containing the partial cDNA encoding for each BSP protein as described earlier were linearized separately and then transcribed using the MAXIscript SP6/T7 kit (Ambion, Austin, Texas, USA) in the presence of [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]UTP (Amersham) to obtain uniformly labeled antisense strands. The BSP-A3 and the BSP-A1/A2 clones were linearized by the EcoRI enzyme, giving an antisense RNA transcript of 375 base pairs (bp) for BSP-A3 and of 438 bp for BSP-A1/A2 with the SP6 RNA polymerase. The BSP-30kDa clone was linearized by the SmaI enzyme, generating a BSP-30kDa antisense RNA transcript of 392 bp with the T7 RNA polymerase. The sequence of each BSP protein cDNA that was transcribed for the different RNase protection assays is shown in Figure 3.3A. Full length RNA probes were recovered from 6%, 8 M urea acrylamide gels by submerging gel slices in elution buffer containing 500 mM ammonium acetate, 1 mM EDTA and 0.2% SDS overnight at room temperature. The diluted RNA probes were precipitated by adding

10 µg of yeast RNA and 2.5 volumes of cold absolute ethanol. RNase protection assays were performed with the RPA II ribonuclease protection kit (Ambion). Briefly, 10 µg of total RNA from adult bovine tissues (the amount and the quality of the RNA used for the protection assays was previously checked on formaldehyde agarose gel to ensure an equal loading of RNA in all samples) were hybridized for 20 hours at 45°C with one of the radiolabeled RNA probe using 1.8×10^5 cpm of the BSP-A3 RNA probe, or 1.5×10^5 cpm of the BSP-30kDa RNA probe, or 3.4×10^5 cpm of the BSP-A1/A2 RNA probe. The specific activity of the probes was greater than 7.5×10^8 cpm/µg. Ribonuclease digestion of the unhybridized RNA was performed at 37°C for 2 hours with 0.1 unit of ribonuclease A and 20 units of ribonuclease T1. The protected RNA fragments were separated on 6% polyacrylamide, 8 M urea gels. The gels were exposed to Biomax MS X-ray film (Kodak, USA) with the Biomax MS intensifying screen, at -80°C overnight and for one week. For each experiment, two control tubes containing the same amount of labeled probe and 10 µg of yeast RNA were incubated with or without ribonucleases. RNA markers are ^{32}P labelled transcripts from the Century marker templates from Ambion.

Southern analysis

High-molecular-weight genomic DNA from different species was prepared as described [28]. For rabbit, rat, human, hamster, male bovine and female bovine the DNA was extracted respectively from a kidney, a spleen, a prostate, CHO cells (chinese hamster ovary cells), a lung and a kidney. 25 µg of genomic DNA from each species were digested with the EcoRI restriction enzyme (New England Biolabs, Mississauga, Ontario, Canada). The fragments were separated on a 1% agarose gel, and transferred to Duralon-UV nylon membranes (Stratagene, La Jolla, California, USA) and hybridized as described. The BSP-A1/A2 and the BSP-A3 DNA probes

were respectively the 371bp and the 308 bp PCR products obtained as described above. The BSP-30k DNA probe was a 435 bp PCR product amplified using primers 30Kdeg.for. and 30k-Apos146. The sequence of each probe is shown in figure 3.3A. Each of these fragments was labeled using (α - 32 P)dCTP (Amersham) and the Ready-to-Go DNA labelling kit (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Membranes were prehybridized in 4X SSPE, 0.1% sodium pyrophosphate, 5% SDS, and 100 μ g/ml heparin for 5 hours at 68°C. Hybridization were carried out overnight at 68°C, the membrane washed three times at room temperature for 5 minutes in 2X sodium chloride/sodium citrate (SSC) with 0.1% SDS, followed by a 60 minutes wash at 65°C in 0.1X SSC/0.1 % SDS (high stringency washing) and three final washes at room temperature in 0.1X SSC. The membranes were exposed to a Biomax MS X-ray film (Kodak) at -80°C with the Biomax MS intensifying screen overnight or up to 10 days. Size markers are λ -DNA digested with HindIII. The percentage of nucleotide similarities between the probes and the different BSP cDNAs are described in Table 5. The BSP-30kDa probe contains the region coding for the unique amino-terminal sequence and this DNA region has no similarity with the other BSP DNA probes (Fig. 3.3A).

RESULTS

BSP-A3 and BSP-30kDa cDNA sequences

PCR fragments covering the complete BSP-A3 and BSP-30kDa cDNAs were cloned and sequenced. First, a specific fragment of each cDNA was amplified by PCR using degenerate primers designed on the basis of the primary sequence of the proteins. The nature of the fragments obtained was verified by comparing their deduced amino acid sequences with the published protein sequences. Then, specific primers were designed on the basis of these sequences. These primers were used to amplify the 3' and 5' untranslated cDNA regions by the 3' and 5' RACE techniques and the fragments were cloned and sequenced. For both cDNAs (Fig. 3.1 and 3.2), the initiation methionine occurs within the sequence CTACCATGG, highly similar to the Kozak consensus sequence CCA(G)CCATGG which controls translational efficiency of mammalian mRNAs [29-31]. Furthermore, both possess the consensus polyadenylation signal AATAAA, 13 or 12 nucleotides upstream of the poly(A) tail, respectively for the BSP-30kDa cDNA and for the BSP-A3 cDNA.

The complete cDNA of BSP-A3, excluding the poly(A) tail, is 633 nucleotide long (Fig. 3.1). The cDNA coding for BSP-A3 contains an open reading frame of 420 nucleotides starting at position 19. The deduced amino acid sequence, excluding the signal peptide, is identical to the primary sequence previously reported [4] except at position 2 where a glutamate (E) is found instead of a glutamine (Q) and position 90 being an isoleucine (I) rather than a lysine (K). The cleavage site for the precursor peptide occurs between amino acid -1 and +1 as determined by the primary sequence previously reported [4] (Fig. 3.1). The theoretical M_r of the 140 amino acid residue precursor polypeptide of BSP-A3 is 16 584 Da.

The complete cDNA of BSP-30kDa, excluding the poly(A) tail, is 782 nucleotide long (Fig. 3.2). The cDNA coding for BSP-30kDa has an open reading frame of 549 bp starting at position 24. The deduced amino acid sequence, excluding the signal peptide, is the same as the primary sequence obtained earlier [6], but we found at position 13 a proline (P) rather than a serine (S). The six unidentified residues in the reported peptide sequence were found to be threonines as was suggested by the authors. The cleavage site for the precursor peptide occurs between amino acid -1 and +1 as determined by the primary sequence previously reported [6] (Fig. 3.2). The theoretical M_r of the 183 amino acid residue precursor polypeptide of BSP-30kDa is 21 721 Da. The aligned sequences of the cDNA encoding for the different BSP proteins are presented in Figure 3.3A and the degree of residue identities between these cDNAs are presented in Table 5. The sequence region between the three BSP cDNAs that have the most identical nucleotides is the one encoding the putative signal peptide (88% of identity) and the sequence region that have the highest nucleotide variations and gap frequencies is the one encoding the N-terminal extension.

The first 25 amino acid residues of the BSP-A3 and BSP-30kDa precursor proteins have a hydrophobic character and they display respectively 92% and 76% similarity with those residues of the signal peptide of the BSP-A1/A2 precursor polypeptide (Fig. 3.3B). They also display a significant similarity (80% for BSP-A1/A2, 80% for BSP-A3 and 68% for BSP-30kDa) with the first 25 amino acid residues of the recently sequenced precursor polypeptide of boar pB1 by Plucienniczak et al. (GenBank # AF047026).

Tissue-specific expression of BSP proteins

The results of the RNase protection assay for BSP-A3 mRNA are depicted in Figure 3.4. In seminal vesicle tissue and ampullae, a strong expression of BSP-A3 mRNA was observed, since the expected 308 bp RNA fragment is detected in these tissues (Fig. 3.4a, lanes 2-7; Fig. 3.4b, lanes 4-7). Also a second major RNA fragment at approximately 270 bp is protected. No BSP-A3 mRNA expression was revealed in artery, small intestine, adipose tissue, brain, kidney, heart, lung, large intestine, liver, epididymis, testis and prostate (Fig. 3.4c). The results of the RNase protection assays for BSP-30kDa and for BSP-A1/A2 mRNAs are depicted respectively in Figures 3.5 and 3.6. These BSP proteins mRNAs showed a strong expression only in seminal vesicle tissue and in the ampullae (Fig. 3.5a and 3.6a, lanes 2-7; Fig. 3.5b, 3.6b, lanes 4-6) since, the expected major RNA fragments (344 bp for BSP-30kDa mRNA or 371 bp for BSP-A1/A2 mRNA) are only detected in these two tissues (Fig. 3.5c and 3.6c).

Southern analysis of different species genomic DNA

A comparative genomic analysis employing a BSP-30kDa specific DNA probe and high stringency washing conditions yielded a band at 3.7 kilobases (kb) in human, rabbit, rat and hamster DNA (Fig. 3.7a). Under the same conditions, bands at 3.7 and 9.8 kb are seen in bovine male and female DNA. The use of a BSP-A1/A2 or a BSP-A3 specific DNA probe using low stringency washing conditions yielded no signal with human, rabbit, rat and hamster DNA (data not shown). Using high stringency conditions with male and female bovine DNA, bands at 4.2 and 3.9 are detected with the BSP-A3 probe (Fig. 3.7b), while bands at 10.5, 1.6 and 1.0 kb are detected with the BSP-A1/A2 probe (Fig. 3.7c). The bands at 4.2 and 3.9 kb (detected with the BSP-A3 probe) were also detected faintly in male and female DNA at medium stringency conditions by the BSP-A1/A2 probe (data not shown).

DISCUSSION

We have sequenced the two complete cDNAs coding for the BSP-A3 and the BSP-30kDa proteins (Fig. 3.1 and 3.2). Both cDNAs possess the same consensus sequence for the initiation methionine (CTACCATGG) and the polyadenylation signal (AATAAA) as the BSP-A1/A2 cDNA [24]. The BSP-A3 and the BSP-30kDa cDNA code respectively for a 140 or a 183 amino acids precursor protein of estimated polypeptide molecular weight of 16 584 Da and 21 721 Da. The first 25 amino acid residues are highly similar among the bovine BSP precursor proteins and also with the boar pB1 precursor protein (Plucienniczak et al., GenBank # AF047026) (Fig. 3.3B). These sequences probably constitute signal peptides, since they are absent from the secreted (mature) BSP proteins [4, 6, 8]. Also, these first 25 amino acid residues display typical features of signal peptides of eukaryotic secretory preproteins. In fact, they have a hydrophobic character, and in the case of BSP-A3 and pB1 the hydrophobic cores are preceded by a basic residue (R) [32]. So, these amino acid residues are probably responsible for the secretion of the BSP proteins.

The deduced amino acid sequences indicate that there is one (for BSP-30kDa) or two (for BSP-A3) amino acid differences with the primary sequences previously reported [4,6]. These differences have been found consistently in several clones from different PCR reactions, excluding the possibility that these differences arise from amplification or sequencing errors. Also, the presence in RNase protection assays of a fragment at the expected size for the full length BSP-A3 mRNA protected probe (308 bp) confirms that the base change (position 362 on the cDNA sequence) detected in the sequencing is present in the mRNA (Fig. 3.4). Polypeptide sequencing errors are unlikely for BSP-A3, since among known members of the BSP proteins family in bovine and in other species, at the position of the first difference,

the amino acid seems to be a conserved glutamine (Q) and at the second different position, a conserved basic amino acid, lysine (K) or arginine (R), except a threonine (T) for HSP-1 (Table VI). No such comparison can be done concerning the proline (P) at position 13 in BSP-30kDa, since this region does not show any similarity to known protein sequences [6, 21].

These differences could be due to polymorphism in the genes coding for the BSP proteins. Several arguments converge in this direction. The presence of a smaller RNA fragment (approximately at 270 bp) with the same intensity as the full length fragment in the BSP-A3 RNase protection assay (Fig. 3.4) suggests the possibility that this bull is heterozygote for the BSP-A3 gene. The total RNA used in these experiments was extracted from tissues of another bull than the one used for the cloning of the BSP cDNAs. This smaller RNA fragment is not the result of cross-binding between the BSP-A3 probe and the BSP-A1/A2 or BSP-30kDa RNA, since there is many nucleotides differences between them (Fig. 3.3A). Also, some amino acids differences are seen between the published primary sequence of boar pB1 [21] and the deduced amino acid sequence of its recently cloned cDNA by Plucienniczak et al. (Genbank #AF047026). Further studies are required in order to determine whether these differences are due to polymorphism in the BSP proteins genes and in similar genes in other species.

The amino acid difference in BSP-30kDa and the first one in BSP-A3 occur in the amino terminal region. The effect of this substitution is unknown since the role of the amino terminal region in each BSP protein is unknown. The second substitution in BSP-A3 occurs in the second type II domain of the protein (domain b). These type II domains are important for the biological function of the BSP proteins [9]. In fact, in BSP-A1/A2, they constitute binding units for sperm membrane choline phospholipids and heparin, and the presence of both type II domains is essential for

the expression of functional properties, namely lipid efflux and sperm capacitation [9]. So, if an amino acid substitution in domain b affects its binding properties, the stimulation of sperm cholesterol efflux and sperm capacitation by the BSP protein will be affected. These amino acid substitutions could modify the affinity of the BSP proteins for sperm membrane choline phospholipids and thus affect sperm capacitation induced by heparin or HDL. Conversely, it could influence their affinity towards heparin or HDL and thus change the sperm capacitation rate.

As seen in the RNase protection assays, all the BSP proteins mRNAs are synthesized in the seminal vesicles and in the ampullae (Fig. 3.4a, 3.5a and 3.6a, lanes 2-6; Fig. 3.4b, lanes 4-7; Fig. 3.5b and 3.6b, lanes 4-6). The expression is very strong in these tissues, since a very intense radioactive signal appears on the autoradiogram only after one night of exposure. Each BSP protein mRNA is detected in only one nanogram of total seminal vesicle RNA (Fig. 3.4b, 3.5b, 3.6b lane 6; Fig. 3.4c lane 1; Fig. 3.5c lane 8 and Fig. 3.6c, lane 15). No signal was detected in 10 μ g RNA from testis, epididymis, and in other male accessory sex glands as well as in other tissues (Fig. 3.4c, 3.5c and 3.6c). This suggest that the BSP protein mRNAs expression in these tissues is at least 10 000 times less than in the seminal vesicles. However, even a very low expression of BSP proteins in other tissues could have a physiological significance, since the large mass of other tissues, even with a very low level of expression, could produce large enough quantities of BSP proteins in the bloodstream to influence some physiological processes, such as cholesterol efflux, for example [33]. Only more sensitive techniques, such as RNase protection on isolated mRNA or nested RT-PCR, could determine if expression of BSP genes in other tissues is totally abolished. The presence of BSP proteins in female bovine tissues is unknown.

Comparison of the signal obtained with RNA from ampullae and seminal vesicles suggests that BSP-A1/A2 and BSP-30kDa mRNAs are expressed at about the same level in the ampullae and seminal vesicles. This is not the case for BSP-A3 mRNA, which is about 50 times less expressed in the ampullae than in seminal vesicles. This difference in the level of expression in the ampullae was confirmed by a northern blot analysis (data not shown). Using probes of approximately the same specific radioactivity, comparison of the signal strength suggests that the amount of BSP-A1/A2 mRNA is higher than the BSP-30kDa mRNA, the amount of BSP-30kDa mRNA is slightly higher than the BSP-A3 mRNA in the seminal vesicles (Fig. 3.4b, 3.5b and 3.6b). This correlates with the proportion of each protein in the seminal fluid (BSP-A1/A2, $\approx 65\%$; BSP-A3, $\approx 15\%$ and BSP-30kDa, $\approx 20\%$ as determined by respective RIAs [5]). These results suggest that the BSP protein expression is controlled at the transcriptional level.

Using a BSP-30kDa specific cDNA probe and high stringency Southern hybridization, a similar sequence at 3.7 kb was detected in genomic DNA from human, rat, hamster and rabbit (Fig. 3.7a), suggesting that the genomic DNA of these species possess a gene with a significant similarity to the bovine BSP-30kDa gene. This is in agreement with the fact that in human, hamster and rat seminal plasma phosphorylcholine-binding proteins immunologically related to the bovine BSP-30kDa protein have been detected [18]. Southern analysis with a BSP-A1/A2 or a BSP-A3 specific cDNA probes at high stringency conditions of hybridization yielded no signal with human and the other mammalian species (Fig. 3.7b and 3.7c). Even, using low stringency conditions of hybridization, these two probes yielded no signal with human and the other mammalian species (data not shown). The BSP-30kDa probe contains the sequence coding for the amino-terminal region without similarity to known protein sequences (Fig. 3.3A). The detection of similar genes in different species using this probe suggests that this unique region has been well

conserved in mammals, while genes similar to BSP-A1/A2 and BSP-A3, if present, seem to have diverged rapidly during evolution. It is unlikely that they are absent in other species, since in human, hamster and rat seminal plasma, phosphorylcholine-binding proteins immunologically related with the bovine BSP-A1/A2 and BSP-A3 proteins have been detected [18]. Furthermore, analogous proteins have been purified from stallion [19] and boar seminal plasma [20, 21]. Analysis of genes similar to the BSP-A1/A2 and BSP-A3 genes in other species will be necessary to confirm this supposed high mutation rate; such a high rate could suggest that these proteins have an important role in reproduction. On the other hand, as mentioned above, one or two amino acid change could influence bull fertility, then, several differences between species could for example, contribute to a cross species barrier in reproduction.

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

In summary, we have determined the complete sequences of the two cDNAs coding for BSP-A3 and BSP-30kDa proteins. Two amino acid changes for BSP-A3 and one for BSP-30kDa were found in the deduced amino acid sequences when compared with the previously reported primary sequences. We propose that the amino acid substitutions in BSP-A3 may be due to genetic polymorphism. All BSP proteins are not only synthesized by the seminal vesicles but they are also produced

by the ampullae. We suggest that these proteins are important mostly in reproduction, since their mRNAs are expressed at a high level only by these two accessory sex glands. Finally, we propose that the BSP analogous proteins in human, rat, hamster and rabbit may have numerous amino acid differences, since no similar genes were detected with the BSP-A1/A2 and BSP-A3 cDNA probes using either high or low Southern hybridization conditions. These differences may be important to block cross-species fertilization.

REFERENCES

1. Manjunath, P. Gonadotropin release and stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. In: Sairam, M.R. and Atkinson, L.E. (eds), *Gonadal Proteins and Peptides and their Biological Significance*. Singapore: World Scientific Publishing Company; 1984: 49-61.
2. Manjunath, P., 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* 1987; 241:685-692.
3. Manjunath, P., Sairam, M.R., Uma, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci Rep* 1987; 7:231-238.
4. Seidah, N.G., Manjunath, P., Rochemont, J., Sairam, M.R., Chrétien, M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem. J* 1987; 243:195-203.
5. Manjunath, P., Baillargeon, L., Marcel, Y.L., Seidah, N.G., Chrétien, M., Chapdelaine, A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: Chrétien M., McKerns K.W. (eds.), *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems*; 1988:259-273.
6. Calvete, J.J., Mann, K., Sanz, L., Raida. M., Töpfer-Petersen, E. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett* 1996; 399:147-152.
7. 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.
8. 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* 1983; 113:861-867.

9. Moreau, R., Thérien, I., Lazure, C., Manjunath, P. Type II domains of BSP-A1/-A2 proteins: binding properties, lipid efflux, and sperm capacitation potential. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 246:148-154.
10. Gerwig, G.J., Calvete, J.J., Töpfer-Petersen, E., Vliegthart, J.F.G. The structure of the O-linked carbohydrate chain of bovine seminal plasma protein PDC-109 revised by H-NMR spectroscopy. A correction. *FEBS Lett* 1996; 387:99-100.
11. 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).
12. Desnoyers, L., Manjunath, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids. *J Biol Chem* 1992; 267:10149-10155.
13. Chandonnet, L., Roberts, K.D., Chapdelaine, A., Manjunath, P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26:313-318.
14. Manjunath, P., Marcel, Y.L., Uma, J., Seidah, N.G., Chrétien, M., Chapdelaine, A. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 1989; 264:16853-16857.
15. Thérien, I., Bleau, G., Manjunath, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 1995; 52:1372-1379.
16. 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.
17. Thérien, I., Moreau, R., Manjunath, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1998; 59:768-776.
18. Leblond, E., Desnoyers, L., Manjunath, P. Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants

- with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1993; 34:443-449.
19. Calvete, J.J., Mann, K., Schäfer, W., Sanz, L., Reinert, M., Nessau, S., Raida, M., Töpfer-Petersen, E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 1995; 310:615-622.
 20. Sanz, L., Calvete, J.J., Mann, K., Gabius, H.J., Töpfer-Petersen, E. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: A dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol Reprod Dev* 1993; 35:37-43.
 21. Calvete, J.J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 1997; 407:201-206.
 22. Calvete, J.J., Sanz, L., Enßlin, M., Töpfer-Petersen, E. Sperm surface proteins. *Reprod Dom Anim* 1996; 31:101-106.
 23. Calvete, J.J., Sanz, L., Reinert, M., Dostàlovà, Z., Töpfer-Petersen, E. Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. In: Jamieson B.G.M., Ausio J., Justine J.-L. (eds), *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. *Mém Mus Natn Hist Nat* 1995; 166:515-524.
 24. Kemme, M., Scheit, K.H. Cloning and sequence analysis of a cDNA clone from seminal vesicle tissue encoding the precursor of the major protein of bull semen. *DNA* 1988; 7:595-599.
 25. Bräuer, C., Scheit, K.H. Characterization of the gene for the bovine seminal vesicle secretory protein SVSP109. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1090:259-260.
 26. Chomczynski, P., Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.

27. Hecker, K.H., Roux, K.H. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *BioTechniques* 1996; 20:478-485.
28. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons. Inc., 1991.
29. Kozak, M. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin *in vivo*. *Nature* 1984; 308:241-246.
30. Kozak, M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nuc Acids Res* 1984; 12:857-872.
31. Lütcke, N.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F., Scheele, G.A. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J* 1987; 6:43-48.
32. Watson, M.E. Compilation of published signal sequences. *Nuc Acids Res.* 1984; 12:5145-5164.
33. Moreau, R., Frank, P.G., Perreault, C., Marcel, Y.L., Manjunath, P. Seminal plasma choline phospholipid-binding proteins stimulate cellular cholesterol and phospholipid efflux. *Biochim Biophys Acta* 1999 (in press).
34. Bellin, M.E., Hawkins, H.E., AX, R.L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J Anim Sci* 1994; 72:2441-2448.
35. Bellin, M.E., Hawkins, H.E., Oyarzo, J.N., Vanderboom, R.J., Ax, R.L. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. *J Anim Sci* 1996; 74:173-182.
36. Bellin, M.E., Oyarzo, J.N., Hawkins, H.E., Zhang H., Greg Smith, R., Forrest, D.W., Sprott, L.R. et Ax, R.L. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci* 1998; 76:2032-2039.

Legends to figures:

Figure 3.1. Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of BSP-A3 cDNA (GenBank accession number AF055981). Numbers on the right represent the nucleotide sequence. The amino acid sequence numbering starts with +1 for the mature BSP-A3. Deduced amino acids differing from the primary sequence previously obtained [4] are bold and underlined. The consensus nucleotide sequences for the initiation site and the polyadenylation signal are underlined.

Figure 3.2. Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of BSP-30kDa cDNA (GenBank accession number AF057133). Numbers on the right represent the nucleotide sequence. The amino acid sequence numbering starts with +1 for the mature BSP-30kDa. The deduced amino acid differing from the primary sequence previously obtained [6] is in bold and underlined. The consensus nucleotide sequences for the initiation site and the polyadenylation signal are underlined.

Figure 3.3A. Aligned sequences of the cDNA encoding for the different BSP proteins and the sequences of each probe used in Southern blots or in RNase protection assays. Numbers represent the nucleotides positions. Nucleotides identical between the three BSP cDNAs are indicated by a star (*). The sequences of probes used in Southern blots are underlined. Both BSP-A1/A2 and BSP-A3 cDNA fragments amplified for the RNase protection assays are the same as the Southern blot probes. The cDNA region used for the BSP-30kDa RNase protection assay extend from nucleotide number 224 to nucleotide number 571. The alignment was performed using the CLUSTALW (1.7) program.

Figure 3.3B. Alignment of the putative signal peptide amino acid sequences of bovine BSP-A3 and BSP-30kDa with those of BSP-A1/A2 and boar pB1. Identical amino acids present in all four proteins are underlined. Identical amino acids present in bovine BSP proteins but different from those of pB1 are indicated by a +.

Figure 3.4. Expression of BSP-A3 mRNA by RNase protection assay using 10 μ g of RNA from each bovine tissue, except where indicated. **A)** Results obtained with a 16 hours exposure only; *Lane 1*, Undigested RNA probe; *lane 2, 3, 4, 5 and 6* contain respectively 10 μ g, 1 μ g, 0.1 μ g, 0.01 μ g and 0.001 μ g of seminal vesicles RNA; *lane 7*, ampulla-vas deferens RNA. **B)** Same gel as in A (*lane 4, 5, 6 and 7* only), exposed for one week. **C)** A gel run in parallel to gel A, with a one week exposure; *Lane 1*, 0.001 μ g of seminal vesicles RNA; *lane 2*, empty; *lane 3*, artery RNA; *lane 4*, small intestine RNA; *lane 5*, adipose tissue RNA; *lane 6*, brain RNA; *lane 7*, kidney RNA; *lane 8*, heart RNA; *lane 9*, lung RNA; *lane 10*, large intestine RNA; *lane 11*, liver RNA; *lane 12*, epididymis RNA; *lane 13*, testis RNA; *lane 14*, prostate RNA; *lane 15*, Probe only, digested with RNases. Numbers indicate the size of RNA transcripts from the Century marker templates from Ambion.

Figure 3.5. Expression of BSP-30kDa mRNA by RNase protection assay using 10 μ g of RNA from each bovine tissue, except where indicated. **A)** Results obtained with a 16 hours exposure only; *Lane 1*, Undigested RNA probe; *lane 2, 3, 4, 5 and 6* contain respectively 10 μ g, 1 μ g, 0.1 μ g, 0.01 μ g and 0.001 μ g of seminal vesicles RNA; *lane 7*, ampulla-vas deferens RNA. **B)** Same gel as in A (*lane 4, 5 and 6* only), exposed for one week. **C)** A gel run in parallel to gel A, with a one week exposure; *Lane 1*, Probe only, digested with RNases; *lane 2*, prostate RNA; *lane 3*, testis RNA; *lane 4*, epididymis RNA; *lane 5*, liver RNA; *lane 6*, large intestine RNA; *lane 7*, lung RNA; *lane 8*, 0.001 μ g of seminal vesicles RNA; *lane 9*, heart RNA; *lane 10*, kidney RNA; *lane 11*, brain RNA; *lane 12*, adipose tissue RNA;

lane 13, small intestine RNA; *lane 14*, artery RNA. Numbers indicate the size of RNA transcripts from the Century marker templates from Ambion.

Figure 3.6. Expression of BSP-A1/A2 mRNA by RNase protection assay using 10 μ g of RNA from each bovine tissue, except where indicated. **A)** Results obtained with a 16 hours exposure only; *Lane 1*, Undigested RNA probe; *lane 2, 3, 4, 5 and 6* contain respectively 10 μ g, 1 μ g, 0.1 μ g, 0.01 μ g and 0.001 μ g of seminal vesicles RNA; *lane 7*, ampulla-vas deferens RNA. **B)** Same gel as in A (*lane 4, 5 and 6* only), exposed for one week. **C)** A gel run in parallel to gel A, with a one week exposure; *Lane 1*, Probe only, digested with RNases; *lane 2*, prostate RNA; *lane 3*, testis RNA; *lane 4*, epididymis RNA; *lane 5*, liver RNA; *lane 6*, large intestine RNA; *lane 7*, lung RNA; *lane 8*, heart RNA; *lane 9*, kidney RNA; *lane 10*, brain RNA; *lane 11*, adipose tissue RNA; *lane 12*, small intestine RNA; *lane 13*, artery RNA; *lane 14*, empty; *lane 15*, 0.001 μ g of seminal vesicles RNA. Numbers indicate the size of RNA transcripts from the Century marker templates from Ambion.

Figure 3.7. Southern blot analysis of the BSP protein genes. Aliquots (25 μ g) of high-molecular-weight genomic DNA from different species were digested with EcoRI, fractionated through 1% agarose gel, and transferred to nylon membrane. **A)** The membrane was hybridized with the BSP-30kDa probe. *Lane 1*, rabbit DNA; *lane 2*, human DNA; *lane 3*, rat DNA; *lane 4*, hamster DNA; *lane 5*, empty; *lane 6*, female bovine DNA; *lane 7*, male bovine DNA. A different membrane was hybridized with **B)** the BSP-A3 probe or **C)** the BSP-A1/A2 probe (see section 2.7). *Lane 1*, rabbit DNA; *lane 2*, human DNA; *lane 3*, rat DNA; *lane 4*, hamster DNA; *lane 5*, female bovine DNA; *lane 6*, male bovine DNA. Numbers indicate the size of fragments from λ -phage DNA digested with HindIII.

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

Origin	Name	Sequence
BSP-A3	A3deg.for.	5'-CCNAARARAARAARGAYCCRGC-3'
	A3deg.rev.	5'-TAYTTCCTNACRCCRTCYTCTC-3'
	A3-Apos115	5'-CTAGCAATACTTCCAAACTCCATCCTC-3'
	A3-Apos102	5'-GTGAGCACCAATAGTTCATAAATG-3'
	A3-Apos30	5'-CACACATTTATTATCTTTGGTTTCTGCAC-3'
	A3-pos34	5'-TCCCTCGATGCAGACTATAC-3'
	A3-pos57	5'-CCTTTATCTATGAAGGCAAGTC-3'
BSP-30K	30Kdeg.for.	5'-GAYATHCCNGAYCCNGG-3'
	30Kdeg.rev.	5'-CARTAYTTCCANGCYTTRTC-3'
	30K-Apos146	5'-AGTGAGTGAGCACCATCTCC-3'
	30K-Apos77	5'-GTGAATGGGAAAGCACATGCAGG-3'
	30K-pos109	5'-GTACTGAGAGAGACGAACCCG-3'
	30K-pos143	5'-CACTCACTTCAAACCTATGACCG-3'
BSP-A1/A2	A1/A2for.	5'-GAGAGCAAGCTACCATGGCAC-3'
	A1/A2rev.	5'-GCACCAAGACATCCACATACTC-3'
RACE	RACE-dt	5'-GCTAAGCTAGCGCTAAGAGCGGCCGCAA- GC(T) ₁₅ -3'
	RACE-2A	5'-GCTAAGAGCGGCCGCAAG-3'
	AAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGII GGGIIG-3'
	AUAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
Sequencing	T7	5'-TGTAATACGACTCACTATAG-3'
	SP6	5'-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3'

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

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

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

- a** The residues overlap included only the first (95 or 90) nucleotides of the A1/A2 cDNA Southern probe.
- b** The residues overlap included the remaining sequence of the A1/A2 cDNA Southern probe.
- c** The residues overlap included the complete sequence of the cDNA or the complete sequence of the Southern probe.

TABLE VI. Alignment of the two BSP-A3 peptide regions containing the amino acid differences (arrows) with the corresponding similar peptide regions from the previously reported BSP-A3 and from the other members of the BSP protein family.

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

^a BSP-A3 [4], BSP-A1/A2 [5, 8], BSP-30kDa [6], HSP-1 [19] and pB1 [21].

Figure 3.1

ACAGGAGAGCAAGCTACCATGGCACTGCGTTTGGGGCTCTTTCTGATTTGGGCTGGCGTG 60
 M A L R L G L F L I W A G V
 -25 -20

TCTATGTTTCTACAACCTGGACCCTGTGAATGGAGATGAGCAGCTGTCTGAGGACAACGTC 120
 S M F L Q L D P V N G D E Q L S E D N V
 -1 +1

ATTCTTCCTAAAGAAAAGAAAGACCCTGCTTCTGGTGCAGAAACCAAAGATAATAAATGT 180
 I L P K E K K D P A S G A E T K D N K C
 20

GTTTTCCCATTCATCTATGGAAACAAAAAGTATTTTGACTGCACATTGCATGGTTCCTTA 240
 V F P F I Y G N K K Y F D C T L H G S L
 40

TTCCTGTGGTGTTCCTCGATGCAGACTATACAGGAAGATGGAAATACTGTACTAAGAAT 300
 F L W C S L D A D Y T G R W K Y C T K N
 60

GACTATGCCAAATGTGTCTTTCCCTTTATCTATGAAGGCAAGTCATATGACACTTGCATA 360
 D Y A K C V F P F I Y E G K S Y D T C I
 80

ATAATTGGGAGTACATTTATGAACTATTGGTGTCTCACTCTCTTCAAACCTATGATGAGGAT 420
I I G S T F M N Y W C S L S S N Y D E D
 100

GGAGTTTGGAAGTATTGCTAGCAGTAAAAAGAGTACTGTCCAGTACATCCACCCATGGC 480
 G V W K Y C *

CACGGATGCAATCAAGCCTTCAAACCTTCAGTGGAGAAAATCAAGAACTCTCAAGCAAAG 540
 GTGATGCTCTGAGCGACAGAGGTGAAATTCTTTCCCTACATCTCTGCCTTGTGCCTGCTG 600
 GGCATGGGTCCAATCAATAAACACTTTCTCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 650

Figure 3.2

CAGCCACAGGAGAGCAAGCTACCATGGCACCGCTAGTGGGGCTCTTTCTGATTTGGGCTG 60
 M A P L V G L F L I W A G
 -25 -20
 GTGCGTCTGTGTTTCAACAACCTACACCCTGTGAATGGAGGGGATATTC^{CCG}ACCCAGGGA 120
 A S V F Q Q L H P V N G G D I P D P G S
 -1 +1
 GCAAACCCACGCCTCCTGGAATGGCAGATGAGCTGCCGACAGAGACGTATGACCTTCCTC 180
 K P T P P G M A D E L P T E T Y D L P P
 20
 CCGAAATTTACACTACTACATTTTTGCCTCGCACCATTTATCCTCAAGAGGAGATGCCGT 240
 E I Y T T T F L P R T I Y P Q E E M P Y
 40
 ATGACGACAAACCTTTTCCTAGCTTGTTGAGCAAAGCCAACGATCTTAATGCAGTTTTTG 300
 D D K P F P S L L S K A N D L N A V F E
 60
 AAGGTCCTGCATGTGCTTTCCCATTACCTATAAAGGCAAAAAGTATTATATGTGCACGC 360
 G P A C A F P F T Y K G K K Y Y M C T R
 80
 GCAAAAATTCCGTATTACTATGGTGTTCCTCGATACAGAATATCAAGGAAACTGGAAAT 420
 K N S V L L W C S L D T E Y Q G N W K F
 100
 TCTGTA^{CT}GAGAGAGACGAACCCGAATGTGTCTTCCCCTTTATCTATCGCAAGAAATCCT 480
 C T E R D E P E C V F P F I Y R K K S Y
 120
 ATGAAAGTTGCACACGGGTGCATAGTTTTTTCTGGAGGAGATGGTGCTCACTCACTTCAA 540
 E S C T R V H S F F W R R W C S L T S N
 140
 ACTATGACCGGGATAAAGCTTGGAAGTATTGCTAGCAAAAAAAAAAAAAAGCTATG TTCAG 600
 Y D R D K A W K Y C *

 TCACTGTCCAGTGCATCCACCCTTGGCCATGGATGCAATCCAGCCTTTGAAACCTCAGTG 660
 ATGAAAATCAAGA^{ACT}CCTTAAGCATGAAGGTGATGCTCTGAATGACAGAGGTGAAATCCT 720
 TTCTCAGCATCTCCACCATGTTCCCCTGGGCATAGGTCCAATCAATAAA^{CC}CACTTTCTCT 780
 GCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 800

Figure 3.3A

```

5'non-coding region / signal peptide region
BSP-A1/A2 1 -----CAGAGCAAGCTACCATGGCACTGCAGTTGGGGCTCTTTCTCATTTGGGCTG 51
BSP-A3 1 -----ACAGGAGAGCAAGCTACCATGGCACTGCAGTTGGGGCTCTTTCTGATTTGGGCTG 55
BSP-30K 1 CAGCCACAGGAGAGCAAGCTACCATGGCACCGCTAGTGGGGCTCTTTCTGATTTGGGCTG 60
          ***** ** *****
          / N-terminal tail region
BSP-A1/A2 52 GCGTGTCTGTGTTTCTACAACCTGGACCCTGTGAATGGAG----- 90
BSP-A3 56 GCGTGTCTATGTTTCTACAACCTGGACCCTGTGAATGGAG----- 94
BSP-30K 61 GTGCGTCTGTGTTTCAACAACCTACACCCTGTGAATGGAGGGGATATTCCCGACCCAGGGA 120
          * * **** ***** *****
          / type II domains region
BSP-A1/A2 91 -----ATCAG-----GACG----- 99
BSP-A3 95 -----ATGAGCAGCTGTCT--GAGG----- 112
BSP-30K 121 GCAAACCCACGCCCTCCTGGAATGGCAGATGAGCTGCCGACAGAGACGTATGACCTTCCTC 180
          ** ** ** *
          / type II domains region
BSP-A1/A2 100 -----A--AGGTGTTT--CT-----AC-TGAACCT----- 119
BSP-A3 113 -----ACAACGTCATT--CT-----TCCTAAAGAA----- 135
BSP-30K 181 CCGAAATTTACACTACTACATTTTTGTCCTCGCACCATTTATCCTCAAGAGGAGATGCCGT 240
          * * * ** * * * * *
          / type II domains region
BSP-A1/A2 120 -----ACCCAAGAC---GGTCCTGCTGAATTACCTG 147
BSP-A3 136 -----AAGAAAGACCCTGCTTCTGGTGCAGAAACCA 166
BSP-30K 241 ATGACGACAAACCTTTTCCTAGCTTGTGAGCAAAGCCAACGATCTTAATGCAGTTTTTTG 300
          * ** * * * *
          / type II domains region
BSP-A1/A2 148 AAGACGAAGAATGCGTTTTCCCATTCGTCATATAGAAACAGAAAGCATTTTTGACTGCACAG 207
BSP-A3 167 AAGATAATAAATGTGTTTTCCCATTCATCTATGGAAACAAAAAGTATTTTTGACTGCACAT 226
BSP-30K 301 AAGGTCCCTGCATGTGCTTTCCCATTCACCTATAAAGGCCAAAAAGTATATATGTGCAC-G 359
          *** ** * ***** ** * * * * *
          / type II domains region
BSP-A1/A2 208 TGCATGG-TTCCTTATTCCCGTGGTGTTCCCCTCGATGCAGACTATGTAGGAAGATGGAAA 266
BSP-A3 227 TGCATGG-TTCCTTATTCCTGTGGTGTTCCCCTCGATGCAGACTATACAGGAAGATGGAAA 285
BSP-30K 360 CGCAAAAATTCCGTATTACTATGGTGTTCCCCTCGATACAGAATATCAAGGAAACTGGAAA 419
          *** ** * * * * * * * * * * *
          / type II domains region
BSP-A1/A2 267 TACTGTGCTCAGAGAGACTATGCTAAATGTGTCTTCCCTTTATCTATGGAGGCAAGAAA 326
BSP-A3 286 TACTGTACTAAGAATGACTATGCCAAATGTGTCTTTCCTTTATCTATGAAGGCAAGTCA 345
BSP-30K 420 TTCTGTACTGAGAGAGACGAACCCGAATGTGTCTTCCCTTTATCTAT---CGCAAGAAA 476
          * **** * * * * * * * * * * * * * *
          / type II domains region
BSP-A1/A2 327 T---ATGAGACTTGCACAAAAATGGGAGTATGTGGATG---TCT-----TGGTGCCT 372
BSP-A3 346 T---ATGACACTTGCATAATAATGGGAGTACATTTATGAACTAT-----TGGTGCCT 394
BSP-30K 477 TCCTATGAAAGTTGCACAC-----GGGTGCATAGTTTTTT---TCTGGAGGAGATGGTGCCT 528
          * **** * ***** * ** * * * *
          /3'non-coding region
BSP-A1/A2 373 CACTCTCTCCAAACTACGACAAGGACAGAGCTTGGAAAGTATTGCTAGCCATAAAAAGAG- 431
BSP-A3 395 CACTCTCTTCAAACATATGATGAGGATGGAGTTTTGGAAAGTATTGCTAGCAGTAAAAAGA-- 452
BSP-30K 529 CACTCACTTCAAACATATGACCGGGATAAAGCTTGGAAAGTATTGCTAGCAAAAAAAAAAAAA 588
          ***** ** ***** * * ** * * ***** ***** *

```

Figure 3.3A (suite)

```

BSP-A1/A2 432 --CTATGTTTCAGTCACTGTCCAGTGCATCCACCCTTGGCCATGGATGCAATCCAGCCTTT 489
BSP-A3      453 -----GTTACTGTCCAGTACATCCACCCATGGCCACGGATGCAATCAAGCCTTC 501
BSP-30K    589 AGCTATGTTTCAGTCACTGTCCAGTGCATCCACCCTTGGCCATGGATGCAATCCAGCCTTT 648
              ** ***** ***** ***** ***** ***** *****
BSP-A1/A2 490 GAAACCTCAGTGAAGAAAATCAAGAACTCTCAAGCATGAAGATGATGCTCTGAAAGCCAG 549
BSP-A3      502 AAAACTTCAGTGGAGAAAATCAAGAACTCTCAAGCA--AAGGTGATGCTCTGAGCGACAG 559
BSP-30K    649 GAAACCTCAGTGATGAAAATCAAGAACTCTTAAGCATGAAGGTGATGCTCTGAATGACAG 708
              **** ***** ***** ***** ***** **** ***** * ***
BSP-A1/A2 550 AGGTGAAATCCTTTTCCCTACATCTCCACCATGTTTCCCCCTATGCGTGGATCCAATCAATA 609
BSP-A3      560 AGGTGAAATTCCTTTCCCTACATCTCTGCCTTGTGCCTGCTGGGCATGGGTCCAATCAATA 619
BSP-30K    709 AGGTGAAATCCTTTTCTCAGCATCTCCACCATGTTTCCC-CTGGGCATAGGTCCAATCAATA 767
              ***** ***** * ***** ** *** ** ** ** * * *****
BSP-A1/A2 610 AACCACTTTTCTCAGCpoly(A) 624
BSP-A3      620 AAC-ACTTTTCTCTGCpoly(A) 633
BSP-30K    768 AACCACTTTTCTCTGCpoly(A) 782
              *** ***** **

```

Figure 3.3B

```
          +   +           +
BSP-A3   :  MALRLGLFLIWAGVSMFLQLDPVNG
BSP-30kDa:  MAPLVGLFLIWAGASVFQQLHPVNG
BSP-A1/A2:  MALQLGLFLIWAGVSVFLQLDPVNG
pB1      :  MAPRLGIFLLWAGVSVFLPLDPVNG
```


Figure 3.4

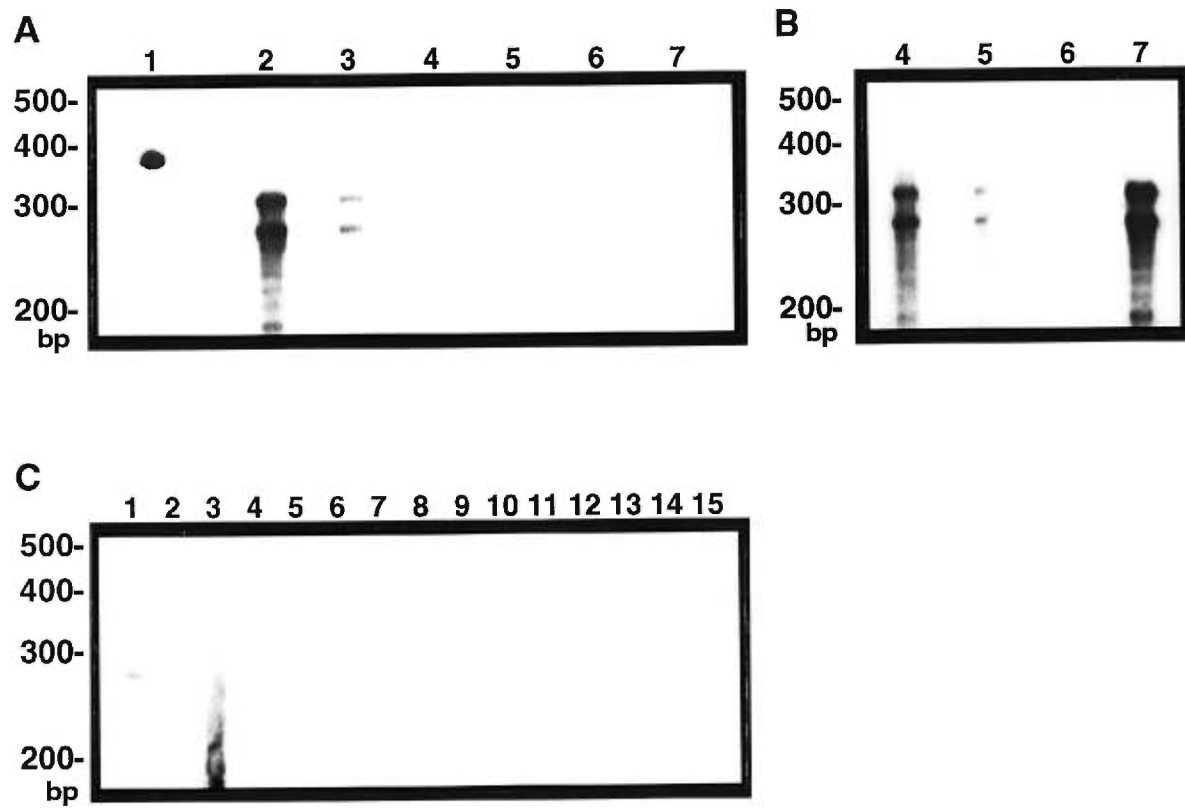


Figure 3.5

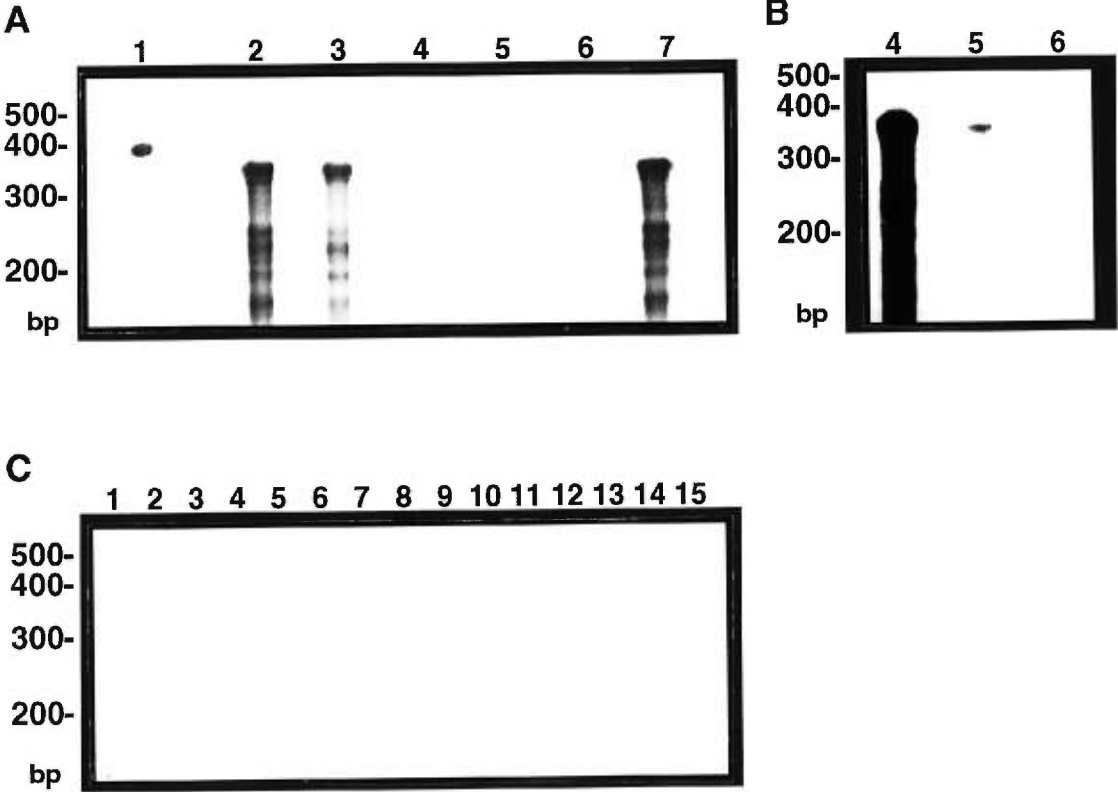


Figure 3.6

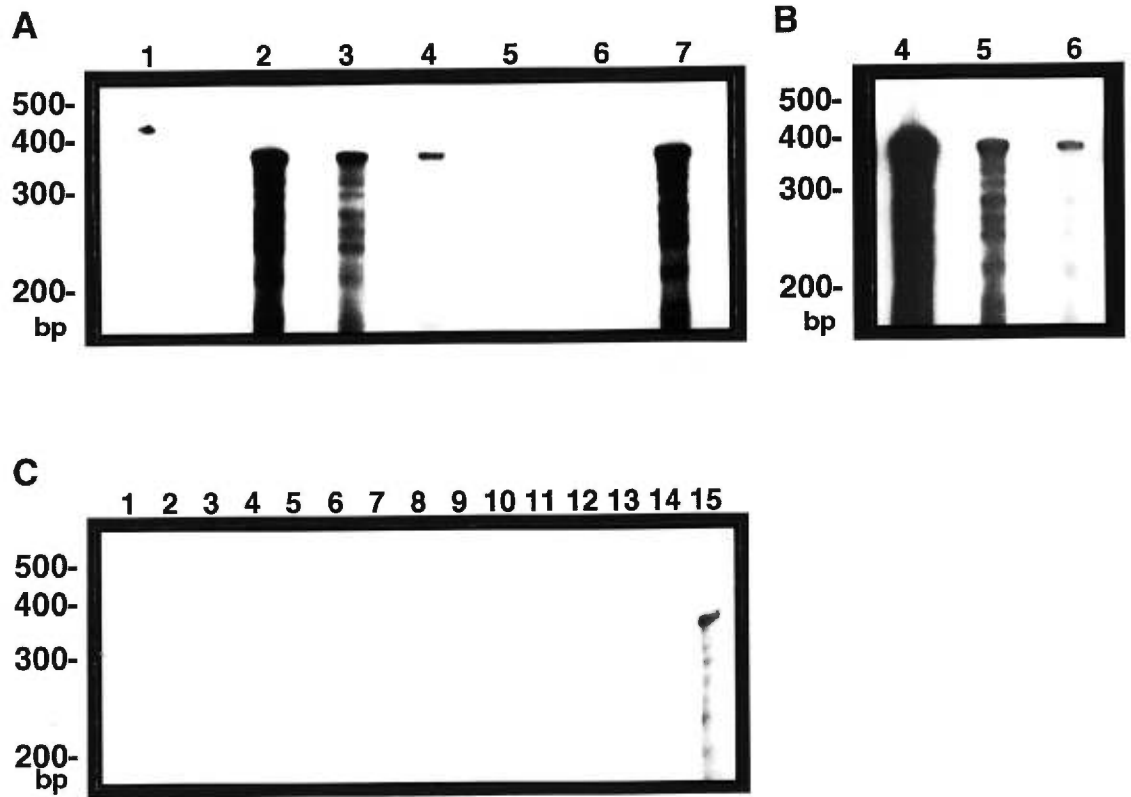
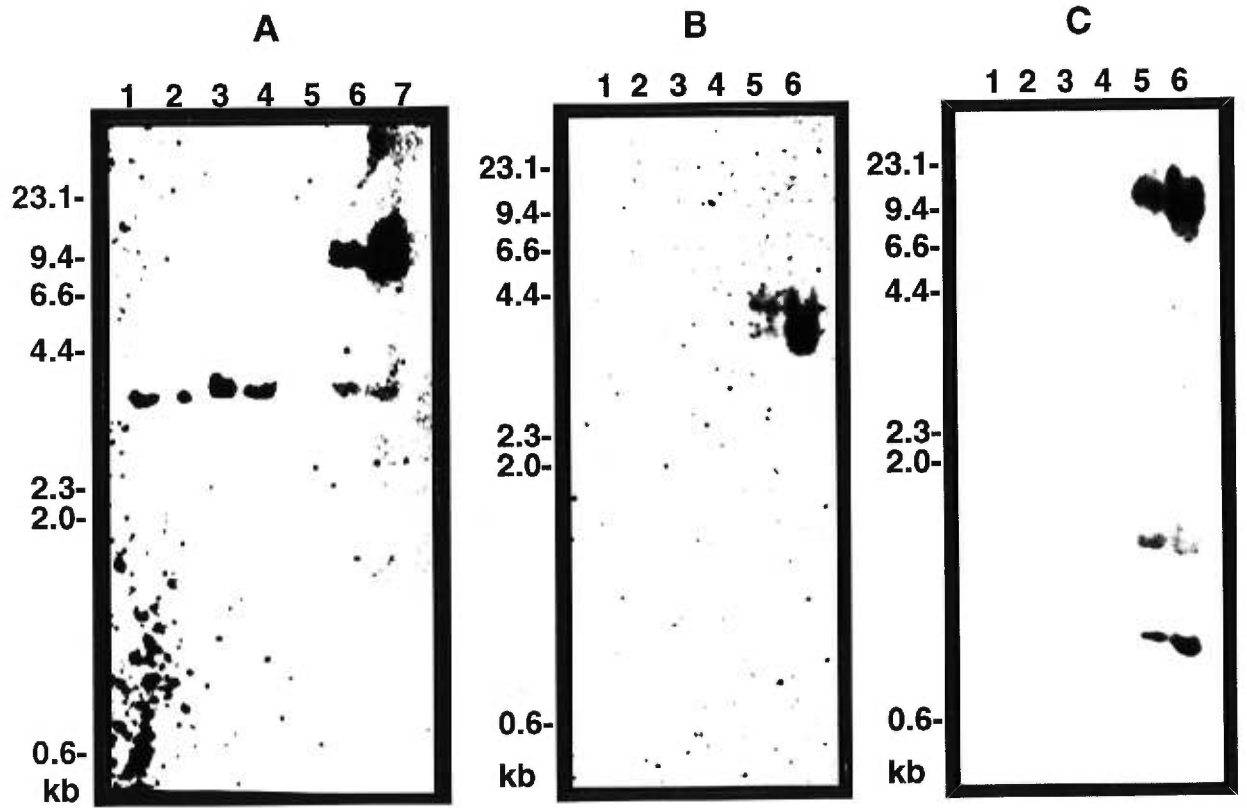


Figure 3.7



3.2. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Cette section présente les résultats non inclus dans l'article précédent ainsi que les résultats démontrant la présence de la protéine BSP-A1/A2 dans le sérum bovin.

3.2.1. Amplification des ADNc codant pour les protéines BSP-A3 et BSP-30kDa

Différentes régions couvrant entièrement les ADNc codant respectivement pour les protéines BSP-A3 et BSP-30kDa ont été amplifiées par PCR. Les résultats des réactions de PCR sont démontrés à la figure 3.8 et résumés au tableau VI. Ces produits de PCR ont tous été clonés et séquencés. Les différentes séquences placées bout à bout, ont permis de déterminer la séquence nucléotidique complète de chacun des ADNc. Premièrement, une région interne et spécifique à chaque ADNc a été amplifiée par PCR à l'aide d'une paire d'oligonucléotides dégénérés construits à partir des séquences primaires des protéines. La nature des différents produits amplifiés a été vérifiée en comparant leur séquence traduite en acides aminés et ce, avec les séquences primaires des protéines connues. Par la suite, des oligonucléotides spécifiques ont été construits en se basant sur ces séquences internes et ceux-ci ont été utilisés afin d'amplifier les extrémités 3' et 5' non-codantes de chaque ADNc, à l'aide des techniques de RACE 3' et 5' (voir matériel et méthodes de la section 3.1).

3.2.2. Analyse de l'expression de l'ARNm de BSP-A3 par Northern blot

En plus, d'une protection à la RNase (voir résultats de la section 3.1), l'expression des ARNm de BSP-A3 a été analysée dans plusieurs tissus bovins par Northern blot, en utilisant des conditions d'hybridation à forte stringence. Les résultats sont présentés à la figure 3.9. Tout comme avec la technique de protection à

Figure 3.8 Amplification par PCR des différentes régions des ADNc codant pour les protéines BSP.

Les produits de PCR amplifiés à partir d'une banque d'ADNc simple brin synthétisée à partir d'ARN total isolé d'une vésicule séminale bovine ont été séparés sur un gel d'agarose 1% et visualisés par une coloration au bromure d'éthidium. Les oligonucléotides correspondant à chacune des réaction de PCR, ainsi que la longueur des différents produits obtenues sont décrits au tableau VI. Les réactions de conditions utilisées sont décrites dans la partie matériel et méthodes de la section 3.1.

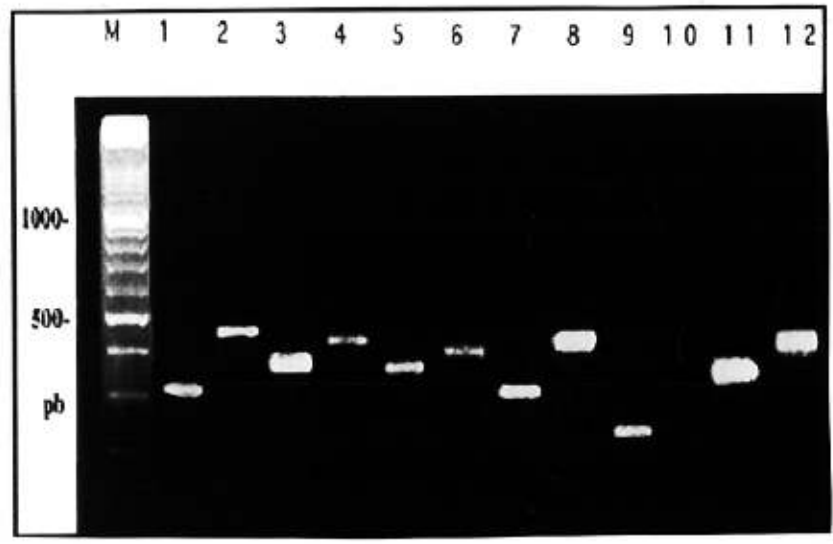


TABLEAU VII

LISTE DES OLIGONUCLÉOTIDES UTILISÉS, AINSI QUE LA LONGUEUR DES PRODUITS OBTENUS POUR CHAQUE RÉACTION DE PCR

RÉACTION DE PCR	OLIGO 1 ^a	OLIGO 2 ^a	LONGUEUR CALCULÉE (pb)	LONGUEUR OBTENUE (pb)
# 1	A3deg.for.	A3deg.rev.	308	308
# 2	30Kdeg.for.	30Kdeg.rev.	471	471
# 3	A1/A2for.	A1/A2rev.	371	371
# 4	A3-pos34	RACE-2A	>189	≈440
# 5	A3-pos57	RACE-2A	≈370	≈370
# 6	30K-pos109	RACE-2A	>152	≈410
# 7	30K-pos143	RACE-2A	≈305	≈305
# 8	A3-Apos102	AAP	>304	≈450
# 9	A3-Apos30	AUAP	≈234	≈234
# 10	30K-Apos146	AAP	>438	n.v.
# 11	30K-Apos77	AUAP	?	≈360
# 12	30Kdeg.for.	30K-Apos146	435	435

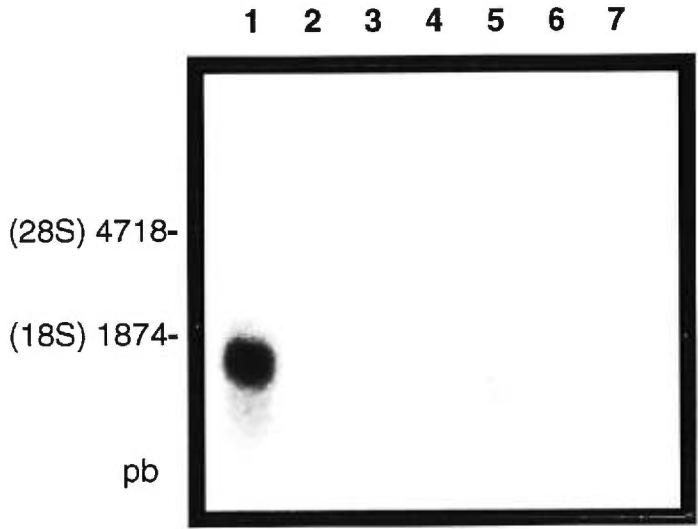
^a La séquence des oligonucléotides est décrite au tableau IV.

[≈ : valeur approximative (i.e. estimation sur gel d'agarose suite à une coloration au bromure d'éthidium)]

[n.v. : non visible suite à la coloration au bromure d'éthidium]

Figure 3.9 Analyse de l'expression de l'ARNm de BSP-A3 par Northern blot.

Dix microgrammes d'ARN total provenant de différents tissus bovins ont été séparés sur un gel d'agarose 1% contenant du formaldéhyde, transférés sur une membrane de nylon, puis hybridés à forte stringence avec un fragment de l'ADNc de BSP-A3 marqué radioactivement. Puit #1, ARN de vésicules séminales; puit #2, ARN du coeur; puit #3, ARN du cerveau; puit #4, ARN du foie; puit #5, ARN d'ampoules; puit #6, ARN de la prostate; puit #7, ARN d'épididymes. La longueur approximative de l'ARNm a été déterminé suite à l'autoradiographie en comparant avec la position des bandes d'ARN ribosomales.



la RNase, seul un signal a été détecté dans les vésicules séminales et dans l'ampoule. De plus, le signal obtenu dans l'ampoule est environ 50 fois moins intense par rapport à celui détecté dans les vésicules séminales. Aucun signal n'a été détecté dans le coeur, le cerveau, le foie, la prostate ainsi que l'épididyme. En se basant sur la position des bandes d'ARN ribosomales 18S (1874 pb) et 28S (4718 pb), comme marqueurs de poids moléculaires connus, la longueur de l'ARNm de BSP-A3 a été grossièrement estimée à 860 pb.

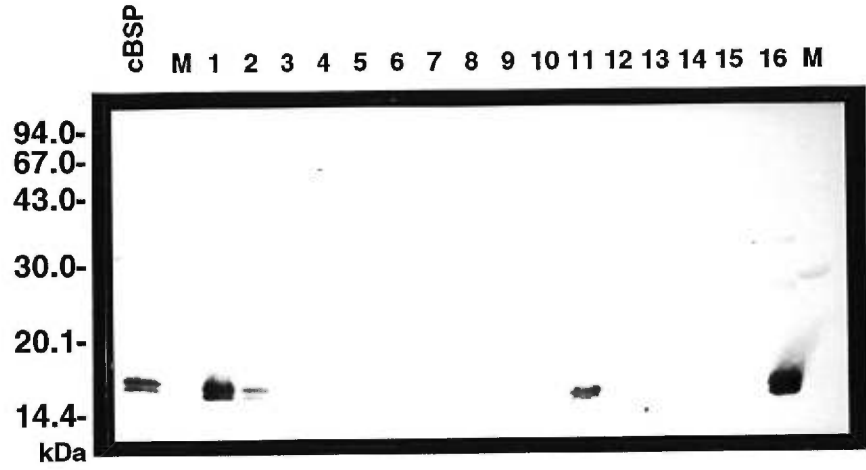
3.2.3. Analyse de l'expression des protéines BSP par immunodétection

L'expression des protéines BSP-A1/A2, -A3 et 30kDa a été analysée dans plusieurs tissus bovins à l'aide d'anticorps spécifiques, dans le but de vérifier la présence de protéines immunologiquement reliées à chacune des protéines BSP dans ces tissus. Les résultats des immunodétections sont présentés à la figure 3.10. À l'aide de l'anticorps anti-BSP-A1/A2, seul un doublet protéique ayant un poids moléculaire d'environ 16 à 16,5 kDa (correspondant à la protéine BSP-A1/A2) a été détecté dans les vésicules séminales, dans les ampoules et dans la prostate (Fig. 3.10a, colonnes 1, 2, 11 et 16). À l'aide de l'anticorps anti-BSP-30kDa, seule une protéine ayant un poids moléculaire d'environ 28 kDa (correspondant à la protéine BSP-30kDa) a été décelée dans les vésicules séminales, dans les ampoules et dans la prostate (Fig. 3.10b, colonnes 1, 2, 11 et 16). Le doublet protéique détecté à la colonne 16 de la figure 3.10b correspond à la protéine BSP-A1/A2, celle-ci a réagit parfois avec l'anticorps anti-BSP-30kDa. À l'aide de l'anticorps anti-BSP-A3, seule une protéine ayant un poids moléculaire d'environ 15 kDa (correspondant à la protéine BSP-A3) a été détectée dans les vésicules séminales, dans les ampoules et dans la prostate (Fig. 3.10c, colonnes 1, 2, 10 et 15). Aucun autre signal significativement intense pouvant correspondre à une protéine immunologiquement reliée aux protéines BSP n'a été

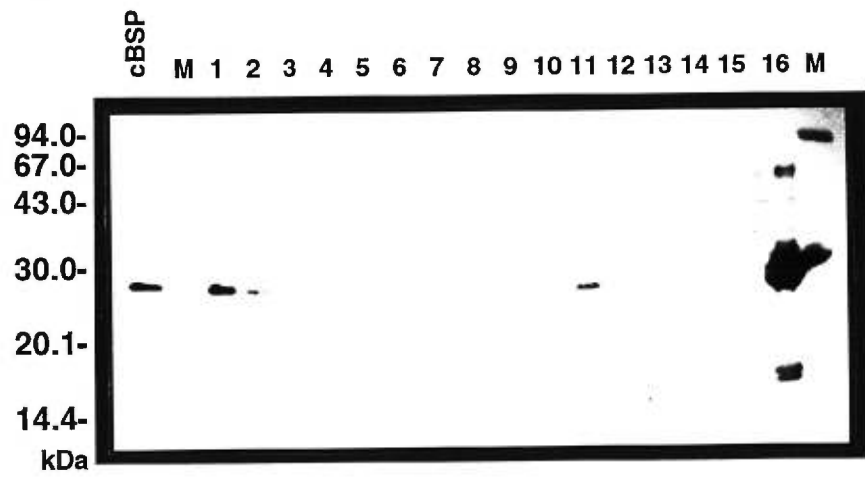
Figure 3.10 Immunodétection des fractions protéiques solubles provenant de différents tissus bovins à l'aide des anticorps anti-BSP.

Les protéines (150 µg) provenant des extraits solubles (surnageants) de différents tissus bovins ont été séparées sur un gel SDS-PAGE. Ces protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF afin d'y être soumises à une immunodétection avec l'anticorps **A**) anti-BSP-A1/A2, ou **B**) anti-BSP-30kDa ou **C**) anti-BSP-A3. L'ordre des tissus pour les figures A et B est la suivante: (1) les vésicules séminales; (2) les ampoules; (3) vide; (4) les épидидymes; (5) les testicules; (6) les reins; (7) le coeur; (8) le cerveau; (9) les poumons; (10) le foie; (11) la prostate; (12) les artères; (13) le tissu adipeux; (14) l'intestin grêle; (15) le petit intestin et (16) les vésicules séminales. L'ordre des tissus pour la figure C est la suivante: (1) les vésicules séminales; (2) les ampoules; (3) les épидидymes; (4) les testicules; (5) les reins; (6) le coeur; (7) le cerveau; (8) les poumons; (9) le foie; (10) la prostate; (11) les artères; (12) le tissu adipeux; (13) l'intestin grêle; (14) le petit intestin; (15) les vésicules séminales et (16) vide. Les standards de poids moléculaire (M) sont décrits à la section 2.3.4.1. et environ 300 ng d'un précipité protéique du plasma séminal bovin (cBSP) a été ajouté comme contrôle positif.

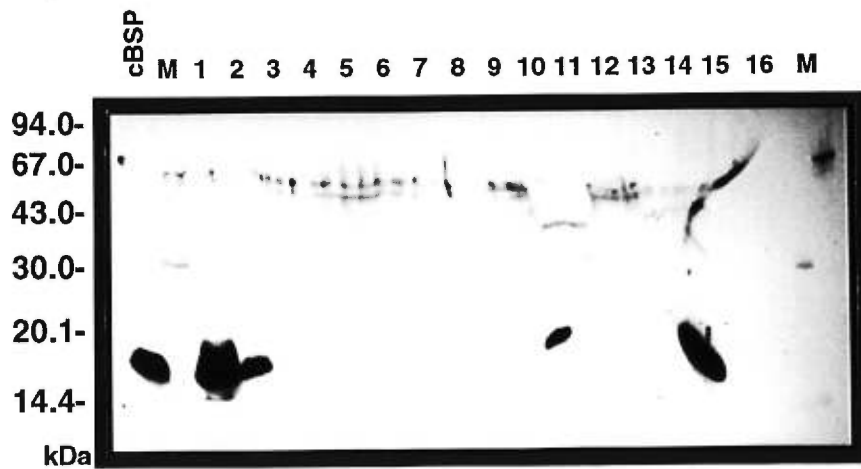
A) Ac anti-BSP-A1/A2



B) Ac anti-BSP-30kDa



C) Ac anti-BSP-A3



décelé, dans les épидидymes, les testicules, les reins, le coeur, le cerveau, les poumons, le foie, les artères, le tissu adipeux, l'intestin grêle ainsi que le petit intestin.

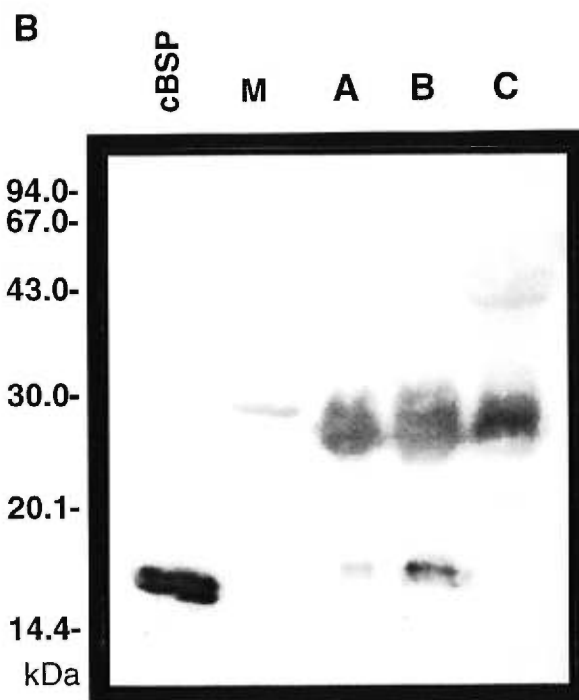
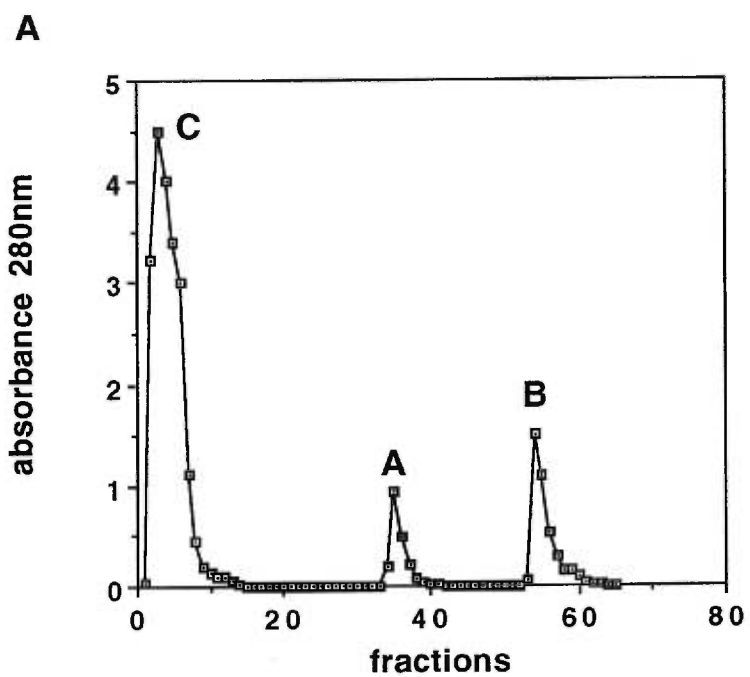
3.2.4. Purification des protéines liant la phosphorylcholine à partir du sérum bovin

Afin d'isoler les protéines sériques du taureau liant la phosphorylcholine, le sérum bovin a été soumis à une chromatographie d'affinité sur une colonne PPC-agarose et les protéines liées ont été éluées avec de la choline (entre en compétition avec les sites de liaisons). Cette méthode est utilisée pour purifier les protéines BSP à partir du plasma séminal (Desnoyers et Manjunath, 1993; Leblond et coll., 1993). Le schéma de purification est démontré à la figure 3.11a. Selon la proportion des pics d'absorbance, la grande majorité des protéines se retrouvent dans la fraction non-absorbée (lavage), une faible quantité de protéines liées à la colonne est éluée en présence de choline (première élution) et une plus grande proportion de protéines plus fortement liées nécessitent de l'urée pour être éluées (deuxième élution). Les protéines contenues dans les fractions de lavage et dans chacune des éluions avec la choline et l'urée ont été soumises à une immunodétection avec l'anticorps anti-BSP-A1/A2. Les résultats de cette immunodétection sont présentés à la figure 3.11b. Une protéine d'environ 28 kDa est décelée dans les trois échantillons et un doublet protéique d'environ 16 kDa est détecté seulement dans la première (choline) et la deuxième (urée) élution. Une immunodétection contrôle en présence de l'anticorps secondaire seulement, n'a décelé que la protéine de 28 kDa (résultat non présenté). Ceci a confirmé la spécificité de l'immunodétection du doublet protéique à 16 kDa. Ce doublet protéique correspond sans doute aux deux isoformes de la protéine BSP-A1/A2. L'isoforme supérieur du doublet semble être en plus grande quantité que la protéine inférieure, puisque le signal de la bande du haut est plus intense que celui de la bande du bas. La quantité des deux isoformes a été estimée à environ 40 ng

Figure 3.11 Purification des protéines sériques du taureau liant la phosphorylcholine et leur immunodétection à l'aide de l'anticorps anti-BSP-A1/A2.

A) Profil chromatographique des différentes éluions de la colonne d'affinité PPC-agarose. Le pic C contient les protéines non-absorbées à la colonne (lavage PB/0,5 M NaCl), le pic A contient les protéines liées à la colonne et éluées lors de la première élution (PB/ 0,3 M NaCl/ 0,2 M choline) et le pic B contient les protéines liées à la colonne et éluées lors de la deuxième élution (PB/ 8 M urée/ 0,2 M choline).

B) Les protéines (150 µg) contenues dans les différentes éluions ont été séparées sur un gel SDS-PAGE, puis transférées sur une membrane de PVDF afin d'y être soumises à une immunodétection avec l'anticorps anti-BSP-A1/A2. Les lettres coïncident avec les pics d'absorbance de la figure A. Les standards de poids moléculaire (M) sont décrits à la section 2.3.4.1. et environ 300 ng d'un précipité protéique du plasma séminal bovin (cBSP) a été ajouté comme contrôle positif.



(concentration des éluions A et B réunis), en comparant l'intensité des bandes avec celle du contrôle positif (cBSP) ayant une concentration connue de protéine BSP-A1/A2 (≈ 120 ng). Notons que toutes ces expériences ont été répétées une deuxième fois afin de s'assurer que les résultats obtenus étaient bien reproductibles (résultats non présentés).

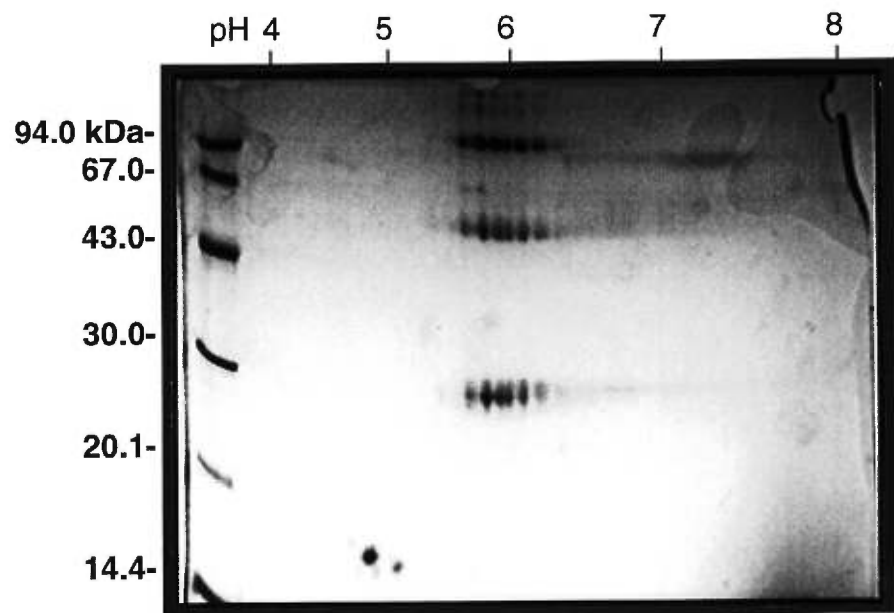
3.2.5. Électrophorèse sur deux dimensions des protéines sériques bovines liant la phosphorylcholine

Afin de déterminer le point isoélectrique des protéines du sérum bovin liant la phosphorylcholine, les protéines liées à la colonne PPC-agarose et éluées avec la solution PB/ 0,2 M choline/ 0,3 M NaCl ont été séparées par une électrophorèse sur deux dimensions. Les résultats de la coloration du gel au bleu de Coomassie sont présentés à la figure 3.12. Des protéines ayant un poids moléculaire d'environ 28 , 60, 90 kDa et possédant plusieurs isoformes se situant entre pH 5,8 et 6,3 ont été révélées. Le micro-séquençage partiel de ces protéines nous a permis de conclure que c'étaient en fait des fragments d'immunoglobulines.

Également, plusieurs protéines de petits poids moléculaire (entre 15-17 kDa) ayant un point isoélectrique se situant entre 4,6 et 5,2 ont été faiblement détectées par la coloration. Parmi ces protéines, quelques unes correspondent probablement au doublet protéique détecté par l'anticorps BSP-A1/A2 (voir section précédente). Cette protéine semble donc être une protéine acide, tout comme la protéine BSP-A1/A2.

Figure 3.12 Séparation par une électrophorèse bidimensionnelle des protéines éluées de la colonne PPC-agarose avec la choline.

Trois cents millilitres de sérum bovin ont été passés sur la colonne PPC-agarose. Deux cents cinquante microgrammes de protéines liées à la colonne PPC-agarose et éluées avec la solution PB/ 0,2 M choline/ 0,3 M NaCl ont été séparées par une électrophorèse sur deux dimensions. Le gel SDS-PAGE a été coloré au bleu de Coomassie. Les standards de poids moléculaire (M) sont décrits à la section 2.3.4.1.. Les marqueurs de pH situés en haut du gel sont approximatifs.



4. DISCUSSION

Il est maintenant bien établi que les protéines BSP jouent un rôle dans la régulation de la capacitation des spermatozoïdes chez le bovin. Également, ces mêmes protéines, de par leur abondance dans le plasma séminal et surtout pour leur affinité pour différents facteurs, laisse croire qu'elles pourraient également jouer d'autres fonctions au niveau de la reproduction (voir section 1.5.8.). De plus, des essais radioimmunologiques suggèrent que ces protéines (ou des protéines analogues) seraient également présentes dans le sérum de plusieurs mammifères (Manjunath et coll., 1988). Ces hypothétiques protéines BSP sériques pourraient jouer plusieurs rôles importants, notamment au niveau du transport inverse du cholestérol (Manjunath et coll., 1988 et 1989). Cependant, les résultats des RIA ne sont pas suffisants pour prouver la présence de protéines BSP dans le sang. C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à trouver davantage de preuves de la présence des protéines BSP dans le sang bovin. Deux approches indépendantes ont été utilisées afin de mener à bien ce projet. La première est une approche basée sur la biologie moléculaire consistant à trouver un organe pouvant sécréter les protéines BSP dans le sang par l'analyse de l'expression de leurs ARNm dans différents tissus, tandis que la deuxième est une approche immunologique et constitue à démontrer directement la présence d'une protéine BSP dans le sérum bovin.

4.1. APPROCHE BASÉE SUR LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Avant d'analyser l'expression des ARNm des protéines BSP dans différents tissus bovins par la technique de protection à la RNase, nous devons d'abord cloner les ADNc codant pour chacune de ces protéines. Nous avons séquencé complètement les

deux ADNc codant pour la protéine BSP-A3 et BSP-30kDa (Fig. 3.1 et 3.2). Les deux ADNc possèdent la même séquence consensus pour la méthionine initiatrice (CTACCATGG) et pour le signal de polyadénylation (AATAAA) que l'ADNc de BSP-A1/A2 (Kempe et Sheit, 1988). L'ADNc de BSP-A3 et de BSP-30kDa code respectivement pour un précurseur polypeptidique de 140 et de 183 acides aminés ayant un poids moléculaire estimé à 16 584 Da et 21 721 Da. Les 25 premiers acides aminés sont hautement similaires parmi les précurseurs des protéines BSP et également avec le précurseur protéique de la protéine porcine pB1 (Plucienniczak et coll., GenBank # AF047026) (Fig. 3.3B). Ces résidus forment probablement une séquence signal, car ils sont absents des protéines BSP sécrétées (matures) (Calvete et coll., 1996; Esch et coll., 1983; Seidah et coll., 1987). De plus, ces 25 premiers acides aminés possèdent certaines caractéristiques communes aux peptides signaux présents dans les précurseurs protéiques des eucaryotes. En fait, ils ont un caractère hydrophobe et dans le cas des protéines BSP-A3 et pB1, le noyau de résidues hydrophobes est précédé d'un acide aminé basique (R) (Watson, 1984). Alors, ces résidus sont probablement responsable de la sécrétion des protéines BSP.

Selon les séquences déduites en acides aminés, il y a une (pour BSP-30kDa) ou deux (pour BSP-A3) différences d'acides aminés en comparant avec les séquences primaires publiées des protéines (Calvete et coll., 1996; Seidah et coll., 1987). Nous avons noté que ces différences se retrouvaient dans plusieurs clones provenant de différentes réactions de PCR, excluant la possibilité que ces mêmes différences pouvaient résulter d'erreurs dues à l'amplification ou au séquençage. De plus, la présence lors de la protection à la RNase de BSP-A3 du produit attendu (308 pb) pour la sonde d'ARNm protégée et de pleine longueur, confirme que le changement de base (position 362 sur la séquence de l'ADNc) détecté lors du séquençage est présent dans l'ARNm (Fig. 3.4). Pour BSP-A3, la probabilité que des erreurs soient survenues lors du séquençage de la protéine est faible. Effectivement, si l'on se base sur le fait que

parmi les membres connus de la famille des protéines BSP bovines et des autres espèces, à la position de la première différence, l'acide aminé semble être une glutamine conservée (Q) et un acide aminé basique, lysine (K) ou arginine (R) à la position de la deuxième différence (Table V). Une telle comparaison ne peut être effectuée concernant la proline (P) à la position 13 de BSP-30 kDa, puisque cette région ne démontre aucune similitude avec les séquences protéiques connues jusqu'à maintenant (Calvete et coll., 1996; Calvete et coll., 1997).

Ces différences pourraient être causées par un polymorphisme au niveau des gènes codant pour les protéines BSP. Plusieurs arguments convergent dans cette direction. La présence dans la protection à la RNase de BSP-A3 d'un plus petit fragment d'ARN protégé (approximativement à 270 pb) ayant la même intensité que le produit pleine longueur (Fig. 3.4) suggère la possibilité que ce taureau est hétérozygote au niveau du gène codant pour BSP-A3. Notons que l'ARN total utilisé dans ces expériences fut extrait de tissus provenant d'un autre taureau que celui utilisé pour le clonage des ADNc. Ce plus petit fragment d'ARN n'est pas le résultat d'une liaison croisée entre la sonde BSP-A3 et l'ARN de BSP-A1/A2 ou l'ARN de BSP-30kDa, puisqu'il y a plusieurs différences entre eux au niveau de leurs nucléotides (Fig. 3.3A). De plus, des différences d'acides aminés ont été notés entre la séquence primaire publiée de la protéine porcine pB1 (Calvete et coll., 1997) et la séquence en acides aminés déduite de son ADNc récemment cloné par Plucienniczak et coll. (Genbank #AF047026). Des études supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer si ces différences sont causées par un polymorphisme dans les gènes codant pour les protéines BSP ou dans les gènes similaires chez les autres espèces.

Le seul changement d'acide aminé chez BSP-30kDa ainsi que le premier chez BSP-A3 sont tous deux situés dans la région amino terminale. L'effet de cette substitution est inconnu puisque le rôle de la région amino terminale de chaque protéine

BSP est également inconnu. La deuxième substitution chez BSP-A3 survient au niveau de son second domaine de type II (le domaine b). Ces domaines de type II sont importants pour la fonction biologique des protéines BSP (Moreau et coll., 1998b). En fait, chez la protéine BSP-A1/A2, ce sont des sites de liaison pour les phospholipides de la membrane des spermatozoïdes ayant un groupement choline et pour l'héparine. De plus, la présence des deux domaines de type II est essentiel pour l'expression des propriétés fonctionnelles des protéines BSP, soit l'efflux de lipides et la capacitation des spermatozoïdes (Moreau et coll., 1998b). Alors, on peut supposer que si le changement d'acide aminé du domaine b affecte les propriétés de liaison de ce domaine, la stimulation de l'efflux de cholestérol et la capacitation des spermatozoïdes par cette protéine BSP seront affectées. Ces substitutions d'acides aminés peuvent modifier l'affinité des protéines BSP envers les phospholipides choline de la membrane des spermatozoïdes et ainsi affecter la capacitation des spermatozoïdes induite par l'héparine ou par les HDL. D'une manière réciproque, cela peut influencer leur affinité envers l'héparine ou les HDL et ainsi changer le taux de capacitation des spermatozoïdes. Ainsi, on suppose que cette variation au niveau de la séquence polypeptidique des protéines BSP pourrait être une des causes responsables des différences dans les taux de fécondation des taureaux. En fait, la présence ou l'absence à la surface des spermatozoïdes bovins de protéines ayant une grande affinité pour l'héparine (ces protéines correspondent aux protéines BSP: voir Chandonnet et coll., 1990) influence le potentiel fécondant des taureaux (Bellin et coll., 1994, 1996 et 1998).

Selon les résultats des protections à la RNase, tous les ARNm des protéines BSP sont synthétisés dans les vésicules séminales et dans les ampoules (Fig. 3.4a, 3.5a and 3.6a, lanes 2-6; Fig. 3.4b, lanes 4-7; Fig. 3.5b and 3.6b, lanes 4-6). L'expression est très forte dans ces tissus, puisqu'un signal radioactif très intense est apparu sur le film autoradiographique après une seule nuit d'exposition. Chaque ARNm a été détecté dans un nanogramme d'ARN total de vésicules séminales (Fig. 3.4b, 3.5b, 3.6b lane 6;

Fig. 3.4c lane 1; Fig. 3.5c lane 8 and Fig. 3.6c, lane 15). Aucun signal a été décelé dans 10 µg d'ARN total provenant des testicules, des épидидymes, des autres glandes sexuelles accessoires mâles et des autres tissus (Fig. 3.4c, 3.5c and 3.6c). Ceci suggère que l'expression des ARNm des protéines BSP est au moins 10 000 fois plus faible dans ces tissus que dans les vésicules séminales. Toutefois, il est important de mentionner que même une très faible expression des protéines BSP par ces tissus peut avoir une signification physiologique. En effet, certains tissus sont beaucoup plus volumineux que les vésicules séminales et ainsi même si leur taux d'expression des protéines BSP par cellule est minime, ils pourraient qu'en même produire une quantité suffisante de ces protéines dans la circulation sanguine pour influencer certains processus physiologiques, comme par exemple, l'efflux de cholestérol (Moreau et coll., 1998a). Seule l'utilisation de techniques plus sensibles, comme une protection à la RNase sur de l'ARNm isolé ou un RT-PCR imbriqué, pourraient déterminer si l'expression des gènes BSP dans ces tissus est complètement abolie. Le fait que les vésicules séminales et les ampoules des canaux déférents dérivent de deux régions des canaux Wolffian adjacentes, pourrait expliquer pourquoi les ARNm des protéines BSP sont synthétisés dans ces deux tissus. D'ailleurs, des évidences récentes suggèrent que les vésicules séminales, les ampoules des canaux déférents et les canaux éjaculateurs peuvent être considérés comme une seule unité fonctionnelle, appelée le complexe ampoulo-vésiculaire (Riva et coll., 1989). Notons que la présence de protéines BSP dans les tissus de la femelle est inconnue.

La comparaison du signal obtenu avec l'ARN des ampoules et des vésicules séminales suggère que le taux d'expression des ARNm de BSP-A1/A2 et de BSP-30kDa est le même dans les ampoules et dans les vésicules séminales. Par contre l'ARNm de BSP-A3, semble être 50 fois moins exprimé dans les ampoules que dans les vésicules séminales. Cette différence du niveau d'expression dans l'ampoule a été

confirmée par une analyse northern (Fig. 3.9). La comparaison de l'intensité des signaux, en sachant que les différentes sondes avaient environ la même activité spécifique, suggère que la quantité d'ARNm de BSP-A1/A2 est plus élevée que celle de l'ARNm de BSP-30kDa et que la concentration de l'ARNm de BSP-30kDa est légèrement supérieure à celle de l'ARNm de BSP-A3 dans les vésicules séminales (Fig. 3.4b, 3.5b and 3.6b). Il y a une corrélation entre ces résultats et la proportion de chaque protéine dans le fluide séminal (BSP-A1/A2, ≈65%; BSP-A3, ≈15% and BSP-30kDa, ≈20%; déterminé précédemment par des RIA, (Manjunath et coll., 1988)). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'expression des protéines BSP est contrôlée au niveau de la transcription.

En utilisant une sonde d'ADNc de BSP-30kDa, lors d'une analyse Southern et des conditions d'hybridation à forte stringence, une séquence similaire de 3.7 kb a été détecté dans l'ADN génomique de l'humain, du rat, du hamster et du lapin (Fig. 3.7a), suggérant par le fait même que l'ADN génomique de ces espèces possèdent un gène ayant une similarité importante avec le gène bovin de BSP-30kDa. Ce résultat est en accord avec le fait que dans le plasma séminal de l'humain, du hamster et du rat, des protéines liant la phosphorylcholine et immunologiquement reliées à la protéine BSP-30kDa bovine ont été détectées (Leblond et coll., 1993). Une analyse Southern utilisant une sonde spécifique à l'ADNc de BSP-A1/A2 ou de BSP-A3 et des conditions de forte stringence n'a détecté aucun signal chez l'humain et chez les autres espèces de mammifères (Fig. 3.7b and 3.7c). Le résultat a été le même en utilisant ces deux sondes et des conditions d'hybridation à faible stringence (résultat non présenté). La sonde BSP-30kDa possède la séquence codante pour la région amino terminale qui démontre aucune similarité avec les protéines connues jusqu'à présent (Fig, 3.3A). La détection de gènes similaires chez les différentes espèces en utilisant cette sonde suggère que cette région unique a été très conservée chez les mammifères, tandis que les gènes similaires aux gènes de BSP-A1/A2 et BSP-A3, s'ils sont présents, semblent avoir

rapidement divergé durant l'évolution. Ces gènes sont probablement présents chez les autres espèces, puisque dans le plasma séminal humain, du hamster et du rat, des protéines liant la phosphorylcholine et immunologiquement reliées aux protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3 ont été détectées (Leblond et coll., 1993). De plus, des protéines analogues ont été purifiées chez le cheval (Calvete et coll., 1995) et le porc (Calvete et coll., 1997; Sanz et coll., 1993). L'analyse des gènes des autres espèces similaires aux gènes de BSP-A1/A2 et BSP-A3 sera nécessaire afin de pouvoir confirmer ce taux de mutation élevée. Un haut taux de mutation pourrait suggérer que la séquence primaire n'est pas importante pour la fonction de ces protéines ou bien que ces protéines ont un nouveau rôle à jouer au niveau de la reproduction. En effet, comme il a été mentionné plus tôt, si un ou deux changement d'acides aminés dans les protéines BSP peut influencer la fertilité des taureaux, alors plusieurs différences entre les protéines analogues des différentes espèces peuvent par exemple contribuer à empêcher la reproduction croisée entre les différentes espèces de mammifères.

Dans un autre ordre d'idée, le fait que la région unique de BSP-30kDa soit très conservée entre les espèces pourrait suggérer que ce domaine joue un rôle commun dans les processus de reproduction de plusieurs espèces. En effet, parmi les protéines BSP bovines, c'est BSP-30kDa qui démontre le plus haut taux de capacitation des spermatozoïdes épидидymaires en présence d'héparine (Thérien et coll., 1995) ou de HDL (Thérien et coll., 1997) et sa présence sur la surface membranaire des spermatozoïdes correspond à une augmentation de la fertilité des taureaux (Bellin et coll., 1994, 1996 et 1998). La fonction commune de cette protéine chez les différentes espèces pourrait bien être d'accélérer la capacitation en augmentant les modifications lipidiques au niveau de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Cependant, il se peut que cette région unique se retrouve dans une protéine n'ayant rien à voir avec la reproduction. La caractérisation de cette protéine pourrait tout de même nous aider à déterminer le rôle spécifique de cette région peptidique. Mais il est également possible

que ces gènes détectés chez les autres espèces ne soient même pas exprimés. Le clonage et le séquençage de ces gènes va nous aider à résoudre ces hypothèses. Notons en terminant que tous les gènes codant pour les protéines BSP sont présents chez la vache (Fig. 3.7), prouvant que ces gènes ne sont pas associés au chromosome sexuel mâle (Y).

4.2. APPROCHE IMMUNOLOGIQUE

Les résultats des protection à la RNase ont été confirmés par des immunodétections, i.e. que les protéines BSP seraient seulement produites en grande quantité par les vésicules séminales et par les ampoules (Fig. 3.10). Le signal détecté dans la prostate est probablement dû à une contamination lors du prélèvement de l'organe par un morceau du canal déférent, pouvant contenir à cet endroit les sécrétions des vésicules séminales et des ampoules. Rappelons qu'aucun ARNm de protéines BSP n'a été décelé dans la prostate. Aucune autre protéine ayant un ou des épitopes communs avec les protéines BSP n'a été décelée dans les épидидymes, les testicules, les reins, le coeur, le cerveau, les poumons, le foie, les artères, le tissu adipeux, l'intestin grêle et le petit intestin.

Étant donné qu'aucun tissu pouvant produire les protéines BSP et étant reconnu pour sécréter des protéines dans le sang n'a été retrouvé, nous avons donc décidé de vérifier directement la présence dans le sérum bovin de la protéine BSP-A1/A2 en soumettant à une immunodétection (avec l'anticorps anti-BSP-A1/A2) les protéines du sérum capables de lier la phosphorylcholine. Une protéine ayant plusieurs caractéristiques communes avec BSP-A1/A2 a été détectée. Premièrement, elle lie spécifiquement la phosphorylcholine, consiste en un doublet protéique d'environ 16 kDa et est détectée spécifiquement par l'anticorps anti-BSP-A1/A2 (Fig. 3.11). Deuxièmement, selon les résultats de l'immunodétection, la protéine supérieure du

doublet est en plus grande concentration que la protéine inférieure, puisque le signal de détection de la bande du haut est plus intense que celle de la bande du bas. Ce résultat est en accord avec le fait que l'isoforme glycosylé de BSP-A1/A2 est normalement en quantité supérieure dans le plasma séminal et ce par rapport à l'isoforme non-glycosylé (voir section 1.5.2.2.). Troisièmement, selon l'électrophorèse bidimensionnelle, le doublet protéique à 16 kDa serait une protéine acide. Notons que ce résultat n'est pas particulièrement convaincant, puisque rien ne nous indique que ce doublet protéique soit parmi les protéines détectées par la coloration au bleu de Coomassie. Il aurait été préférable de transférer les protéines sur une membrane et les soumettre à une immunodétection avec l'anticorps anti-BSP-A1/A2. De toute façon, les autres indices nous laissent croire que cette protéine sérique est en réalité la protéine BSP-A1/A2. Le microséquençage d'une partie de cette protéine devrait probablement nous le confirmer. On suggère qu'une certaine quantité de BSP-A1/A2 dans le sérum existerait sous une forme libre puisque ces protéines ont interagi directement avec la colonne PPC-agarose. Ajoutons que la concentration de protéines BSP-A1/A2 sériques serait très faible, contrairement à sa concentration dans le plasma séminal. Ce dernier résultat est en accord avec les précédentes concentrations mesurées par les RIA (Manjunath et coll., 1988). Il est également possible que les protéines BSP soient en plus grande concentration dans le sérum mais que la majorité de celles-ci soient liées aux cellules des tissus via des interactions avec les lipides des membranes cellulaires, plutôt que d'être libre dans le sérum.

Alors, plusieurs hypothèses concernant l'origine tissulaire des protéines BSP sériques se posent. La première hypothèse est que les vésicules séminales et/ou les ampoules seraient en réalité capables de sécréter des protéines dans le sang. La deuxième est qu'un tissu qui n'a pas été étudié lors de ces expériences sécréterait ces protéines dans le sang. La troisième est que certains tissus utilisés lors des expériences contiendraient très peu de copies d'ARNm des protéines BSP par cellule et que les

conditions de protection à la RNase utilisées n'ont pas pu les détecter. Tel qu'il a été mentionné précédemment, ces tissus par leur grosse taille pourraient quand même produire une quantité suffisante de ces protéines dans la circulation sanguine. Finalement, la quatrième hypothèse est tiré du fait qu'il se peut fort bien que les immunoglobulines du plasma séminal humain origineraient du sang, i.e. que celles-ci pourraient diffuser à travers une barrière entre le sang et le plasma séminal (Friberg et Tilly-Friberg, 1976). Alors il est possible que la migration inverse puisse se produire à travers cette barrière, i.e. que des protéines du plasma séminal pourraient passer en petite quantité dans la circulation sanguine. Des expériences futures seront nécessaires afin de déterminer l'origine tissulaire des protéines BSP sériques et afin de vérifier si ces mêmes protéines ont un rôle physiologique, notamment dans le transport inverse du cholestérol.

4.3. CONCLUSION

L'approche basée sur la biologie moléculaire nous a indiqué que les protéines BSP sont synthétisées seulement par les vésicules séminales et les ampoules, suggérant pour l'instant que ces mêmes protéines jouent un rôle principalement en reproduction, puisque leurs ARNm sont exprimés fortement seulement chez ces deux glandes sexuelles accessoires. Par contre, l'approche immunologique nous a permis de recueillir plusieurs indices nous indiquant que les protéines BSP se retrouveraient en faible concentration dans le sang bovin.

De plus, nous avons déterminé la séquence complète des ADNc codant pour les protéines BSP-A3 et BSP-30kDa. Deux différences au niveau des acides aminés de BSP-A3 et une pour BSP-30kDa ont été trouvées dans les séquences d'acides aminés déduites des ADNc, lorsqu'elles sont comparées aux séquences primaires des protéines déjà publiées. Nous suggérons que ces substitutions d'acides aminés chez BSP-A3 pourraient être causées par un polymorphisme génétique.

Finalement, nous proposons que les protéines apparentées aux protéines BSP chez l'homme, le rat, le hamster et le lapin pourraient avoir de nombreuses différences au niveau de leurs acides aminés, puisqu'aucun gène similaire n'a été détecté avec les sondes d'ADNc de BSP-A1/A2 et BSP-A3, lors d'analyses Southern en utilisant des conditions d'hybridation à forte et même à faible stringence. Ces différences pourraient être importantes dans le blocage de la fécondation croisée entre différentes espèces de mammifères ou elles pourraient indiquer que la séquence primaire de ces protéines est peu importante pour leur fonction.

4.4. PERSPECTIVES

Plusieurs études qui devront être faites dans l'avenir ont été citées tout le long de la discussion. Cette section décrit d'autres études intéressantes à accomplir prochainement.

4.4.1. Vérification de la présence des autres protéines BSP dans le sérum bovin.

On doit soumettre les protéines du sérum liant la phosphorylcholine à des immunodétections avec l'anticorps anti-BSP-30kDa ou anti-BSP-A3. De plus, on doit également étudier la présence de protéines BSP dans le sang d'une femelle. Puis finalement, nous vérifierons l'association de ces protéines à la surface des membranes cellulaires. Les protéines contenues dans les culots insolubles (contiennent les débris cellulaires) obtenus lors des extraction protéiques décrits à la section 2.3.2.1. seront séparées par un gel SDS-PAGE, transférées sur une membrane de PVDF, puis soumises à une immunodétection avec un des trois anticorps anti-protéine BSP. Ces culots seront préalablement délipidés par une extraction au méthanol/ chloroforme afin d'éliminer les lipides pouvant interférer avec la migration sur gel, le transfert et l'immunodétection.

4.4.2. Vérification de l'association des protéines BSP sériques avec les HDL.

On suppose qu'une bonne partie des protéines BSP sériques seraient associées aux HDL et le fait de prouver cette association pourrait indiquer que les BSP ont un rôle à jouer au niveau du métabolisme lipidique. Cette association sera vérifiée comme suit: premièrement, on isolera les HDL du sérum bovin par une ultracentrifugation sur un gradient de bromure de potassium. Ces lipoprotéines une fois purifiés, seront

délipidées par des traitement successifs avec une solution de méthanol/chloroforme. En conditions normales, les protéines devraient précipiter lors de la délipidation. L'échantillon sera ensuite centrifugé et le culot de protéines sera lavé avec de l'éther anhydre, puis séché sous un jet d'azote. Finalement, une partie du culot sera fractionné par un gel SDS-PAGE, transféré sur une membrane de PVDF, puis soumis à une immunodétection avec un des trois anticorps anti-protéine BSP.

4.4.3. Expression de différentes régions de l'ADNc codant pour la protéine BSP-30kDa tronquée dans *E. coli*.

L'expression de protéines BSP tronquées nous permettrait d'identifier spécifiquement les régions de ces protéines qui sont responsables de l'efflux de cholestérol au niveau des membranes cellulaires et de la capacitation des spermatozoïdes. De plus, la technique de mutagenèse dirigée sera utilisée dans le but d'évaluer l'importance de certains acides aminés dans l'efflux lipidique et dans la capacitation par les protéines BSP. Les peptides seront exprimés dans *E. coli* à l'aide de la trousse Qiaexpress IV de Qiagen, puisqu'un domaine de type II de la fibronectine humaine a déjà été exprimé avec succès dans cette cellule hôte (Banyai et coll., 1990). Tout d'abord, quatre régions de l'ADNc de BSP-30kDa seront amplifiées par PCR: 1) la région de l'ADNc recouvrant la protéine complète, 2) la région de l'ADNc recouvrant seulement les deux domaines de type II, 3) la région de l'ADNc recouvrant seulement le premier domaine et la queue N-terminale, puis 4) la région de l'ADNc recouvrant seulement la queue N-terminale de la protéine. Chaque produit de PCR sera cloné selon le bon cadre de lecture dans un vecteur d'expression pQE de Qiagen, séquencé afin de vérifier la nature de l'ADNc et exprimé dans *E. coli*, en suivant les directives du fabricant. Les vecteurs pQE ajoute un HIS-tag et cela va être très utile pour purifier le peptide exprimé. Cet HIS-tag, lors de la purification de la protéine exprimée, va permettre de procéder à différents essais de dénaturation et de renaturation, comme il a

été cité précédemment (Banyai et coll., 1990) afin que la protéine puisse gagner ces propriétés fonctionnelles. Les peptides exprimés seront soumis à différents tests de liaison par chromatographie d'affinité avec l'héparine, la choline, l'apoA-I et seront utilisés dans des expériences d'efflux de cholestérol et de capacitation de spermatozoïdes.

5. BIBLIOGRAPHIE

Adams, C.E. et Chang, M.C. (1962) Capacitation of rabbit spermatozoa in the fallopian tube and in the uterus. *J. Exp. Zool.*, **151**: 159-165.

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

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

Almeida, E.A.C., Huovila, A.P.J., Sutheland, A.E., Stephens, L.E., Calarco, P.G., Shaw, L.M., Mercurio, A.M., Sonnenberg, A., Primakoff, P., Myles, D.G. et Whites, J.M. (1995) Mouse egg integrin $\alpha 6\beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell*, **81**: 1095-1104.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, E.W., et Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403-410

Amelar, R.D. et Dubin, L. (1977) Semen analysis. dans: Male Infertility. (édit. Amelar, R.D., Dubin, L. et Walsh, P.C.) W.B. Saunders, Philadelphia, pp 105-140.

Anderson, G.B. (1991) Fertilization, Early Development, and Embryo Transfer. dans: Reproduction in Domestic Animals. (édit Cupps, P.T.), Academic Press, Inc., New York. pp 279-313.

Aumüller, G. et Seitz, J. (1990) Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int. Rev. Cytol.*, **121**: 127-231.

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

Austen, B.M. (1979) Predicted secondary structures of amino-terminal extension sequences of secreted proteins. *FEBS Lett.*, **103**: 308-313.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1991), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons. Inc., New York.

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

Bányai, L., Tordai, H. et Patthy, L. (1996) 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.

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

Bellin, M.E., Hawkins, H.E. et Ax, R.L. (1994) Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J. Anim. Sci.*, **72**: 2441-2448.

Bellin, M.E., Hawkins, H.E., Oyarzo, J.N., Vanderboom, R.J. et Ax, R.L. (1996) Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. *J. Anim. Sci.*, **74**: 173-182.

Bellin, M.E., Oyarzo, J.N., Hawkins, H.E., Zhang H., Greg Smith, R., Forrest, D.W., Sprott, L.R. et Ax, R.L. (1998) Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J. Anim. Sci.*, **76**: 2032-2039.

Beato, M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, **56**: 335-344.

Bedford, J.M. (1975) Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. dans: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System. (édit. Hamilton, D.W. et Greep, R.O.) American Physiological Society, Washington, D.C., pp 303-317.

Bellve, A.R. et O'Brien, D.A. (1983) The mammalian spermatozoa: structure and temporal assembly. dans: Mechanism and control of animal fertilization. (édit. Hanman, J.F.), Academic Press, New York. pp 55-137.

Bischoff, P., Martin-Du-Pan, R., Lauber, K., Girard, J.P., Hermann, W.L. et Sizonenko, P.C. (1983) Human seminal plasma contains a protein that shares physicochemical, immunochemical, and immunosuppressive properties with pregnancy-associated plasma protein-A. *J. Clin. Endo. Met.*, **56**: 359-362.

Bouvet, J.P., Couderc, J. et Pillet, J. (1987) In vivo et in vitro immunosuppression in mice by a 100-110 kDa fraction from boar seminal plasma. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, **14**: 135-140.

Brackett, B.G. et Server, J.B. (1970) Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus. *Fertil. Steril.*, **21**: 687-695.

Brantmeier, S.A., Grummer, R.R. et Ax R.L. (1987) Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J. Dairy Sci.*, **70**: 2145-2149.

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

Bräuer, C. et Scheit, K.H. (1991) Characterization of the gene for the bovine seminal vesicle secretory protein SVSP109. *Biochem. Biophys. Acta*, **1090**: 259-260.

Bronson, R.A., Gailit, J., Bronson, S. et Oula, L. (1995) Echistatin, a disintegrin, inhibits sperm-oolemmal adhesion but not oocyte penetration. *Fert. Ster.*, **64**: 414-420.

- Brooks, D.E. (1979) Biochemical environment of sperm maturation. dans: The spermatozoa. (édit. Fawcett, D.W. et Bedford, J.M.) Urban and Schwarzenberg, Baltimore. pp 23-34.
- Bunge, R.G. (1970) Some observations on the male ejaculate. *Fertil. Steril.*, **21**: 639-644.
- Byskov, A.G. et Hoyer, P.E. (1988) Embryology of mammalian gonads and ducts. dans: The Physiology of Reproduction. (édit. Knobil, E. et Neill, J.D.), Raven Press, New York, pp 265-302.
- Calvete, J.J., Mann, K., Sanz, L., Raida, M., et Töpfer-Petersen, E. (1996a) The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett.*, **399**: 147-152.
- Calvete, J.J., Mann, K., Schäfer, W., Sanz, L., Reinert, M., Nessau, S., Raida, M. et Töpfer-Petersen, E. (1995) Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem. J.*, **310**: 615-622.
- Calvete, J.J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L. et Töpfer-Petersen, E. (1997) Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett.*, **407**: 201-206.
- Calvete, J.J., Raida, M., Sanz, L., Wempe, F., Scheit, K.H., Romero, A., et Töpfer-Petersen, E. (1994) Localization and structural characterization of an oligosaccharide O-linked to bovine PDC-109. Quantitation of the glycoprotein in seminal plasma and on the surface of ejaculated and capacitated spermatozoa. *FEBS Lett.*, **350**: 203-206.
- Calvete, J.J., Sanz, L., Enßlin, M., et Töpfer-Petersen, E. (1996b) Sperm surface proteins. *Reprod. Dom. Anim.*, **31**: 101-106.
- Calvete, J.J., Varela, P.F., Sanz, L., Romero, A., Mann, K., et Töpfer-Petersen (1996c) A Procedure for the Large-Scale Isolation of Major Bovine Seminal Plasma Proteins. *Protein Expression and Purification*, **8**: 48-56.
- Chandonnet, L., Roberts, K.D., Chapdelaine, A., et Manjunath, P. (1990) Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Molec. Reprod. Dev.*, **26**: 313-318.
- Chang, M.C. (1959) Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature*, **184**:466-467.
- Chang, M.C. (1984) The meaning of sperm capacitation, *J. Androl.*, **5**: 45-50.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid-Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159.
- Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, **15**: 532-537.

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

Coffey, D.S. (1988) Androgen Action and the Sex Accessory Tissues. dans: The Physiology of Reproduction. (édit. Knobil, E. et Neill, J.D.), Raven Press, New York. pp 1081-1119.

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

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

Cross, N.L. et Overstreet, J.W. (1987) Glycoconjugates of the human sperm surface. *Gamete Res.*, **16**: 23-35.

Cuasnicu, P.S., Echeverria, F.G., Piazza, A. et Blaquier, J.A. (1984) Addition of androgens to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, **70**: 541-547.

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

D'Addario, D.A., Turner, T.T. et Howards, S.S. (1980) Effect of vasectomy on the osmolarity of hamster testicular and epididymal intraluminal fluid. *J. Androl.*, **1**: 167-170.

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

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

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

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

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

Davis, B.K. et Hungund, B.J. (1976) Effect of modified membrane vesicles from seminal plasma on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **69**: 1004-1010.

- Demott, R.P. et Suarez, S.S. (1992) Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol. Reprod.*, **46**: 779-785.
- Dennis, E.A. (1994) Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, **269**: 13057-13060.
- Desnoyers, L. et Manjunath, P. (1992) Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **267**: 10149-10155.
- Desnoyers, L. et 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.
- Desnoyers, L. et Manjunath, P. (1994) Major Proteins of Bovine Seminal Fluid Bind to Insulin-like Growth Factor-II. *J. Biol. Chem.*, **269**: 5776-5780.
- Desnoyers, L., Thérien, I., et Manjunath, P. (1994) Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol. Reprod. Dev.*, **37**: 425-435.
- Dorit, R.L., Schoenbacher, L. et Gilbert, W. (1990) How big is the universe of exons? *Science*, **250**: 1377-1382.
- Dukelow, W.R., Chernoff, H.N. et Williams, W.L. (1967) Properties of decapacitation factor and presence in various species. *J. Reprod. Fert.*, **14**: 393-399.
- Eddy, E.M. (1988) The spermatozoon. dans: *The Physiology of Reproduction*. (édit. Knobil, E. et Neill, J.D.), Raven Press, New York. pp 27-68.
- Ehrenwald, E., Foote, R.H. et Parks, J.E. (1990) Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol. Reprod. Dev.*, **25**: 195-204.
- Ehrenwald, E., Parks, J.E. et Foote, R.H. (1988) Cholesterol efflux from bovine sperm: Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Res.*, **20**: 145-157.
- Elstein, M. (1978) The role of cervical mucus in the physiology of sperm transport and its clinical assessment. dans: *Spermatozoa, Antibodies and Infertility*. (édit. Cohen, J. et Hendry, F.), Blackwell, Oxford. pp 55-65.
- Emiliozzi, C. et Fenichel, P. (1997) Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm *in vitro* but is not sufficient for its completion. *Biol. Reprod.*, **56**: 674-679.
- Eng, L.A. et Oliphant, G. (1978) Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol. Reprod.*, **19**: 1083-1094.
- Esch, F.S., Ling, N.C., Böhlen, P., Ying, S.Y. et Guillemin, R. (1983a) Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **113**: 861-867.
- Esch, F.S., Ling, N.C., Ying, S.Y. et Guillemin, Y. (1983b) dans : *Role of Peptides and Proteins in Control of Reproduction* (édit. McCann, S.), Elsevier Science

Publishing Co., Inc.. Peptides of gonadal origin involved in reproductive biology. pp 275-290.

Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. (review) *Science*, **240**: 889-895.

Evans, J.P., Schultz, R.M. et Kopf, G.S. (1995) Mouse sperm-egg plasma membrane interactions: analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin). *J. Cell Sci.*, **108**: 3267-3278.

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

Feinberg, A.P., et Vogelstein, B. (1983) A technique for radio-labelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**: 6-13.

Fielding, C.J. et Fielding, P.E. (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. (review) *J. Lipid Res.*, **36**: 211-228.

Flemming, A.D. et Yanagimachi, R. (1981) 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.

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

Florman, H. et First, N.L. (1988) 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.

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

Friberg, J. et Tilly-Fryberg, I. (1976) Antibodies in human seminal fluid. Dans: Human Semen and Fertility Regulation in Men. (édit. Hafez, E.S.E.), C.V. Mosby, St-Louis, pp 258-264.

Fry, M.R., Ghosh, S.S., East, J.M. et Franson, R.C. (1992) Role of human sperm phospholipase A₂ in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A₂ activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biol. Reprod.*, **47**: 751-759.

George, F.W. et Wilson, J.D. (1988) Sex determination and differentiation dans: The Physiology of Reproduction. (édit. Knobil, E. et Neill, J.D.), Raven Press, New York, pp 3-26.

Gerena, R.L., Irikura, D., Urade, Y., Eguchi, N., Chapman, D.A. et Killian, G.J. (1998) Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol. Reprod.*, **58**: 826-833.

- Gerwig, G.J., Calvete, J.J., Töpfer-Petersen, E., et Vliegthart, J.F.G. (1996) The structure of the O-linked carbohydrate chain of bovine seminal plasma protein PDC-109 revised by H-NMR spectroscopy. A correction. *FEBS Lett.*, **387**: 99-100.
- Go, K.J. et Wolf, D.P. (1985) Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.*, **32**: 145-153.
- Gould, J.E., Overstreet, J.W. et Hanson, F.W. (1985) Interaction of human spermatozoa with the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte following capacitation by exposure to human cervical mucus. *Gamete Res.*, **12**: 47-54.
- Hamilton, D.W., Wenstrom, J.C. et Baker, J.B. (1986) Membrane glycoproteins from spermatozoa: partial characterization of an integral Mr = ca. 24,000 molecule from the rat spermatozoa that is glycosylated during epididymal maturation. *Biol. Reprod.*, **34**: 925-936.
- Harper, M.J.K. (1988) Gamete and Zygote Transport. dans: The Physiology of Reproduction. (édit. Knobil, E. et Neill, J.D.), Raven Press, New York, pp 103-134.
- Hess, E.A., Ludwick, T.M., Martig, R.C. et Ely, F. (1960) Influence of seminal vesiculectomy on certain physical and biochemical properties of bovine semen. *J. Dairy Sci.*, **43**: 256-265.
- Holland, S.K., Harlos, K. et Blake, C.C.F. (1987) Deriving the generic structure of the fibronectin type II domain from the prothrombin Kringle I crystal structure. *EMBO J.*, **6**: 1875-1880.
- Howards, S., Lechene, C. et Vigetsky, R. (1979) The fluid environment of the maturing spermatozoa. dans: The spermatozoa. (édit. Fawcett, D.W. et Bedford, J.M.) Urban and Schwarzenberg, Baltimore. pp 35-41.
- Huggins, C. et Neal, W. (1942) Coagulation and liquefaction of semen. Proteolytic enzymes and citrate in prostatic fluid. *J. Exp. Med.*, **76**: 527-541.
- Hunter, R.H.F., (1980) Physiology and technology of reproduction in female domestic animals. Academic Press, New York.
- Hynes, R.O. (1986), Fibronectins. *Sci. Amer.*, **254**: 42-51.
- Hynes, R.O. et Yamada, K.M. (1982) Fibronectins : Multifonctionnal modular glycoproteins. *J. Cell Biol.*, **95**: 369-377.
- Ishijima, S., McCracken, J.A. et Witman, G.B. (1985) Flagellar movement of intact and demembrated ram spermatozoa., *J. Cell Biol.*, **101**: 364a.
- Ishizaki, J., Hanasaki, K., Higashimo, K., Kishino, J., Kikuchi, N., Ohara, O. et Arita, H. (1994) Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A2 receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**: 5897-5904.
- Jaspard, B., Collet, X., Barbaras, R., Manent, J., Vieu, C., Parinaud, J., Chap. H. et Perret, B. (1996) Biochemical characterization of pre-beta 1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. *Biochemistry*, **35**: 1352-1357.

- James, K. et Hargreave, T.B. (1984) Immunosuppression by seminal plasma and its clinical significance. *Immunol. Today*, **5**: 357-363.
- Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M. et Nussenzweig, M.C. (1995) The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*, **375**: 151-155.
- Jinno, M., Burkman, L.J. et Coddington, C.C. (1987) Human sperm hyperactivated motility and egg penetration. *Biol. Reprod.*, 36 (Suppl. 1) :**53** (abst. 20).
- Jost, A. (1972) A new look at the mechanisms controlling sexual differentiation in mammals. *Johns Hopkins Med. J.*, **130**: 38-53.
- Katz, D.F., Drobnis, E.Z. et Overstreet, J.W. (1989) Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocytes vestments. *Gamete Res.*, **22**: 443-469.
- Kellokumpo-Lehtinen, P., Santti, R. et Pelliniemi, L.J. (1980) Correlation of early cytodifferentiation of the human fetal prostate and Leydig cells. *Anat. Rec.*, **196**: 263-273.
- Kemme, M., Madiraju, M.V.V.S., Krauch, E., Zimmer, M. et Scheit, K.H. (1986) The major protein of bull seminal plasma is a secretory product of seminal vesicle. *Biochem. Biophys. Acta*, **884**: 282-290.
- Kemme, M. et Scheit, K.H. (1988a) Cloning and sequence analysis of a cDNA clone from seminal vesicle tissue encoding the precursor of the major protein of bull semen. *Nucleosides and Nucleotides*, **7**: 693-697.
- Kemme, M. et Scheit, K.H. (1988b) 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.
- Killian, G.J., Chapman, D.A. et Rogowski, L.A. (1993) Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.*, **49**: 1202-1207.
- Kohane, A.C., Cameo, M.S., Pineiro, L., Garberi, J.C. et Blaquier, J.A. (1980a) Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol. Reprod.*, **23**: 181-187.
- Kohane, A.C., Gonzalez Echeverria, F.M.C., Pineiro, L. et Blaquier, J.A. (1980b) Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **23**: 737-742.
- Kopecny, V., Flechon, J.E. et Pivko, J. (1984) Binding of secreted glycoproteins to spermatozoa in the mammalian epididymis: a fine structure autoradiographic study. *Anat. Rec.*, **208**: 197-206.
- Kopf, G.S. et Gerton, G.L. (1991) The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. dans: Elements of mammalian fertilization. (édit. Wasserman, P.M.), CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 153-203.

- Kozak, M. (1984a) Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin *in vivo*. *Nature*, **308**: 241-246.
- Kozak, M. (1984b) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nuc. Acids Res.*, **12**: 857-872.
- Kretser, D.M. et Kerr, J.B. (1988) The Cytology of the Testis. dans: The Physiology of Reproduction. (édit. Knobil, E. et Neill, J.D.), Raven Press, New York, pp 837-932.
- Lakoski, K.A., Carron, C.P., Cabot, C.L. et Saling, P.M. (1988) Epididymal maturation and the acrosomal reaction in the mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigens. *Biol. Reprod.*, **38**: 221-233.
- Lane, M.E., Thérien, I., Moreau, R. et Manjunath, P. (1998) Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol. Reprod.*, **60**: (sous presse).
- Langlais, J., Kan, F.W.K., Granger, L., Raymond, L., Bleau, G. et Roberts, K.D. (1988) Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Gamete. Res.*, **20**: 185-201.
- Leblond, E., Desnoyers, L. et 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.
- Lechene, C. (1982) Elemental and biochemical microanalysis of the male reproductive tract. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **383**: 513-526.
- Leclerc, P., de Lamirande, E. et Gagnon, C. (1996) Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol. Reprod.*, **55**: 684-692.
- Lee, C.N., Handrow, R.R., Lenz, R.W. et Ax, R.L. (1985) Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa *in vitro*. *Gamete Res.*, **12**: 345-355.
- Lefebvre, R., Chenoweth, P.J., Drost, M., LeClear, C.T., MacCubbin, M., Dutton, J.T. et Suarez, S.S. (1995) Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biol. Reprod.*, **53**: 1066-1074.
- Lefebvre, R. et Suarez, S.S. (1996) Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol. Reprod.*, **54**: 575-582.
- Legault, Y., Bouthilier, M., Bleau, G., Chapdelaine, A. et Roberts, K.D. (1979) The sterol and sterol sulfate content of the male hamster reproductive tract. *Biol. Reprod.*, **20**: 1213-1219.
- Lenz, R.W., Ax, R.L., Grimek, H.J. et First, N.L. (1982) Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **106**, **4** : 1092-1098.
- Leyton, L. et Saling, P. (1989a) Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J. Cell. Biol.*, **108**: 2163-2168.

- Leyton, L. et Saling, P. (1989b) 95 KDa sperm proteins binds ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell*, **57**: 1123-1130.
- Lin, Y. et Kan, F.W.K. (1996) Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol. Reprod.*, **55**: 1133-1146.
- Liu, C., Litscher, E.S., Mortillo, S., Sakai, Y., Kinloch, R.A., Stewart, C.L. et Wassarman (1996) Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**: 5431-5436.
- Llanos, M.N., Lui, C.W. et Meizel, S. (1982) Studies of phospholipase A₂ related to the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.*, **221**: 107-117.
- Llanos, M.N. et Meizel, S. (1983) Phospholipid methylation increases during capacitation of golden hamster sperm *in vitro*. *Biol. Reprod.*, **28**: 1043-1051.
- Lobel, P., Dahms, N.M., Breitmeyer, J., Chirgwin, J.M. et Kornfeld, S. (1987) Cloning of the bovine 215-kDa cation-independent mannose-6-phosphate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **84**: 2233-2237.
- Lütcke, N.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F. et Scheele, G.A. (1987) Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.*, **6**: 43-48.
- MacDonald, R.G., Pfeffer, S.R., Coussens, L., Tepper, M.A., Brocklebank, C.M., Mole, J.E., Anderson, J.K., Chen, E., Czech, M.P. et Ullrich, A. (1988) A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate. *Science*, **239**: 1134-1137.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L. et Tolbert, M.E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, **87**: 206-210.
- Manjunath, P. (1984), Gonadotropin release and stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. dans : Gonadal Proteins and Peptides and their Biological Significance, (édit Sairam, M.R. et Atkinson, L.E.), World Scientific Publishing Co., Singapore. pp 49-61.
- Manjunath, P., Baillargeon, L., Marcel, Y.L., Seidah, N.G., Chrétien, M. et Chapdelaine, A. (1988) Diversity of novel proteins in gonadal fluids. dans : Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidinergetic Systems (édit. McKerns, K.W. et Chrétien, M.), Plenum Publishing Corp., New York, pp 259-273.
- Manjunath, P., Chandonnet, L., Leblond, E. et Desnoyers, L. (1994) Major Proteins of Bovine Seminal Vesicles Bind to Spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **50**: 27-37. (Erratum: *Biol. Reprod.* 1994; 50: 977).
- Manjunath, P., Marcel, Y.L., Uma, J., Seidah, N.G., Chrétien, M. et Chapdelaine, A. (1989) Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J. Biol. Chem.*, **264**: 16853-16857.

- Manjunath, P. et Sairam, M.R. (1987) Purification and biochemical characterisation of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem. J.*, **241**: 685-692.
- Manjunath, P., Sairam, M.R. et Uma, J. (1987) Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci. Rep.*, **7**: 231-237.
- Mann, T. et Lutwak-Mann, C. (1981) Male Reproductive Function and Semen. Springer-Verlag, New-York.
- Mason, A.J., Hayflick, J.S., Ling, N., Esch, F., Ueno, N., Ying, S.Y., Guillemin, R., Niall, H.D. et Seeburg, P.H. (1985) A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Nature* **318**: 659-663.
- Mason, A.J., Niall, H.D. et Seeburg, P.H. (1986) Structure of two human ovarian inhibins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **135**:957-964.
- Matousek, J. et Stanek, R. (1993) Immunosuppressive and leucolytic effect of phospholipid binding protein in bull seminal plasma. *Anim. Reprod. Sci.*, **31**: 1-6.
- McLean, J.W., Tomlison, J.E., Kuang, W.J., Eaton, D.L., Chen, E.Y., Fless, G.M., Scanu, A.M. et Lawn, R.M. (1987) cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature*, **300**: 132-137.
- McMullen, B.A. et Fujikawa, K. (1985) Amino acid sequence of the heavy chain of human alpha-factor XIIa (activated Hageman factor). *J. Biol. Chem.*, **260**: 5328-5341.
- Meizel, S. et Turner, K.T. (1991) Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol. Cell Endocrinol.*, **11**: 1-5.
- Metafora, S., Peluso, G., Persico, P., Ravagnan, G., Esposito, C. et Porta, R. (1989) Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. *Biochem. Pharmacol.*, **38**: 121-131.
- Michod, R.E. et Levin, B.R. (1987) The evolution of sex. (édit. Michod, R.E. et Levin, B.R.) Sinauer Associates, Saunderland, Massachusetts.
- Miller, D.J. et Ax, R.L. (1988) Seminal plasma: what is it and why is it important. *Proc. 12th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.*, 97-107.
- Miller, D.J., Winer, M.A. et Ax, R.L. (1990) Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol. Reprod.*, **42**: 899-915.
- Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y. et Kitamura, N. (1993) 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.

Moreau, R., Frank, P.G., Perreault, C., Marcel, Y.L. et Manjunath, P. (1998a) Seminal plasma choline phospholipid-binding proteins stimulates cellular cholesterol and phospholipid efflux. soumis à *Biochem. Biophys. Acta* .

Moreau, R., Thérien, I., Lazure, C. et Manjunath, P. (1998b) Type II Domains of BSP-A1/-A2 Proteins: Binding Properties, Lipid Efflux, and Sperm Capacitation Potential. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **246**: 148-154.

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

Mohri, H. et Ishijima, S. (1989) Epididymal maturation and motility of mammalian spermatozoa. dans: Prospects in Andrology. (édit. Serio, M.), Raven Press, New York. pp 291-298.

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

Mullins, K.J. et Seake, R.G. (1989) Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. *Am. J. Anat.*, **225**: 106-117.

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

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

O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.

O'Rand, M.G. (1985) Differentiation of mammalian sperm antigens. dans: Biology of fertilization. (édit. Metz, C.B. et Monroy, A.), Academic Press, New York. pp 103-119.

Orgebin-Crist, M.C. et Fournier-Delpech, S. (1982) Sperm-egg interaction: evidence for maturational changes during epididymal transit. *J. Androl.*, **3**: 429-433.

Overstreet, J.W. (1983) Transport of gametes in the reproductive tract of the female mammal. dans: Mechanism controlling animal fertilization. (édit. Hartmann, J.F.), Academic Press, New York. pp 499-543.

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

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

- Patthy, L. (1991) Exons--original building blocks of proteins ? (review). *BioEssays*, **13**: 187-192.
- Parks, J.E. et Ehrenwald, E. (1990) Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. *dans*: Fertilization in mammals. (édit. Bavister, B.D., Cummins, J. et Roldan, E.R.S.), Sero Symposia, Norwell, Massachusetts. pp 155-167.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Winer, M.A. et First, N.L. (1988) Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, **38**: 1171-1180.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Handrow, R.R., Sims, M.M. et First, N.L. (1989) Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.*, **40**: 1020-1025.
- Peitz, B. et Olds-Clarke, P. (1986) Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol. Reprod.*, **35**: 608-617.
- Peterson, R.N., Hunt, W.P. et Henry, L.H. (1986) Interaction of boar spermatozoa with porcine oocytes: increase in proteins with high affinity for the zona pellucida during epididymal transit. *Gamete Res.*, **14**: 57-64.
- Phelps, B.M., Koppel, D.E., Primakoff, P. et Myles, D.G. (1990) Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domain. *J. Cell. Biol.*, **111**: 1839-1847.
- Pieters, M.N., Schouten, D. et Van Berkel, T.J.C. (1994) *In vitro* and *in vivo* evidence for the role of HDL in reverse cholesterol transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **1225**: 125-134.
- Price, R.J., Roberts, T.K., Green, D. et Boettcher, B. (1984) Anti-complementary activity in human semen and its possible importance in reproduction. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **6**: 92-98.
- Primakoff, P., Hyatt, H. et Tredick-Kline, J. (1987) Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J. Cell Biol.*, **104**: 141-149.
- Proudfoot, N.G. et Brownlee, G.G. (1976) 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, **263**: 211-214.
- Queen, K., Dhabuwala, C.B. et Pierrepont, C.G. (1981) The effect of the removal of the various accessory sex glands on the fertility of male rats. *J. Reprod. Fertil.*, **62**: 423-426.
- Rana, A.P.S., Majumder, G.C., Misra, S. et Ghosh, A. (1991) Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochem. Biophys. Acta*, **1061**: 185-196.
- Reddy, J.M., Audhya, T.K., Goodpasture, J.C. et Zaneveld, L.J.D. (1982) Properties of a highly purified antifertility factor from human seminal plasma. *Biol. Reprod.*, **27**: 1076-1083.

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

Rinderknecht, E. et Humbel, R.E. (1978a) The amino sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.*, **253**: 2769-2773.

Rinderknecht, E. et Humbel, R.E. (1978b) Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett.*, **89**: 283-286.

Riva, A., Usai, E., Scarpa, R., Cossu, M. et Lantini, M.S. (1989) Fine structure of the accessory glands of the human male genital tract. dans: *Developments in ultrastructure of reproduction*. (édit. Motta, P.M.), A.R. Liss, New York. pp 233-240.

Roldan, E.R.S. et Fragio, C. (1993) Phospholipase A₂ activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, **268**: 13962-13970.

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

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

Roth, R.A. (1988) Structure of the receptor for insulin-like growth factor II : The puzzle amplified., *Science*, **239**: 1269-1271.

Rowley, M., Teshima, J.F. et Heller, C.G. (1970) Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system. *Fertil. Steril.*, **21**: 390-396.

Russell, L.D., Petersen, R.N., Hunt, W. et Strack, L.E. (1984) Post-testicular surface modifications and contributions of reproductive tract fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **30**: 959-978.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanz, L., Calvete, J.J., Mann, K., Gabius, H.J. et Töpfer-Petersen, E. (1993) 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.

Saling, P.M. (1982) Development of the ability to bind zonae pellucidae during epididymal maturation. *Biol. Reprod.*, **26**: 429-436.

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

Scheit, K.H., Kemme, M., Aumüller, G., Seitz, J., Hagendorff, G. et Zimmer, M. (1988) The Major protein of bull seminal plasma : Biosynthesis and biological function. *Biosci. Rep.*, **8**: 589-608.

Scheit, K.H. (1990) Gene expression in bovine seminal vesicles. *Andrologia*, **22**: 74-82.

Schlegel, R.A., Hammerstedt, R., Cofer, G.P. et Kozarsky, K. (1986) Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. *Biol. Reprod.*, **34**: 379-391.

Scott, D.L. et Sigler, P.B. (1994) Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A₂. *Adv. prot. chem.*, **45**: 53-88.

Seidah, N.G., Manjunath, P., Rochemont, J., Sairam, M.R. et Chrétien, M., (1987) 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.

Seki, N., Toyama, Y. et Nagano, T. (1992) 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.

Setchell, B.P., Scott, T.W., Voglmayr, J.K. et Waites, J.M.G. (1969) Characteristics of testicular spermatozoa and the fluid which transports them into the epididymis. *Biol. Reprod. Suppl.*, **1**: 40-66.

Setchell, B.P. (1991) Male Reproductive Organs and Semen. dans: *Reproduction in Domestic Animals*. (édit Cupps, P.T.), Academic Press, Inc., New York. pp 221-249.

Setchell, B.P. et Brooks, D.E. (1988) Anatomy, Vasculature, Innervation, and Fluids of the Male Reproductive Tract. dans: *The Physiology of Reproduction*. (édit. Knobil, E. et Neill, J.D.), Raven Press, New York, pp 753-836.

Singer, S.L., Lambert, H, Cross, N.L., Overstreet, J.W. (1985) Alteration of the human sperm surface during *in vitro* capacitation as assessed by lectin-induced agglutination. *Gamete Res.*, **12**: 291-299.

Singleton, C.L. et Killian , G.J. (1983) A study of phospholipase in albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J. Andro.*, **4**: 150-156.

Snell, W.J. et White, J.M. (1996) The Molecules of Mammalian Fertilization. (review), *Cell*, **85**: 629-637.

Soubeyrand, S., Khadir, A., Brindle, Y. et Manjunath, P. (1997) Purification of a Novel Phospholipase A₂ from Bovine Seminal Plasma. *J. Biol. Chem.*, **272**: 222-227.

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

- Srivastava, P.N., Kumar, V.M. et Arbtan, K.D. (1988) Neuraminidase induces capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, **245**: 106-110.
- Suarez, S.S., Drost, M., Redfern, K. et Gottlieb, W. (1990) Sperm motility in the oviduct. dans: Fertilization in mammals. (édit. Bavister, B.D., Cummins, J. et Roldan, E.R.S.), Serono Symposia, Norwell, Massachusetts. pp 155-167.
- Suzuki, F. (1990) Morphological aspects of sperm maturation. dans: Fertilization in mammals. (édit. Bavister, B.D., Cummins, J. et Roldan, E.R.S.), Serono Symposia, Norwell, Massachusetts. pp 65-75.
- Suzuki, F. et Yanagimachi, R. (1989) Changes in the distribution of intra membranous particles and Filipin-reactive membrane sterols during *in vitro* capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res.*, **23**: 335-347.
- Talbot, P. et Chacon, R. (1981) Detection of modifications in the tail of capacitated guinea pig sperm using lectins. *J. Exp. Zool.*, **216**: 435-444.
- Tarter, T.H. et Alexander, N.J. (1984) Complement-inhibiting activity of seminal plasma. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **6**: 28-32.
- Tauber, P.F., et Zanaveld, L.J.D. (1976) Coagulation and liquefaction of human semen. dans: Human Semen and Fertility Regulation in Men. (édit. Hafez, E.S.E.) C.V. Mosby, St-louis, pp 153-166.
- Taylor, M.E., Conary, J.T., Lennartz, M.R., Stahl, P.D. et Drickamer, K. (1990) Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J. Biol. Chem.*, **265**: 12156-12162.
- Thérien, I., Bleau, G. et Manjunath, P. (1995) Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.*, **52**: 1372-1379.
- Thérien, I., Moreau, R. et Manjunath, P. (1998) Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein Induce Cholesterol Efflux from Epididymal Sperm. *Biol. Reprod.*, **59**: 768-776.
- Thérien, I., Soubeyrand, S. et Manjunth, P. (1997) Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Modulate Sperm Capacitation by High-Density Lipoprotein. *Biol. Reprod.*, **57**: 1080-1088.
- Thomas, T.S., Reynolds, A.L. et Oliphant, G. (1984) Evaluation of the site of synthesis of rabbit sperm acrosome stabilizing factor using immunocytochemical and metabolic labeling techniques. *Biol. Reprod.*, **30**: 693-705.
- Tong, Z.B., Nelson, L.M. et Dean, J. (1995) Inhibition of zona pellucida gene expression by antisense oligonucleotides injected into mouse oocytes. *J. Biol. Chem.*, **270**: 849-853.
- Töpfer-Petersen, E., Mann, K. et Calvete, J.J. (1993) Identification of porcine oocyte 55 kDa alpha and beta proteins within the zona pellucida glycoprotein families indicates that oocyte sperm receptor activity is associated with different zona pellucida proteins in different mammalian species. *Biol. Chem, Hoppe Seyler*, **374**, 411-417.

- Towbin, H., Staehelin, T., et 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.
- Trexler, M. et Patthy, L. (1983) Folding autonomy of the kringle 4 fragment of human plasminogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 2457-2461.
- Voglmayr, J.K. (1975) Male Reproductive System. dans: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, (édit. Hamilton, D.W. et Greep, R.O.), American Physiological Society, Washington, D.C., pp 437-451.
- Voglmayr, J.K., White, I.G. et Parks, R.P. (1978) The fertilizing capacity of ram testicular spermatozoa, freshly collected and after storage in cauda epididymal fluid. *Theriogenology*, **10**: 313-321.
- Voglmayr, J.K. et Sawyer, F.R. (1986) Surface transformation of ram spermatozoa in uterus, oviductal and cauda epididymal fluids in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, **78**: 315-325.
- Vredenburg-Wilberg, W.L. et Parrish, J.J. (1995) Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol. Reprod. Dev.*, **40**: 490-502.
- Vreeburg, J.T.M., Holland, M.K. et Orgebin-Crist, M.C. (1992) Binding of epididymal proteins to rat spermatozoa *in vivo*. *Biol. Reprod.*, **47**: 588-597.
- Ward, D.N., Glenn, S.D., Liu, W.K., et Gordon, W.L. (1983) dans: Factors Regulating Ovarian Function (édit. Greenwald, G.S., et Terranova. P.F.), Raven Press, New York. pp 141-156.
- Ward, C.R. et Kopf, G.S. (1993) Molecular events mediating sperm activation. *Dev. Biol.*, **158**: 9-34.
- Wassarman, P.M. et Litscher, E.S. (1995) Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **30**: 1-19.
- Watson, M.E. (1984) Compilation of published signal sequences. *Nuc Acids Res*, **12**: 5141-5164.
- White, I.G. et Kar, A. (1973) Aspects of the physiology of sperm in the female genital tract. *Contraception*, **3**: 183-194.
- White, I.G. et Voglmayr, J.K. (1986) ATP-induced reactivation of ram testicular, caudal epididymal, and ejaculated spermatozoa extracts with Triton X-100. *Biol. Reprod.*, **34**: 183-193.
- Williams-Ashman, H.G. (1988) Perspectives in the Male Sexual Physiology of Eutherian Mammals. dans: The Physiology of Reproduction. (édit. Knobil, E. et Neill, J.D.), Raven Press, New York. pp 727-751.
- Wilson, J.D. et Goldstein, J.L. (1975) Classification of hereditary disorders of sexual development. *Birth Defects*, **11**: 1-16.

Wong, P.Y.D. et Lee, W.M. (1983) Potassium movement during sodium-induced motility initiation on the rat cauda epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **28**: 206-212.

Yanagimachi, R. (1994) Fertilization in mammals. dans: The Physiology of Reproduction. (édit. Knobil, E. et Neill, J.D.), Raven Press, New York, pp 189-317.

Yanagimachi, R. et Suzuki, F. (1985) A further study of lysolecithin-mediated acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res.*, **11**: 29-40.

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