

Université de Montréal

Étude du mécanisme de protection des spermatozoïdes de mammifères par le lait

par

Marie-France Lusignan

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)  
en Biochimie

Juin 2011

© Marie-France Lusignan, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :  
Étude du mécanisme de protection des spermatozoïdes de mammifères par le lait

Présentée par :  
Marie-France Lusignan

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Luc DesGroseillers, président-rapporteur  
Puttaswamy Manjunath, directeur de recherche  
Michel Lafleur, co-directeur  
Gilles Bleau, membre du jury  
Janice L. Bailey, examinateur externe  
Claude Lazure, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Le lait écrémé est utilisé depuis plus d'un demi-siècle comme diluant protecteur des spermatozoïdes de mammifères. Depuis quelques années, il existe une demande grandissante pour des diluants exempts de produits d'origine animale. Toutefois, le mécanisme par lequel le lait protège les spermatozoïdes n'est pas connu, ce qui rend difficile de lui trouver un substitut.

Les protéines majeures du plasma séminal de taureau, les protéines « Binder of SPerm » (BSP), sont néfastes lors de la conservation de la semence. Les spermatozoïdes sont en contact avec une grande concentration de protéines BSP qui stimulent une extraction continue de cholestérol/phospholipides de leur membrane plasmique. Les lipoprotéines de faible densité (LDL) du jaune d'œuf, un autre composé utilisé dans les diluants, empêcheraient les protéines BSP de se lier à la membrane des spermatozoïdes de taureaux et de stimuler un efflux des lipides membranaires, ce qui les protégerait durant la conservation. Notre hypothèse était que les protéines du lait protègent les spermatozoïdes durant la conservation en séquestrant les protéines BSP.

Premièrement, nous avons démontré par filtration sur gel qu'il y a une interaction entre les protéines BSP bovines et les protéines du lait. Le lait écrémé a été fractionné en trois fractions : F1 ( $\alpha$ -lactalbumine,  $\beta$ -lactoglobuline et caséine  $\kappa$ ), F2 (toutes les protéines du lait) et F3 (sels, sucres et petits peptides). Les protéines BSP1 et BSP5 ont une affinité plus grande pour F1 que BSP3, tandis que toutes les protéines BSP ont une affinité pour F2. Le titrage calorimétrique isotherme a permis de confirmer l'interaction entre les protéines BSP et les protéines du lait. L'association entre la protéine BSP1 bovine et les micelles de caséines est caractérisée par une constante d'affinité ( $K_a$ ) de 3.5

$\times 10^5 \text{ M}^{-1}$  et un paramètre stoechiométrique (n) de 4,5 BSP1 pour une caséine. L'association entre la protéine BSP1 bovine et l' $\alpha$ -lactalbumine (une protéine du sérum principale), est caractérisée par un  $K_a$  de  $2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  et une valeur "n" de 0,8. Ces résultats indiquent que le lait protège les spermatozoïdes bovins en séquestrant les protéines BSP grâce à une interaction protéine : protéine, tandis que le jaune d'œuf les protège grâce à une interaction protéine : lipoprotéine. Deuxièmement, nous avons démontré par filtration sur gel que les protéines homologues aux BSP bovines retrouvées dans le plasma séminal de porc, d'étalon et de bélier ont une affinité avec les protéines du lait, ce qui suggère que le mécanisme de protection des spermatozoïdes par le lait pourrait être le même chez ces espèces. Troisièmement, nous avons caractérisé l'interaction entre BSP1 bovine et les LDL du jaune d'œuf qui a un  $K_a$  de  $3.4 \pm 0.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  et une valeur de « n » de 104 BSP1 pour une particule de LDL, indiquant qu'il existe des différences entre le mécanisme de protection des spermatozoïdes par le lait et le jaune d'œuf.

Nous croyons que les résultats présentés dans cette thèse aideront à créer de nouveaux diluants ne contenant pas de produits d'origine animale afin de cryoconserver les spermatozoïdes des mammifères.

Mots clefs : cryoconservation, lait, protection des spermatozoïdes, micelles de caséines, protéines du sérum,  $\alpha$ -lactalbumine,  $\beta$ -lactoglobuline, jaune d'œuf, lipoprotéines de faible densité, protéines BSP.

## Abstract

Skim milk is being used as a protective agent for mammalian semen conservation over half a century. Recently, there has been increased interest in developing extenders free of animal products. However, it is difficult to find suitable component in order to replace milk as an extender, because the mechanisms by which milk protect sperm against cooling and freezing damages during the storage is unknown.

The Binder of Sperm (BSP) proteins are the major proteins of bull seminal plasma and they are harmful during sperm storage. In fact, sperm would be in contact with a large quantity of BSP proteins that induce a continuous cholesterol and phospholipids efflux from the sperm membrane during storage. When bull sperm is diluted with an extender containing egg yolk, another compound frequently used in extender, the low-density lipoproteins (LDL) present in the egg yolk prevent the binding of the BSP proteins to the sperm membrane, thus, preventing the lipid efflux from the sperm membrane induced by the BSP proteins. Our hypothesis was that milk proteins would protect sperm during storage by binding BSP proteins.

First, we demonstrated by gel filtration that bovine BSP proteins could bind the milk proteins. Skim milk was fractionated into three fractions: F1 ( $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin, the major whey proteins and  $\kappa$ -casein), F2 (mainly caseins and all other milk proteins in small amounts) and F3 (salts, sugars and small peptides). Bovine BSP1 and BSP5 have more affinity for F1 as compared to BSP3 and all the BSP proteins have affinity for F2. We confirmed the interaction between bovine BSP proteins and milk proteins by isothermal titration calorimetry. The binding of BSP1 to casein micelles is characterized by an affinity constant ( $K_a$ ) of  $3.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  and of a stoichiometric

parameter for the association (n) of 4.5 BSP1 per casein. The association between BSP1 and  $\alpha$ -lactalbumin (one of the major whey proteins) is characterized by a  $K_a$  of  $2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  and a “n” value of 0.8. These results support our contention that milk can protect sperm by preventing the BSP proteins’ binding to the sperm membrane attributable to a protein : protein interaction, while egg yolk sperm protection is attributable to a protein : lipoprotein interaction. Second, our studies showed that the homologous BSP proteins found in the boar, stallion and ram seminal plasma can bind the milk proteins. These results indicate that the mechanism of sperm protection by milk in these species should be similar to the one in bovine species. Third, we characterized the interaction between bovine BSP1 protein and LDL from hen’s egg yolk. The binding was characterized by a  $K_a$  of  $3.4 \pm 0.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  and a « n » value of 104 BSP1 per LDL particle. Our results indicated that there is difference between the mechanism of sperm protection by milk and egg yolk.

We believe that the results presented in this thesis may help to create new extenders free of animal product for mammal sperm preservation in liquid or frozen state.

Key words: cryopreservation, milk, sperm protection, casein micelles, whey proteins,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, egg yolk, low-density lipoproteins, BSP proteins.

## Table des matières

Résumé .....	i
Abstract .....	iii
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des abréviations et des sigles.....	xi
Remerciements .....	xv
1. Introduction .....	1
1.1. Les spermatozoïdes .....	1
1.1.1. Morphologie .....	1
1.1.2. La membrane plasmique .....	3
1.2. Maturation des spermatozoïdes et éjaculation .....	4
1.3. Capacitation des spermatozoïdes et réaction de l'acrosome .....	6
1.4. Le plasma séminal.....	7
1.4.1. Rôle et composition du plasma séminal.....	8
1.4.2. Effet du plasma séminal sur les spermatozoïdes.....	9
1.4.3. Effets bénéfiques du plasma séminal .....	10
1.4.4. Effets néfastes du plasma séminal.....	11

1.5. Les protéines majeures du plasma séminal bovin .....	12
1.5.1. Propriétés biochimiques des protéines BSP .....	12
1.5.2. Structure des protéines BSP .....	13
1.5.3. Propriétés de liaison des protéines BSP .....	13
1.5.4. Agrégation des protéines BSP .....	16
1.5.5. Rôle biologique .....	16
1.5.5.1. Capacitation des spermatozoïdes .....	16
1.5.5.2. Formation du réservoir oviductal de spermatozoïdes .....	17
1.5.6. Protéines homologues aux protéines BSP .....	18
1.6. La conservation des spermatozoïdes .....	19
1.6.1. Conservation de la semence de différents mammifères .....	21
1.6.2. Effets néfastes de la conservation sur les spermatozoïdes .....	24
1.6.2.1 Choc dû au froid .....	24
1.6.2.2 Congélation et dégel .....	25
1.6.2.3. Composition lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes ...	26
1.6.2.4. Espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	27
1.6.3. Les diluants .....	29
1.6.3.1. Composition .....	29
1.6.3.2. Les agents protecteurs .....	29



1.6.3.2.1 Le jaune d'œuf .....	30
1.6.3.2.2. Le lait.....	33
1.6.3.2.3. Agents cryoprotecteurs.....	37
1.6.3.3. Les constituants qui améliorent la conservation .....	38
1.6.3.4. Diluants commerciaux .....	40
1.7. Problématique du projet de recherche.....	41
1.7.1. Hypothèse.....	43
1.7.2. Objectifs expérimentaux .....	43
2. Articles .....	45
2.1. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. Lusignan, M.F., Bergeron, A., Lafleur, M. and Manjunath, P. <i>Biology of Reproduction</i> , doi:10.1095/biolreprod.110.089961.....	45
2.2. Mechanism of sperm protection by milk: a comparative study of interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from bovine, stallion, ram and boar semen. Lusignan, M.F., Lafleur, M. and Manjunath, P. Soumis dans <i>Reproduction</i> , juin 2011.....	86
2.3. Thermodynamics of the interaction between bovine Binder of Sperm BSP1 and low-density lipoprotein from hen's egg yolk. Lusignan, M.F., Lafleur, M. and Manjunath, P. <i>Thermochimica Acta 516 (2011) 88-90</i> .....	113
3. Discussion .....	132

3.1. Interaction des protéines BSP avec les protéines du lait et stabilité du complexe protéique.....	133
3.2. Nouveau mécanisme de protection des spermatozoïdes de taureau par le lait.....	135
3.3. Le nouveau mécanisme de protections par le lait est-il semblable chez les autres mammifères? .....	137
3.4. Comparaison entre le mécanisme de protection des spermatozoïdes par le lait et par le jaune d'œuf.....	141
3.5. Amélioration des protocoles de conservation des spermatozoïdes de mammifères dilués dans le lait.....	144
3.6. Création d'un diluant exempt de produit d'origine animale .....	145
4. Conclusion et perspectives .....	152
5. Références .....	155

**Liste des tableaux**

Table I. Caractéristiques de la semence de certains mammifères. ....	6
Table II. Concentration moyenne des protéines BSP et des spermadhésines retrouvées dans le plasma séminal de différents mammifères.....	141
Table III. Interaction de la protéine BSP1 bovine avec différents systèmes.....	150

## Liste des figures

Figure 1. Structure d'un spermatozoïde. A) Schéma d'un spermatozoïde. B) Schéma de la tête d'un spermatozoïde. ....	2
Figure 2. Tractus génital du taureau.....	5
Figure 3. Structure des protéines BSP. Les sites de glycosylation sont indiqués par des cercles pleins et noirs. A) BSP1. B) BSP3. C) BSP5.....	15
Figure 4. Mécanisme de protection des spermatozoïdes par le jaune d'oeuf.....	33
Figure 5. Structure d'une micelle de caséines. Les points pleins représentent le phosphate de calcium, les cercles vides représentent les caséines et les traits entourant la micelle représentent la structure désordonnée de la caséine $\kappa$ .....	36
Figure 6. Nouveau mécanisme proposé pour la protection des spermatozoïdes de taureaux par le lait.....	136

**Liste des abréviations et des sigles**

%	Pourcentage
~	Environ
μ	Micro ( $10^{-6}$ )
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire
°C	Degré celcius
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
BSP	<u>B</u> inder of <u>S</u> Perm
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
Cl <sup>-</sup>	Chlorure
CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Carbonate
CUB	Domaine identifié dans les protéines <u>C</u> lr/ <u>C</u> ls, <u>U</u> egf et <u>B</u> MP1

Fn2	Domaine homologue de type II semblable à ceux de la fibronectine
$g$	Accélération gravitationnelle (9,81 m/sec <sup>2</sup> )
g	Gramme
GAG	Glycosaminoglycan
h	Heure
HCl	Acide hydrochlorique
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonate
HDL	Lipoprotéines de haute densité « <u>H</u> igh <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein »
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
ITC	Titrage calorimétrique isotherme « <u>I</u> sothermal <u>T</u> itration <u>C</u> alorimetry »
K <sup>+</sup>	Ion potassium
K <sub>a</sub>	Constante d'affinité
KDa	KiloDalton
L	Litre
LDL	Lipoprotéines de faible densité « <u>L</u> ow <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein »

M	Molaire (mole/litre)
m	Mètre
m/m	Masse/masse
mg	Milligramme
Mg <sup>2+</sup>	Ion magnésium
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
n	Paramètre stoichiométrique
Na <sup>+</sup>	Ion sodium
nm	Nanomètre
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PI	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylsérine
PVDF	Fluorure de polyvinylidène P

®	Marque déposée
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec sodium dodécylsulfate « <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate- <u>P</u> oly <u>A</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis »
s	Seconde



## Remerciements

Je remercie mon directeur de recherche, Dr. Puttaswamy Manjunath, pour m'avoir accueillie dans son équipe et m'avoir supervisée pendant ma formation doctorale. Je tiens également à remercier mon co-directeur de recherche, Dr. Michel Lafleur, pour m'avoir aidée dans l'analyse et la compréhension des résultats des expériences de thermodynamique.

Je remercie mes collègues ainsi que les stagiaires qui m'ont aidée de près ou de loin à la réalisation de ce projet de recherche. Merci à Dr. Annick Bergeron d'avoir révisé rigoureusement mon manuscrit.

Finalement, je tiens à remercier mes proches qui m'ont soutenue tout au long de ces études.

## **1. Introduction**

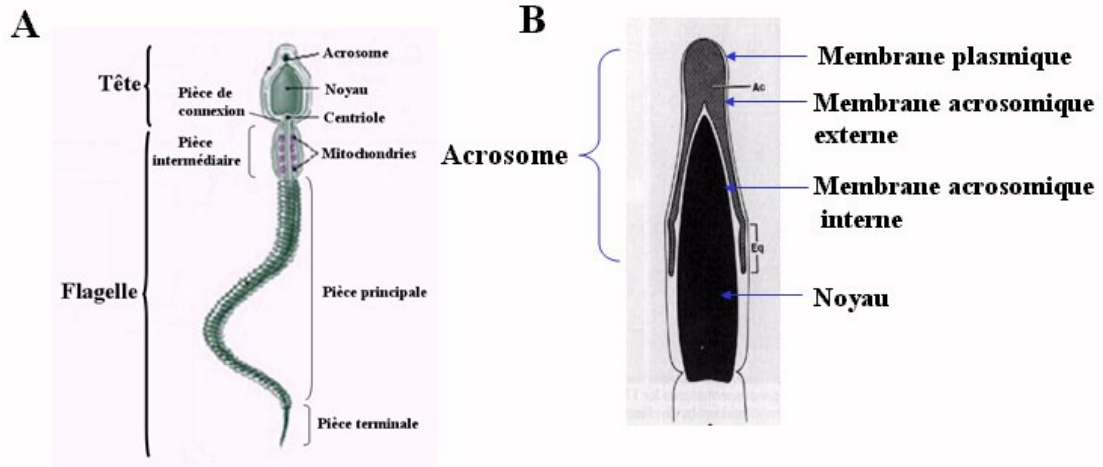
La reproduction sexuée chez les mammifères consiste en la fécondation d'une cellule haploïde femelle (ovocyte) par une cellule haploïde mâle (spermatozoïde) afin de donner un zygote diploïde. Ces cellules, nommées gamètes, sont hautement spécialisées et n'ont qu'une seule fonction: assurer la continuité de l'espèce. Cette thèse portera uniquement sur la conservation du gamète mâle, le spermatozoïde.

### **1.1. Les spermatozoïdes**

Les spermatozoïdes sont produits par spermatogenèse, un processus qui a lieu dans les tubules séminifères des testicules. La spermatogenèse est constituée de trois éléments importants : des mitoses permettant le renouvellement des cellules souches (spermatogonies), la méiose permettant la réduction du nombre de chromosomes, ainsi que des changements morphologiques (spermiogenèse) qui vont permettre à un spermatide de devenir un spermatozoïde.

#### **1.1.1. Morphologie**

Un spermatozoïde est constitué de deux parties : une tête et un flagelle (Figure 1). Le contenu réduit de cette cellule lui permet de survivre jusqu'à la fécondation.



**Figure 1.** Structure d'un spermatozoïde (adapté de [1]). A) Schéma d'un spermatozoïde. B) Schéma de la tête d'un spermatozoïde.

La tête est composée d'un noyau haploïde (qui ne contient qu'un chromosome de chaque paire), un acrosome, une faible quantité de cytoplasme et de composantes cytosquelettiques [1]. Le noyau des spermatozoïdes est unique car l'ADN génomique est très compact et est majoritairement associé à de petites protéines nucléaires nommées protamines. L'acrosome est un organelle dérivant de l'appareil de Golgi et il est situé dans la partie antérieure de la tête du spermatozoïde. L'acrosome est constitué de deux membranes : une membrane intérieure qui suit la partie antérieure du noyau (membrane acrosomique interne) et une membrane extérieure qui est accolée à la membrane plasmique (membrane acrosomique externe). L'acrosome contient plusieurs enzymes protéolytiques nécessaires à la fusion entre le spermatozoïde et l'ovocyte [1]. Certaines de ces enzymes ne sont retrouvées que chez les spermatozoïdes de mammifères, telles que l'hyaluronidase (glycosidase) et l'acrosine (protéase à sérine). L'acrosome contient également d'autres enzymes en plus petite concentration qui sont fréquemment retrouvées dans les lysosomes primaires [1].

Le flagelle du spermatozoïde lui permet de se mouvoir dans le tractus génital femelle et atteindre l'ovocyte afin de le féconder. Il est composé de quatre parties distinctes: la pièce connective, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale [2] (Figure 1). La pièce connective est située entre la tête et la pièce intermédiaire, dans une zone que l'on nomme le col, qui a pour fonction de lier la tête au flagelle. La pièce intermédiaire contient une couche de mitochondries qui entoure les structures cytosquelettiques. La pièce principale est entourée d'une couche fibreuse qui est unique aux spermatozoïdes et qui sert d'échafaudage aux protéines des voies de signalisation qui sont possiblement impliquées dans la maturation, la motilité, l'hyperactivation et/ou la réaction de l'acrosome [2]. Le flagelle contient un axonème central qui va de la tête jusqu'à la partie terminale de la queue. L'axonème est un complexe de microtubules et il est entouré au niveau des pièces intermédiaire et principale par des fibres denses extérieures. L'ATP est utilisé comme source d'énergie afin de permettre le mouvement du flagelle [2].

### **1.1.2. La membrane plasmique**

Une particularité de la membrane plasmique du spermatozoïde est d'être divisée en différents domaines dont la composition et la fonction varient. La membrane plasmique de la tête est segmentée en trois parties : l'acrosome antérieur, le segment équatorial et la région post-acrosomique [1]. Tel que mentionné à la section précédente, le flagelle du spermatozoïde est divisé en quatre parties qui sont entourées par la membrane plasmique.

La composition en lipides de la membrane des spermatozoïdes de mammifères varie d'une espèce à l'autre. Toutefois, le contenu est d'environ 70% de phospholipides, 25% de lipides neutres tel le cholestérol, et 5% de glycolipides (revu dans [3]). Dans la

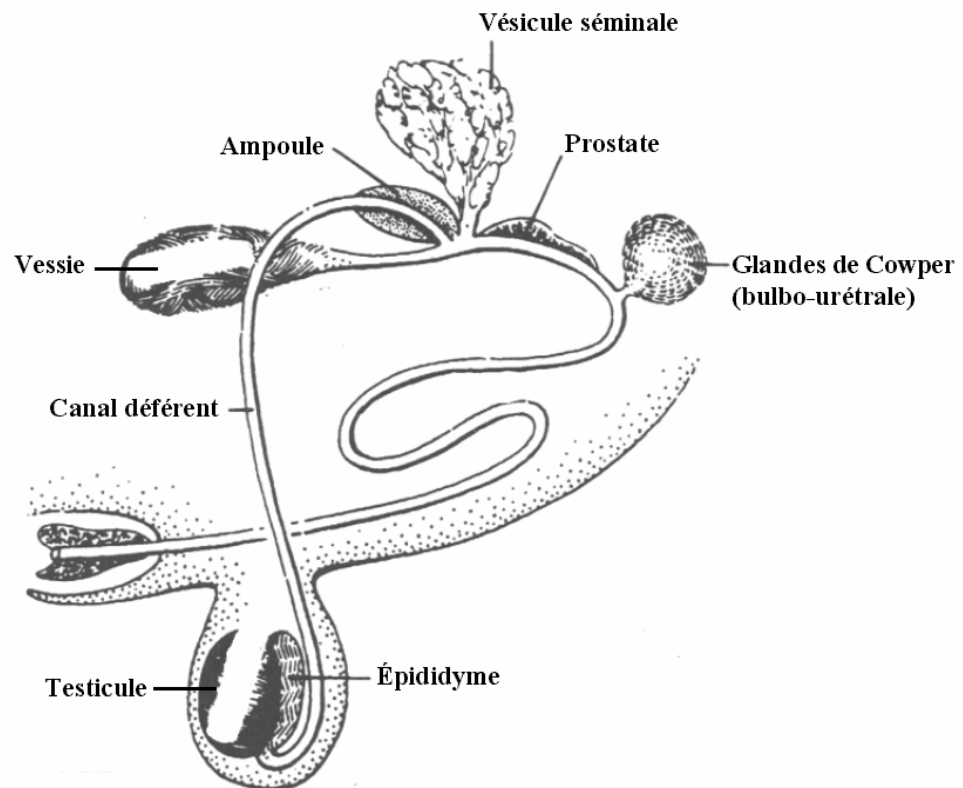
membrane des spermatozoïdes bovins, un peu plus de 50% des phospholipides portent un groupement choline, tels la sphingomyéline, la phosphatidylcholine (PC) et le PC plasmalogène, et ils se retrouvent majoritairement dans le feuillet externe de la bicouche lipidique [4] (revu dans [5]). Les autres phospholipides présents dans la membrane portent des groupements sérine ou éthanolamine et sont surtout retrouvés dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Les principales chaînes acyles saturées des phospholipides de la membrane sont les acides palmitique (16 : 0) et stéarique (18 : 0), tandis que les chaînes insaturées majoritairement retrouvées sont les acides arachidonique (20 : 4, n-6), docosapentanoïque (22 : 5, n-6) et docosahexonique (22 :6, n-3) (revu dans [6]). Les spermatozoïdes de plusieurs mammifères tels que le taureau, le bélier et le porc possèdent un ratio élevé de chaînes insaturées : saturées, tandis que chez le lapin, le chien et l'humain, ce ratio est moins élevé [7]. La concentration de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes varie d'une espèce à l'autre. Le ratio molaire cholestérol/phospholipide de la membrane des spermatozoïdes est de 0,40 chez le bovin, 0,43 chez le bélier, 0,36 chez l'étalon, 0,83 chez l'humain et 0,20 chez le porc (revu dans [8]).

La composition et l'organisation de la membrane plasmique du spermatozoïde sont modifiées lors de son transit dans l'épididyme, pendant l'éjaculation et durant son passage dans le tractus génital femelle.

## **1.2. Maturation des spermatozoïdes et éjaculation**

Suite à la spermatogenèse, les spermatozoïdes sont transportés passivement des testicules vers les épидидymes où ils peuvent acquérir la capacité à être motile et subir diverses modifications de leur membrane plasmique [1].

Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes matures qui étaient entreposés dans la partie distale de la queue de l'épididyme, dans l'ampoule du canal déférent, ainsi que dans le canal déférent, sont mélangés avec le plasma séminal qui est composé des sécrétions des différentes glandes accessoires (les ampoules, les vésicules séminales, la prostate et les glandes de Cowper ou glandes bulbo-urétrales [1]) (Figure 2). Les spermatozoïdes sont expulsés du tractus génital mâle et sont déposés dans le tractus génital femelle, soit dans le vagin ou directement dans la cavité utérine, selon l'espèce.



**Figure 2.** Tractus génital du taureau (adapté de [1]).

Dans les centres d'insémination artificielle, la semence éjaculée (qui est le mélange des spermatozoïdes et du plasma séminal) est récoltée dans un contenant. La

concentration de spermatozoïdes, le volume et la concentration protéique de la semence de mammifères varient d'une espèce à l'autre (Table I).

### 1.3. Capacitation des spermatozoïdes et réaction de l'acrosome

Les spermatozoïdes fraîchement éjaculés ne possèdent pas encore leur pouvoir fécondant. Ils doivent subir plusieurs modifications biochimiques et physiologiques qui ont lieu dans le tractus génital femelle afin d'être capable d'enclencher la réaction de l'acrosome qui est nécessaire à la fécondation.

**Table I.** Caractéristiques de la semence de certains mammifères (adapté de [1][9]).

Espèce	Concentration de spermatozoïdes (nb $\times 10^6$ /ml)	Volume de la semence (ml)	Concentration protéique du plasma séminal (mg/ml)
Bélier	2000-5000	0,7-2	50
Bouc	1000-5000	0,2-2,5	28
Étalon	30-800	30-300	10
Homme	50-150	2-6	35-50
Porc	25-300	150-500	30
Taureau	300-2000	2-10	55

L'ensemble de ces changements est connu sous le nom de capacitation et a été décrit pour la première fois il y a plus d'un demi siècle par Austin et Chang [10][11]. Le

mécanisme de capacitation est mieux caractérisé chez le bovin que chez les autres espèces de mammifères.

Durant la capacitation, il y a une augmentation des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{Na}^+$  à l'intérieur du spermatozoïde, ainsi qu'une augmentation intracellulaire du pH. De plus, il y a une diminution du ratio cholestérol:phospholipide de la membrane, une perte de certaines protéines présentes à la surface du spermatozoïde, une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une augmentation de l'AMPc intracellulaire, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de certaines protéines [12][13].

*In vivo*, la capacitation des spermatozoïdes est initiée par les facteurs capacitants qui sont présents dans le tractus génital femelle, tels que les lipoprotéines de haute densité (HDL), qui sont des accepteurs de cholestérol, ainsi que les glycosaminoglycanes (héparane sulfate et chondroïtine sulfate B [14][15][16][17]. *In vitro*, la capacitation des spermatozoïdes peut être induite par l'héparine [18][19], un glycosaminoglycane. Les spermatozoïdes qui ont complété le processus de capacitation peuvent ensuite se lier à la zone pellucide qui entoure l'ovocyte via la protéine ZP3 et enclencher la réaction de l'acrosome, qui consiste en la fusion de sa membrane acrosomique externe avec la membrane plasmique [20]. La réaction de l'acrosome permet de relâcher les enzymes hydrolytiques contenues dans l'acrosome qui servent à digérer partiellement la zone pellucide dans la partie correspondant au trajet du spermatozoïde qui réalise la fécondation [1].

#### **1.4. Le plasma séminal**

Le plasma séminal permet le transport des spermatozoïdes de l'épididyme au tractus génital femelle, ainsi que leur survie [1]. Tel que mentionné à la section 1.2., le



plasma séminal est composé des sécrétions des différentes glandes du tractus génital mâle, mais majoritairement des sécrétions des glandes de Cowper (~30-60% des sécrétions) [21].

#### **1.4.1. Rôle et composition du plasma séminal**

Le plasma séminal contient des facteurs qui stimulent la motilité des spermatozoïdes épидидymaires [21][22]. De plus, le changement ionique que subissent les spermatozoïdes qui entrent en contact avec le plasma séminal lors de l'éjaculation stimule aussi leur motilité [23]. Le plasma séminal aurait également un rôle à jouer dans l'initiation de la capacitation des spermatozoïdes [24][25][26].

Le plasma séminal est un milieu liquide dont la composition n'est pas constante. La composition varie entre les espèces, entre les individus et, également chez un même individu d'une récolte à une autre [1]. La composition du plasma séminal est aussi influencée chez une même espèce selon la saison pendant laquelle la semence est récoltée. Le plasma séminal contient du fructose qui sert de substrat métabolique aux spermatozoïdes en leur fournissant l'énergie nécessaire à leur motilité [21]. La présence de sorbitol et d'inositol a aussi été observée dans le plasma séminal. La présence de plusieurs ions dans le plasma séminal permet de garder un équilibre osmotique optimal pour les spermatozoïdes. Les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  sont retrouvés en plus grande concentration, mais il y a aussi, entre autres, des ions  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^-$  et  $\text{Cl}^-$  [1].

Le plasma séminal contient une grande variété de protéines dont la concentration varie d'une espèce à l'autre (Table I). La fonction de certaines des protéines n'est pas encore totalement comprise. Le plasma séminal contient, entre autres, des fibronectines impliquées dans l'adhésion entre les cellules, des enzymes causant de la protéolyse dans la

semence, des facteurs décapacitants (qui préviennent la capacitation), des facteurs stabilisateurs de l'acrosome, des protéines liant le zinc qui sont impliquées dans la maintenance de la motilité, des protéines régulant le calcium comme la calmoduline et la caltrine, des protéines liant l'héparine, etc [21].

#### **1.4.2. Effet du plasma séminal sur les spermatozoïdes**

L'effet du plasma séminal sur les fonctions spermatiques est complexe. Des résultats contradictoires ont été obtenus suite à des études portant sur l'effet du plasma séminal sur les fonctions spermatiques, telles que la viabilité, la motilité et le pouvoir fécondant. Certaines études démontrent que le plasma séminal ou ses composantes ont un effet bénéfique pour les spermatozoïdes [27][28][29][30], tandis que d'autres ont montré un effet néfaste sur les fonctions spermatiques [31][32][33]. Les différentes études sur l'effet du plasma séminal ou de ses composantes sur les fonctions spermatiques ont été effectuées sur des spermatozoïdes épидидymaires (non exposés au plasma séminal) ou des spermatozoïdes éjaculés (qui ont déjà été en contact avec le plasma séminal), ce qui expliquerait les conclusions divergentes. De plus, l'utilisation de différents temps d'incubation des spermatozoïdes avec le plasma séminal ou ses composantes peut influencer les résultats. Il est important de noter qu'*in vivo*, les spermatozoïdes sont en contact avec le plasma séminal pendant un court laps de temps, soit au moment de l'éjaculation, puis lorsqu'ils sont émis dans le tractus génital femelle. Ensuite, ils avancent dans le tractus génital femelle, tandis que le plasma séminal est laissé en arrière. *In vitro*, par contre, les spermatozoïdes demeurent en contact avec le plasma séminal pour une plus longue période et celui-ci ne semble pas être le milieu optimal pour leur survie (ce point

sera discuté dans la section 1.4.4.). De ce fait, il est normal que selon les conditions expérimentales, les résultats des études *in vitro* puissent diverger.

### 1.4.3. Effets bénéfiques du plasma séminal

Le plasma séminal exerce un effet positif sur la motilité, la viabilité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes et possède des propriétés antioxydantes [27][28][29][30][34]. Il aide à la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires de taureau en augmentant le nombre de sites de liaison à l'héparine [24][35]. L'héparine induit la capacitation des spermatozoïdes en se liant à ces derniers. Également, des spermatozoïdes épидидymaires de taureau peuvent subir la réaction de l'acrosome s'ils ont été préalablement mis en contact avec du plasma séminal avant d'être capités *in vitro* par l'héparine [25]. Également, les protéines majeures du plasma séminal de taureau potentialisent la capacitation des spermatozoïdes induite par les HDL [36] et par l'héparine [19].

Plusieurs composants du plasma séminal sont responsables des effets bénéfiques sur les fonctions spermatiques. Une protéine présente dans le plasma séminal de taureau, la « forward motility protein », induit la motilité des spermatozoïdes épидидymaires [22]. La motilité des spermatozoïdes éjaculés de taureau et lavés du plasma séminal peut être rétablie par les protéines de faible poids moléculaire du plasma séminal [27]. De plus, certaines protéines du plasma séminal de taureau sont associées à une fertilité élevée [29][30][37]. Une faible expression des isoformes de la spermadhésine Z13 (14 kDa), ainsi qu'une expression élevée des isoformes de l'ostéopontine (55 kDa) et de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, 58 kDa) sont associées à des taureaux ayant une grande fertilité [37]. La spermadhésine Z13 est un peptide qui possède 43% et 50% d'homologie avec les

protéines SPMI (« seminal plasma motility inhibitor ») et aSFP (« acidic seminal fluid protein »), respectivement, qui sont connues pour avoir un effet néfaste sur la motilité des spermatozoïdes de taureau, de porc et d'humain [38-40]. L'ostéopontine influencerait l'interaction spermatozoïde-ovocyte, ainsi que les événements ayant lieu pendant le début du développement embryonnaire [37]. La PLA<sub>2</sub> est associée avec la fertilité (revu [37]). La concentration de la protéine bovine BSP5 dans le fluide des glandes accessoires est aussi associée à la fertilité des taureaux : une faible concentration est bénéfique pour la fertilité, tandis qu'une haute concentration est néfaste [37]. Les rôles de la protéine BSP5 et des protéines BSP seront abordés plus en détail à la section 1.5.5. Le plasma séminal de porc contient des antioxydants de faible poids moléculaire, tels que le glutathion, l'acide ascorbique et l'ergothionéine, qui proviennent des sécrétions des vésicules séminales et qui protègent les spermatozoïdes des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [34].

#### **1.4.4. Effets néfastes du plasma séminal**

Le plasma séminal peut aussi avoir des effets négatifs sur les fonctions spermatiques. En effet, des facteurs décapacitants (qui empêchent la capacitation) sont retrouvés dans le plasma séminal de taureau et de lapin et affectent négativement le pouvoir fécondant des spermatozoïdes [41][42][43][44]. Par exemple, il a été montré qu'une glycoprotéine de haut poids moléculaire du plasma séminal de lapin, nommée ASF (« acrosome stabilizing factor »), est un facteur décapacitant car elle inhibe de façon réversible la fécondation *in vivo* [44]. De plus, cette protéine est un facteur stabilisateur de l'acrosome, car elle empêche les spermatozoïdes de subir la réaction de l'acrosome. Deux protéines prédominantes de 16 kDa ayant un pI de 4,1 et de 6,7 dans le plasma séminal sont associées à une faible fertilité des taureaux [45]. Le plasma séminal contient

également des facteurs qui peuvent inhiber la motilité des spermatozoïdes, telles que les protéines SPMI et aSFP [39][40] mentionnée à la section précédente. De plus, lorsque les protéines de haut poids moléculaire du plasma séminal de taureau sont ajoutées à des spermatozoïdes éjaculés, cela entraîne une diminution du pourcentage de spermatozoïdes motiles [27].

### **1.5. Les protéines majeures du plasma séminal bovin**

Les protéines principales retrouvées dans le plasma séminal bovin constituent une famille de protéines communément appelée Binder of SPerm (BSP). Les protéines BSP représentent environ 65% des protéines totales du plasma séminal, soit une concentration de 30-50 mg/ml [46][47]. Elles sont sécrétées par les vésicules séminales. Tout récemment, la nomenclature des gènes et des protéines BSP a été modifiée afin d'éviter la confusion engendrée par les différents noms proposés par les groupes de recherche étudiant cette famille de protéines. La nouvelle nomenclature respecte les normes recommandées par le HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) [48]. Pour une meilleure compréhension des articles cités dans cette thèse, les noms originellement attribués aux protéines BSP seront mentionnés lors de leur description dans les différentes sous-sections.

#### **1.5.1. Propriétés biochimiques des protéines BSP**

La famille des protéines BSP bovines est représentée par trois protéines: BSP1, BSP3 et BSP5. La protéine BSP1 était originellement appelée PDC-109 ou BSP-A1/-A2 alors que BSP3 et BSP5 étaient connues sous les noms de BSP-A3 et BSP-30kDa, respectivement. BSP1 possède une masse théorique de 12,744 kDa et BSP3 de 13,403 kDa, mais elles ont des masses moléculaires apparentes plus élevées, qui varient de 15,5 à

16,5 kDa. La masse moléculaire de BSP5, calculée à partir de sa séquence d'acides aminés, est de 18,612 kDa, tandis que sa masse moléculaire apparente est de 28-30 kDa [49](revu dans [46]). Ces protéines sont acides avec un point isoélectrique de 3,6-5,2. BSP1 et BSP5 sont des protéines glycosylées, tandis que BSP3 ne l'est pas. Les carbohydrates sont liés à des groupements hydroxyles de résidus thréonine (O-glycosylé). BSP1 possède un disaccharide ou un trisaccharide (Gal-GalNAc- ou NeuNAc-Gal-GalNAc-, respectivement) et BSP5 possède six trisaccharides de même nature que celui mentionné plus haut (revu dans [26]).

### **1.5.2. Structure des protéines BSP**

Les protéines BSP sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique. Ce qui caractérise cette famille de protéines est que chaque membre possède une structure primaire comportant deux domaines homologues de type II (Fn2), placés en tandem et similaires à ceux retrouvés dans la fibronectine (Figure 3). Chaque domaine compte 38 à 41 acides aminés et les domaines sont reliés par deux ponts disulfure. La portion N-terminal de chaque protéine BSP est variable : celles de BSP1 et BSP3 possèdent de 23-28 acides aminés, tandis que celle de BSP5 en compte 71 acides aminés [50][51][49]. La structure cristalline de BSP1 a été élucidée [52]. Des modèles de similitudes de structure ont été proposés pour BSP3 et BSP5 [53]. Il a été estimé que l'aire transversale de la protéine BSP1 est d'environ 6-7,5 nm<sup>2</sup> [54].

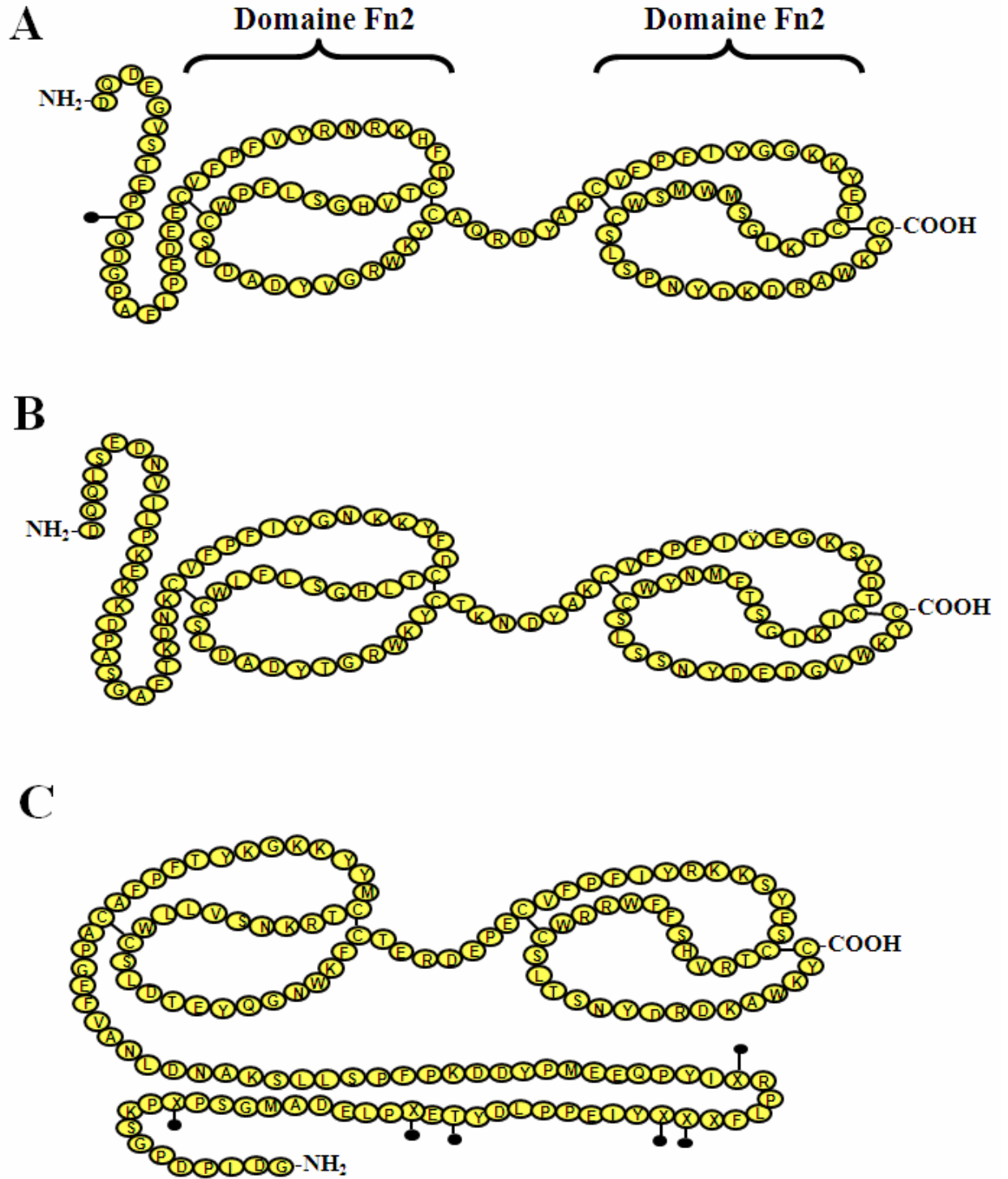
### **1.5.3. Propriétés de liaison des protéines BSP**

Les protéines BSP peuvent se lier à différentes macromolécules via leurs domaines Fn2, telles les glycosaminoglycans (GAG; héparine, chondroïtine sulfate B et héparan sulfate) [55][55][17], différents types de collagène (I, II, III et IV) [46], la gélatine [56], la

calmoduline [57], le fibrinogène [46], le fucose [58], l'apolipoprotéine A-I [59], les lipoprotéines de haute densité (HDL) [46][59] et les lipoprotéines de faible densité (LDL) [60].

Les protéines BSP se lient à la surface des spermatozoïdes lors de l'éjaculation et interagissent avec les phospholipides de la membrane plasmique, plus spécifiquement les PC, les PC plasmalogènes et les sphingomyélines [61][62]. Il a été démontré que  $9,3 \pm 0,3 \times 10^6$  molécules de BSP1 se liaient à la membrane d'un spermatozoïde éjaculé et que cette quantité demeurait constante, sauf lorsque les spermatozoïdes étaient incubés dans un milieu capacitant où le nombre de molécule de BSP1 diminuait légèrement [63].

Des études utilisant des vésicules de phospholipides synthétiques ont été effectuées afin de mieux comprendre comment les protéines BSP interagissent avec les membranes. Il a été démontré qu'une molécule de BSP1 pouvait se lier à 10-15 molécules de phosphatidylcholine [64][65][66]. La protéine BSP1 ne se lie pas seulement aux résidus choline des phospholipides, exposés au milieu aqueux, mais elle peut également interagir avec le cœur hydrophobe des liposomes [64]. La protéine BSP1 interagit avec les chaînes acyles des lipides jusqu'au quatorzième atome de carbone [54]. De plus, l'interaction de BSP1 avec des vésicules de phospholipides cause une rigidification de la phase lipidique [64].



**Figure 3.** Structure des protéines BSP [26]. Les sites de glycosylation sont indiqués par des cercles pleins et noirs. A) BSP1. B) BSP3. C) BSP5.



#### **1.5.4. Agrégation des protéines BSP**

Les protéines BSP ont tendance à former des agrégats [67], mais il n'est toutefois pas clair que ces agrégats soient actifs biologiquement ou ne représentent que des artefacts dus à la purification des protéines. En solution, la protéine BSP1 a tendance à être polydispersée et à s'agréger même si les carbohydrates sont enlevés; ceci suggère que ces tendances seraient attribuables à la chaîne polypeptidique [68]. Calvete [69] a montré que BSP1 possédait des propriétés de liaison à l'héparine seulement sous forme d'agrégat et qu'elle les perdait sous forme de monomère. De plus, BSP1 a été cristallisée sous forme de dimère et ses sites de liaison à la phosphorylcholine ont été identifiés [70][52]. L'analyse des structures suggère, entre autres, que la dimérisation de la protéine serait nécessaire à sa liaison à l'héparine [52].

#### **1.5.5. Rôle biologique**

La fonction des protéines BSP n'est pas complètement élucidée, mais leurs propriétés de liaison suggèrent qu'elles auraient un rôle à jouer dans la capacitation ainsi que dans la formation du réservoir oviductal de spermatozoïdes. Notons que les HDL et les GAGs sont retrouvés dans les fluides oviductal et folliculaire et induisent la capacitation des spermatozoïdes.

##### **1.5.5.1. Capacitation des spermatozoïdes**

Tel que mentionné précédemment, l'efflux de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes serait un des premiers événements se produisant lors de la capacitation. Il a été montré que chaque protéine BSP pouvait induire un efflux de cholestérol et de phospholipides de la membrane des spermatozoïdes épидидymaires de

taureau, phénomène qui variait en fonction selon du temps et de la concentration en protéines BSP [71][72]. De plus, les protéines BSP stimulent la capacitation des spermatozoïdes de taureau induite par l'héparine et les HDL [19][36]. Ces résultats ont amené à l'élaboration d'un mécanisme où les protéines BSP participeraient aux événements reliés à la modification des lipides de la membrane lors de la capacitation (revu dans [26]).

Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes de taureau entrent en contact avec les sécrétions des glandes accessoires contenant les protéines BSP. Ces dernières pourraient induire un premier efflux de lipides de la membrane, causant une déstabilisation. Des protéines BSP pourraient également se lier à la membrane des spermatozoïdes via les phosphatidylcholines. Tel que mentionné précédemment, le progrès des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle leur permet de quitter le plasma séminal. Ils pourraient ensuite être capités par les HDL et les GAGs présents dans les fluides oviductal et folliculaire. Les HDL pourraient interagir avec les protéines BSP liées sur la membrane des spermatozoïdes, ce qui créerait un deuxième efflux de lipides de la membrane. Ceci pourrait résulter en une diminution plus importante du ratio cholestérol/phospholipides de la membrane des spermatozoïdes, permettant ainsi l'activation de voies de signalisation intracellulaires inconnues amenant à la capacitation. Les protéines BSP liées à la membrane pourraient également servir de sites de liaison pour l'héparine et les GAGs des fluides folliculaire ou oviductal afin d'induire la capacitation des spermatozoïdes.

#### **1.5.5.2. Formation du réservoir oviductal de spermatozoïdes**

Les spermatozoïdes qui sont déposés dans le tractus génital femelle sont capturés dans la partie caudale de l'oviducte et forment ce qu'on appelle un réservoir de

spermatozoïdes (revu dans [73]). Ce réservoir servirait à conserver les spermatozoïdes fertiles jusqu'au moment de l'ovulation et pourrait contribuer à prévenir la polyspermie. Il a été montré que les protéines BSP bovines permettraient aux spermatozoïdes de se lier aux cellules de l'oviducte et de former un réservoir oviductal de spermatozoïdes [74][75].

### **1.5.6. Protéines homologues aux protéines BSP**

Des antigènes semblables aux protéines BSP ont été détectés dans les sécrétions des vésicules séminales de rat, de souris, de hamster, de porc et dans le plasma séminal d'humain [76]. Les séquences complètes d'ADNc des gènes encodant les protéines homologues aux protéines BSP chez l'humain et la souris ont été clonées [77].

Le plasma séminal d'étalon contient approximativement 20% de protéines BSP, correspondant à environ 2 mg/ml [78]. Trois protéines homologues ont été isolées et caractérisées : BSP1 et BSP2 (anciennement connues sous les noms de HSP-1 ou SP-1 et HSP-2 ou SP-2, respectivement) [79][80], ainsi qu'une protéine de 12 kDa [81]. BSP1 et BSP2 équine ont une affinité pour l'héparine, la gélatine et les PC [79][80]. La séquence complète en acides aminés de BSP1 équine a été déterminée [79]. Tout comme les protéines BSP bovines, les protéines BSP équine interagissent avec les LDL du jaune d'œuf [81]. La fonction des protéines BSP équine n'a pas encore été élucidée, toutefois, BSP1 équine peut interagir avec des lipides membranaires. Par contre, il semble que cette interaction ne soit pas aussi forte que celle des BSP bovines [82]. De plus, BSP1 équine ne peut pas extraire des lipides des érythrocytes, tel que démontré pour BSP1 bovine [82].

Une seule protéine homologue aux protéines BSP a été isolée et purifiée du plasma séminal de porc : BSP1 porcine anciennement connue sous le nom de pB1 [80]. Des analyses de séquence ont montré que cette protéine avait déjà été identifiée auparavant et

qu'elle induisait l'adhésion des leukocytes dans les vésicules séminales de porc pendant la réaction inflammatoire [83]. BSP1 porcine représente ~1% des protéines totales du plasma séminal porcine [84]. Cette protéine peut se lier à l'héparine, au sulfate de chondroïtine, aux PC et aux spermatozoïdes épидидymaires [80] [85][86]. Il a été récemment montré que BSP1 porcine pouvait capaciter les spermatozoïdes épидидymaires de porc [87].

Des protéines homologues aux protéines BSP ont également été isolées et purifiées du plasma séminal de bélier, de bouc et des vésicules séminales de bison. Chez le bélier, il y a quatre protéines BSP qui possèdent des masses moléculaires relatives de 15, 16, 22 et 24 kDa et qui constituent ~20% des protéines totales du plasma séminal [88]. Quatre protéines homologues aux protéines BSP sont retrouvées dans le plasma séminal de bouc, avec des masses moléculaires relatives de 14, 15, 20 et 22 kDa. Elles constituent ~50% des protéines totales du plasma séminal de bouc [89]. Quatre protéines BSP (16, 17, 18 et 28 kDa) ont été isolées chez le bison et représentent ~20% des protéines totales [90]. Les protéines BSP de bouc, de bélier, d'étalon et de bison peuvent se lier à la gélatine, l'héparine (sauf les BSP de bouc de 14 et 15 kDa, ainsi que la BSP de bison de 16 kDa) et les LDL.

### **1.6. La conservation des spermatozoïdes**

Les spermatozoïdes de mammifères peuvent être conservés sans être congelé pendant une courte durée, soit de quelques heures à quelques jours (à 4 °C ou entre 15-20 °C). La cryoconservation, qui consiste à congeler et entreposer la semence dans l'azote liquide (-196 °C), permet de conserver les spermatozoïdes pendant plusieurs années.

La conservation de la semence joue un rôle important dans le domaine de la reproduction des animaux de ferme : les spermatozoïdes peuvent ainsi être utilisés au

moment voulu pour l'insémination artificielle. De plus, la conservation permet de distribuer la semence à travers le monde et un éjaculat peut être divisé en plusieurs petites doses pour inséminer des femelles [91][92]. La sélection génétique est ainsi facilitée. Également, la conservation des spermatozoïdes permet de préserver le patrimoine génétique d'animaux en voie d'extinction et peut servir au traitement de l'infertilité.

Les spermatozoïdes étant des cellules sensibles aux changements de température, certaines précautions doivent être prises afin de permettre leur conservation. Il faut tout d'abord qu'ils soient dilués dès la récolte, dans un milieu protecteur que l'on nomme diluant. Les ratios de dilution utilisés varient d'une espèce à l'autre, variant habituellement de 1 : 10 à 1 : 20 (semence : diluant). L'utilisation de ratios de dilution des spermatozoïdes épидидymaires ou éjaculés plus grands affectent négativement la motilité et la viabilité des spermatozoïdes de taureau, de lapin et de bélier [31][93]. Ce phénomène est appelé « effet de dilution » (revu dans [94]).

La dilution, le refroidissement et la congélation entraînent des dommages irréversibles aux spermatozoïdes et perturbent les fonctions spermatiques. Par exemple, leur pouvoir fécondant est diminué [95]. De plus, environ la moitié des spermatozoïdes survivent après la cryoconservation, et de ceux-ci, la majorité sont endommagés et ont de la difficulté à progresser dans le tractus génital femelle [95][96][97][98]. La cryoconservation affecte négativement la motilité des spermatozoïdes. Par exemple, il faut utiliser un nombre plus grand de spermatozoïdes bovins cryoconservés comparativement à des spermatozoïdes fraîchement éjaculés, pour obtenir un pourcentage de fécondation équivalent, car la cryoconservation réduit leur vélocité [99][100]. Par rapport à d'autres types cellulaires les spermatozoïdes sont des cellules très vulnérables à la congélation;

ceci est dû à leur forme effilée, la présence d'un acrosome et la nature hétérogène de leur membrane plasmique [5].

Les sections suivantes décrivent plus en détails les effets subis par les spermatozoïdes lors de la conservation, la composition des diluants, ainsi que le rôle des différents constituants des diluants.

### **1.6.1. Conservation de la semence de différents mammifères**

La méthode de conservation de la semence diffère d'une espèce à l'autre. Généralement, après dilution, la semence est refroidie à environ 4 °C sur une période de 2-4 heures, ce qui permet de ralentir le métabolisme des spermatozoïdes et de prolonger leur survie. La semence peut être conservée ainsi ou encore être distribuée dans des paillettes pour ensuite être cryoconservée. Cette section traitera des particularités reliées à la conservation des spermatozoïdes de taureau, de bélier, d'étalon et de porc.

Le taureau est l'espèce où la conservation des spermatozoïdes est la mieux établie. La semence de taureau peut être conservée à l'état liquide ou être cryoconservée. Lors de la congélation, la semence est diluée 1 : 5 avec un diluant ne contenant pas de glycérol, puis elle est refroidie à 5 °C. Le glycérol est ensuite ajouté et la semence congelée (revu dans [91]). La semence de taureau est généralement diluée à une concentration de 40 ou 80 millions de spermatozoïdes/ml, ce qui équivaut à un ratio de dilution d'environ 1 : 15 ou 1 : 30 (semence : diluant).

La semence de bélier peut être conservée à l'état liquide (5 ou 15-20 °C) ou être cryoconservée (revu dans [101]). Le choix du type de conservation chez cette espèce dépend de la technique d'insémination artificielle qui sera utilisée. La semence conservée

à l'état liquide est inséminée de manière exo-cervicale (à l'entrée du col de l'utérus). La cryoconservation de la semence de bélier réduit de beaucoup le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. L'utilisation de l'insémination exo-cervicale avec la semence cryoconservée donne lieu à de faibles taux de fécondation. La semence cryoconservée doit être inséminée de manière intra-utérine (par laparoscopie, à l'intérieur des cornes utérines) afin d'obtenir des taux de fécondité élevés (revu dans [101]). Étant donné que la laparoscopie est plus coûteuse, car elle demande l'aide d'un vétérinaire et d'un équipement dispendieux, la semence non congelée est surtout utilisée pour l'insémination artificielle chez le bélier. L'éjaculat de bélier est directement dilué dans un diluant et des ratios variant de 1 : 2 à 1 : 5 sont généralement utilisés avant la cryoconservation [101].

La semence d'étalon peut être conservée à l'état liquide ou être cryoconservée. Aux États-Unis, la semence qui est conservée à l'état liquide est habituellement diluée à une concentration de 25-50 millions de spermatozoïdes/ml dans un diluant composé de lait écrémé [102], ce qui équivaut à un ratio de dilution variant de 1 : 10 à 1 : 20. Une concentration élevée de plasma séminal dans la semence diluée d'étalon est néfaste lors de la conservation [103]. Des ratios élevés de dilution de la semence permettent de diminuer l'effet néfaste du plasma séminal d'étalon lors de la conservation à l'état liquide [104]. Par contre, si tout le plasma séminal est enlevé, la motilité des spermatozoïdes est affectée négativement [105]. La présence d'un certain volume de plasma séminal semble donc requise pour une meilleure préservation des spermatozoïdes d'étalon lors de la conservation à l'état liquide.

Il n'est pas possible de cryoconserver la semence de tous les étalons. En effet, environ 20% des étalons produisent une semence qui ne peut être cryoconservée et cette

variabilité entre les individus n'est pas encore comprise [106][107]. L'ajout de plasma séminal provenant de la semence d'étalons dont les spermatozoïdes conservent une bonne motilité après le dégel à des spermatozoïdes d'étalons ayant des spermatozoïdes qui ont une faible motilité après le dégel améliore la motilité de ces derniers [108]. Ceci suggère que le plasma séminal de certains étalons a un effet toxique sur la motilité des spermatozoïdes. Le plasma séminal est généralement enlevé par centrifugation avant de cryoconserver les spermatozoïdes d'étalon [109].

Les spermatozoïdes de porc sont très sensibles au refroidissement. La majorité des inséminations artificielles chez le porc est effectuée avec de la semence conservée entre 15-20 °C, car le taux de gestation est diminué et les portées sont plus petites lorsque la semence cryoconservée est utilisée [110][111][112]. Avant la congélation de la semence porcine, le plasma séminal est généralement enlevé afin d'éviter son effet toxique sur les spermatozoïdes [113]. La dilution de la semence de porc avec un diluant ne dépasse habituellement pas un ratio semence : diluant de 1 : 10 [111].

La cryoconservation des spermatozoïdes humains a commencé durant les années 40, suite à la découverte du glycérol comme agent protecteur [114]. Un entreposage adéquat de la semence dans l'azote liquide permet de conserver les spermatozoïdes humains sur une longue période de temps sans que la qualité ne soit affectée. En effet, des enfants sont nés suivant l'insémination avec de la semence cryoconservée depuis plus de vingt-huit années [115]. Les spermatozoïdes humains ne sont pas très sensibles au choc causé par une diminution de température et ils tolèrent assez bien la cryoconservation [114]. Les protocoles d'analyse et de conservation de la semence humaine sont



standardisés et rassemblés dans un livre qui est publié par l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization, WHO) [114].

Différents facteurs peuvent influencer l'aptitude des spermatozoïdes de différentes espèces à être congelés, comme la physiologie et la biochimie du spermatozoïde, ainsi que des variations dans le transport des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle [116].

## **1.6.2. Effets néfastes de la conservation sur les spermatozoïdes**

### **1.6.2.1 Choc dû au froid**

Le refroidissement des spermatozoïdes à une température inférieure à 15 °C cause un choc thermique qui est nommé choc dû au froid (« cold shock »). Le choc dû au froid affecte principalement les membranes plasmique, acrosomique et mitochondriale des spermatozoïdes [5][100][117]. La fluidité des membranes est modifiée pendant le changement de température. Les membranes des spermatozoïdes passent d'une phase plus fluide (liquide-cristalline) à une phase plus rigide (gel) lors du refroidissement, ce qui les rend plus cassables. Le changement de phase qu'engendre le refroidissement rend les membranes moins fonctionnelles (revu dans [118]).

Le choc dû au froid entraîne une diminution de la concentration de cholestérol et de phospholipides de la membrane plasmique [119][120]. Il entraîne aussi une augmentation de la perméabilité membranaire permettant l'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$  et la sortie des ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Mg}^{2+}$  [121][5]. Certaines des composantes du spermatozoïdes sont retrouvées dans le diluant après le refroidissement, telle la hyaluronidase, ce qui indique que la membrane acrosomique a été endommagée [121][122]. Les dommages aux membranes des mitochondries induits par le choc dû au froid entraînent une diminution de

la production d'ATP (revu dans [100]). Les spermatozoïdes épидидymaires de taureau, d'étalon et de bélier sont plus résistants au choc dû au froid que les spermatozoïdes éjaculés [123](revu dans [7]).

### **1.6.2.2 Congélation et dégel**

La congélation et le dégel des spermatozoïdes entraînent des dommages importants aux spermatozoïdes (revu dans [5]). En effet, pendant la congélation, il y a formation de glace dans le milieu où sont dilués les spermatozoïdes, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la concentration en solutés dans le milieu extracellulaire [124]. Ceci provoque une déshydratation des spermatozoïdes et une fluctuation de leur volume, causant des dommages à leurs membranes. La congélation des spermatozoïdes peut également entraîner la formation de glace intracellulaire, ce qui est fatal pour les cellules. La survie des spermatozoïdes peut être maximisée en utilisant un taux de refroidissement qui est assez rapide pour empêcher l'effet néfaste de la concentration élevée des solutés du milieu, mais assez lent pour éviter la formation de glace intracellulaire [5]. Ce taux de refroidissement optimal varie d'une espèce à l'autre [100][125]. Chez le bovin, le taux de refroidissement est situé entre -50 et -100 °C/min (revu dans [92]). La semence refroidie à 4 °C est généralement congelée jusqu'à une température de -140 °C et entreposée dans l'azote liquide à -196 °C.

Le dégel des spermatozoïdes est fait rapidement. Les paillettes qui étaient entreposées dans l'azote liquide sont mises dans un bain d'eau à 37 °C pendant une minute. La semence décongelée peut alors être utilisée pour l'insémination artificielle. La glace présente dans le milieu extracellulaire fond et cela diminue rapidement la concentration des solutés dans le milieu extracellulaire [5]. De l'eau pénètre alors dans les

spermatozoïdes, augmentant leur volume et causant par le fait même des dommages aux membranes [5][100]. Tout comme ce qui se passe durant la congélation, les membranes des spermatozoïdes subissent des changements de phase durant le réchauffement (phase gel à la phase liquide-cristalline), ce qui entraîne une réorganisation des lipides et des protéines de la membrane et les rend moins fonctionnelles [5]. Le dégel cause des dommages à la structure de l'acrosome, ainsi que des ruptures des membranes de spermatozoïdes [100][116].

Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est affecté par la cryoconservation. Ils subissent des modifications semblables à celles observé lors de la capacitation et se comportent comme s'ils avaient été capités [100]. Ce phénomène est appelé cryocapacitation. Il est accompagné d'une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et on peut observer sous microscope une augmentation de la proportion des spermatozoïdes présentant un profil de spermatozoïde capité.[126][127][128]. La cryoconservation induit également une perte de protéines membranaires et une diminution de la capacité des spermatozoïdes à se lier aux cellules épithéliales de l'oviducte [129][130][131]. De plus, les dommages causés par la cryoconservation pourraient altérer l'ADN et la structure de la chromatine des spermatozoïdes [132](revu dans [133]).

### **1.6.2.3. Composition lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes**

Tel que mentionné à la section 1.6.1., les spermatozoïdes de certains mammifères sont plus sensibles à la cryoconservation que d'autres. En effet, ceci serait dû à la composition en lipides des membranes de spermatozoïdes. Par exemple, les spermatozoïdes de taureau et de bélier sont moins résistants au refroidissement que ceux d'humain et de lapin. Le ratio molaire cholestérol : phospholipides de la membrane

plasmique des spermatozoïdes bovin et de bélier est plus faible que celui d'humain et de lapin [134][135]. Le cholestérol stabilise les membranes en interagissant avec les chaînes acyles des phospholipides [136]. Il a été montré que la résistance des spermatozoïdes au choc dû au froid est diminuée lorsqu'il y a une diminution du contenu en cholestérol de leurs membranes [134]. Le ratio cholestérol : phospholipide est important pour déterminer la fluidité membranaire ainsi que la susceptibilité de la membrane aux dommages causés par le refroidissement. Si la membrane contient moins de cholestérol, elle est moins stable et a plus tendance à se fracturer lors du refroidissement. Le ratio de lipides insaturés : saturés influence aussi la susceptibilité des membranes aux dommages causés par le refroidissement [7]. En effet, les chaînes saturées sont plus rigides que celles insaturées. Une quantité élevée de chaînes insaturées dans les membranes de spermatozoïdes les rend donc plus fragiles aux bris causés par des changements de températures.

#### **1.6.2.4. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

Les spermatozoïdes produisent des ROS, telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxide nitrique (NO) et l'anion superoxide ( $O_2^-$ ). La mitochondrie est une source majeure de la production de ROS chez les spermatozoïdes humains [137]. La génération de ROS dans la semence bovine est principalement causée par les spermatozoïdes morts suite à une réaction catalysée par une oxidase d'acide aminé aromatique [138]. Les ROS sont connus pour causer des dommages oxydatifs aux lipides membranaires et à l'ADN et inactiver des protéines [139]. L'excès de ROS est également corrélé à une diminution de la motilité [132](revu dans [140]). Les spermatozoïdes peuvent se protéger de l'effet néfaste des ROS grâce aux enzymes antioxydantes présentes dans leur cytoplasme, telles que la catalase, la dismutase superoxide, glutathione peroxidase [141]. Des agents

réducteurs (glutathion, acide ascorbique, taurine et hypotaurine) présents dans les spermatozoïdes ou dans leur environnement aident aussi à les protéger des ROS (revu dans [92]). Étant donné que le volume et la distribution du cytoplasme des spermatozoïdes est limité, ces cellules possèdent peu d'enzymes antioxydantes pour se défendre de l'attaque des radicaux libres ou d'un excès de ROS, ce qui les rends particulièrement vulnérables.

Malgré que les ROS sont principalement connues pour avoir un effet néfaste sur les cellules, il est maintenant montré qu'ils ont un effet bénéfique sur les spermatozoïdes en jouant un rôle dans la cascade des événements qui mènent à la capacitation et à la réaction de l'acrosome [92][139]. Par exemple,  $H_2O_2$  aurait un effet bénéfique sur la capacitation des spermatozoïdes en augmentant le nombre de spermatozoïdes hyperactivés ainsi que le nombre de spermatozoïdes ayant subit la réaction de l'acrosome [142][143].

Durant la cryoconservation, des ROS sont également générés. L'excès de ROS qui est produit pendant la cryoconservation est associé avec une diminution de la viabilité, de la motilité, de l'intégrité de l'acrosome et de la fertilité des spermatozoïdes après le dégel (revu dans [144]). Les spermatozoïdes cryoconservés possèdent un système de défense contre les ROS qui est diminué par rapport à des spermatozoïdes fraîchement éjaculés. En effet, le niveau de la glutathione peroxidase est très faible et il y a absence de catalase chez les spermatozoïdes bovins cryoconservés par rapport aux spermatozoïdes fraîchement éjaculée [145]. De plus, la cryoconservation des spermatozoïdes humains entraîne une diminution de l'activité de la superoxide dismutase [146]. Les ROS peuvent oxyder les chaînes insaturées qui sont présentes en grande proportion dans la membrane plasmique des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes sont incapables de synthétiser des lipides et ne

peuvent donc pas remplacer les chaînes oxydées (revu dans [92]). La cryoconservation des spermatozoïdes humains entraîne une augmentation des dommages causés par la peroxydation des lipides de la membrane plasmique [146].

### **1.6.3. Les diluants**

Il existe une grande variété de diluants protecteurs utilisés pour la conservation des spermatozoïdes de mammifères. Certains sont vendus commercialement, d'autres sont préparés selon les recettes existantes.

#### **1.6.3.1. Composition**

La composition des diluants est variable, mais certains ingrédients de base sont généralement utilisés. Le diluant est un milieu liquide qui contient un tampon afin de garder un pH extracellulaire optimal pour la survie des spermatozoïdes (qui varie de 6,7 à 7,0), ainsi qu'une osmolarité adéquate (entre 320-350 mOsm). Les tampons utilisés sont généralement des tampons à base de phosphate, de Tris ou de citrate de sodium [91]. Le diluant contient également un ou plusieurs sucres, tels que du glucose, du lactose, du raffinose, du saccharose ou du tréhalose [133]. Des antibiotiques sont ajoutés, tels que de la pénicilline ou de la streptomycine, pour prévenir la croissance bactérienne. Également, on doit ajouter un agent protecteur contre le choc dû au froid, comme le jaune d'œuf ou le lait. Lorsque les spermatozoïdes sont congelés, l'ajout d'un agent cryoprotecteur, tel que le glycérol, s'impose.

#### **1.6.3.2. Les agents protecteurs**

Il y a plus de soixante ans, les propriétés du jaune d'œuf comme agent protecteur durant le refroidissement étaient découvertes et le lait était utilisé comme diluant pour la

semence bovine [147](revu [148]). On ne sait pas clairement comment ces agents protègent les spermatozoïdes, mais il est reconnu qu'ils ont un effet bénéfique sur leur viabilité, leur motilité et leur pouvoir fécondant post-conservation.

#### **1.6.3.2.1 Le jaune d'œuf**

Le jaune d'œuf est un agent protecteur non-perméant, il ne pénètre donc pas dans la cellule. Il protège les spermatozoïdes lors du refroidissement et durant la congélation [147][149]. Le jaune d'œuf est ajouté aux diluants utilisés pour conserver les spermatozoïdes de taureau, ainsi que ceux de plusieurs mammifères, tels que le buffle (revu dans [150]), le bélier (revu dans [101]), le bouc (revu dans [151]), le porc (revu dans [111]), le chien [152], l'humain [153], la gazelle [154], le singe [155] et le chat [156]. Le jaune d'œuf est composé d'eau, de lipides, de protéines, de glucides, de minéraux et de vitamines [157]. Plusieurs données attestent que la fraction de lipoprotéines de faible densité (LDL) est le constituant du jaune d'œuf qui protège les spermatozoïdes durant la cryoconservation [158][159][160]. Ainsi, des LDL isolés à partir du jaune d'œuf protègent aussi efficacement les spermatozoïdes que le jaune d'œuf entier lors du refroidissement et de la congélation [122][159][160][161].

La fraction de LDL est le constituant majeur du jaune d'œuf et représente environ 2/3 de la matière solide. Les LDL sont des particules sphériques composées d'approximativement 11% de protéines et 89% de lipides [162]. Les lipides principaux sont les triglycérides (70%) qui forment le cœur hydrophobe de la particule. Ils sont entourés par une monocouche de phospholipides et de cholestérol (26 et 4% (m/m) des lipides totaux, respectivement). Le principal phospholipide retrouvé dans les LDL est la diacyl-PC (73% (m/m) des phospholipides), mais il y a aussi de la

phosphatidyléthanolamine (PE, 19%) et d'autres lipides (lyso-PC, sphingomyéline et lyso-PE, 9% (m/m)) [162][163]. Des protéines, nommées apovitelline I, II, III, IV, V, VI, sont insérées dans la monocouche de phospholipides [162][164].

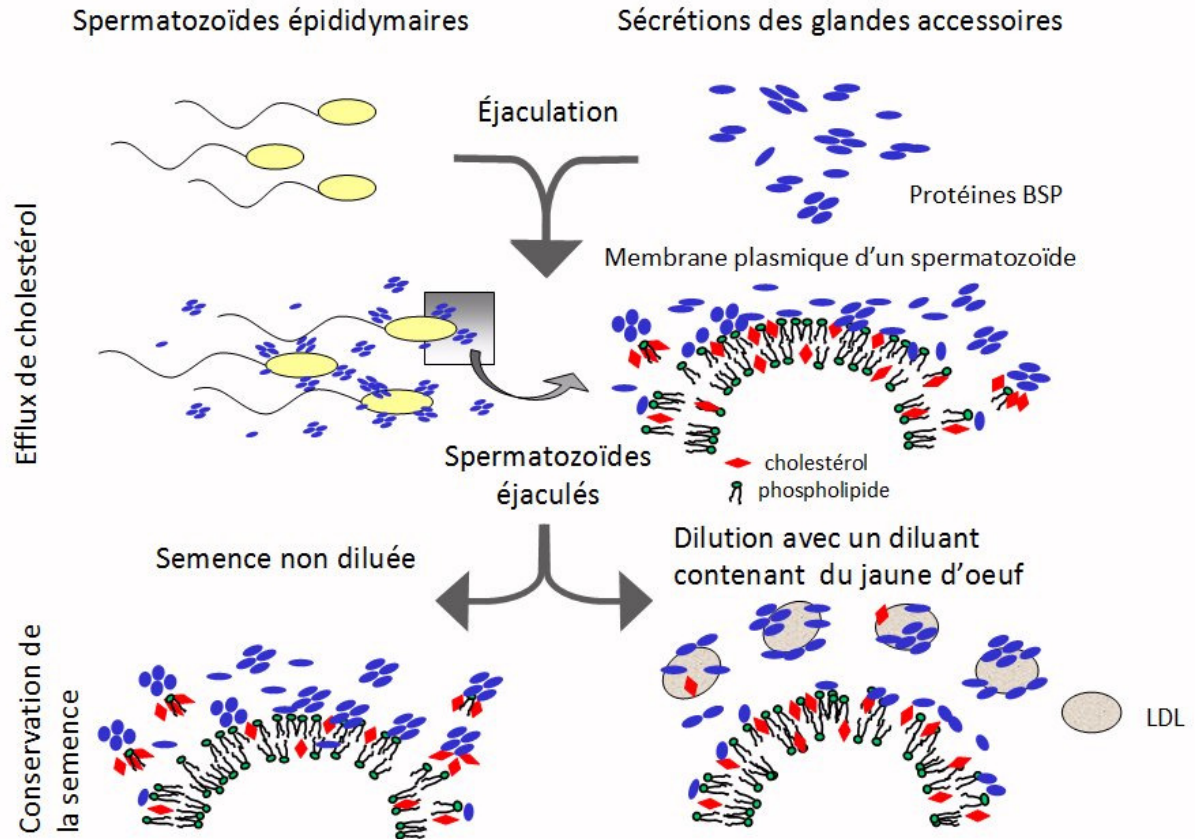
Le mécanisme par lequel le jaune d'œuf protège les spermatozoïdes n'est pas élucidé. Une première hypothèse propose que les LDL s'associent à la membrane des spermatozoïdes et la stabilisent, ce qui protégerait les spermatozoïdes. Toutefois, des résultats contradictoires sont obtenus quant à la stabilité de ce complexe [122][165][166][167]. Une seconde hypothèse suggère que les phospholipides des LDL formeraient un film protecteur à la surface des spermatozoïdes ou encore remplaceraient les phospholipides perdus ou endommagés de leur membrane durant la cryoconservation [165][168][169]. Il est impossible de mimer la protection que le jaune d'œuf ou les LDL fournissent aux spermatozoïdes bovins durant la conservation en utilisant des liposomes de PC et de cholestérol [149]. De plus, les PC d'origine végétale ne sont pas aussi efficaces que des diluants contenant du jaune d'œuf pour protéger les spermatozoïdes bovins lors de la cryoconservation [170][171]. Une troisième hypothèse propose que le jaune d'œuf entre en compétition avec des agrégats de peptides cationiques (< 5 kDa) présents dans le plasma séminal bovin et qui sont néfastes pour les spermatozoïdes [172]. Les facteurs cationiques présents dans le jaune d'œuf viendraient se lier aux spermatozoïdes bovins et empêcheraient les peptides cationiques néfastes du plasma séminal d'interagir avec les spermatozoïdes [173].

Un nouveau mécanisme de protection des spermatozoïdes par le jaune d'œuf a été proposé par notre laboratoire (revu dans [78]). Tel que mentionné précédemment, les protéines BSP peuvent se lier aux LDL du jaune d'œuf [60]. Cette interaction est rapide,



spécifique, saturable et le complexe formé est stable après la congélation et le dégel de la semence bovine [60]. Une particule de LDL peut se lier à 240-555 molécules de protéines BSP. De plus, les protéines homologues aux BSP dans le plasma séminal des autres mammifères possèdent également cette propriété de liaison (revu dans [78]). Lorsque des spermatozoïdes bovins sont dilués avec un diluant contenant des LDL isolés à partir du jaune d'œuf, 50-80% moins de protéines BSP se lient à la membrane des spermatozoïdes, par rapport au témoin ne contenant pas de LDL ou de jaune d'œuf [174]. De plus, il y a une diminution de l'efflux de lipides de la membrane des spermatozoïdes lorsqu'ils sont dilués dans un diluant contenant des LDL ou du jaune d'œuf. La motilité, l'intégrité de l'acrosome et la viabilité sont protégées lorsque les spermatozoïdes sont dilués dans un diluant contenant des LDL [174].

Ces résultats ont permis de proposer le mécanisme suivant concernant la protection des spermatozoïdes par un diluant contenant du jaune d'œuf (Figure 4). Lorsque les spermatozoïdes sont éjaculés, ils entrent en contact avec les protéines BSP. *In vivo*, les spermatozoïdes ne sont pas en contact pendant une longue période avec le plasma séminal et seulement la quantité de protéines BSP nécessaire à la capacitation se lie à la membrane plasmique du spermatozoïde. Dans un contexte de conservation *in vitro*, les spermatozoïdes sont en contact avec un excès de protéines BSP qui induisent un efflux continu de lipides de la membrane plasmique du spermatozoïde [174]. Lorsque les spermatozoïdes sont dilués avec un diluant contenant du jaune d'œuf, l'excès de protéines BSP du plasma séminal serait séquestré par les LDL, ce qui permettrait de préserver l'intégrité de la membrane plasmique de spermatozoïdes durant la conservation [78].



**Figure 4.** Mécanisme de protection des spermatozoïdes par le jaune d'oeuf (adapté de [78]).

#### 1.6.3.2.2. Le lait

Le lait est utilisé pour diluer les spermatozoïdes de différents mammifères, tels que le taureau [175], l'étalon (revu dans [108]), le bouc (revu dans [151]), le bélier (revu dans [101]), le buffle (revu dans [150]), le chien [176] et la souris [177]. Le lait entier et le lait écrémé (sans lipides) protègent aussi bien les spermatozoïdes que les diluants contenant du jaune d'œuf (revu dans [148]). Toutefois, les spermatozoïdes qui ont été dilués avec du lait sont moins visibles au microscope que ceux dilués avec du jaune d'œuf, ce qui rend difficile l'évaluation de la semence [91][118]. Le lait joue le rôle de tampon et d'agent

protecteur contre le choc dû au froid [178][179][175]. Le lait écrémé ou complet doit toutefois être chauffé durant 10 minutes à 95 °C avant d'être utilisé comme diluant, ceci afin d'inactiver un facteur néfaste pour la survie des spermatozoïdes, la lacténine [180]. Après avoir été chauffé, le lait est refroidi et il est ensuite filtré pour enlever le coagulum qui s'est formé durant le chauffage.

Le lait entier est un milieu complexe composé majoritairement d'eau (90%), de lipides (3,7%), de protéines (3,2%), de sucres (4,6%) et de minéraux (0,8%) [181]. Il contient aussi des enzymes, des vitamines, des gaz et des pigments en très faible quantité. Les principaux lipides retrouvés dans le lait entier sont les triglycérides (98%), mais il y a aussi des phospholipides (1%) et du cholestérol (0,4%) [181]. Les phospholipides du lait sont des PC (33%), des PE (33%), des phosphatidylsérines (PS, 0,3%), des phosphatidylinositols (PI, 0,5%) et des sphingomyélines (25%). Ces lipides se retrouvent dans le lait sous forme de petites sphères ayant un diamètre variant de 0,1 à 20 µm. Les sphères de lipides sont formées de triglycérides entourés d'une couche de phospholipides et de protéines [182]. L'homogénéisation du lait permet de réduire le diamètre de ces sphères de lipides et de prévenir la séparation des lipides de la partie aqueuse du lait. Le lait écrémé contient les mêmes constituants que le lait entier, mais il est pratiquement exempt de lipides ( $\leq 0,1\%$ , surtout des triglycérides).

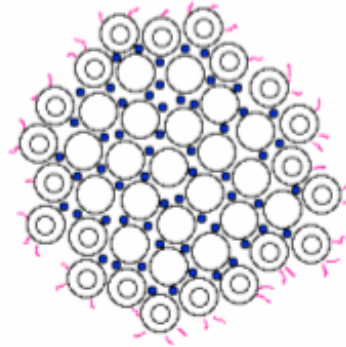
Afin de comprendre comment le lait protège les spermatozoïdes, l'effet des différents composants du lait lors de la conservation a été étudié, mais aucun mécanisme n'a été proposé. Puisque le lait écrémé protège aussi efficacement les spermatozoïdes bovins que le lait entier durant la conservation à 4 °C ou encore durant la cryoconservation, il semble que les lipides ne soient pas le constituant qui a le rôle d'agent

protecteur [175][179]. Le lactose, qui est le sucre le plus abondant retrouvé dans le lait (4,8%) [181], améliore l'efficacité des diluants [183]. De plus, le filtrat de lait, qui contient du lactose et des minéraux, ne permet pas de protéger les spermatozoïdes d'étalon pendant la conservation [184].

Le composant du lait qui protégerait les spermatozoïdes semble être les caséines, les protéines qui sont retrouvées en plus grande concentration dans le lait (80% m/m) [181][185]. Des études montrent que les caséines isolées du lait protègent les spermatozoïdes de taureau, d'étalon et de bélier durant la conservation à 4-5 °C [186][187][188][184][189][190]. Également, les caséines protègent les spermatozoïdes de taureaux durant la congélation en présence de glycerol [183].

Les caséines se retrouvent dans le lait sous forme d'agrégats que l'on nomme micelles. Les micelles sont composées de quatre caséines,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ . Elles possèdent un rayon qui varie de 10-300 nm, avec une masse moyenne de  $2.5 \times 10^8$  [191][192][193][194]. Elles sont composées d'un cœur hydrophobe formé par les caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  et  $\beta$  entourées par une couche de caséines  $\kappa$  [195][185]. Du phosphate de calcium relie les caséines entre elles. Chaque micelle contient entre 20 000 et 150 000 molécules de caséines [194] (Figure 4).

Les autres protéines du lait sont communément appelées protéines du sérum (« whey proteins ») et représentent environ 20% (m/m) des protéines du lait. On retrouve de l' $\alpha$ -lactalbumine, de la  $\beta$ -lactoglobuline, de l'albumine, des immunoglobulines, la lactoferrine, ainsi que des enzymes et autres protéines sous forme de traces [181][185]. Les deux principales protéines du sérum sont la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine (55 et 22% (m/m), respectivement).



**Figure 5.** Structure d'une micelle de caséines. Les points pleins représentent le phosphate de calcium, les cercles vides représentent les caséines et les traits entourant la micelle représentent la structure désordonnée de la caséine  $\kappa$  (image modifiée provenant de <http://www.foodsci.uoguelph.ca/deicon/casein.html>).

On ne sait pas clairement si les protéines du sérum ont un rôle à jouer dans la protection des spermatozoïdes. Le perméat de lait (lait écrémé sans les caséines) n'est pas suffisant pour protéger les spermatozoïdes bovins [190]. L'ajout de  $\beta$ -lactoglobuline n'améliore pas un diluant contenant des phosphocaséinates natives lorsque des spermatozoïdes de bouc ou d'étalon sont conservés à 4 °C [184][189]. Les phosphocaséinates natives sont obtenues par microfiltration sur membrane et consistent en un mélange de caséines [184]. Par contre, lorsque la  $\beta$ -lactoglobuline est utilisée seule, elle peut protéger des spermatozoïdes d'étalon à une concentration optimale de 45 g/L [184]. L' $\alpha$ -lactalbumine n'est pas suffisante pour protéger les spermatozoïdes d'étalon durant la conservation à 4 °C [184], mais elle semble améliorer l'efficacité des diluants utilisés pour cryoconserver les spermatozoïdes de bélier [196].

### 1.6.3.2.3. Agents cryoprotecteurs

Des agents cryoprotecteurs sont ajoutés dans les diluants afin de protéger les spermatozoïdes durant la congélation. L'agent cryoprotecteur le plus efficace et le plus utilisé est le glycérol; agent perméant, il peut donc pénétrer et diffuser à l'intérieur des cellules [92][121][116]. Il abaisse la température de nucléation de l'eau à l'intérieur de la cellule, ce qui diminue les risques de formation de glace intracellulaire qui est létale pour les cellules. De plus, le glycérol diminue la température à laquelle les membranes subissent un changement de phase (phase liquide-cristalline à phase gel) pendant le refroidissement. Le glycérol permet donc de conserver les membranes plus fluides jusqu'à des températures plus basses, diminuant ainsi le risque de cassure des membranes des spermatozoïdes causée par le choc dû au froid. Il atténue également les changements de volume que les spermatozoïdes subissent lors de l'augmentation de la concentration des solutés à l'extérieur de la cellule causée par la congélation de l'eau extracellulaire [124]. La concentration de glycérol ajouté aux diluants varie d'une espèce à une autre. Généralement, les diluants pour la semence bovine contiennent de 4-8% de glycérol, tandis que pour la semence porcine, il ne faut pas excéder 3%, sinon cela cause des dommages à l'acrosome [96]. Une concentration de 2-2,5% de glycérol est utilisée lors de la cryoconservation des spermatozoïdes d'étalon [197]. D'autres agents cryoprotecteurs perméants sont utilisés pour la cryoconservation des spermatozoïdes, comme le diméthylsulfoxyde, le 1,2-propanediol ou l'éthylène glycol [92][118][198].

### 1.6.3.3. Les constituants qui améliorent la conservation

Plusieurs constituants ont été ajoutés dans les diluants afin d'améliorer leur efficacité. Ils permettent surtout d'améliorer légèrement la motilité des spermatozoïdes [92][116].

Différents glucides ont été ajoutés aux diluants, tels que le glucose, le fructose, le raffinose, le galactose, etc (revu dans [199]). Ils participent à l'équilibre osmotique du diluant et sont non-perméants. Ils auraient comme rôle de stabiliser les membranes des spermatozoïdes [91]. L'ajout de tréhalose, de saccharose ou de lactose dans un diluant utilisé pour cryoconserver des spermatozoïdes bovins permet d'augmenter le pourcentage de motilité suivant le dégel de la semence [199][200][201]. Chez le bélier, le raffinose et saccharose fournissent une meilleure protection de l'intégrité de l'acrosome, par rapport au glucose, au fructose ou au lactose [101]. Les spermatozoïdes de bouc peuvent être congelés dans un diluant où le jaune d'œuf a été remplacé par du tréhalose qui protège bien les spermatozoïdes en augmentant leur fluidité membranaire [202]. Le tréhalose et le lactose peuvent protéger les spermatozoïdes épидидymaires de souris pendant la cryoconservation [203][204].

Tel que mentionné à la section 1.6.1.4., des ROS sont générés durant la cryoconservation. Afin d'améliorer la qualité des spermatozoïdes congelés, des antioxydants peuvent être ajoutés aux diluants. La vitamine E, la catalase, l'ascorbate de sodium, l'hydroxytoluène améliorent le pourcentage de spermatozoïdes motiles suivant leur dégel [205][206][207][196]. Les antioxydants préviendraient l'effet néfaste des ROS sur les membranes plasmiques des spermatozoïdes et les acides nucléiques. Toutefois,

l'ajout d'antioxydants dans un diluant de lait ne semble pas améliorer la qualité de la semence bovine après la cryoconservation [179][206].

Des acides aminés peuvent être ajoutés aux diluants. L'utilisation des acides aminés dans les diluants provient du fait que plusieurs plantes accumulent des acides aminés, par exemple la proline, en réponse à des températures froides et cette accumulation serait associée à une tolérance au froid [208]. Également, certains types d'acides aminés peuvent protéger différents types de cellules animales durant la cryoconservation [209]. La proline, la glutamine ou la bétaine (un dérivé triméthylé de la glycine qui porte un groupe pseudocholine) augmentent le pourcentage de spermatozoïdes motiles après la cryoconservation des spermatozoïdes de bélier et d'étalon dilués dans un diluant Tris-glycérol contenant du jaune d'œuf [210][211]. La bétaine a aussi un effet positif sur le taux de motilité de spermatozoïdes bovins dilués dans du Tris-glycérol et conservés entre 0 et 20 °C [212].

L'effet de l'ajout de cholestérol aux membranes des spermatozoïdes durant la préservation a été étudié. Le cholestérol stabilise les membranes, tel que mentionné à la section 1.6.1.3. Les cyclodextrines sont des oligomères cycliques composés de 6-8 molécules de glucose qui sont hydrophiles et qui peuvent transporter des molécules hydrophobes, tel le cholestérol. Lorsque des spermatozoïdes bovins sont incubés avec de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine chargée de cholestérol avant la cryoconservation, une amélioration du pourcentage de spermatozoïdes motiles est obtenue après le dégel [213]. L'ajout de cholestérol à la semence d'étalon via la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine augmente la survie des spermatozoïdes cryoconservés [214]. Une amélioration de la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes de bélier, de porc, de bouc, de lapin est observée après la



cryoconservation de spermatozoïdes qui avaient été traités avec des cyclodextrines chargées de cholestérol avant d'être congelés (revu dans [215]).

L'efficacité de différents constituants d'origine végétale a été testée durant la conservation des spermatozoïdes. L'ajout de protéines de blé déshydratés améliore la motilité des spermatozoïdes de dinde conservés 24 h à 5 °C [216]. L'eau de la noix de coco peut remplacer le Tris lors de la conservation de spermatozoïdes de chien qui ont été dilués dans un diluant contenant du glycérol et du jaune d'œuf [152].

#### **1.6.3.4. Diluants commerciaux**

Des diluants commerciaux sont disponibles pour la conservation des spermatozoïdes de différentes espèces. Ces diluants contiennent un agent protecteur d'origine animale ou végétale et ils peuvent être utilisés pour la conservation des spermatozoïdes en milieu liquide et/ou congelé. Cette section présentera les diluants commerciaux les plus souvent cités dans la littérature.

Triladyl<sup>®</sup> (Minitüb, Allemagne) est un diluant à base de jaune d'œuf utilisé majoritairement pour la semence de taureau, mais il peut également être utilisé pour diluer les spermatozoïdes de bélier, de bouc et de chien [217](revu dans [101][218][219]. Optidyl<sup>®</sup> (Biovet, France) est un autre diluant à base d'œuf utilisé par plusieurs centres d'insémination artificielle en France [220]. CAPROGEN<sup>®</sup> (Livestock Improvement, Nouvelle-Zélande) est un diluant pour la conservation de la semence bovine à température ambiante (18-24 °C) et est utilisé seulement avec de la semence qui garde un bon taux de fécondité pendant une période de quatre jours (revu dans [91]) . EquiPro<sup>®</sup> (Minitüb) et INRA-96<sup>®</sup> sont des diluants à base de lait utilisés pour conserver la semence d'étalon [221][222].

Andromed<sup>®</sup> (Minitüb) et Biociphos Plus<sup>®</sup> (IMV) sont deux des premiers diluants de composition définie disponibles commercialement qui ne contiennent pas de produit d'origine animale, mais plutôt de la lécithine de soya [223]. Bioxcell<sup>®</sup> remplace maintenant Biociphos Plus<sup>®</sup>. Le nom « lécithine » réfère aux phospholipides, plus particulièrement aux PC, qui sont obtenus à partir de l'huile végétale [224]. Ces diluants ne sont toutefois pas aussi efficaces que des diluants contenant du jaune d'œuf pour protéger les spermatozoïdes bovins lors de la cryoconservation [223][170]. Par contre, le diluant Bioxcell<sup>®</sup> est aussi efficace pour conserver les spermatozoïdes de bélier que les diluants lait-jaune d'œuf utilisés couramment lors de la cryoconservation et donne des taux de fertilité semblables [225].

Un inconvénient des diluants commerciaux est que la composition est formulée pour conserver les spermatozoïdes d'une espèce en particulier. Présentement, la majorité des diluants disponibles sont conçus pour la conservation des spermatozoïdes de taureaux. La composition des diluants commerciaux est tenue secrète, il est donc impossible de les modifier pour les utiliser pour d'autres espèces. De Paz et al. [226] ont préparé un diluant à base de lécithine de soya pour conserver les spermatozoïdes de bélier. Ils ont observé que la température de préparation et de conservation des diluants affecte les lipides (formation d'émulsions), mais que ces effets étaient minimaux lors de la conservation à 5 °C.

### **1.7. Problématique du projet de recherche**

Il existe depuis quelques années une demande croissante pour l'utilisation de diluants qui ne contiennent pas de produits d'origine animale.

Étant donné que les diluants utilisés pour diluer la semence de différents mammifères contiennent des agents protecteurs, comme du lait et/ou du jaune d'œuf, il y a des craintes quant à la transmission de maladies entre les espèces via des bactéries ou des mycoplasmes [227]. La production d'endotoxines par ces micro-organismes est néfaste pour le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. De plus, la distribution de la semence préservée partout à travers le monde pourrait introduire dans des pays des maladies qui n'étaient pas présentes [228]. En effet, il a été montré que le jaune d'œuf provenant de différents sources (ferme ou marché), ainsi que celui retrouvé dans des diluants commerciaux (Triladyl<sup>®</sup> et Laiciphos<sup>®</sup>) étaient contaminés par des bactéries [227]. Également, un facteur dans le jaune d'œuf est connu pour inhiber la respiration des spermatozoïdes [229].

Une autre raison pour l'utilisation de diluants exempts de produit d'origine animale est que leur composition n'est pas constante. Ceci rend donc difficile de comparer les résultats d'une étude à l'autre. De plus, l'efficacité des diluants varie d'une espèce à l'autre. Une meilleure compréhension du mécanisme de protection des spermatozoïdes par les diluants aiderait à les améliorer.

La création d'un diluant qui contient un agent protecteur d'origine végétale ou chimique qui serait aussi efficace dans la protection des spermatozoïdes que ceux contenant du jaune d'œuf ou du lait est souhaité par l'industrie de l'insémination artificielle. Ce diluant aurait une composition constante et ne contiendrait pas de microorganismes pouvant nuire aux spermatozoïdes. Toutefois, il est difficile pour le moment de créer ce diluant, puisque nous ne savons pas clairement comment le lait ou le jaune d'œuf protègent les spermatozoïdes pendant leur conservation. Certe, un nouveau

mécanisme de protection des spermatozoïdes par le jaune d'œuf a été proposé par notre laboratoire grâce à plusieurs évidences obtenues, mais le mécanisme par lequel le lait protège les spermatozoïdes est inconnu.

Cette thèse portera sur l'étude du mécanisme de protection des spermatozoïdes par le lait pendant la conservation.

### **1.7.1. Hypothèse**

Il a été récemment montré dans notre laboratoire que les protéines BSP du plasma séminal bovin induisent un enlèvement continu des lipides de la membrane plasmique des spermatozoïdes de taureaux qui n'étaient pas conservés dans un diluant contenant un agent protecteur (lait ou jaune d'œuf). De plus, la présence de lait écrémé ou de micelles de caséines isolées du lait dans un diluant lors de la conservation des spermatozoïdes bovins à 4 °C diminue le nombre de protéines BSP liées à la membrane, prévient l'enlèvement des lipides de la membrane plasmique du spermatozoïde et permet de préserver les fonctions des spermatozoïdes, telles que la viabilité, la motilité et l'intégrité de l'acrosome [190]. L'hypothèse de notre projet est à l'effet que le lait contient un agent protecteur (les micelles de caséines) qui séquestre les protéines BSP et que cette interaction protéine-protéine est à la base de la protection des spermatozoïdes par le lait.

### **1.7.2. Objectifs expérimentaux**

Les objectifs expérimentaux de cette étude étaient :

- 1) Démontrer s'il se produit une interaction entre les protéines BSP bovines et les micelles de caséines du lait. Vérifier si d'autres protéines du lait ont une affinité pour les protéines BSP.

- 2) Déterminer si le mécanisme de protection des spermatozoïdes bovins par le lait est semblable chez différentes espèces de mammifères.
- 3) Déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction entre BSP1 et une particule de LDL du jaune d'œuf afin de comparer le mécanisme de protection des spermatozoïdes par le lait et par le jaune d'œuf.

Les résultats présentés dans cette thèse permettront d'avoir une meilleure connaissance de la façon dont le lait protège les spermatozoïdes de mammifères durant leur conservation. Ceci permettra de mettre en place de nouvelles stratégies pour l'élaboration d'un diluant ne contenant pas de produits d'origine animale ou encore d'améliorer les diluants existants qui sont utilisés pour la conservation des spermatozoïdes.

## 2. Articles

**2.1. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender.** Lusignan, M.F., Bergeron, A., Lafleur, M. and Manjunath, P. *Biology of Reproduction*, 2011, doi:10.1095/biolreprod.110.089961.

Préambule :

Mon projet de doctorat fait suite aux travaux de Mme Annick Bergeron sur l'étude du mécanisme de protection des spermatozoïdes de mammifères par le lait. Elle avait montré que les micelles de caséines dans un diluant protégeaient les spermatozoïdes de taureaux et diminuaient la liaison des protéines BSP à la membrane plasmique des spermatozoïdes, ainsi que l'extraction des lipides de la membrane des spermatozoïdes. Dans l'étude présentée dans cette section, nous avons montré pour la première fois l'interaction entre les protéines BSP bovines et les différentes protéines du lait par filtration sur gel et ITC. Nous avons proposé que cette interaction est l'élément clef dans le mécanisme de protection des spermatozoïdes de taureaux par le lait.

J'ai planifié toutes les expériences menant à la rédaction de cet article. Les expériences de filtration sur gel ont été effectuées par une stagiaire d'été sous ma supervision et j'ai fait les expériences d'ITC. J'ai fait l'interprétation des résultats et j'ai rédigé l'article. M. Michel Lafleur m'a aidée à interpréter les résultats d'ITC. Mme Annick Bergeron, M. Michel Lafleur et M. Puttaswamy Manjunath ont participé à la révision du manuscrit.

**The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender<sup>1</sup>**

Marie-France Lusignan<sup>3</sup>, Annick Bergeron<sup>3</sup>, Michel Lafleur<sup>4</sup> and Puttaswamy Manjunath<sup>2</sup>,

<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada

<sup>2</sup>Correspondence: Puttaswamy Manjunath, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, 5415 L'Assomption blvd, Montréal, Québec, Canada, H1T 2M4.

FAX : 514-252-3430.

<sup>3</sup>Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and Faculty of Medecine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

**Key words:** BSP proteins, sperm preservation, extenders/diluters, caseins/casein micelles, whey proteins ( $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin), isothermal calorimetry, protein-protein interaction.

**Short title:** Basis of sperm protection in milk extender.

**Summary:** The binder of sperm proteins (BSP1, BSP3 and BSP5), which are detrimental to sperm during storage, interact with caseins,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin of skimmed milk, and this interaction could be the basis for the sperm protection during preservation in liquid and/or frozen state.

## Abstract

Milk has been used routinely as an extender for sperm preservation. Caseins, the major proteins of milk, are proposed to be the protective constituents of milk during sperm preservation. It is unclear whether the whey proteins of milk are also implicated in the protection of sperm. Our previous studies have shown that the major proteins of bovine seminal plasma (recently named as Binder of Sperm or BSP, which comprise BSP1, BSP3 and BSP5 proteins) mediate a continuous phospholipid and cholesterol efflux from the sperm plasma membrane that is detrimental for sperm preservation. In this study, we investigated if the protective effect of milk could be due to an interaction between BSP proteins and milk proteins. The binding of BSP proteins to milk proteins was demonstrated by gel filtration chromatography. Milk was fractionated into three fractions: the first containing whey protein aggregates and  $\kappa$ -casein, the second containing all milk proteins and the third containing small peptides, salts and sugars. BSP1 has a higher affinity for the milk proteins in the milk fractions as compared to BSP3 and BSP5. The binding of BSP proteins to milk proteins was further characterized by isothermal titration calorimetry. We demonstrated that BSP1 binds to caseins and the titration could be simulated with a Scatchard approach leading to an affinity constant ( $K_a$ ) of  $350 \text{ mM}^{-1}$  and of a stoichiometric parameter for the association ( $n$ ) of 4.5 BSP1 per casein. The association between BSP1 and  $\alpha$ -lactalbumin was characterized by a  $K_a$  of  $240 \text{ mM}^{-1}$  and a 'n' value of 0.8. These results indicate the existence of an interaction between BSP proteins and milk proteins that could be the origin of the protection of sperm during preservation in milk.



## Introduction

The cryopreservation of sperm and artificial insemination (AI) techniques represent the most important achievements in dairy farming. These two techniques have enabled the worldwide distribution and use of desired genetic lines at a reasonable cost. The most commonly used media (also called diluters or extenders) to conserve mammalian sperm contain 20% egg yolk (EY) or milk (skimmed or whole). This basic constituent of sperm extenders has remained the same since the practice of AI some 65 years ago (reviewed in [1]). EY and milk being products of animal origin represent a potential risk of transmission of diseases. Therefore, there is an urgent need for developing synthetic extenders, which are free of products of animal origin. However, it is difficult to find replacement component for EY or milk because the mechanisms involved in sperm protection by these agents remain unclear.

Our work, during the past 10 years, has provided new insights into the understanding of sperm protection by EY. We discovered that bull seminal vesicles secrete in abundant quantity, a family of phospholipid-binding proteins, named Binder of Sperm (BSP) [2]. BSP family is constituted by BSP1, BSP3 and BSP5 (previously called BSP-A1/-A2, BSP-A3 and BSP-30-kDa respectively) and it represents ~60 (w/w)% (30-50 mg/ml) of total bull seminal plasma proteins [2-4]. The primary structure of the BSP proteins contains two fibronectin type 2 (Fn2) domains repeated in tandem [5, 6]. These BSP proteins are added to sperm at ejaculation, bind to the sperm membrane and extract selectively some lipids from membranes, a phenomenon that is essential for sperm fertility in vivo (reviewed in [1, 7]). Subsequently sperm swim through the cervical mucous within minutes (15-20 min), leaving behind seminal plasma. In this case, BSP proteins

participate in sperm capacitation events that occur in the female genital tract [8] and are shown to have a positive effect on sperm fertility (reviewed in [1, 7]). However, when semen is collected for *in vitro* storage, sperm is in continuous contact with BSP proteins. These induce an extensive lipid removal from sperm membranes, rendering them sensitive to cold shock and freezing [1, 9, 10]. Interestingly, BSP proteins interact with low-density lipoproteins (LDL), the main constituents of EY extenders [11]. The beneficial effect of egg yolk during sperm protection is proposed to be due to a rapid and stable interaction between LDL and BSP proteins (lipoprotein:protein interaction), that prevents the harmful effects of extended contact between BSP proteins and sperm membranes [9, 11]. Thus, we postulated that the sequestration of BSP proteins by EY-LDL is the major mechanism of sperm protection (reviewed in [1]).

Heated skimmed milk or whole milk is also used as an extender for sperm preservation. Semen is directly diluted in these extenders and stored at 4 °C or frozen in the presence of glycerol (reviewed in [12]). Milk is a complex medium composed of large part of water, lipids, proteins, sugars and minerals [13]. Although, lipids (lipoproteins, fat membranes and phospholipids) in whole milk could protect sperm as with EY-LDL, they do not seem to be the constituents in milk that protect sperm during preservation because skimmed milk (that contains less than 0.1% lipids) is as efficient as whole milk for sperm preservation during storage at 4 °C or during cryopreservation [14, 15]. Lactose is the most abundant sugar of milk (4.8%) [13]. Milk filtrate, which contains minerals and lactose, is insufficient to protect sperm during storage [16]. Lactose seems to improve the efficiency of the extenders but without being able to protect sperm during preservation by itself [17].

The protective constituent from milk has been proposed to be the caseins, the major proteins of milk [10, 16-21]. Caseins exist in milk as large colloidal aggregates termed micelles, at a concentration of approximately 27 g/L, representing 80 (w/w)% of total milk proteins [13, 22]. The micelles have hydrodynamic radii that range from approximately 10-300 nm [23-26]. They are constituted of four different caseins, namely  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins (23.5, 25.2, 24 and 19 kDa, respectively). These micelles basically consist of a hydrophobic core of  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - and  $\beta$ -caseins, surrounded by a coat of  $\kappa$ -caseins [22, 27]. Caseins are linked within micelles by calcium phosphate, each micelle containing between 20,000 and 150,000 caseins [26]. It has been demonstrated that sperm could be protected by casein micelles (isolated from milk) during their storage at 4-5 °C [10, 16, 18-21]. Moreover, casein micelles can protect bull sperm during freezing in the presence of glycerol [17].

The other proteins present in milk are collectively called whey proteins. They represent approximately 20 (w/w)% of total milk proteins (i.e. a concentration of 6 g/L) and include  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, albumin, immunoglobulins, lactoferrin, and several other proteins and enzymes in trace amounts [13, 22].  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin are the major whey proteins in milk (55 and 22 (w/w)% of whey proteins, respectively)). It is not clear whether whey proteins are implicated in sperm protection during preservation. Milk permeate (skimmed milk without caseins) is not sufficient to prevent the binding of BSP proteins to the sperm membrane, leading to membrane phospholipids and cholesterol loss [10].  $\alpha$ -lactalbumin alone is not sufficient to protect stallion sperm during storage at 4°C [16]. However, this protein seems to improve the efficiency of extenders used to cryopreserve ram sperm [28]. The supplementation with

$\beta$ -lactoglobulin of an extender containing native phosphocaseinate does not improve its efficiency when goat or stallion sperm are stored at 4°C [16, 21]. When used alone,  $\beta$ -lactoglobulin has a protective effect on stallion sperm with an optimal concentration of 45 g/L, but this effect is less significant as compared to native phosphocaseinate [16].

Recently, we demonstrated that casein micelles isolated from skimmed milk prevent the binding of BSP proteins to sperm membranes, thus preventing cholesterol and phospholipid efflux while maintaining sperm motility and viability during sperm storage [10]. Studies also indicated that the protection of sperm by milk is not due to the direct binding of milk proteins to sperm membranes during storage and it was speculated that the mechanism may involve interactions of milk proteins with BSP proteins [10].

In order to gain further insight into the mechanism of sperm protection by milk, we investigated, in the present study, the interaction between milk casein micelles and BSP proteins. Also, to assess whether other milk proteins could play a role in sperm protection, we examined if there was an interaction between BSP proteins and the major whey proteins ( $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin). We used gel filtration chromatography as a general approach to study the interaction between BSP proteins and milk proteins. Subsequently, we used isothermal titration calorimetry (ITC) to describe quantitatively the interaction between BSP proteins and milk proteins. We first examined the association of BSP proteins with heated skim milk and second, we detailed the thermodynamics of the association of BSP1, the most abundant protein of the BSP family in bull semen, with the milk proteins that were identified by gel filtration chromatography as the ones presenting the strongest affinity. ITC is a sensitive and powerful tool to study

biomolecular interactions (weak or strong) such as protein-protein, antibody-antigen, macromolecule-model membrane interactions [29-31].

## Materials and methods

### *Materials*

$\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin were a generous gift from Dr. Yves Pouliot (Université Laval, Québec City, QC, Canada). 3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid (MOPS) was obtained from ICN Biomedicals Inc (Cleveland, OH). Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and bovine serum albumin (BSA) were from Sigma (St-Louis, MO). Sepharose CL-4B was from Pharmacia Biotech Inc (Baie d'Urfé, QC, Canada). Acrylamide and bisacrylamide were purchased from MP Biomedical (Irvine, CA). Sodium dodecyl sulfate (SDS) and other electrophoresis products were from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). Low molecular weight (LMW) calibration kit was from GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada). Immobilon-P polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes were purchased from Millipore (Nepean, ON, Canada). Western Lightning Chemiluminescence Reagent kit was from Perkin-Elmer Life Sciences (Boston, MA). All other chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers. Skimmed milk was purchased at a local food store.

### *Isolation of BSP proteins*

Three different protein preparations were used. First, the preparation that includes all the bovine seminal plasma proteins was prepared as described previously [11]; this crude protein fraction is designated by SP (Seminal plasma Proteins). The system of SP interacting with milk fractions is a representative model of the situation when semen is diluted in milk. Second, BSP proteins, which consist of BSP1, BSP3 and BSP5 in an approximate ratio of 80:10:10, were isolated by affinity chromatography using gelatin-agarose stationary phase [32]. The reported method was modified by eluting the bound

proteins with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 M arginine (non-denaturing conditions), and by dialysing the isolated proteins against MOPS buffer. This preparation is referred to Gelatin-Bound Seminal plasma Proteins, and is identified by GB-SP. Third, pure BSP1 was isolated as described previously [3, 32].

#### *Isolation of casein micelles*

Casein micelles were isolated as described by Holt [33]. Skimmed milk (previously heated for 10 min at 95 °C and the coagulum removed) was allowed to reach room temperature and was transferred into 11.5 ml Quick Seal tubes (Mandel Scientific Co., Guelph, ON, Canada) and centrifuged (Sorval Ultracentrifuge, Rotor T-865) at  $70\,000 \times g$  at 20 °C for 90 min. Supernatants were then discarded and the pelleted casein micelles were resuspended in 10 mM MOPS buffer (pH 7.4, 0.02% sodium azide) with gentle stirring overnight at room temperature. The dispersion was then centrifuged at  $5\,000 \times g$  for 30 min at room temperature to pellet any undispersed material.

#### *Gel filtration chromatography*

Gel filtration chromatography was carried out on a Sepharose CL-4B column (78 × 2.5 cm) equilibrated with Tris-saline buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, pH 7.5) at room temperature at a flow rate of 79 ml/h. Fractions of 3.6 ml were collected and their absorbance was measured at 280 nm. Elution profiles of SP were analyzed before and after incubation with milk fractions.

#### *Analyses of proteins by SDS-PAGE and immunoblotting*

Proteins were precipitated with trichloroacetic acid (15(w/v)% final concentration), reduced, denatured, and separated by electrophoresis on 15(w/v)%

polyacrylamide gels. Proteins in the gel were then either stained with Coomassie Blue R-250 or transferred electrophoretically to PVDF membrane, as described by Matsudaira [34]. Proteins were probed with antiserum directed against BSP1 (1:10 000), BSP3 (1:3 000) or BSP5 (1:2 000). Molecular mass was estimated by comparison with the LMW Calibration kit containing phosphorylase b ( $M_r = 97\ 000$ ), albumin ( $M_r = 66\ 000$ ), ovalbumin ( $M_r = 45\ 000$ ), carbonic anhydrase ( $M_r = 30\ 000$ ), trypsin inhibitor ( $M_r = 21\ 100$ ) and  $\alpha$ -lactalbumin ( $M_r = 14\ 400$ ).

#### *Isothermal Titration Calorimetry (ITC)*

BSP1,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, milk, and caseins were individually diluted in MOPS buffer. The pH of the protein solutions was measured and re-adjusted to 7.4 if necessary with 0.1 N NaOH or HCl solutions. Every protein solution was filtered through a porous membrane of 0.2  $\mu\text{m}$  (BSP1, GB-SP proteins, SP proteins,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin) or 0.45  $\mu\text{m}$  (milk and caseins).

ITC experiments were performed on a MicroCal VP-ITC calorimeter (MicroCal inc., Northampton, MA) at 37 °C. Samples were degassed before ITC experiments, except for milk and milk caseins in order to avoid affecting the micellar structure of caseins. The critical micellization concentration (CMC) of milk caseins, the concentration above which casein micelles are formed, was evaluated under the conditions used for the affinity experiments using ITC, by injecting casein micelles to MOPS buffer. For these experiments, the injector-stirrer syringe was loaded with 0.09 mM casein suspension (a concentration above the CMC). The reaction cell volume was 1.4527 ml. A run consisted of 19 injections of 10  $\mu\text{l}$ , each aliquot injected in 24 s with a delay of 200 s between successive injections. During the course of the experiment, the concentration of casein in



the measurement cell increased from 0 to above its CMC, leading to a drastic change in the recorded heat/injection [29-31]. The CMC was determined using the maximum of the first derivative of thermogram. For the titration experiments of milk proteins with seminal plasma proteins, the injector-stirrer syringe was loaded with a solution of GB-SP proteins or isolated BSP1, and the calorimeter cell was filled with diluted milk, or a solution containing milk casein,  $\alpha$ -lactalbumin or  $\beta$ -lactoglobulin. The titration of heated skimmed milk (diluted in MOPS buffer to obtain a total protein concentration of 0.12 mg/ml) with GB-SP proteins (5 mg/ml) consisted of 25 injections of 10  $\mu$ l (12 s/injection and a delay of 350 s between the injections). Milk caseins (5  $\mu$ M) were titrated with BSP1 (0.275 mM) and the run consisted of 21 injections of 10  $\mu$ l (24 s/injection and a delay of 300 s between successive injections). BSP1 (0.319 mM) was injected in  $\alpha$ -lactalbumin solution (0.038 mM) in 24 aliquots of 10  $\mu$ l (8 s/injection with a delay of 300 s between the injections). The dilution of GB-SP proteins or BSP1 protein in the buffer led to a small endothermic contribution and the dilution of milk, caseins,  $\alpha$ -lactalbumin or  $\beta$ -lactoglobulin by the addition of buffer led to a small exothermic contribution. These were subtracted from the enthalpies measured during the titration. For each run, an initial injection of 0.5  $\mu$ l (1.5 s/injection with a delay of 150 s) was carried out. The data of the first injection was discarded as the enthalpy of binding measured for the initial injection did not give rise to an observable variation of the heat flow [29]. Data were analyzed using the Origin software (version 5.0) provided by MicroCal. The reported average values and their standard deviations were obtained from triplicates.

#### *Protein assay*

The protein content of the samples was determined by the modified Lowry procedure [35].

## Results

### *Gel filtration chromatography experiments*

In order to screen the putative interactions between BSP proteins and milk proteins, we used gel filtration chromatography. Milk was fractionated into three fractions (Fig. 1A). Proteins were present in Milk-Fractions 1 and 2 as demonstrated by SDS-PAGE (Fig. 1B). Milk-Fraction 1 contained mainly  $\alpha$ -lactalbumin (14.2 kDa),  $\beta$ -lactoglobulin (18.3 kDa),  $\kappa$ -casein (apparent molecular weight of 28 kDa) and some high molecular weight proteins (45-110 kDa), which correspond to albumin, lactoferrin, and immunoglobulins. Milk-Fraction 2 contained mainly caseins ( $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins; apparent molecular weight of 29-33 kDa) as well as small amounts of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and  $\kappa$ -casein. Milk-Fraction 3 did not seem to contain any proteins, but some small molecular weight components such as amino acids, salts, sugars, vitamins, etc. were present and that gave rise to the observed optical density. We have therefore focussed our study on the interactions between BSP and Milk-Fractions 1 and 2.

We first examined the interactions between the Milk-Fractions with SP, the total proteins from bovine seminal plasma. In the AI centers, the semen is diluted with milk at various dilution ratios depending on the sperm count and number of sperm to be packed per straw. Typically, the semen/milk dilution ratio varies from 1/5 to 1/20 (v/v), corresponding to a protein ratio of 1/5 to 1/18 (w/w). We studied the binding specificity of the BSP proteins to Milk-Fraction 1 and Milk-Fraction 2, by carrying out the affinity experiments with two different quantities of SP. We used small quantity of SP (1 mg) corresponding to high protein ratio (w/w) (SP:Milk-Fraction 1 ratio of 1/4 or a SP:Milk-Fraction 2 ratio of 1/21; Fig. 2A-B and Fig. 3A-B respectively) and large quantity of SP

(10 mg) corresponding to low protein ratio (w/w) (SP:Milk-Fraction 1 ratio of 1/0.4 or a SP:Milk-Fraction 2 ratio of 1/2; Fig. 2C-D and Fig. 3C-D respectively).

In the gel filtration chromatography experiments involving a small quantity of SP with Milk-Fraction 1, one large peak (Fraction a) dominated the chromatogram (Fig. 2A). The subsequent eluted volume was pooled into six fractions (Fractions b-g; details in legend) and all these fractions were analysed by immunoblotting. BSP1 and BSP5 were detected in Fractions a-c, indicating that they interact with milk proteins in Milk-Fraction 1, and BSP3 was detected in Fractions e and f (Fig. 2B). Gel filtration chromatography of large quantity of SP with Milk-Fraction 1 resulted in two major peaks (Fig. 2C). The fractions were pooled as indicated in the legend and analysed by immunoblotting. BSP1 was the major protein of Fraction a, and was also detected in Fractions b-d. BSP3 was detected mostly in fraction d and BSP5 was detected in Fractions b-d (Fig. 2D).

Gel filtration chromatography of Milk-Fraction 2 with a small or a large quantity of SP gave essentially one broad peak that was separated into five fractions: Fraction a-e (Fig. 3A and C). When proteins were analysed by immunoblotting, BSP1 was detected in Fractions a-c when a small quantity of SP was used (Fig. 3B) or in Fractions a-e in the presence of a large quantity of SP (Fig. 3D). BSP3 was eluted in Fractions a-d when a small quantity of SP was used (Fig. 3B) and in Fractions c and d in the presence of a large quantity of SP (Fig. 3D). BSP5 was eluted in Fractions a-b, and in Fractions a-d, in the presence of a small quantity of SP (Fig. 3B) and a large (Fig. 3D) quantity of SP, respectively.

The chromatography of SP alone on the Sepharose CL 4B column, followed by immunoblotting using polyclonal antibodies directed against BSP1, BSP3 and BSP5 was

carried out as a control. In these conditions, BSP proteins were essentially recovered towards the end of the elutions; they were found in fraction f (Fig 2A) or fractions d-e (Fig 3A) when small quantities of SP were loaded and in fractions d-e (Fig. 2C) or in fractions c-e (Fig 3C) when large quantities of SP alone were loaded (the immunoblot data are not shown).

### *ITC experiments*

In order to describe the thermodynamics of the interactions between the milk proteins and the BSP proteins, we carried out ITC experiments. We first examined the interaction between GB-SP proteins and heated skimmed milk. As shown in Figure 4, there was an exothermic interaction between GB-SP proteins and milk constituents. Upon the titration, the area of the peaks became smaller, illustrating the saturation of the binding of GB-SP proteins to the milk components. The heat flow associated with the last injections corresponded to the enthalpies of dilutions of GB-SP proteins and of heated skimmed milk. Despite the fact that a quantitative analysis of the thermogram is practically impossible due to the complexity of the system, these results establish clearly the existence of interactions between the two components.

We studied the interaction between BSP1, the major component of the BSP family, and various milk proteins. The first system involves caseins as they have been proposed to be the main milk component acting for protecting the semen and they have been shown, using gel filtration chromatography, to interact with BSP1. In order to optimize the concentration of caseins used for ITC and to ensure that their dilution in the buffer would not lead to their demicellization, we first evaluated the CMC of caseins in the MOPS buffer used in this study, using ITC [36-38]. The CMC of caseins at 37 °C in MOPS

buffer was evaluated to be  $1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$  (results not shown). Therefore, micellar caseins at a concentration of  $5 \mu\text{M}$  (more than 3.5 times its CMC) were titrated with BSP1 (0.275 mM). As observed for heated skimmed milk, the interaction between BSP1 and caseins was exothermic (Fig. 5, top panel). The surface of the peaks decreased with each BSP1 injection to reach a value characteristic of the dilution of BSP1 in buffer, indicating the saturation of the binding of milk caseins by BSP1. The variation of enthalpy of the system calculated per injected BSP1 ( $\Delta H$ ) as a function of the concentration of BSP1 relative to the casein has been calculated and this titration curve (Fig. 5, bottom panel) was analyzed with a standard Scatchard binding model. In the model, we expressed the casein concentration in mol of casein/L, using an average molecular weight of 23 kDa [26]. This assumption includes that all the casein molecules are equally accessible, a situation which is likely not perfectly respected in the case of casein micelles. We also supposed that all binding sites are equivalent and independent and that the binding enthalpy per mole of BSP1 ( $\Delta H_a$ ) is constant over the whole titration. Despite these assumptions, it is notable that the isotherm titration data could be well simulated using such a simple model. The association constant ( $K_a$ ) of BSP1 to a binding site on caseins, the stoichiometry ( $n$ ) of the association in terms of the molar ratio of bound BSP1/casein, and  $\Delta H_a$  were used as fitting parameters (Table 1).  $K_a$  for the binding of BSP1 to caseins was  $350 \pm 60 \text{ mM}^{-1}$ . The stoichiometry  $n$  was  $4.5 \pm 0.2$ , indicating the assembly of approximately 4-5 BSP1 molecules per casein.  $\Delta H_a$  was  $-7 \pm 2 \text{ kcal/mol}$  of BSP1. The molar free energy of the binding ( $\Delta G_a$ ) and the molar binding entropy ( $\Delta S_a$ ) were calculated using:

$$\Delta G_a = -RT \ln K_a \quad (1)$$

$$\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a \quad (2)$$

where  $R$  is the gas constant and  $T$  is the temperature in Kelvin degrees.  $\Delta G_a$ , and  $\Delta S_a$  were  $-7.9 \pm 0.1$  kcal/mol and  $1 \pm 5$  cal/mol K, respectively. Therefore it was concluded that the association of BSP1 and caseins is mainly enthalpy driven.

Because BSP1 also showed affinity for Milk-Fraction 1, we studied the thermodynamics of the interaction between BSP1 and  $\alpha$ -lactalbumin. The interaction between the two proteins was exothermic (Fig. 6, top panel), and the titrations showed characteristic profiles where a progressive decrease of the surface of the peaks was observed. Again the titration curves (Fig. 6, bottom panel) could be well fitted with the Scatchard model using the  $\alpha$ -lactalbumin concentration obtained from an average molecular weight of 14.2 kDa [22]. The resulting thermodynamic parameters are presented in Table 1. The  $K_a$  for the association was  $240 \pm 70$  mM<sup>-1</sup>. The stoichiometry parameter  $n$  was  $0.8 \pm 0.2$ , indicating that BSP1 and  $\alpha$ -lactalbumin bind in equimolar proportions. The  $\Delta H_a$  was  $-8 \pm 3$  kcal/mol of BSP1 and the derived  $\Delta G_a$ , and  $\Delta S_a$  were  $-7.6 \pm 0.2$  kcal/mol and  $-1 \pm 9$  cal/mol K, respectively.

## Discussion

The prior work in our laboratory suggested that caseins may be responsible for sperm protection [10]. It was hypothesized that this protection could be due to an interaction between BSP, detrimental factors for bull semen preservation and caseins, the major components of milk extender. In this study, we provide the first evidence that there is an interaction between BSP and casein micelles as demonstrated by using gel filtration chromatography. In addition, this work also established, using ITC technique, the details of the interaction between BSP and whey proteins ( $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin). These results support our novel concept that an interaction between BSP with extender components is crucial for sperm protection during the storage. Thus, detailed study of this interaction is the key for the improvement of current protocols for sperm protection and/or for the development of novel extenders, which are free of animal products.

### *Interaction of BSP proteins with milk proteins by gel filtration chromatography studies*

In order to demonstrate the interaction between BSP proteins and milk proteins, we used fractionated milk proteins (Fig. 1). Milk-Fraction 1 essentially contained  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein. Milk-Fraction 2 essentially contained various caseins.

BSP1 and BSP5 proteins had affinity for the proteins of Milk-Fraction 1 and 2 (Fig. 2 and 3). BSP3 elution was not influenced by the presence of the milk proteins of Milk-Fraction 1 but it had affinity for the milk proteins of Milk-Fraction 2. This difference in their binding to the whey protein aggregates may be related to BSP glycosylation; BSP3 is the only BSP protein that is not glycosylated [4]. Interestingly,



only BSP1 bound to Milk-Fraction 1 and 2 when a large quantity of SP was used, indicating a higher affinity of BSP1 for the milk proteins as compared to BSP3 and BSP5. These results are consistent with our previous study that indicate that casein micelles essentially sequester BSP1 and as a result there is significantly less binding of this protein to sperm membranes during the storage. The net effect is the prevention of lipid loss from sperm membranes and protection of sperm [10].

#### *Interaction between BSP proteins and milk proteins by ITC*

Using ITC, we detected an interaction between GB-SP and skimmed milk constituents (Fig. 4). These results clearly established the existence of exothermic interactions between BSP proteins and milk proteins. In order to establish the specificity of the interaction, we examined the putative association using purified BSP1 because it had more affinity for proteins of Milk-Fraction 1 and 2, as compared to BSP3 and BSP5, and it is the most abundant BSP protein [39]. We demonstrated that there was an interaction between BSP1 and the casein micelles and  $\alpha$ -lactalbumin (Fig. 5 and 6). We also observed an interaction between BSP1 and  $\beta$ -lactoglobulin. This interaction was exothermic and the heat released was smaller (results not shown) than that released when BSP1 was injected in  $\alpha$ -lactalbumin solutions. Despite an extensive exploration to optimize the protein concentrations, it was not possible to obtain a workable titration curve with  $\beta$ -lactoglobulin, suggesting a complex association of these two species.

The heat flow changes resulting from the injections of GB-SP to skimmed milk and the injection of GB-SP (results not shown) or BSP1 to casein micelles were similar (Fig. 4 and Fig. 5, top panel). These observations suggest that the other constituents present in milk (proteins present in trace amounts, minerals and lactose) did not seem to

affect the interaction between BSP proteins and milk proteins, nor that BSP3 and BSP5 seem to interfere with the interaction between BSP1 and the milk proteins. In addition, the presence of BSP3 and BSP5 did not lead to significant changes in the titration thermograms compared to those obtained using exclusively BSP1. First, these BSP proteins have similar structural organization (including for their ligand binding sites) [8], and similar binding properties (ex. to gelatine, glycosaminoglycans, heparin, HDL, LDL, choline phospholipids and oviduct epithelial cells) [7, 40-41]; therefore it is possible that the thermodynamics of binding of BSP3 and BSP5 is similar to that of BSP1. Second, one must remember that BSP3 and BSP5 are found in limited quantities in the mixture and the precision of our measurements prevented us from conclusively pinpointing their contribution. The main conclusion is the existence, in physiological conditions, of attractive interactions between BSP1 and milk proteins, even in the presence of the other BSP proteins (BSP3 and BSP5).

The thermodynamic parameters calculated for the association between BSP1 and casein micelles or  $\alpha$ -lactalbumin revealed that the two binding associations share some similarities (Table I). The association constants of BSP1 to casein micelles or to  $\alpha$ -lactalbumin are in the same range. The binding enthalpies of the two systems are comparable (Table I), and they are, in both cases, the main contributor to the free energy of binding. However, our results show a greater binding capacity of caseins compared to  $\alpha$ -lactalbumin since one casein can bind up to 4.5 BSP1 whereas  $\alpha$ -lactalbumin binds BSP1 in approximately an equimolar proportion (ca. 0.8). The pH and the composition of the media in which BSP1 is diluted influence its aggregation state [4, 42], therefore, it is possible that at 37 °C, BSP1 forms mixed micelles with the milk proteins. It should be

noted that in the context of sperm conservation, bull semen is usually diluted in milk that was heated to 95 °C and cooled to 33°C before use [43]. The average pH of bull semen is similar to that of milk (6.9 and 6.7, respectively) [13, 44]. The aggregation state of BSP proteins in diluted semen is not known, but the buffer, temperature and pH used in this investigation are close to the conditions prior to sperm preservation. Thus it is likely that during sperm conservation, BSP proteins could be interacting in a similar manner as demonstrated in this investigation. Consequently, further work is required to identify the structural details of the resulting self-assemblies obtained with BSP proteins and caseins.

The protection of sperm by milk could then be provided mainly by the casein micelles, considering their large quantity in milk and their higher capacity to bind BSP proteins as compared to whey proteins. Such phenomena would explain why caseins micelles but not whey proteins can protect bovine or stallion sperm during conservation [10, 16]. While caseins in milk may be the main components of sperm protection, the whey protein aggregates containing  $\kappa$ -casein (i.e. Milk-Fraction 1) could act in synergy with milk caseins to protect sperm during storage. Since the affinity of BSP proteins for  $\alpha$ -lactalbumin is similar to their affinity for caseins ( $K_a$  is in the same range), the presence of large quantities of  $\alpha$ -lactalbumin or  $\beta$ -lactoglobulin could possibly prevent the binding of BSP proteins to the sperm membrane, and thus, protect the sperm during preservation. This hypothesis remains to be evaluated.

#### *Mechanism of sperm protection by milk and egg yolk extenders*

The current study suggests that the mechanism of bovine sperm protection by extender seems to share a common characteristic that consist in the sequestration of the BSP proteins by protective compounds in extenders. In case of milk, it would be a

protein: protein interaction that leads to sperm protection, whereas it would be a protein: lipid interaction in the case of hen egg yolk, (reviewed in [1]). The interaction between the BSP proteins and the protective compounds in extenders is proposed to be strong enough to allow the sequestration of BSP proteins from seminal plasma, preventing their binding to the sperm membrane. However, the protective compounds would still allow some BSP proteins to bind to the sperm membrane and maintain fertility of the sperm.

Interestingly, skimmed milk is used as an extender for sperm of other mammalian species, such as, ram (reviewed in [45]), goat (reviewed in [46]), stallion (reviewed in [47]), and buffalo (reviewed in [48]). Since BSP homologs have been identified in the semen of all of these species (reviewed in [7]), it could be postulated that the mechanism of sperm protection by milk may be similar for all mammals.

In summary, we demonstrated for the first time that BSP proteins interact with casein micelles,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin, the major milk proteins. This interaction indicates that the protective effect of milk on sperm is similar to that provided by egg yolk. Interestingly, the mechanism of sperm protection by milk seems to involve a protein-protein interaction rather than a protein-lipid interaction as observed with egg yolk. These findings should aid to improve current sperm extenders and to develop novel extenders free of animal sources that could be used for sperm storage in the liquid or frozen state.

**Acknowledgments**

We thank Dr Patrick Blondin, L'Alliance Boviteq, for providing bull seminal plasma required for this study. We also thank Huda Salem for her participation during the gel filtration chromatography experiments.

**References**

1. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 1338-1344.
2. Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. *Biol Reprod* 2009; 80: 394-397.
3. Manjunath P, Sairam MR. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 1987; 241: 685-692.
4. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: Chrétien M, McKerns KW (eds.), *Molecular biology of brain and endocrine peptidergic systems*. New-York: Plenum Press; 1988: 259-273.
5. Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, Chrétien M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma (homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin). *Biochem J* 1987; 243: 195-203.
6. Calvete JJ, Mann K, Sanz L, Raida M, Topfer-Petersen E. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett* 1996; 399: 147-152.

7. Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 217-228.
8. Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 109-119.
9. Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 2004; 70: 708-717.
10. Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol Reprod* 2007; 77: 120-126.
11. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* 2002; 67: 1250-1258.
12. Kakar SS, Ganguli NC. Milk as an extender for semen: A review. *Indian J Anim Sci* 1978; 48: 777-790.
13. Amiot J, Fournier S, Leboeuf B, Paquin P, Simpson R. Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse

du lait. In: Vignola CL (ed.) Science et technologie du lait, transformation du lait. Montréal: Presses Internationales Polytechnique; 2002: 1-73.

14. Almquist JO, Flipse RJ, Thacker DL. Diluters for bovine semen. IV. Fertility of bovine spermatozoa in heated homogenized milk and skimmilk. *J Anim Sci* 1954; 13: 1303-1307.
15. Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 2002; 71: 13-23.
16. Batellier F, Magistrini M, Fauquant J, Palmer E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology* 1997; 48: 391-417.
17. Choong CH, Wales RG. The use of various diluents for deep-freezing bull spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 1963; 16: 896-904.
18. Choong CH, Wales RG. The effect of cold shock on spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 1962; 15: 543-551.
19. Martin ICA. Diluents for the preservation of ram spermatozoa. I. Diluents used at 37°C and 5°C containing casein. *Aust J Biol Sci* 1966; 19: 645-653.
20. O'Shea T, Wales RG. Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at 5°C on diluted ram and bull semen. *Aust J Biol Sci* 1966; 19: 871-882.
21. Leboeuf B, Guillouet P, Batellier F, Bernelas D, Bonne JL, Forgerit Y, Renaud G, Magistrini M. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology* 2003; 60: 867-877.



22. Farrell HM, Jr., Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF, Swaisgood HE. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *J Dairy Sci* 2004; 87: 1641-1674.
23. Holt C. Casein micelle size from elastic and quasi-elastic light scattering measurements. *Biochim Biophys Acta* 1975; 400: 293-301.
24. Schmidt DG, Both P, van Markwijk BW, Buchheim W. The determination of size and molecular weight of casein micelles by means of light-scattering and electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1974; 365: 72-79.
25. Griffin MC, Roberts GC. A <sup>1</sup>H-n.m.r. study of casein micelles. *Biochem J* 1985; 228: 273-276.
26. Schorsch C, Jones MG, Norton IT. Micellar casein gelation at high sucrose content. *J Dairy Sci* 2002; 85: 3155-3163.
27. Dalglish D. Casein Micelles as colloids: surface structures and stabilities. *J Dairy Sci* 1998; 81: 3013-3018.
28. Ollero M, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology* 1998; 37: 1-12.
29. Pierce MM, Raman CS, Nall BT. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* 1999; 19: 213-221.

30. Ladbury JE, Chowdhry BZ. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chem Biol* 1996; 3: 791-801.
31. Lassiseraye D, Courtemanche L, Bergeron A, Manjunath P, Lafleur M. Binding of bovine seminal plasma protein BSP-A1/-A2 to model membranes: lipid specificity and effect of the temperature. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 502-513.
32. Manjunath P, Sairam MR, Uma J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci Rep* 1987; 7: 231-238.
33. Holt C. Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by sephacryl column chromatography. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2994-3003.
34. Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 1987; 262: 10035-10038.
35. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87: 206-210.
36. Paula S, Süs W, Tuchtenhagen J, Blume A. Thermodynamics of micelle formation as a function of temperature: a high sensitivity titration calorimetry study. *J Phys Chem* 1995; 99: 11742-11751.

37. Dai S, Tam KC. Isothermal titration calorimetric studies on the temperature dependence of binding interactions between poly(propylene glycol)s and sodium dodecyl sulfate. *Langmuir* 2004; 20: 2177-2183.
38. Portnaya I, Cogan U, Livney YD, Ramon O, Shimoni K, Rosenberg M, Danino D. Micellization of bovine beta-casein studied by isothermal titration microcalorimetry and cryogenic transmission electron microscopy. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 5555-5561.
39. Nauc V, Manjunath P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biology Reprod* 2000; 63: 1058-1066.
40. Gwathmey T, Ignatz G, Suarez S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 2003; 69: 809-815.
41. Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 2006; 75: 501-507.
42. Gasset M, Saiz JL, Laynez J, Sanz L, Gentzel M, Topper-Petersen E, Calvete JJ. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *Eur J Biochem* 1997; 250: 735-744.

43. Flipse RJ, Patton S, Almquist JO. Diluters for bovine semen. III. Effect of lactenin and lactoperoxidase upon spermatozoan livability. *J Dairy Sci* 1954; 37: 1205-1211.
44. Miller DJ, Ax RL. Seminal plasma: what is it and why is it important. In: 12th technical conference on artificial insemination and reproduction; 1988. 97-107.
45. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 77-111.
46. Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 113-141.
47. Aurich JE, Kuhne A, Hoppe H, Aurich C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 1996; 46: 791-797.
48. Sansone G, Nastri MJ, Fabbrocini A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 55-76.

### Figure legends

**Fig. 1.** Gel filtration chromatogram of heated skimmed milk. A) 2 ml heated skimmed milk. Milk-Fraction 1: tubes 31-46; Milk-Fraction 2: tubes 54-80; Milk-Fraction 3: tubes 87-100. B) SDS-PAGE pattern of the eluted fractions. Protein samples (40  $\mu$ g) were reduced, denatured, separated on 15% polyacrylamide gel, and stained with Coomassie Blue R-250. Lane 1, LMW standard; Lane 2, skimmed milk proteins; Lane 3-5, Milk-Fractions 1, 2 and 3 respectively.

**Fig. 2.** Gel filtration chromatograms of SP proteins and of the mixture of SP proteins with milk proteins. Milk-Fraction 1 (defined in Figure 1A) from two runs was pooled, concentrated to 4 ml, and then 1 ml (~4 mg of proteins) was chromatographed. Alternatively, 1 or 10 mg of SP and 1 ml of concentrated Milk-Fraction 1 were mixed, incubated for 1 h at room temperature and subjected to chromatography. A) Chromatogram of 1 mg of SP alone (open square) or incubated with Milk-Fraction 1 (filled diamond). The eluates in tubes were pooled as different fractions: a, tubes 31-44; b, tubes 45-54; c, tubes 55-64; d, tubes 65-74; e, tubes 74-84; f, tubes 85-94 and g, tubes 95-104. B) Western blot of the pooled fractions of SP incubated with Milk-Fraction 1 (Fig. 2A). For western blot with anti-BSP1, the following protein concentrations were used: SP, 50 ng; M (heated skimmed milk), 1  $\mu$ g; F1 (Milk-Fraction 1), 1.1  $\mu$ g; Fractions a-g, 0.6-1.4  $\mu$ g. For immunoblots with anti-BSP3 and anti-BSP5, the following protein concentrations were used: SP, 400 ng; M, 1  $\mu$ g; F1, 2.2  $\mu$ g; Fractions a-g, 1.2-2.8  $\mu$ g. C) Chromatogram of 10 mg of SP alone (open square) or incubated with Milk-Fraction 1 (filled diamond). The eluates in tubes were pooled as different fractions: a, tubes 29-39; b, tubes 40-55; c, tubes 56-73 and d, tubes 74-103. D) Western blots of pooled fractions

of SP incubated with Milk-Fraction 1 (Fig. 2C). For immunoblot with anti-BSP1, the following protein concentrations were used: SP, 50 ng; M, 1  $\mu$ g; F1, 2  $\mu$ g; Fractions a-c, 1-2  $\mu$ g; Fraction d, 100 ng. For immunoblots with anti-BSP3 and anti-BSP5, the following protein concentrations were used: SP, 400 ng; M, 1  $\mu$ g; F1, 2  $\mu$ g; Fractions a-d, 0.8-2  $\mu$ g.

**Fig. 3.** Gel filtration chromatograms of SP and of a mixture of SP with milk proteins. Milk-Fraction 2 (defined in Figure 1A) from 2 runs was concentrated to 4 ml, then 1 ml (~21 mg of proteins) was chromatographed. Alternatively, 1 or 10 mg of SP and 1 ml of Milk-Fraction 2 concentrated were mixed, incubated for 1 h at room temperature and subjected to chromatography. A) Chromatogram of 1 mg of SP alone (open square) or incubated with Milk-Fraction 2 (filled diamond). The eluates in tubes were pooled as different fractions: a, tubes 51-62; b, tubes 63-73; c, tubes 74-82; d, tubes 83-91 and e, tubes 92-100. B) Western blot of the pooled fractions of SP incubated with Milk-Fraction 2 (Fig. 3A). For western blot with anti-BSP1, the following protein concentrations were used: SP, 50 ng; M (heated skimmed milk), 1  $\mu$ g; F2 (Milk-Fraction 2), 5  $\mu$ g; Fractions a-e, 0.1-1  $\mu$ g. For immunoblots with anti-BSP3 and anti-BSP5, the following protein concentrations were used: SP, 400 ng; M, 1  $\mu$ g; F2, 10  $\mu$ g; Fractions a-e, 0.8-1.7  $\mu$ g. C) Chromatogram pattern of 10 mg of SP alone (open square) or incubated with Milk-Fraction 2 (filled diamond). The eluates in tubes were pooled as different fractions: a, tubes 50-62; b, tubes 63-71; c, tubes 72-79; d, tubes 80-89 and e, tubes 90-101. D) Western blot of pooled fractions of SP incubated with Milk-Fraction 2 (Fig. 3C). For western blot with anti-BSP1, the following protein concentrations were used: SP, 50 ng; M, 1  $\mu$ g; F2, 1  $\mu$ g; Fractions a-e, 50 ng. For immunoblots with anti-BSP3 and anti-BSP5,

the following protein concentrations were used: SP, 400 ng; M, 1  $\mu$ g; F2, 1  $\mu$ g; Fractions a-e, 100 ng.

**Fig 4.** Isothermal calorimetric titration of heated skimmed milk (0.12 mg protein/ml) with GB-SP proteins (5 mg/ml) at 37 °C.

**Fig 5.** Isothermal calorimetric titration of milk caseins (0.005 mM) with BSP1 (0.275 mM) at 37 °C. Top panel, heat flow changes resulting from the injections and bottom panel, calculated binding enthalpy. The solid line represents the fit obtained from the Scatchard model.

**Fig 6.** Isothermal calorimetric titration of  $\alpha$ -lactalbumin (0.038 mM) with BSP1 (0.319 mM) at 37 °C. Top panel, heat flow changes resulting from the injections and bottom panel, calculated binding enthalpy. The solid line represents the fit obtained from the Scatchard model.

**Table 1.** Thermodynamic parameters for the association of BSP1 with milk proteins.

Protein	$K_a$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$\Delta H_a$ (kcal/mol)	$\Delta G_a$ (kcal/mol)	$\Delta S_a$ (cal/mol K)	n
Casein micelles	$350 \pm 60$	$-7 \pm 2$	$-7.9 \pm 0.1$	$1 \pm 5$	$4.5 \pm 0.2$
$\alpha$ -lactalbumin	$240 \pm 70$	$-8 \pm 3$	$-7.6 \pm 0.2$	$-1 \pm 9$	$0.8 \pm 0.2$



Figure 1

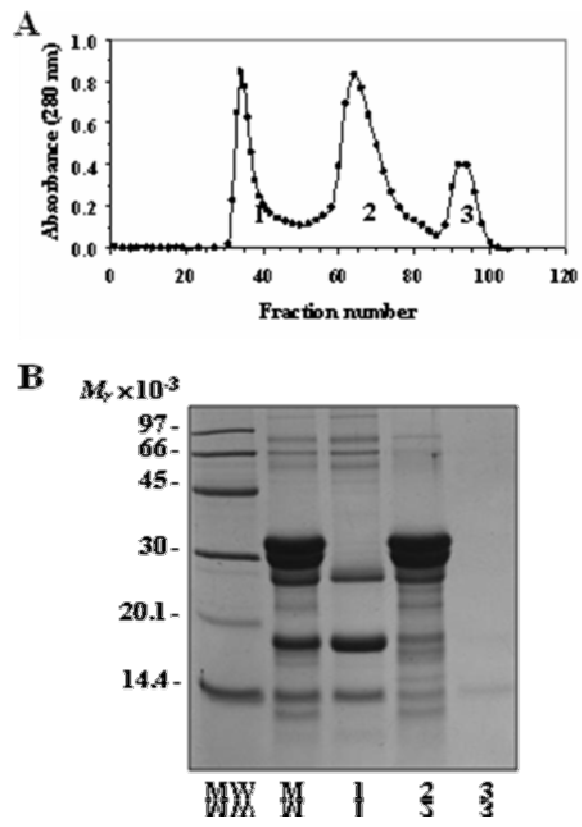


Figure 2

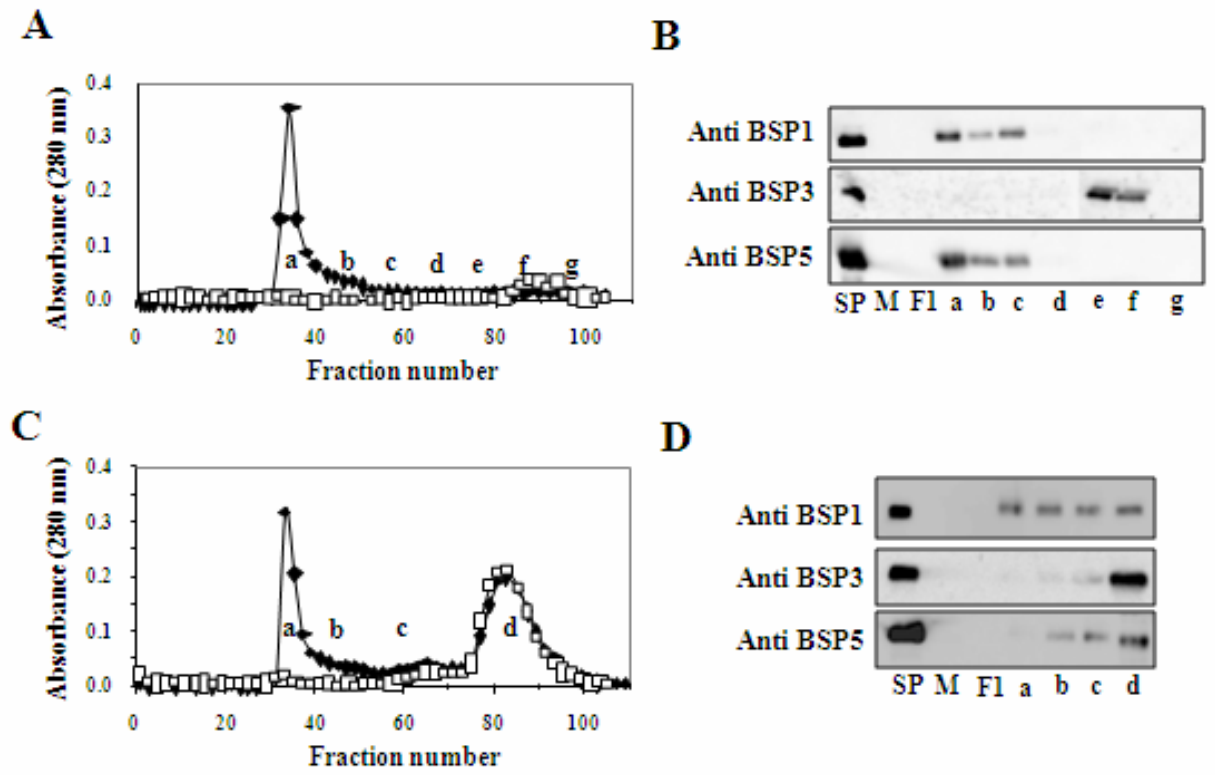


Figure 3

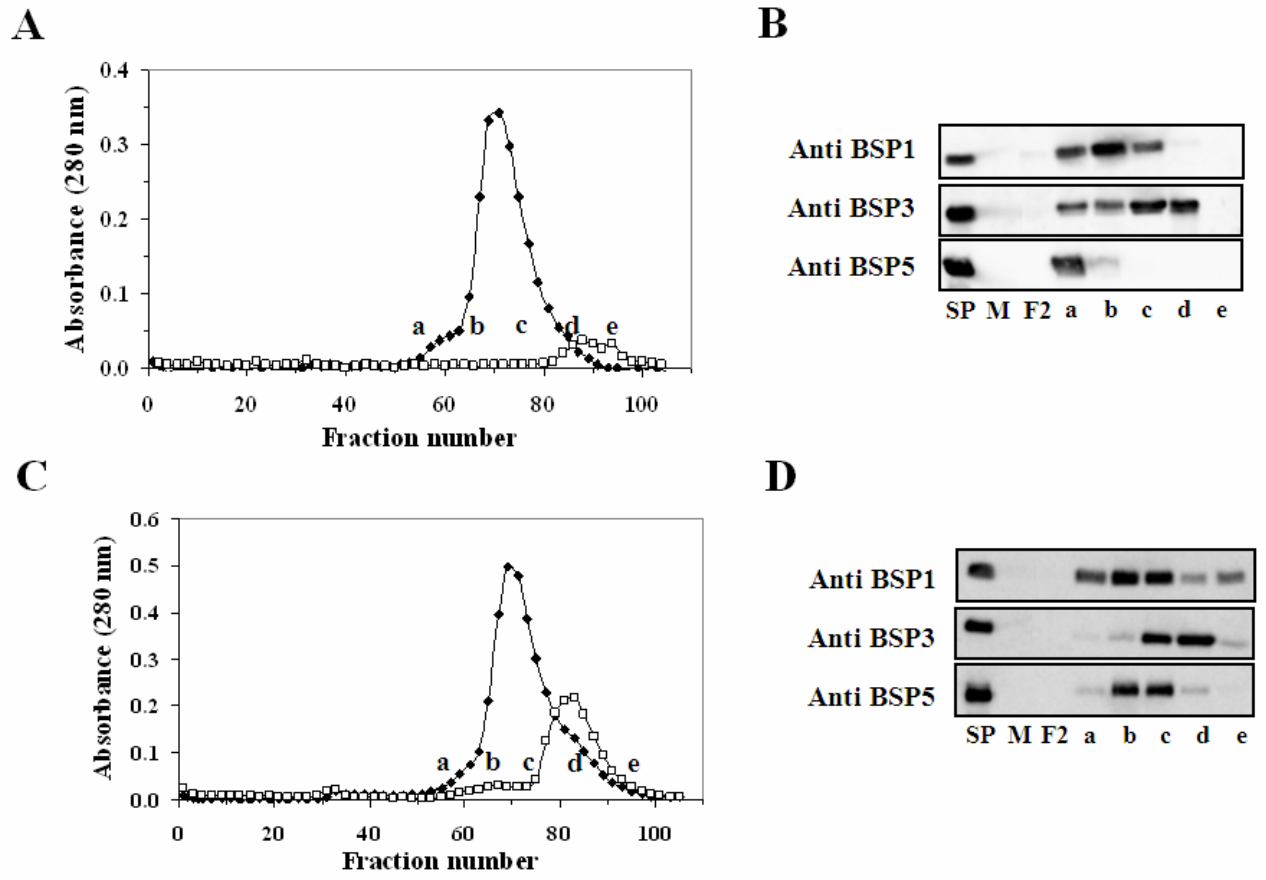


Figure 4

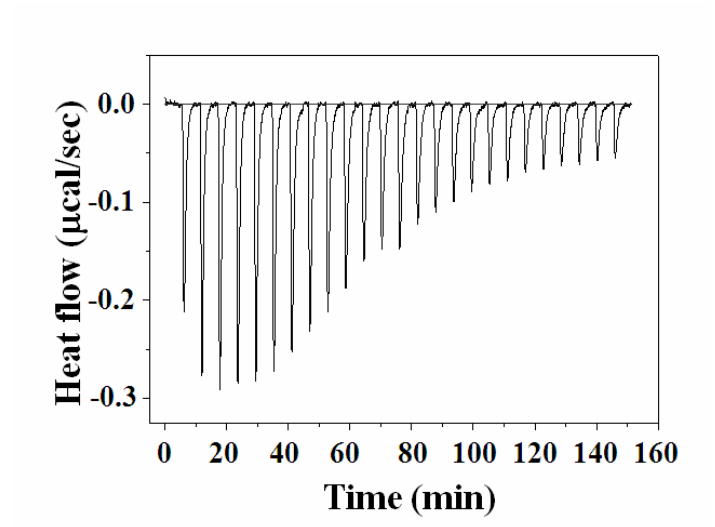


Figure 5

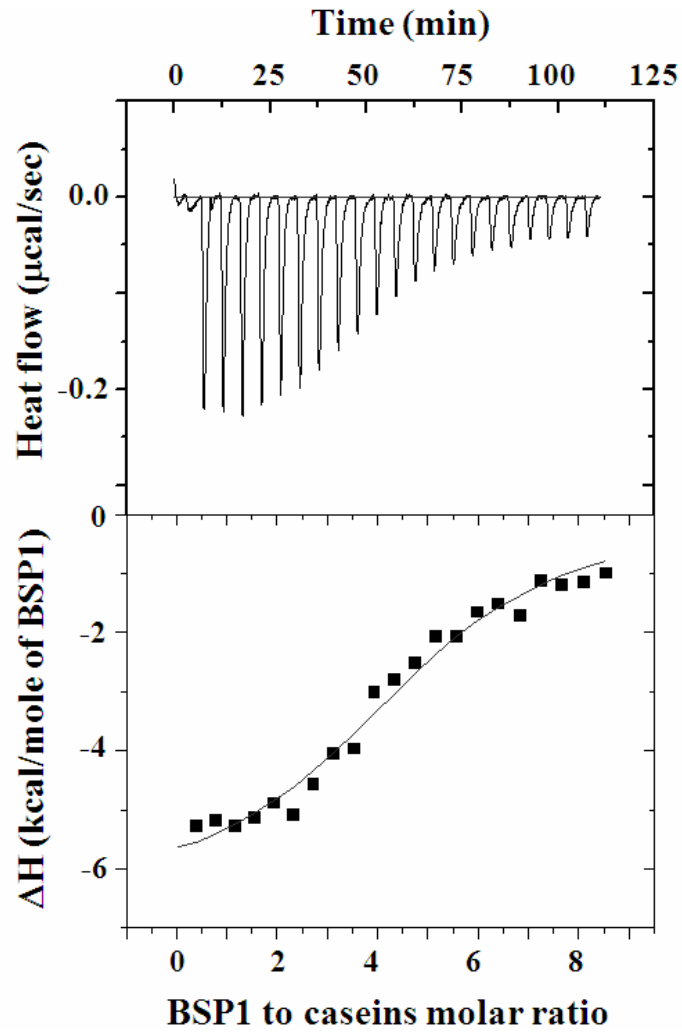
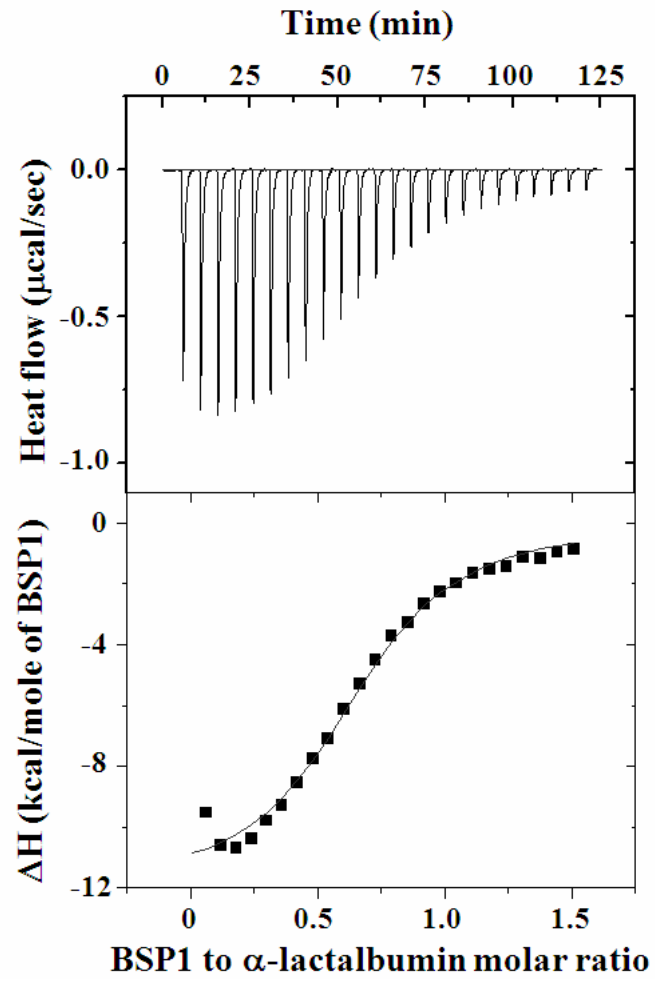


Figure 6



**2.2. Mechanism of sperm protection by milk: a comparative study of interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from bovine, stallion, ram and boar semen.** Lusignan, M.F., Lafleur, M. and Manjunath, P. Soumis dans *Reproduction*, juin 2011.

Préambule :

Dans l'article précédent, nous avons montré qu'il y avait une interaction entre les protéines BSP bovines et les protéines du lait et que cette interaction est probablement la façon dont le lait protège les spermatozoïdes bovins durant leur conservation. Les protéines BSP sont retrouvées dans les sécrétions des vésicules séminales et dans le plasma séminal de plusieurs mammifères. Dans cet article, nous avons montré par filtration sur gel que les protéines BSP retrouvées dans le plasma séminal de porc, d'étalon et de bélier interagissaient avec les protéines du lait suggérant que le lait protège les spermatozoïdes de ces espèces de la même façon que l'espèce bovine.

J'ai planifié et effectué tous les travaux menant à la rédaction de cet article. J'ai fait l'interprétation des résultats et j'ai rédigé l'article. M. Michel Lafleur et M. Puttaswamy Manjunath ont participé à la révision du manuscrit.

**Mechanism of sperm protection by milk: a comparative study of interaction of milk proteins and binder of sperm (BSP) proteins from bovine, stallion, ram and boar semen<sup>1</sup>**

Marie-France Lusignan<sup>2</sup>, Michel Lafleur<sup>3</sup> and Puttaswamy Manjunath<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada

<sup>2</sup> Department of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

<sup>4</sup>Correspondence: Puttaswamy Manjunath, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, 5415 L'Assomption blvd, Montreal, Quebec, Canada, H1T 2M4.

FAX : 514-252-3430.

**Key words:** Sperm preservation, BSP protein, milk extender, caseins, whey proteins, protein-protein interaction, bovine, boar, stallion, ram.

**Short title:** Interaction of milk extender components and BSP proteins

**Summary:** Using gel filtration and immunoblotting, we demonstrate for the first time that the BSP family protein from several mammalian semen (bovine, boar, stallion and ram) interact with milk extender components ( $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and casein micelles). This protein-protein interaction seems to be a general phenomenon when milk is used in semen extender and appears to be the basis of sperm protection during storage by milk extender.



**Abstract**

Skimmed milk is used as an extender for preservation of sperm from various mammals. However, the mechanism by which milk components protect sperm is poorly understood. Mammalian semen contains a family of closely related proteins known as Binder of Sperm (BSP proteins) that are added to sperm at ejaculation. BSP proteins extract lipids from the sperm membrane thereby extensively modifying its composition, a change which appears to be detrimental to sperm storage. We recently demonstrated that bovine BSP proteins interact with major milk proteins and proposed that this interaction could be the basis of sperm protection by milk. In the present study, we investigated if homologous BSP proteins present in boar, stallion and ram seminal plasma have also affinity for the milk proteins in order to assess whether the mechanism of sperm protection by milk for these species is similar to that found with bovine semen in milk extender. Skim milk was incubated with seminal plasma proteins (bovine, boar, stallion and ram), chromatographed on a Sepharose CL 4B column and proteins in various fractions were analyzed by immunoblotting. Bovine, boar, stallion and ram BSP proteins had affinity for a milk protein fraction mainly composed of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and  $\kappa$ -casein. Bovine, boar and ram had also affinity for another milk protein fraction composed of mostly casein micelles. However stallion BSP seemed to behave differently as no significant affinity could be determined for the casein-containing fraction. These results support our view that milk proteins associate with BSP proteins thereby preventing detrimental effect of BSP proteins on the sperm membrane and this interaction is proposed to be the basis of sperm protection when milk is used as extender to preserve mammalian semen.

## Introduction

Heated skim milk or whole milk is commonly used as an extender for sperm preservation (reviewed in [1, 2]). Being a product of animal origin, its composition is not constant and it presents a potential risk of contamination of semen. Because of these drawbacks, there is an interest to find substitutes. The development of novel extenders free of products of animal origin is difficult considering that the mechanism by which milk protects sperm is not well known.

We previously demonstrated that casein micelles isolated from milk could prevent the binding of the harmful factor of bovine seminal plasma, the Binder of Sperm (BSP) proteins to sperm membranes [3]. Consequently this association precludes the cholesterol and phospholipid extraction from the membranes that is induced by BSP proteins while maintaining sperm viability and motility during sperm storage [3]. These results suggested that the association of BSP proteins and casein micelles may be the basis of sperm protection by milk. In further studies, we demonstrated by isothermal titration calorimetry and gel filtration that BSP proteins bind to several milk proteins, namely casein micelles,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin [4]. These studies led us to propose that the interaction between milk proteins and BSP proteins is the basis for sperm protection during storage.

The bovine BSP family is constituted by three member: BSP1, BSP3 and BSP5 [5, 6]. Previous results have shown that BSP genes and proteins are in fact a superfamily [7, 8]. Homologs of BSP proteins have been isolated and characterized from the seminal plasma (SP) or seminal vesicle secretions of many mammals, including bison, goat, stallion, boar and ram (reviewed in [2]). Recently, a BSP1-like protein was detected in the buffalo SP [9].

Interestingly, milk is used to dilute sperm of different mammals such as stallion (reviewed in [10]), goat (reviewed in [11]), ram (reviewed in [12]) and buffalo (reviewed in [13]). Since BSP homologs have been identified in the semen of all these species, it could be postulated that the mechanism of their sperm protection by milk may be similar.

In this study, we investigated by gel filtration followed by immunoblot if the BSP homologous proteins found in ram and stallion SP have affinity for the milk proteins and compared these results with those obtained with BSP from bovine species. Boar semen is mainly preserved in extender containing egg yolk (reviewed in [14]). In order to have a better understanding of the binding properties of the homologous BSP proteins, we verified if boar BSP1 protein has affinity for the milk proteins.

## **Materials and method**

### *Materials*

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) was from Sigma (St-Louis, MO). Sepharose CL-4B and Sephadex G-25 medium were from Pharmacia Biotech Inc (Baie d'Urfé). Acrylamide and bisacrylamide were purchased from MP Biomedical (Irvine, CA). SDS and other electrophoresis products were from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). Low molecular weight (LMW) calibration kit was from GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada). Immobilon-P polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes were purchased from Millipore (Nepean, ON, Canada). Western Lightning Chemiluminescence Reagent kit was from Perkin-Elmer Life Sciences (Boston, MA). All other chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers. Skimmed milk was purchased at a local food store.

### *Preparation of SP proteins*

Bovine, stallion, ram SP proteins and boar SP were prepared as previously [5, 15-17]. Boar SP was concentrated using an YM-3 membrane in Amicon stirring ultrafiltration cell.

### *Isolation of BSP proteins from stallion and ram SP*

Gelatin-adsorbed ram and stallion BSP were isolated as described previously [16], except that the adsorbed proteins were eluted with PBS 7M urea. Gelatin-adsorbed fractions were desalted at room temperature on a Sephadex G-25 column using 50 mM ammonium bicarbonate and the eluted proteins were then lyophilized. The isolated BSP

proteins corresponded to ~8 % and 30% of the total SP proteins loaded into the column for ram and stallion, respectively.

#### *Generation of polyclonal antibodies directed against stallion and ram BSP proteins*

Gelatin-adsorbed ram or stallion BSP proteins were dissolved in saline (1 mg/ml) and sent to the Biotechnology Research Institute (Montréal, QC, Canada) to raise polyclonal antibodies in rabbits. Polyclonal antibodies were purified by affinity chromatography on a protein A-Sepharose column and their specificity was assessed by immunoblot analysis [18].

#### *Gel Filtration Chromatography*

Milk fraction 1 (milk F1) was prepared as previously [4]. SP proteins and gelatin-bound ram proteins were dissolved in a Tris saline buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, pH 7.4). Milk or milk F1 were filtered through a 5 µm filter and SP proteins (bovine, boar, ram and stallion) or gelatin-bound ram BSP proteins were filtered through a 0.45 µm filter. Protein mixtures were incubated 1 hour at room temperature before loading on a Sepharose CL 4B column.

Gel filtration chromatography was carried out on a Sepharose CL-4B column (78 × 2.5 cm) equilibrated with Tris saline buffer at room temperature at a flow rate of 70 ml/h. Fractions of 3.2 ml were collected and their absorbance was measured at 280 nm. The presence of BSP proteins in the various fractions was analyzed by immunoblotting using respective polyclonal antibodies.

#### *Analyses of proteins by immunoblotting*

Proteins were precipitated with trichloroacetic acid (TCA, 15(w/v)% final concentration), reduced, denatured, and separated by electrophoresis on 15(w/v)% polyacrylamide gels. Proteins in the gel were transferred electrophoretically to PVDF membrane, as described by Matsudaira [19]. Proteins were probed with antiserum directed against each bovine BSP proteins [18, 20], boar BSP1 [17], stallion BSP (antibodies isolated from the third boost were used, 1:1000) or ram BSP (antibodies isolated from the third boost were used, 1:3000). Molecular mass was estimated by comparison with the Low Molecular Weight Calibration kit containing phosphorylase b ( $M_r = 97\ 000$ ), albumin ( $M_r = 66\ 000$ ), ovalbumin ( $M_r = 45\ 000$ ), carbonic anhydrase ( $M_r = 30\ 000$ ), trypsin inhibitor ( $M_r = 21\ 100$ ), and  $\alpha$ -lactalbumin ( $M_r = 14\ 400$ ).

#### *Protein assay*

The protein content of the samples was determined by the modified Lowry procedure [21].

## Results

### *Interaction of bovine BSP proteins with milk proteins*

On the Sepharose CL 4B column, bovine SP proteins eluted as a single peak, corresponding to the fractions VIII-X (Fig. 1A). Immunoblotting using antibodies directed against bovine BSP1, BSP3 and BSP5 confirmed the presence of these bovine BSP proteins (Fig.1B). In order to demonstrate the binding of bovine BSP proteins to milk proteins, a sample with a 1:20 bovine SP:milk protein ratio was incubated and loaded on the column. The chromatogram is shown in Figure 1A. The proteins eluted in three major peaks that are characteristics of the fractionation of heated skim milk using this column [4]. The first peak (milk F1) contains  $\kappa$ -casein and the two major whey proteins,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. The second peak (milk F2) mainly contains caseins even though small amounts of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and  $\kappa$ -casein can also be found in small proportions [4]. The third peak contains some small molecular weight components such as amino acids, salts, sugars, vitamins, etc. that gave rise to the observed optical density [4]. The tubes were pooled into ten fractions (I-X) and the immunoblotting analysis of these fractions showed that BSP1 and BSP3 were present in each fraction and BSP5 could be found in fractions I-V, indicating that the bovine BSP proteins interact with milk proteins (Fig. 1B).

### *Interaction of boar BSP protein with milk proteins*

Boar SP contains one BSP homolog, which is named boar BSP1 (previously known as pB1) [8, 22]. When boar SP was chromatographed on a Sepharose CL 4B column, the proteins gave rise to one large peak. The collected samples were pooled into

five fractions (1-5) and were subjected to immunoblotting using antibodies directed against boar BSP1. Boar BSP1 was detected in fractions 4 and 5 (Fig. 2B). In order to validate the association between boar BSP1 and milk proteins, we used a sample with a 1:1 boar SP:milk protein ratio. The proteins mixture eluted from a Sepharose CL 4B column in four major peaks and the tubes were pooled into seven fractions (I-VII) (Fig. 2A). As observed in Figure 2B, boar BSP1 was present in various quantities in each fraction, indicating that it interact with milk proteins. The major quantity of boar BSP1 was present in fraction V, which corresponds to fraction, milk F2 (mostly contain casein micelles).

#### *Interaction of stallion BSP proteins with milk proteins*

Stallion SP eluted from a Sepharose CL 4B column as a small peak of proteins around tubes 105-135 (Fig. 3A). Different tubes were analyzed by immunoblotting using polyclonal antibodies directed against stallion BSP proteins (Fig. 3B). Preliminary studies showed clearer immunoblotting results if tubes were used instead of pooled fractions (results not shown). Our polyclonal antibodies can mainly detect stallion BSP1, which has a molecular weight of 22 kDa as described previously [15]. It can also detect a glycoform of stallion BSP1 (17 kDa), and stallion BSP2 (16 kDa) but cannot detect the 12 kDa stallion BSP protein [15]. Stallion BSP eluted in tubes 88-142 (Fig. 3B). The two stallion BSP1 and BSP2 were detected. Also, two bands around 28 kDa and 32 kDa were detected in tubes 108-136. A stallion SP: milk protein ratio of 1:20 was incubated and analyzed using a Sepharose CL 4B column. The elution pattern of this mixture showed three major peaks (Fig. 3A). The stallion BSP1 protein of 22 kDa was found in tubes 45-108 (Fig. 3B). Stallion BSP1 of 17 kDa was detected weakly in tube 45, while stallion BSP2 of 16



kDa was detected in tubes 47-63, 88-100 and 118-127. In tube 118, two proteins with a molecular weight of approximately 28 and 32 kDa were present. These results indicate that the stallion BSP proteins can interact with milk F1.

#### *Interaction of ram BSP proteins with milk proteins*

When ram SP proteins were loaded into the Sepharose CL 4B column, a small protein peak eluted around tubes 115-135. Different tubes were analyzed by immunoblotting using polyclonal antibodies directed against ram BSP proteins. The polyclonal antibodies can recognize mainly the 22 and 24 kDa ram BSP proteins, as described previously [16], and these proteins could be detected as one large band. The 15 and 16 kDa ram BSP proteins [16] were separated as closely migrating doublets but migrated as one band when a large quantity of ram BSP was used (results not shown). Ram BSP proteins of 22 and 24 kDa eluted in tubes 115-130 (Fig. 4B). The interaction between ram BSP proteins and milk protein was studied by incubating SP proteins with milk at a protein ratio of 1:20. The protein eluted as three major peaks from the Sepharose CL 4B column (Fig. 4A). Low quantity of the ram BSP of 15, 16, 22 and 24 kDa were detected in the first elution peak (tubes 44-48), and a large quantity of the BSP proteins of 22 and 24 kDa were detected in tubes 85-130 (Fig. 4B) indicating the interaction between the ram BSP proteins and the milk proteins.

In order to verify if some factor from the SP could prevent the binding of the ram BSP proteins to the milk proteins, we used a different strategy. Instead of SP, gelatin-bound ram BSP proteins (containing BSP proteins only) were incubated with milk F1 using a protein ratio of 1:10 and passed into the Sepharose CL 4B column. Elution pattern showed one large peak (Figure 5A). The analysis of different tube demonstrated that BSP

of 15 and 16 kDa were present in tubes 46 and 48. Small quantity of BSP of 22 and 24 kDa were also present in tubes 46 and 48, but the larger quantity was in tubes 114-135 (Fig. 5B).

## Discussion

### *Interaction of BSP homologs in boar, stallion and ram with the milk proteins*

We demonstrated that BSP homologs in boar, stallion and ram share the binding properties of the bovine BSP for the milk proteins. In all cases, a significant amount of BSP proteins co-eluted with milk proteins. Even though this phenomenon appears to be a general feature, some distinctions could be observed between the different systems.

For the boar BSP1 and milk protein interaction, it is interesting to note that boar BSP1 mainly binds to milk F2, suggesting a higher affinity of the protein for the caseins instead of the whey proteins in milk F1 [4].

Stallion BSP1 protein of 22 kDa and 17 kDa and stallion BSP2 of 16 kDa can interact with the milk proteins of milk F1. However, it cannot be concluded with gel filtration chromatography if the stallion BSP proteins have affinity for the milk proteins F2, which essentially contains casein micelles. An alternative technique, such as isothermal titration calorimetry, could be used to demonstrate the binding between stallion BSP proteins with caseins. It was successfully used previously to study the interaction between bovine BSP proteins and milk proteins [4]. The two bands of ~28 and 32 kDa that were detected strongly in tubes 118 and 127 (Fig. 3B), could be another glycoform of stallion BSP1, such as the 28 kDa protein that was described by Calvete [22]. It could also be due to a non-specific binding of the antibody because the detected proteins were in an amount large enough to be detected on PVDF membrane stained with amido black.

Ram BSP proteins can bind the milk proteins. However, only the 22 and 24 kDa BSP proteins bind to the caseins of milk F2. Ram BSP proteins seem to have a weak

affinity for the milk proteins, since the major quantity of the 22 and 24 kDa BSP eluted at the same place as they elute when milk proteins are absent. Previous study demonstrated that the 22 and 24 kDa ram BSP protein can bind to each other [16]. Moreover, it is known that the BSP proteins have tendencies to aggregate [5, 23]. This aggregation could hide their binding sites and thus prevent them to bind to the milk proteins. Alternatively, there could be structural differences that prevent them to bind to the milk proteins.

#### *Mechanism of sperm protection*

We previously proposed that the sequestration of bovine BSP proteins by milk proteins is the basis of sperm protection by milk during storage [4]. The BSP proteins in the SP of boar, stallion and ram have affinity for the milk proteins, suggesting that when semen of these species is diluted in milk, the milk proteins may sequester the BSP proteins from the SP.

However, the concentration of BSP protein homologs in the SP varies from species to species. In bovine species, the BSP proteins constitute the major quantity of the total SP proteins (~65%, 36 mg/ml) [2]. Approximately 20% (2 mg/ml) of the total proteins in stallion SP correspond to the BSP [2] and in ram, BSP proteins account for ~30% (15 mg/ml) of the total proteins of SP [2]. This suggests that the scavenging of the BSP proteins by the milk proteins may contribute in part to the mechanism of mammalian sperm protection by milk. It is possible that milk proteins protect sperm from other harmful factors present in SP. More studies are required to have a better understanding of the mammals' sperm protection by milk.

The bison BSP homologs share approximately 100% sequence identity with the bovine BSP proteins, as demonstrated by amino-terminal sequencing [24]. This suggests

that the bison BSP proteins could have affinity for the milk proteins as well as the bovine do [4]. Interestingly, goat BSP homologs are most closely related to ram BSP protein homologs than to other BSP homologs [16]. Since the affinity of the ram BSP proteins for milk proteins seem to be weak, it can be postulated that the goat BSP proteins should behave similarly.

In the artificial insemination industry, each ejaculate is diluted with the extender according to their sperm concentration. In order to improve the sperm protection by milk, the dilution ratio of the semen with the milk extender could be adapted for each species according to the BSP concentration in SP. In species with a high BSP concentration, a higher dilution ratio could be used. However, the dilution ratio should permit some BSP proteins to interact with sperm since they are required for sperm capacitation (reviewed in [25]).

In summary, we demonstrated that BSP proteins present in boar, ram and stallion SP have affinity for the milk proteins. These results suggest that the mechanism of sperm protection by milk in ram and stallion should be similar as the one proposed for bovine species. However the variability of the BSP concentration in the SP suggests that the dilution ratio of the semen in milk should be adapted for each species to preserve the fertility of the sample. The results presented in this paper may aid in improving the efficiency of the current extenders and in developing novel extenders free of product of animal origin.

## References

1. Kakar SS, Ganguli NC. Milk as an extender for semen: A review. *Indian J Anim Sci* 1978; 48: 777-790.
2. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 1338-1344.
3. Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol Reprod* 2007; 77: 120-126.
4. Lusignan MF, Bergeron A, Lafleur M, Manjunath P. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. *Biol Reprod* 2011, doi: 10.1095/biolreprod.110.089961.
5. Manjunath P, Sairam MR. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 1987; 241: 685-692.
6. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: Chrétien M, McKerns KW (eds.), *Molecular biology of brain and endocrine peptidergic systems*. New-York: Plenum Press; 1988: 259-273.
7. Fan J, Lefebvre J, Manjunath P. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals. *Gene* 2006; 375: 63-74.

8. Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. *Biol Reprod* 2009; 80: 394-397.
9. Harshan HM, Sankar S, Singh LP, Singh MK, Sudharani S, Ansari MR, Singh SK, Majumdar AC, Joshi P. Identification of PDC-109-like protein(s) in buffalo seminal plasma. *Anim Reprod Sci* 2009; 115: 306-311.
10. Aurich JE, Kuhne A, Hoppe H, Aurich C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 1996; 46: 791-797.
11. Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 113-141.
12. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 77-111.
13. Sansone G, Nastri MJ, Fabbrocini A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 55-76.
14. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 143-172.
15. Ménard M, Nauc V, Lazure C, Vaillancourt D, Manjunath P. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. *Mol Reprod Dev* 2003; 66: 349-357.
16. Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 461-470.

17. Lusignan MF, Bergeron A, Crete MH, Lazure C, Manjunath P. Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. *Biol Reprod* 2007; 76: 424-432.
18. Nauc V, Manjunath P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biology Reprod* 2000; 63: 1058-1066.
19. Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 1987; 262: 10035-10038.
20. 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.
21. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87: 206-210.
22. Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Töpfer-Petersen E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 1997; 407: 201-206.
23. Calvete JJ, Sanz L, Reinert M, Dostalova Z, Töpfer-Petersen E. Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. In: Jamieson BGM, Ausio, J., and Justine, J.-L. (ed.) *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*, vol. 166. Paris: Mém. Mus. natn, Hist. nat.; 1995: 515-524.



24. Boisvert M, Bergeron A, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol Reprod* 2004; 70: 656-661.
25. Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 109-119.

### Figure legends

**Fig. 1** Gel filtration analysis of bovine SP proteins and interaction between bovine SP with milk proteins. A) Chromatographic pattern of bovine SP (1.7 mg) and milk proteins (35 mg). Tubes corresponding to bovine SP incubated with skim milk (filled circle) were pooled as different fractions : I, tubes 46-54; II, tubes 55-64; III, tubes 65-74; IV, tubes 75-84; V, tubes 85-94; VI, tubes 95-104; VII, tubes 105-114; VIII, tubes 115-125; IX, tubes 126-135; X, tubes 136-146. Tubes corresponding to bovine SP proteins (1.75 mg; open circle) were pooled as different fractions: I, tubes 42-55; II, tubes 56-65; III, tubes 66-75; IV, tubes 76-85; V, tubes 86-95; VI, tubes 96-105; VII, tubes 106-115; VIII, tubes 116-125; IX, tubes 126-135; X, tubes 136-147. B) Immunoblot analysis of Sepharose CL 4B eluted fractions (I-X) of bovine SP incubated with skim milk and immunoblot analysis of bovine SP pooled fractions (I-X). SP: bovine SP (with anti BSP1, 50 ng; with anti BSP3 and BSP5, 400 ng). Aliquot of equivalent volume was precipitated according to each total fraction volume. Bovine SP: fraction I, 169  $\mu$ l; fractions II-X, 141  $\mu$ l. Bovine SP + milk: fraction I, 127  $\mu$ l; fractions II, IV-VI and IX, 141  $\mu$ l; fractions III and VII, 146  $\mu$ l; fraction VII, and X, 160  $\mu$ l.

**Fig. 2** Gel filtration analysis of boar SP and interaction between boar BSP1 in SP with milk proteins. A) Chromatographic pattern of boar SP (35 mg) and milk proteins (35 mg). Tubes corresponding to boar SP incubated with skim milk (filled circle) were pooled as different fractions: I, tubes 42-54; II, tubes 55-71; III, tubes 72-88; IV, tubes 89-94; V, tubes 95-106; VI, tubes 107-124 and VII, tubes 125-138. Tubes corresponding to boar SP (35 mg; open circle) were pooled as different fractions: 1, tubes 42-51; 2, tubes 52-78, 3, tubes 79-103, 4, tubes 104-128, 5, tubes 129-139. B) Immunoblot analysis of Sepharose

CL 4B eluted fractions (I-VII) of boar SP incubated with skim milk and immunoblot analysis of boar SP pooled fractions (1-5). SP: boar SP (3  $\mu$ g). Aliquot of equivalent volume was precipitated according to each total fraction volume. Boar SP: fraction I and II, 2 ml; fraction III, 909  $\mu$ l; fraction IV, 24  $\mu$ l; fraction V, 516  $\mu$ l. Boar SP + milk: fraction I, 126  $\mu$ l; fraction II, 163  $\mu$ l; fraction III, 158  $\mu$ l; fraction IV, 57  $\mu$ l; fraction V, 115  $\mu$ l; fraction VI, 2.2  $\mu$ l and fraction VII, 132  $\mu$ l.

**Fig. 3** Gel filtration analysis of stallion SP proteins and interaction between stallion BSP in SP with milk proteins. A) Chromatographic pattern of stallion SP proteins (1.75 mg) incubated with skim milk (35 mg; filled circle) and stallion SP proteins (1.75 mg; open circle). B) Immunoblot analysis of Sepharose CL 4B eluted fractions (tube number) of stallion SP proteins incubated with skim milk and eluted fractions (tube number) of stallion SP proteins. SP: stallion SP proteins (300 ng). Aliquot of equivalent volume was precipitated according to each total fraction volume. Stallion SP: 1 ml/tube. Stallion SP + milk, 170  $\mu$ l/tube.

**Fig. 4** Gel filtration analysis of ram SP proteins and interaction between ram BSP in SP with milk proteins. A) Chromatographic pattern of ram SP proteins (1.75 mg) incubated with skim milk (35 mg; filled circle) and ram SP proteins (1.75 mg; open circle). B) Immunoblot analysis of Sepharose CL 4B eluted fractions (tube number) of ram SP proteins incubated with skim milk and eluted fractions (tube number) of ram SP proteins. SP: ram SP proteins (300 ng). Aliquot of equivalent volume was precipitated according to each total fraction volume. Ram SP, 116  $\mu$ l/tube. Ram SP + milk, 116  $\mu$ l/tube.

**Fig. 5** Gel filtration analysis of the interaction between gelatin-adsorbed ram BSP proteins with milk fraction F1. A) Chromatographic pattern of gelatin-adsorbed ram BSP proteins (500  $\mu\text{g}$ ) incubated with milk fraction F1 (4.8 mg; filled circle). B) Immunoblot analysis of Sepharose CL 4B eluted tubes of gelatin-adsorbed ram BSP proteins incubated with milk fraction F1. SP: ram SP proteins (300 ng). Aliquot of equivalent volume was precipitated according to each total fraction volume. Ram SP + milk F1, 148  $\mu\text{l}$ /tube.

Figure 1

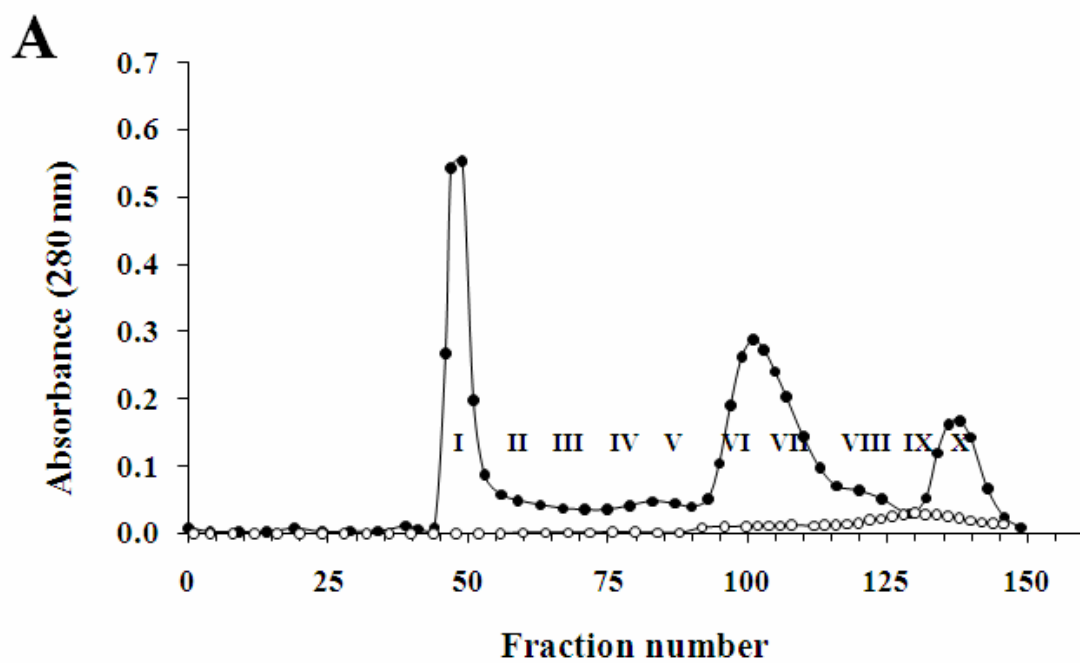
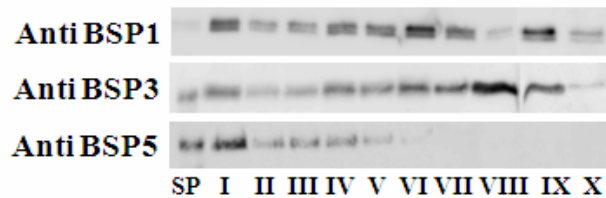
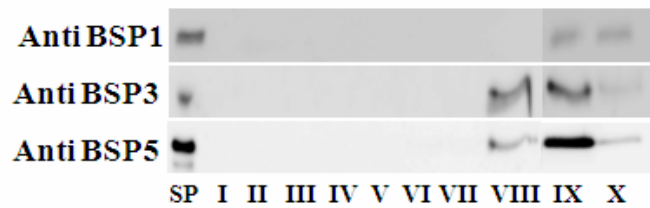
**B****Milk + bovine seminal plasma proteins****Bovine seminal plasma proteins**

Figure 2

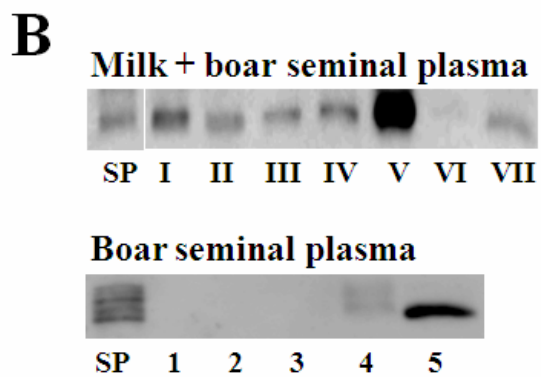
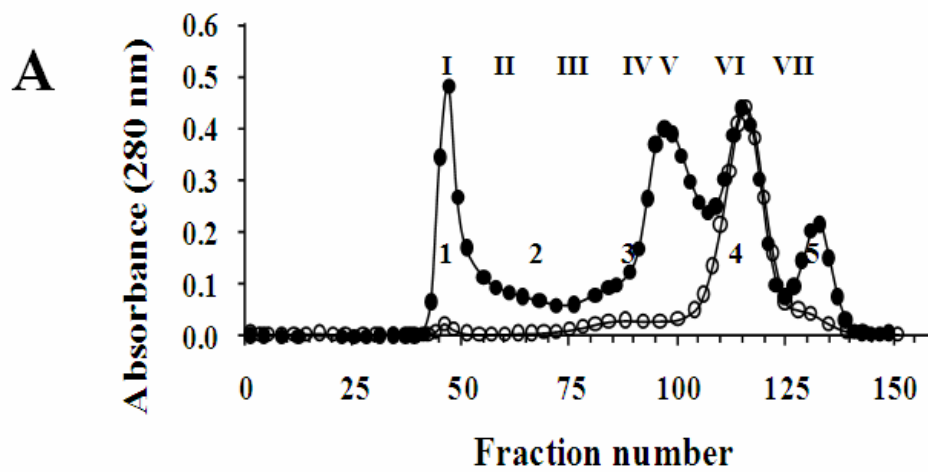


Figure 3

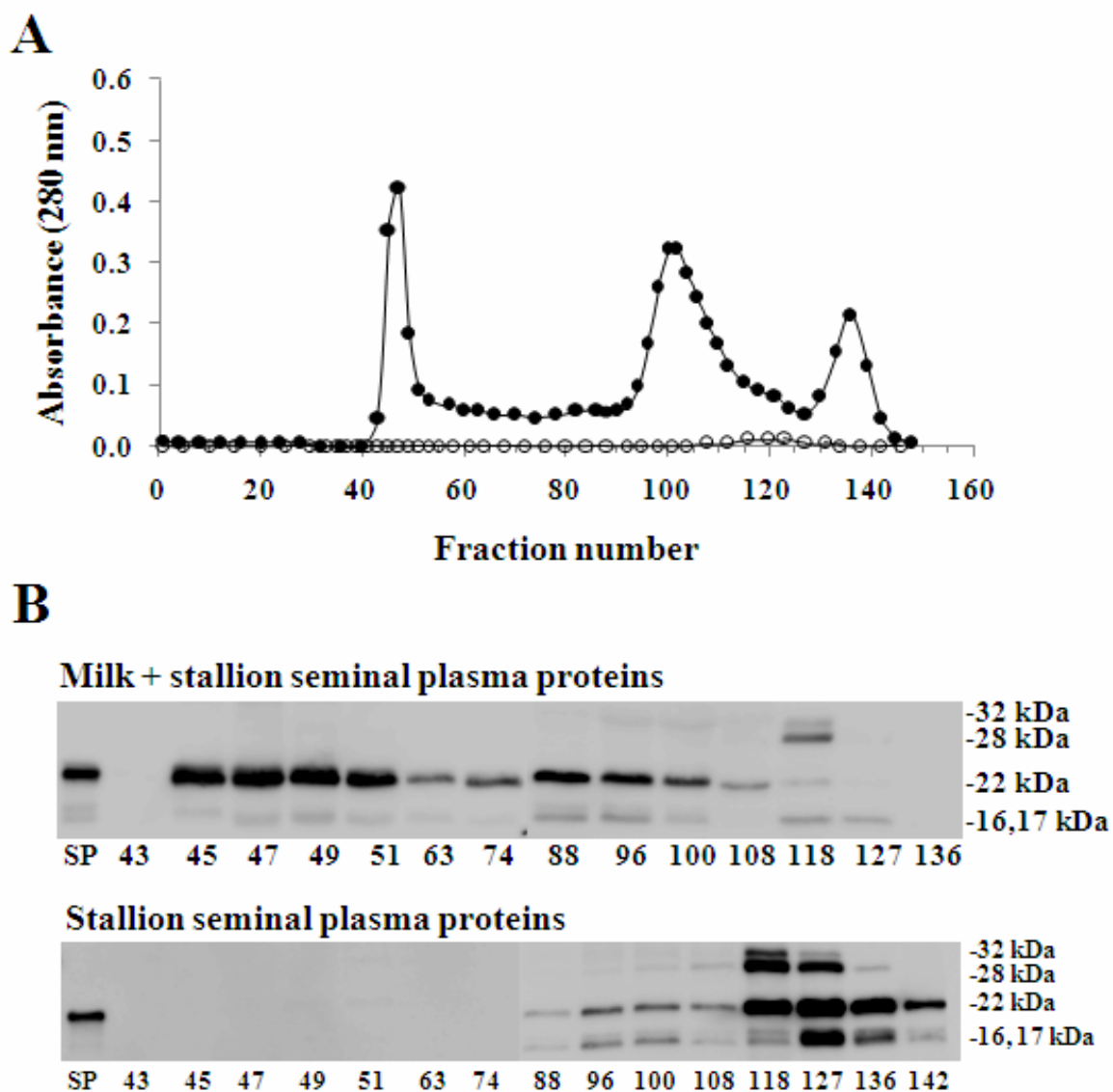


Figure 4

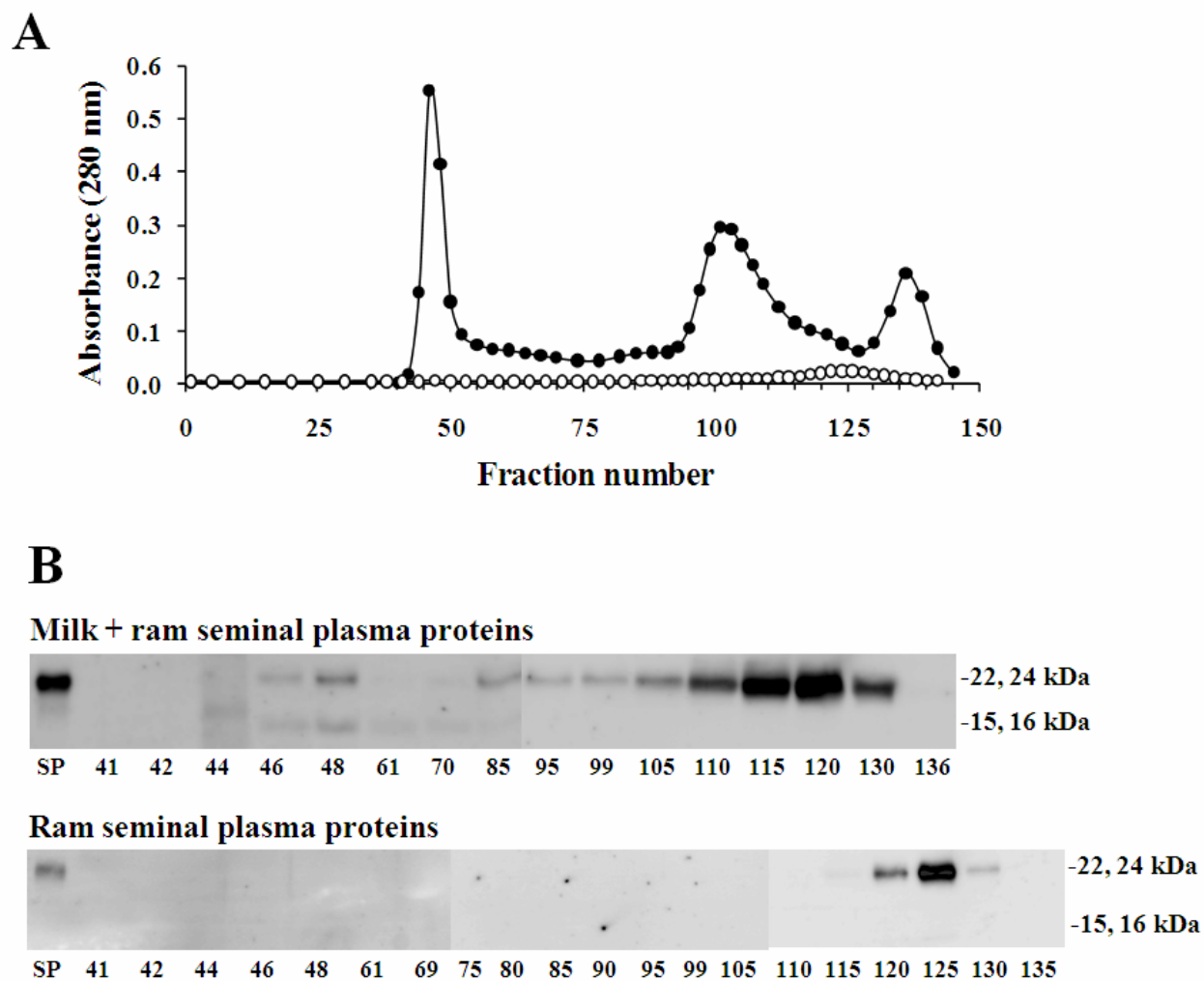
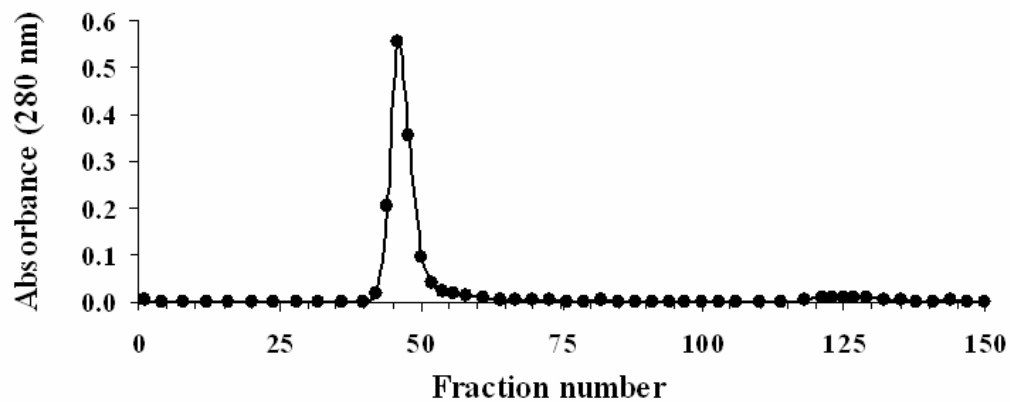
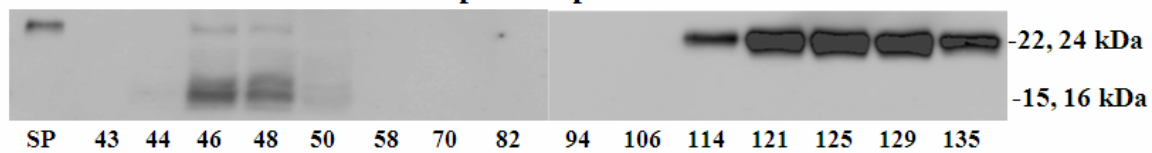




Figure 5

**A****B**

Milk fraction 1 + ram seminal plasma proteins



**2.3. Thermodynamics of the interaction between bovine Binder of Sperm BSP1 and low-density lipoprotein from hen's egg yolk.** Lusignan, M.F., Manjunath, P. and Lafleur, M. *Thermochimica Acta* 516 (2011) 88-90.

Préambule :

Les travaux précédents ont montré que la protection des spermatozoïdes de différentes espèces par le lait serait due à l'interaction entre les protéines du lait et les protéines BSP. Le jaune d'œuf est un autre composant ajouté dans les diluants protecteurs. Il a déjà été montré que les LDL du jaune d'œuf interagissent avec les protéines BSP. Nous avons voulu étudier la thermodynamique de cette interaction afin de comparer les mécanismes de protection des spermatozoïdes fournis par le lait et le jaune d'œuf. Nous avons montré dans cet article que l'interaction entre les protéines BSP et les LDL du jaune d'œuf est plus forte que celle entre les protéines BSP et les protéines du lait. De plus, une particule de LDL peut séquestrer un plus grand nombre de molécule de BSP, par rapport aux protéines du lait.

J'ai planifié et effectué tous les travaux menant à la rédaction de cet article. J'ai fait l'interprétation des résultats et j'ai rédigé l'article. M. Michel Lafleur m'a aidée pour l'interprétation des résultats d'ITC. M. Michel Lafleur et M. Puttaswamy Manjunath ont participé à la révision du manuscrit.

**Thermodynamics of the interaction between bovine Binder of Sperm BSP1 and low-density lipoprotein from hen's egg yolk**

Marie-France Lusignan<sup>1</sup>, Puttaswamy Manjunath<sup>1</sup>, and Michel Lafleur<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and Department of Medicine,  
Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre Ville, Montréal, Québec, Canada H3C  
3J7

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Centre for Self-Assembled Chemical Structures (CSACS),  
Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre Ville, Montréal, Québec, Canada H3C  
3J7

\*Correspondence: Michel Lafleur, Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P.  
6128, Succ. Centre Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

FAX : 1-514-343-7586.

**Key words:** isothermal titration calorimetry; low-density lipoproteins; Binder of sperm protein; sperm preservation; egg yolk extender.

Short title: BSP1 binds to low-density lipoproteins

**Abstract**

Egg yolk is used in extender to protect sperm from cold shock and freezing during preservation. It is the low-density lipoprotein (LDL) fraction of egg yolk that protects sperm. Even though essential for sperm capacitation, the major proteins from bull seminal plasma, the Binder of Sperm (BSP) proteins, are detrimental for sperm preservation because they induce a continual phospholipids and cholesterol efflux from sperm membranes. The BSP proteins were proposed to bind to egg yolk LDL, preventing the sperm membrane damage. We characterized the binding between the BSP proteins and the LDL by isothermal titration calorimetry, providing the thermodynamics and quantitative description of this putative association. The association between BSP1 (major BSP proteins) and LDL is characterized by an affinity constant ( $K_a$ ) of  $3.4 \pm 0.4 \mu\text{M}^{-1}$ . A protein/LDL ratio of  $104 \pm 5$  was determined indicating that 104 molecules of BSP1 would bind to one LDL particle. This stoichiometry leads to proposing that the association involves  $1.6 \pm 0.1$  phosphatidylcholines (PC) per BSP protein. This finding is satisfactorily consistent with the fact that each BSP1 protein has 2 binding sites for choline group. In conclusion, the formation of a high affinity complex between BSP1 and LDL is proposed to be important for the protection of sperm by egg yolk extender.

## 1. Introduction

Mammalian sperm can be preserved following dilution in extenders. Media, such as hen egg yolk, are routinely used. Egg yolk can protect bovine sperm during liquid storage [1-3] and cryopreservation [4-7]. A concentration of 20% egg yolk is generally added to the extender. The constituent of egg yolk that provides the protection of sperm against cold shock and freezing damages is the low-density lipoprotein (LDL) [6, 8, 9].

The mechanism of sperm protection by egg yolk is not well known. We proposed a novel mechanism suggesting that the LDL could protect sperm by sequestering a family of lipid-binding proteins from bovine seminal plasma, known as Binder of Sperm or BSP proteins (reviewed in [10, 11]). BSP proteins are secreted by the bull seminal vesicles and are constituted of BSP1, BSP3 and BSP5 [12, 13]. BSP proteins are beneficial *in vivo* because they bind to sperm membranes via the choline-containing phospholipids at ejaculation and induce a cholesterol and phospholipid efflux from sperm membranes, increasing the fertility of sperm (reviewed in [14]). However, *in vitro*, sperm is in continuous contact with an excess of BSP proteins that induce lipid efflux from the sperm membrane, resulting in decreased sperm resistance to cold shock and freezing [15]. Egg yolk LDL can bind BSP proteins in a rapid and saturable manner. The resulting lipoprotein: protein complex appears to be stable even after freeze thawing of the semen [16]. When semen is diluted in an extender containing egg yolk, the LDL present in egg yolk would sequester most of the BSP present in seminal plasma. This would prevent the lipid efflux induced by the BSP proteins (reviewed in [10]).

In order to gain a better understanding of the mechanism of sperm protection by egg yolk, we characterized the thermodynamics of the interaction between BSP proteins and LDL by using isothermal titration calorimetry (ITC). This approach presents a quantitative description of the affinity of BSP for LDL and provides significant insights into the nature of the interaction between these two species.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

BSP1 was isolated as described previously [13, 17]. Egg yolk LDL was prepared as previously [16]. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) was from Sigma (St-Louis, MO). All other chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

### 2.2. ITC experiments

BSP1 was dissolved in Tris-HCl buffer (10 mM), pH 7.4. LDLs were diluted in the same buffer. The pH of the solutions was measured and re-adjusted if necessary with 0.1 N NaOH solution. BSP1 solution was filtered through a porous membrane of 0.2  $\mu\text{m}$ . LDL solution was not filtered, in order not to affect their fragile structure. ITC experiments were performed at 37 °C on a MicroCal VP-ITC calorimeter (MicroCal inc., Northhampton, MA). Samples were degassed before ITC experiment, except for LDL. The injector-stirrer syringe was loaded with BSP1 solution (3.2 mg/ml). The reaction cell ( $V=1.4527$  ml) was filled with LDL solution (0.1 mg/ml). The run consisted of 18 aliquots of 10  $\mu\text{l}$  injected in 12 s with a delay of 500 s between successive injections, under constant stirring (300 RPM). The dilution of BSP1 (occurring upon injection in the cell) and of LDL (by the injected buffer volume) led to small contributions (endothermic and exothermic, respectively) that were subtracted from the enthalpies measured during the titration. For each run, the initial injection was 0.5  $\mu\text{l}$  injected in 1.5 s and the associated data point was discarded from the titration as no peak was typically observed [18]. Data

were analyzed using the Origin software (MicroCal, version 5.0). The reported values and the standard deviation are obtained from triplicates.



### 3. Results and discussion

The isothermal titration of LDL (0.1 mg/ml) with BSP1 (3.2 mg/ml) was performed at 37 °C (Fig. 1). BSP1 was used in this study because it is the major protein (~80%) from the BSP protein family [19]. The interaction between BSP1 and LDL is exothermic (Fig. 1, top panel) as indicated by the negative peaks of the titration. The area of the peaks gradually decreases during the titration, indicating that the binding of BSP1 progressively saturates the LDL. At the end of the titration, the peaks display a constant area that essentially corresponds to the dilution enthalpy of the injected BSP1 solution in the cell filled with BSP1-saturated LDL suspension. The areas of the peaks associated with the BSP1 injections were determined and, for each titration, the enthalpy variations ( $\Delta H$ ) as a function of the evolution of the BSP1 to LDL ratio in the cell were obtained (Fig. 1, bottom panel).

Despite the complexity of the investigated system, the titration curves could be analysed with a standard Scatchard binding model (Table I). This model assumes that the LDL particles provide  $n$  independent and equivalent binding sites to BSP1 and these sites are characterized by an affinity constant,  $K_a$ . The molar enthalpy of association of BSP to LDL particles ( $\Delta H_a$ ) is considered to be constant during the titration. This model was previously used to successfully describe the association of BSP1 with lipid model membranes [20, 21]. The data were analyzed considering LDL as binding units with an average molecular weight estimated to 760 kDa [16]. The calorimetric titrations were fitted using  $\Delta H_a$ ,  $n$ , and  $K_a$  as adjustable parameters. The results indicate a strong association between BSP1 and LDL particles, characterized by a  $K_a$  of  $3.4 \pm 0.4 \mu\text{M}^{-1}$ . This finding is consistent with previous studies of the BSP-LDL complex characterized by

gel filtration, electrophoresis and ultracentrifugation suggesting qualitatively a high affinity binding between BSP proteins and LDL [16]. The  $\Delta H_a$  was  $-106 \pm 7$  kJ/mol. The molar free energy of binding ( $\Delta G_a$ ) and the molar change in entropy ( $\Delta S_a$ ) was calculated using:

$$\Delta G_a = -RT \ln K_a \quad (1)$$

$$\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a \quad (2)$$

where  $R$  is the gas constant and  $T$  is the temperature in Kelvin degrees.  $\Delta G_a$ , and  $\Delta S_a$  were estimated to  $-38.8 \pm 0.3$  kJ/mol and  $-217 \pm 23$  J/mol K, respectively. These values indicate that the association is enthalpy-driven and relatively strong interactions between LDL and BSP1 should exist.

The fitted stoichiometric parameter,  $n$ , was  $104 \pm 5$ , indicating that one LDL particle could bind on average, 104 BSP1. It was previously demonstrated that, at saturation, approximately 243 moles of BSP proteins could bind to a mole of LDL particles (actually LDL-II, which is the most abundant type in egg yolk) [16]; this value is in the same order of magnitude as that reported here, inferred from a thermodynamics method. The interaction between BSP proteins and LDL particles in the previous [16] and the present studies were examined under the same conditions (buffer, pH and salts) except that room temperature was used in the case of the gel filtration experiment whereas the temperature was set to 37 °C in the present study. It was previously estimated, upon its association to lipid membranes, that BSP1 defines an average cross-sectional area of  $\sim 6.75$  nm<sup>2</sup> [22]. If one assumes that LDL particles have a spherical shape with an average diameter of 37.5 nm [23], their average surface should correspond to 4418 nm<sup>2</sup>. Therefore,

it is estimated that about 16% of the LDL surface is covered with BSP1, assuming a coating with monomeric BSP1. At this point, however, the quaternary structure of LDL-bound BSP1 is not identified. Despite the fact that BSP1 appears to exist under a polydispersed/aggregated form in solution [24], it was proposed that BSP1 oligomers would dissociate upon their binding to membranes and monomers and/or dimers would be formed [21, 24]. The LDL coverage estimated above is based on the formation of BSP1 monomeric coating and should, therefore, be considered as a maximum value.

In the present model, the definition of binding sites is indeed not precisely defined because of the complex structure and composition of LDL particles. LDL are formed of approximately 11% (w/w) proteins and 89% (w/w) lipids [25]. They are surrounded by a monolayer of phospholipids and cholesterol and these lipidic species correspond to 26, and 4% (w/w) of total lipids, respectively. The major phospholipid of LDL is phosphatidylcholine (PC) with a weight proportion of ~73% [25]. Considering that the mass of a LDL particle was estimated to 760 kg/mol [16], and that the average molar mass of LDL PCs is estimated to 770 g/mol, it is calculated that 104 BSP1 moles bind 170 moles of PC, assuming that all the BSP molecules bind exclusively to PC moieties. Therefore, it is inferred that there are 1.6 PC per bound BSP1. This result is interesting because previous equilibrium dialysis studies indicated that one BSP1 would bind 1.8 choline molecules [26]. Moreover, the crystal structure of BSP1 and phosphorylcholine complex was obtained and four phosphorylcholine groups were found to bind to a BSP1 dimers [27]. Therefore we could propose that the PC molecules of the LDL monolayer act as binding anchors for the BSP1 proteins. Proteins from the LDL surface must also be a part of a binding site.

#### 4. Conclusion

The use of ITC to study the thermodynamics of the interaction between egg yolk LDL and BSP1 protein demonstrated the high affinity of the BSP proteins for the LDL particles, with a  $K_a$  of  $3.4 \mu\text{M}^{-1}$ . It was estimated that 104 molecules of BSP1 could bind one LDL particle. This would correspond to 1.6 PC per bound BSP1. The strong interaction between LDL particles and BSP1, which is now quantified, could be the key to the sperm protection by egg yolk extender.

## **5. Acknowledgement**

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for the financial support.

**Table 1.** Thermodynamic parameters for association of BSP1 with LDL at 37 °C.

System	$K_a$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$\Delta H_a$ (kJ/mol)	$\Delta G_a$ (kJ/mol)	$\Delta S_a$ (J/mol/K)	n BSP1/ LDL
LDL	$3.4 \pm 0.4$	$-106 \pm 7$	$-38.8 \pm 0.3$	$-217 \pm 23$	$104 \pm 5$

**Figure legend**

**Fig 1.** Isothermal titration calorimetry of 0.1 mg/ml LDL suspensions with 3.2 mg/ml BSP1 at 37 °C. Top panel: heat flow changes resulting from the injections. Bottom panel: Isothermal titration. The squares represent the data points derived from the injections whereas the curve represents the best fit obtained with Scatchard model, using  $\Delta H_a$ ,  $n$ , and  $K_a$  as adjustable parameters.

## References

- [1] P. Phillips, A.L. Lardy, A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen, *J. Dairy Sci.* 23 (1940) 399-404.
- [2] H.O. Dunn, R.W. Bratton, W.J. Collins, Fertility and motility of bovine spermatozoa in buffered whole egg extenders, *J. Dairy Sci.* 33 (1950) 434-437.
- [3] P. Shannon, B. Curson, Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures, *N. Z. J. Agric. Res.* 26 (1983) 187-189.
- [4] J.F. Lasley, D.T. Mayer, A variable physiological factor necessary for the survival of bull spermatozoa, *J. Ani. Sci.* 3 (1944) 129-135.
- [5] R. Foote, R. Bratton, The fertility of bovine semen cooled with and without the addition of citrate-sulfanilamide-yolk extender, *J. Dairy Sci.* 32 (1949) 856-861.
- [6] P.F. Watson, The protection of ram and bull spermatozoa by low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep freezing, *J. Therm. Biol.* 1 (1976) 137-141.
- [7] F.E. De Leeuw, A.M. De Leeuw, J.H. Den Daas, B. Colenbrander, A.J. Verkleij, Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing, *Cryobiology* 30 (1993) 32-44.
- [8] M.M. Pace, E.F. Graham, Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing, *J. Anim. Sci.* 39 (1974) 1144-1149.
- [9] J.A. Foulkes, The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa, *J. Reprod. Fertil.* 49 (1977) 277-284.

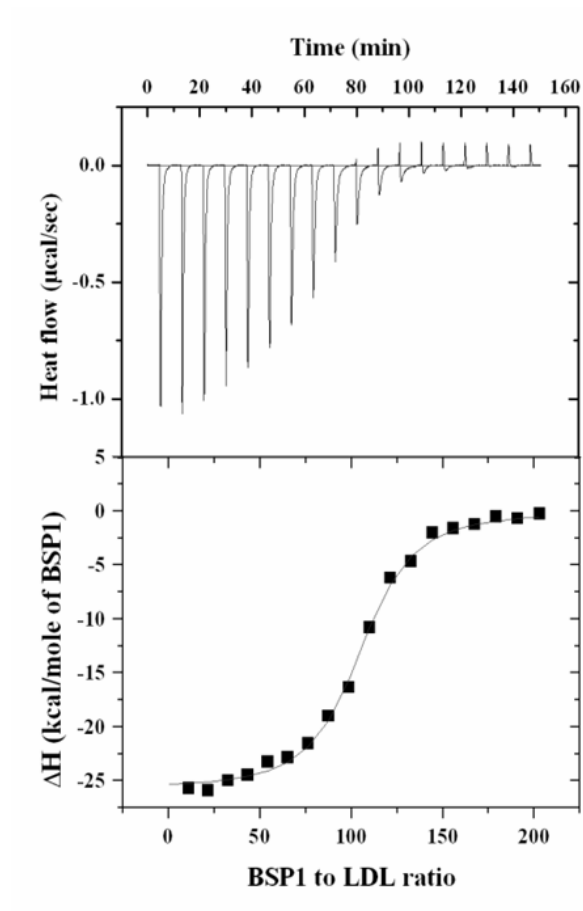


- [10] A. Bergeron, P. Manjunath, New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk, *Mol. Reprod. Dev.* 73 (2006) 1338-1344.
- [11] P. Manjunath, J. Lefebvre, P.S. Jois, J. Fan, M.W. Wright, New Nomenclature for Mammalian BSP Genes, *Biol. Reprod.* 80 (2009) 394-397.
- [12] P. Manjunath, L. Baillargeon, Y.L. Marcel, N.G. Seidah, M. Chrétien, A. Chapdelaine, Diversity of novel proteins in gonadal fluids. in: M. Chrétien, K.W. McKerns, (Eds.), *Molecular biology of brain and endocrine peptidergic systems*, Plenum Press, New-York, 1988, pp. 259-273.
- [13] P. Manjunath, M.R. Sairam, Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma, *Biochem. J.* 241 (1987) 685-692.
- [14] P. Manjunath, I. Thérien, Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation, *J. Reprod. Immunol.* 53 (2002) 109-119.
- [15] A. Bergeron, M.H. Crête, Y. Brindle, P. Manjunath, Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane, *Biol. Reprod.* 70 (2004) 708-717.
- [16] P. Manjunath, V. Nauc, A. Bergeron, M. Ménard, Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk, *Biol. Reprod.* 67 (2002) 1250-1258.

- [17] P. Manjunath, M.R. Sairam, J. Uma, Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography, *Biosci. Rep.* 7 (1987) 231-238.
- [18] M.M. Pierce, C.S. Raman, B.T. Nall, Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions, *Methods* 19 (1999) 213-221.
- [19] V. Nauc, P. Manjunath, Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa), and their quantification in seminal plasma and sperm, *Biol. Reprod.* 63 (2000) 1058-1066.
- [20] C.J. Thomas, V. Anbazhagan, M. Ramakrishnan, N. Sultan, I. Surolia, M.J. Swamy, Mechanism of membrane binding by the bovine seminal plasma protein, PDC-109: A surface plasmon resonance study, *Biophys. J.* 84 (2003) 3037-3044.
- [21] D. Lassiseraye, L. Courtemanche, A. Bergeron, P. Manjunath, M. Lafleur, Binding of bovine seminal plasma protein BSP-A1/-A2 to model membranes: lipid specificity and effect of the temperature, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 502-513.
- [22] M. Ramakrishnan, V. Anbazhagan, T.V. Pratap, D. Marsh, M.J. Swamy, Membrane insertion and lipid-protein interactions of bovine seminal plasma protein PDC-109 investigated by spin-label electron spin resonance spectroscopy, *Biophys. J.* 81 (2001) 2215-2225.
- [23] M. Anton, V. Martinet, M. Dalgalarrodo, V. Beaumal, E. David-Briand, H. Rabesona, Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk, *Food Chem.* 83 (2003) 175-183.

- [24] M. Gasset, J.L. Saiz, J. Laynez, L. Sanz, M. Gentzel, E. Topper-Petersen, J.J. Calvete, Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes, *Eur. J. Biochem.* 250 (1997) 735-744.
- [25] W.H. Cook, W.G. Martin, Egg lipoproteins. in: E. Tria, A.M. Scanu, (Eds.), *Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems*, Academic Press, New York, 1969, pp. 579-615.
- [26] L. Desnoyers, P. Manjunath, Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices, *Arch. Biochem. Biophys.* 305 (1993) 341-349.
- [27] D.A. Wah, C. Fernandez-Tornero, L. Sanz, A. Romero, J.J. Calvete, Sperm Coating Mechanism from the 1.8 Å Crystal Structure of PDC-109-Phosphorylcholine Complex, *Structure* 10 (2002) 505-514.

Figure 1



### **3. Discussion**

La conservation des spermatozoïdes de mammifères est une technique utilisée depuis plus d'une soixantaine d'années. Grâce à cette technique, les spermatozoïdes peuvent être conservés sur de courtes périodes de temps à l'état liquide à des températures d'environ 5 °C ou entre 15-20 °C ou ils peuvent être conservés sur de longues périodes de temps lorsqu'ils sont congelés. La conservation requiert que les spermatozoïdes soient dilués dans un milieu liquide qui est appelé « diluant ».

La composition des diluants utilisés pour conserver les spermatozoïdes des différentes espèces de mammifères est variable et plusieurs types de diluants peuvent être utilisés au sein d'une même espèce. Les constituants de base utilisés dans la composition des diluants sont semblables pour tous les diluants (tampon, sel, agent protecteur, agent cryoprotecteur, antibiotique). Malgré le nombre impressionnant d'études ayant essayé d'améliorer les diluants déjà existants, aucune n'est parvenue à trouver le diluant « idéal », i.e. un diluant qui permettrait de conserver un taux de spermatozoïdes vivants, motiles et féconds plus important que ceux obtenus avec les diluants qui sont utilisés de façon courante (autour de 50% spermatozoïdes vivants dont une partie qui ne sont pas féconds). Ces études tentent de trouver un ou des nouveaux constituants qui pourraient améliorer l'efficacité des diluants, mais elles n'essaient pas de comprendre comment les diluants protègent les spermatozoïdes.

Une meilleure compréhension du mécanisme d'action des agents protecteurs dans les diluants permettrait de cibler d'autres composants spécifiques qui pourraient être ajoutés aux diluants déjà existants ou encore de créer des composants qui permettraient une meilleure protection des spermatozoïdes. De plus, ceci permettrait de modifier de

façon plus efficace les diluants pour qu'ils soient adaptés à la conservation des spermatozoïdes de différentes espèces de mammifères.

Le lait et le jaune d'œuf sont les agents protecteurs qui sont les plus efficaces pour protéger les spermatozoïdes pendant la conservation et ils sont utilisés fréquemment dans les diluants. Certaines études ont proposé des hypothèses quant à la fonction du jaune d'œuf dans la protection des spermatozoïdes et notre laboratoire s'est intéressé dernièrement à comprendre comment le jaune d'œuf protégeait les spermatozoïdes de mammifères durant la conservation (voir section 1.6.3.2.1.). Il est connu que les micelles de caséines seraient les constituants du lait qui protègent les spermatozoïdes pendant leur conservation (section 1.6.3.2.2.), toutefois le mécanisme de protection des spermatozoïdes par le lait n'est pas compris.

Cette thèse avait pour but d'étudier comment le lait peut protéger les spermatozoïdes de mammifères durant leur conservation.

### **3.1. Interaction des protéines BSP avec les protéines du lait et stabilité du complexe protéique**

Plusieurs études démontrent que les micelles de caséines semblent protéger les spermatozoïdes durant la conservation [186][187][188][184][189][190], mais il n'est pas connu par quel mécanisme ces protéines ont un effet protecteur. Il a été récemment montré que la présence de caséines dans un diluant diminue la quantité de protéines BSP qui se lie à la membrane des spermatozoïdes bovins et prévient l'efflux des lipides de la membrane plasmique [190].

Nous avons démontré que les protéines BSP interagissent avec les protéines du lait. Premièrement, en utilisant la chromatographie de filtration sur gel, nous avons démontré que les protéines BSP se lient aux complexes de protéines du lait de haut poids moléculaire (milk F1) composés majoritairement d' $\alpha$ -lactalbumine, de  $\beta$ -lactoglobuline et de caséine  $\kappa$ , ainsi que les complexes de plus faible poids moléculaire (milk F2) composés majoritairement de caséines et des autres protéines retrouvées en faible concentration dans le lait (article 2.1.). La protéine BSP1 a une affinité plus prononcée pour les protéines du lait que BSP3 et BSP5. Des études d'ITC nous ont permis de déterminer plus spécifiquement quelles protéines du lait BSP1, la protéine majeure de la famille des protéines BSP, pouvait se lier. La protéine BSP1 interagit avec les micelles de caséines isolées du lait (article 2.1.). De plus, elle se lie aux deux principales protéines du sérum du lait, soit l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline. La majorité des protéines du lait (~95% (m/m) des protéines totales) possède donc la capacité de lier les protéines BSP.

L'interaction de BSP1 avec les caséines et l' $\alpha$ -lactalbumine est caractérisée par une constante d'affinité de  $3.5 \pm 0.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  et  $2.4 \pm 0.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , respectivement (article 2.1.). Les paramètres de l'interaction entre BSP1 et la  $\beta$ -lactoglobuline ne pouvaient pas être déterminés par ITC à cause de la complexité de l'interaction. Le paramètre stoechiométrique est différent entre l'interaction BSP1-caséine et BSP1- $\alpha$ -lactalbumine (4,5 et 0,8, respectivement; article 2.1.) et indique que la capacité de liaison des caséines est plus grande que celle de l' $\alpha$ -lactalbumine. Il n'est pas connu si les autres protéines du sérum qui sont retrouvées en plus faible concentration dans le lait, telles que la lactoferrine, l'albumine, les immunoglobulines et les autres protéines ou enzymes retrouvées sous forme de trace, peuvent également se lier aux protéines BSP. De plus, la

partie de la protéine BSP1 qui est impliquée dans l'interaction avec les protéines du lait est inconnue.

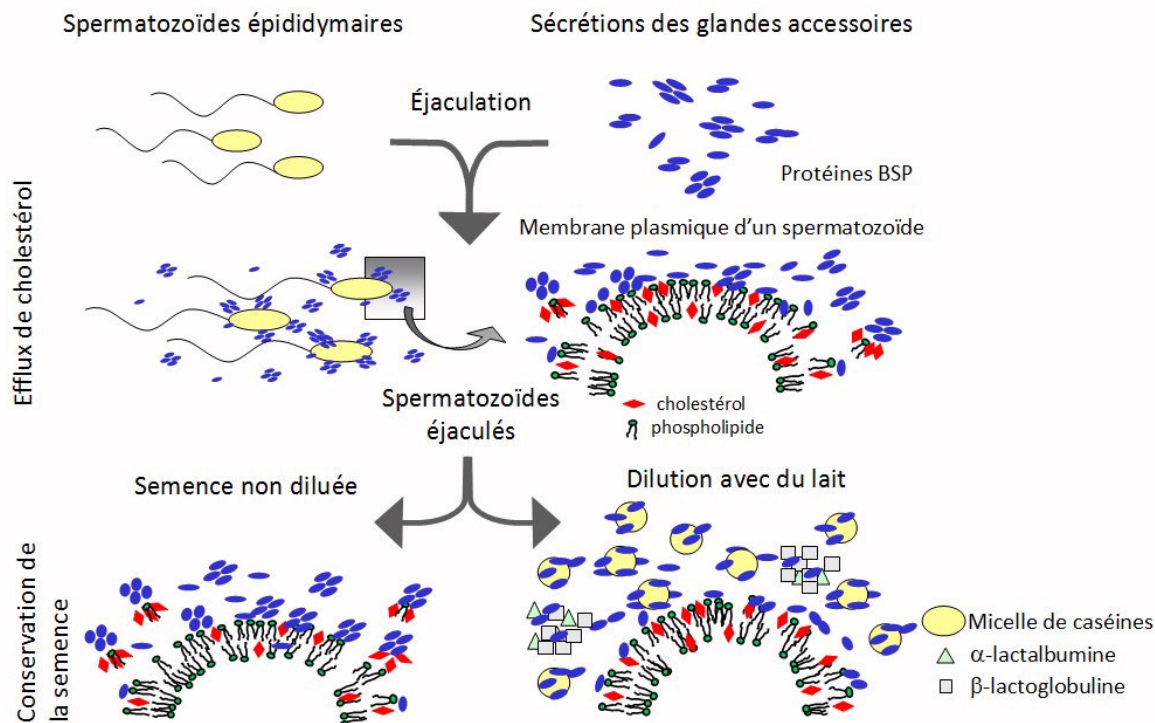
Les complexes protéiques formés entre les protéines BSP et les différentes protéines du lait sont stables après la congélation des spermatozoïdes bovins (Lusignan MF et Manjunath P, résultats non publiés). Le lait protège donc les spermatozoïdes durant tout le processus de cryoconservation (de la dilution jusqu'après le dégel).

### **3.2. Nouveau mécanisme de protection des spermatozoïdes de taureau par le lait**

Les résultats présentés dans cette thèse nous ont permis de proposer un nouveau mécanisme de protection des spermatozoïdes de taureau par le lait. Ce mécanisme permet d'expliquer comment les caséines protègent les spermatozoïdes bovins et de plus, nous montrons pour la première fois que d'autres protéines du lait seraient aussi impliquées dans la protection des spermatozoïdes. L'élément clef de cette protection est l'interaction entre les protéines du lait et les protéines BSP.

Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes sont mélangés avec les sécrétions des glandes accessoires du tractus génital mâle, ce qui les met en contact avec les protéines BSP (Figure 6). Les protéines BSP interagissent avec la membrane plasmique des spermatozoïdes et induisent un efflux de lipides de la membrane. Toutefois, si les spermatozoïdes sont dilués avec du lait, l'excès de protéines BSP est séquestré par les différentes protéines du lait. Cette interaction protéine-protéine prévient une extraction continue des lipides de la membrane des spermatozoïdes causée par les protéines BSP, ce processus assure une meilleure conservation des spermatozoïdes.





**Figure 6.** Nouveau mécanisme proposé pour la protection des spermatozoïdes de taureaux par le lait (modèle adapté de [78]).

Nos résultats suggèrent que les principales protéines du sérum ( $\alpha$ -lactalbumine et  $\beta$ -lactoglobuline) sont aussi impliquées dans la protection des spermatozoïdes, mais leur effet serait beaucoup moins important que celui des micelles de caséines. Ceci pourrait être expliqué par deux phénomènes. Premièrement, les protéines du sérum sont retrouvées en plus faible concentration dans le lait que les caséines et deuxièmement, dans le cas de l' $\alpha$ -lactalbumine, sa capacité à se lier aux protéines BSP est plus faible que celle des caséines, tel que démontré par ITC (article 2.1.). Ceci expliquerait pourquoi des résultats contradictoires sont obtenus dans différentes études quant à l'effet protecteur des protéines du sérum. L'effet protecteur des protéines du sérum n'est pas observé dans les études où des concentrations de protéines semblables à celles retrouvées dans le lait sont

utilisées dans les diluants. Par exemple, le perméat de lait (lait exempt de caséines) [190] ou l' $\alpha$ -lactalbumine seule [184] ne sont pas suffisantes pour protéger les spermatozoïdes de taureau et d'étalon, respectivement. Lorsque les spermatozoïdes de taureau sont dilués dans le perméat de lait, la motilité et la viabilité des spermatozoïdes sont diminuées d'environ 20% par rapport à celles des spermatozoïdes dilués dans le lait écrémé ou dans le perméat où des caséines ont été ajoutées. De plus, il y a environ trois fois plus de lipides de la membrane plasmique qui sont perdus lorsque les spermatozoïdes de taureau sont dilués dans le perméat de lait par rapport à ceux dilués dans le lait écrémé [190]. Toutefois, il semble que l'effet protecteur des protéines du sérum est observé avec des diluants qui contiennent une concentration de protéines du sérum plus élevée que celle du lait. Par exemple, la  $\beta$ -lactoglobuline à une concentration optimale de 45 g/L peut protéger des spermatozoïdes d'étalon [184]. Il serait intéressant de vérifier si un diluant contenant une concentration élevée de protéines du sérum pourrait séquestrer une quantité de protéines BSP équivalente à celle des caséines lors de la conservation des spermatozoïdes bovins à 4°C [190].

### **3.3. Le nouveau mécanisme de protections par le lait est-il semblable chez les autres mammifères?**

Nous avons montré que les protéines homologues aux protéines BSP bovines retrouvées dans le plasma séminal de porc, d'étalon et de bélier interagissent avec les protéines du lait (article 2.2.). La technique utilisée pour l'étude de l'interaction entre les protéines BSP homologues et les protéines du lait n'a pas permis de montrer si les protéines BSP d'étalon se lient à la fraction de lait contenant les caséines. Une technique alternative, telle que l'ITC, pourrait être utilisée afin de montrer l'interaction des

protéines BSP d'étalon avec les différentes protéines du lait. L'affinité des protéines BSP pour les protéines du lait semble toutefois varier, ce qui suggère des différences spécifiques pour chaque espèce. Chez le bélier, les protéines BSP de 22 et 24 kDa ne semblent pas avoir une forte affinité pour les protéines du lait, puisque la majorité ne se lie pas aux protéines du lait (article 2.2.). Il a été précédemment montré que les protéines BSP de 22 et 24 kDa ont tendance à former ensemble des agrégats [88]. Il est possible que l'agrégation des protéines BSP masque leurs sites de liaison pour les protéines du lait et que seule la forme monomère puisse se lier aux protéines du lait. Tel que mentionné dans le manuscrit de la section 2.2., le lait n'est habituellement pas utilisé pour diluer des spermatozoïdes de porc, mais ce sont plutôt des diluants contenant du jaune d'œuf qui sont utilisés (revu dans [111]). Nous avons tout de même vérifié s'il y avait une interaction entre les protéines de lait et la protéine BSP1 porcine pour deux raisons : 1) l'homologie de la séquence entre la protéine BSP1 de porc et les protéines BSP bovines est grande (36-65%; revu dans [87]) ce qui suggérait des propriétés de liaison semblables aux BSP bovines, 2) nous avons du plasma séminal de porc au laboratoire, ainsi que de la protéine BSP1 porcine purifiée. Par filtration sur gel, nous avons aussi montré que la protéine BSP1 porcine purifiée interagissait avec les protéines du lait (Lusignan MF et Manjunath P, résultats non publiés).

Nos résultats suggèrent donc que lorsque les spermatozoïdes d'étalon et de bélier sont dilués dans du lait, les protéines du lait peuvent séquestrer les protéines BSP, ce qui pourrait protéger les spermatozoïdes durant leur conservation chez ces espèces. De plus, les protéines BSP ont été retrouvées dans le plasma séminal ou dans les sécrétions des vésicules séminales de plusieurs autres mammifères (revu dans [53]), ce qui suggère que

les protéines du lait pourraient également séquestrer les protéines BSP chez les mammifères autres que ceux de la présente étude.

Toutefois, deux éléments devraient être étudiés plus en détail afin d'avoir une meilleure compréhension du mécanisme de protection des spermatozoïdes de mammifères par le lait. Premièrement, l'effet qu'ont les protéines BSP homologues sur la membrane des spermatozoïdes de bélier et d'étalon durant la conservation n'a pas été étudié extensivement. Deuxièmement, la concentration des protéines BSP dans le plasma séminal chez ces espèces n'est toutefois pas aussi élevée que dans le plasma séminal de taureau (Table II). Il est donc possible que la séquestration des protéines BSP par les protéines du lait ne soit pas le seul événement permettant la protection des spermatozoïdes par le lait chez le bélier et l'étalon.

En ce qui concerne l'effet des protéines BSP homologues sur la membrane des spermatozoïdes, des études montrent que ces protéines homologues semblent partager certaines propriétés avec les protéines BSP bovines. Contrairement aux protéines BSP bovines qui se lient aux spermatozoïdes à l'éjaculation, la protéine BSP1 d'étalon est déjà liée aux spermatozoïdes dans les épидидymes [82]. Des études faites avec BSP1 d'étalon montrent que la protéine peut interagir avec des vésicules de lipides et qu'elle a une affinité plus prononcée pour les PC [82], tout comme les protéines BSP bovines. Toutefois, la protéine BSP1 équine n'a pas la même influence sur les membranes synthétiques que la protéine BSP1 bovine, car elle entraîne une rigidification plus faible des lipides par rapport à la protéine BSP1 bovine. De plus, contrairement à la protéine BSP1 bovine, la protéine BSP1 équine ne peut pas extraire des lipides des globules rouges du sang [82]. Ces résultats suggèrent que malgré un degré de similarité élevé entre les

protéines BSP des différents mammifères, il semble y avoir des différences quant à leur effet sur les membranes. Il reste à déterminer si cet effet est aussi néfaste pour les spermatozoïdes lors de la conservation que celui engendré par les protéines BSP bovines.

Contrairement à l'espèce bovine où les protéines BSP sont les protéines majeures du plasma séminal, la famille principale de protéines retrouvée dans le plasma séminal de bélier et de porc est la famille des spermadhésines (Table II) [230][88]. Le plasma séminal d'étalon contient une spermadhésine, HSP-7, mais sa concentration dans le plasma séminal n'est pas clairement déterminée [231][78]. Deux spermadhésines ont aussi été identifiées dans le plasma séminal de taureau, aSFP [42] et Z13 [232]. Le plasma séminal de porc contient plusieurs membres de la famille des spermadhésines : AWN-1, AWN-2, AQN-1, AQN-3, PSP-I et PSP-II (revu dans [230]).

Les spermadhésines sont caractérisées par un domaine CUB, qui est nommé d'après la première lettre des protéines auquel ce domaine a été identifié (Clr, Uegf et Bmp1) [233]. Ces protéines peuvent se lier à la gélatine, à l'héparine et aux sucres, ainsi qu'à la membrane plasmique des spermatozoïdes lors de l'éjaculation [234]. Les spermadhésines auraient plusieurs rôles, tels que d'être impliquées dans la réponse immunitaire, dans la formation du réservoir de spermatozoïdes et dans la reconnaissance entre le spermatozoïde et la zone pellucide de l'ovocyte (revu dans [9]). Il n'est pas connu si les spermadhésines sont néfastes pour la conservation des spermatozoïdes. Il a été récemment montré que la protéine majeure du plasma séminal de bélier, soit la spermadhésine de 15,5 kDa, ne se lie pas aux LDL isolés du jaune d'œuf [88], ce qui suggère que les LDL du jaune d'œuf ne protègent pas les spermatozoïdes en neutralisant

l'effet des spermadhésines. Il n'est toutefois pas connu si les spermadhésines ont une affinité pour les protéines du lait.

**Table II.** Concentration moyenne des protéines BSP et des spermadhésines retrouvées dans le plasma séminal de différents mammifères [235][236][84][232][78].

Espèce	Protéines BSP		Spermadhésines		Protéines BSP / <i>Spermadhésines</i> (mg/éjaculat)
	(mg/ml)	% des protéines totales	(mg/ml)	% des protéines totales	
Bélier	15	30	22,5	45	<b>20,3 / 30,4</b>
Étalon	2	20	ND	ND	<b>330 / ND</b>
Porc	0,32	1,1	9,8	32,6	<b>104 / 3185</b>
Taureau	35,8	65	3,5	6,4	<b>234,3 / 18</b>

Une meilleure connaissance du rôle de chaque protéine du plasma séminal est requise afin de déterminer si d'autres facteurs du plasma séminal de porc, de bélier et d'étalon sont néfastes pour les spermatozoïdes durant leur conservation.

#### **3.4. Comparaison entre le mécanisme de protection des spermatozoïdes par le lait et par le jaune d'œuf**

Le nouveau mécanisme de protection des spermatozoïdes bovins par le lait que nous avons proposé à la section 3.2. présente des similitudes et des différences avec celui proposé par notre laboratoire pour les diluants contenant du jaune d'œuf [78].

Le point commun majeur entre les deux mécanismes de protection des spermatozoïdes est que l'agent protecteur (les protéines du lait ou encore les LDL du jaune d'œuf) séquestre l'excès des protéines BSP du plasma séminal, qui sont néfastes *in vitro* dans un contexte de conservation des spermatozoïdes. Une autre point commun entre les deux mécanismes est que l'interaction des protéines BSP avec les protéines du lait ou les LDL du jaune d'œuf est stable durant toute la conservation des spermatozoïdes, soit avant et après la congélation, indiquant une efficacité continue de l'agent protecteur. Le lait et le jaune d'œuf sont parmi les agents protecteurs les plus utilisés dans les diluants pour conserver la semence de mammifères et leur efficacité est possiblement due à ces caractéristiques communes.

Une différence majeure entre le mécanisme de protection des spermatozoïdes par le lait et le jaune d'œuf est que dans le cas du lait, la protection est fournie par une interaction protéine-protéine, tandis que pour le jaune d'œuf, c'est une interaction lipoprotéine-protéine qui protège les spermatozoïdes. L'interaction des protéines BSP avec les différentes protéines du lait est plus faible que celle avec les LDL du jaune d'œuf. En effet, nous avons montré que l'interaction entre BSP1 et les LDL isolés du jaune d'œuf était caractérisée par une constante d'affinité de  $3,4 \pm 0,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (article 2.3.) qui est d'un ordre de grandeur plus important que les constantes d'affinités obtenues dans le cadre de l'interaction de BSP1 avec les protéines du lait (article 2.1.). Nous avons montré qu'une particule de LDL peut lier 104 molécules de BSP1 (article 2.3.). La différence d'ordre de grandeur de la constante d'affinité qui caractérise l'interaction des protéines BSP avec les protéines du lait et l'interaction des protéines BSP avec LDL du jaune d'œuf, ainsi que la capacité de liaison des protéines du lait (section 3.2.), peut

expliquer pourquoi des volumes différents de lait et de jaune d'œuf sont utilisés dans les diluants des spermatozoïdes. Habituellement, les spermatozoïdes sont directement dilués dans du lait afin d'être conservés, tandis qu'un diluant contenant du jaune d'œuf contient d'environ 20% (v/v) de jaune d'œuf. Par exemple, si un ml de semence de taureau est diluée à un ratio semence : diluant de 1 : 20, il y aura ~570 mg de protéines de lait (concentration moyenne des protéines totales du lait de ~30 mg/ml) dans le lait, tandis qu'il y aura ~237,5 mg de LDL (concentration moyenne de LDL de 12,5 mg/ml dans 20% de jaune d'œuf [60]) dans un diluant contenant du jaune d'œuf. Il faut donc une quantité protéique qui est un peu plus du double de celle des LDL du jaune d'œuf pour obtenir une protection semblable des spermatozoïdes par du lait.

La différence d'affinité des protéines BSP avec les protéines du lait et les LDL du jaune d'œuf peut être bénéfique pour la protection des spermatozoïdes de certaines espèces. Par exemple, le lait est fréquemment utilisé pour diluer les spermatozoïdes d'étalon et de bélier. Le plasma séminal de ces espèces contient moins de protéines BSP que chez le taureau (Table II). Étant donné que l'interaction entre les protéines BSP et les protéines du lait est moins forte que celle avec les LDL du jaune d'œuf, il y a peut-être moins de protéines BSP qui sont séquestrées lorsque du lait est utilisé comme diluant, par rapport à un diluant contenant du jaune d'œuf. Le lait permettrait de garder disponible une quantité suffisante de protéine BSP pour conserver le pouvoir fécondant des spermatozoïdes, tandis qu'un diluant contenant 20% de jaune d'œuf séquestrerait trop de protéines BSP, ce qui serait néfaste pour le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Alternativement, un diluant contenant du jaune d'œuf pourrait être utilisé à la condition d'adapter le pourcentage de jaune d'œuf à l'espèce dont on veut diluer la semence.



### **3.5. Amélioration des protocoles de conservation des spermatozoïdes de mammifères dilués dans le lait**

Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent que certaines modifications devraient être apportées aux protocoles utilisés pour conserver les spermatozoïdes de mammifères dans le but d'obtenir une protection optimale des spermatozoïdes pour chaque espèce.

La semence de mammifère est souvent diluée pour obtenir un nombre de spermatozoïde fixe. Par exemple, dans les centres d'insémination artificielle, la semence de taureau est diluée pour avoir une concentration finale de  $80 \times 10^6$  spermatozoïdes/ml afin de préparer des paillettes contenant  $20 \times 10^6$  spermatozoïdes/paillette. Si deux éjaculats ont le même volume et qu'un est très concentré en spermatozoïdes, le plus concentré sera dilué avec un rapport de dilution plus élevé que celui ayant une faible concentration de spermatozoïdes. Il n'y aura donc pas assez d'agent protecteur pour séquestrer l'excès de protéines BSP dans l'échantillon le moins dilué. Un moyen de régler ce problème serait de diluer la semence selon son volume afin d'avoir une concentration suffisante d'agent protecteur pour protéger les spermatozoïdes des protéines BSP.

Une autre possibilité pour améliorer l'efficacité des diluants serait de centrifuger la semence dès qu'elle est récoltée pour empêcher l'effet néfaste rapide que les protéines BSP ont sur les spermatozoïdes. Le culot de spermatozoïdes serait ensuite dilué avec le diluant pour obtenir la concentration voulue de spermatozoïdes et un volume fixe de plasma séminal serait rajouté au diluant afin de préserver le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. La semence de certains mammifères est centrifugée dès la récolte, principalement celle d'animaux produisant un éjaculat ayant un volume élevé (Table I).

Par exemple, la semence d'étalon est centrifugée avant d'être cryoconservée [109]. Toutefois, un certain volume de plasma séminal semble requis pour préserver les fonctions des spermatozoïdes. Par exemple, si le plasma séminal d'étalon est complètement enlevé, la motilité des spermatozoïdes est affectée [105]. Un désavantage de la centrifugation est qu'elle peut être néfaste pour les spermatozoïdes [237].

### **3.6. Création d'un diluant exempt de produit d'origine animale**

L'industrie de l'insémination artificielle souhaite depuis quelques années créer des diluants qui ne contiendraient pas de produits d'origine animale. Alors que le lait est un agent protecteur efficace, sa composition n'est pas uniforme, ce qui peut réduire son efficacité lors de la conservation des spermatozoïdes. De plus, il y a une crainte de transmission de maladies entre les espèces lorsque du lait est utilisé comme diluant. Afin de remplacer le lait, il faut d'abord comprendre comment il permet de protéger les spermatozoïdes durant leur conservation.

Les résultats obtenus dans cette thèse montrent clairement que l'agent protecteur du lait, les micelles de caséines, protège les spermatozoïdes en séquestrant les protéines BSP. Un diluant ne contenant pas de produits d'origine animale devrait contenir un produit d'origine végétale ou synthétique qui a la propriété de se lier aux protéines BSP. Cette liaison avec les protéines BSP doit être rapide et spécifique afin d'empêcher les protéines BSP d'avoir un effet néfaste sur la membrane plasmique des spermatozoïdes. Le nouvel agent protecteur doit avoir une capacité élevée à se lier aux protéines BSP afin que l'excès de protéines BSP soit séquestré. De plus, le complexe formé entre l'agent protecteur et les protéines BSP doit être stable durant et après la congélation afin de permettre une efficacité du diluant pendant toute la durée de la conservation des

spermatozoïdes. Une autre caractéristique importante pour un nouvel agent protecteur qui n'est pas d'origine animale est qu'il ne doit pas changer l'osmolarité du diluant. Une bonne osmolarité du diluant permet de préserver la viabilité des spermatozoïdes lors de la dilution, car l'eau intracellulaire sort à l'extérieur des spermatozoïdes quand ils sont dilués avec un milieu dont l'osmolarité est trop élevée.

Certains produits synthétiques ou d'origine végétale qui sont présentement disponibles sur le marché peuvent interagir avec les protéines BSP, ce qui en fait des candidats potentiels pour la création d'un nouveau diluant pouvant remplacer le lait. Toutefois, certains possèdent des propriétés indésirables ou encore leur concentration n'est pas adéquate pour protéger aussi efficacement les spermatozoïdes de mammifères que le lait.

Les protéines BSP possèdent une affinité pour certains glucides, tels que le mannose [238] et le fucose [58]. Différents glucides (glucose, fructose, raffinose, etc) sont utilisés comme agents cryoprotecteur dans les diluants [199] : ils permettraient de stabiliser la membrane plasmique des spermatozoïdes et d'améliorer la motilité des spermatozoïdes après la congélation [91][199][200][201]. Il pourrait être intéressant d'ajouter du fucose ou du mannose à un diluant afin de prévenir la liaison des protéines BSP aux membranes des spermatozoïdes. Toutefois, en trop forte concentration, ces sucres pourraient modifier l'osmolarité du diluant. De plus, la stabilité de l'interaction entre les protéines BSP et le fucose ou le mannose n'a pas encore été montrée. Des spermatozoïdes non capacitées ont une plus grande affinité pour le fucose que des spermatozoïdes capacitées [58]. Lors de la cryoconservation, les spermatozoïdes sont modifiés et se comportent comme s'ils avaient été capacitées [100]. Le fucose ne pourrait

donc pas protéger de façon efficace les spermatozoïdes durant toute la conservation, car il aurait une affinité moins importante pour les spermatozoïdes cryocapacités.

Les protéines BSP peuvent se lier au groupement choline des phospholipides [61]. La choline pourrait être utilisée directement dans un diluant afin de séquestrer les protéines BSP. Toutefois, elle est disponible commercialement sous forme de sel et l'ajout d'une quantité suffisante de sel de choline au diluant pour séquestrer l'excès des protéines BSP augmenterait son osmolarité, ce qui serait néfaste pour les spermatozoïdes.

Les diluants commerciaux AndroMed<sup>®</sup> et Bioxcell<sup>®</sup> contiennent des phospholipides d'origine végétale, plus particulièrement des phospholipides portant un groupe choline, ce qui les rend intéressants afin de remplacer le lait comme diluant. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus concernant leur efficacité. Par exemple, Bioxcell<sup>®</sup> est aussi efficace dans la protection des spermatozoïdes de bélier qu'un diluant contenant du jaune d'œuf [225], mais AndroMed<sup>®</sup> et Biociphos<sup>®</sup> ne sont toutefois pas aussi efficaces que le diluant contenant du jaune d'œuf pour protéger les spermatozoïdes de taureaux [170][223]. Les diluants commerciaux ne contiennent possiblement pas une concentration suffisante de phospholipides pour séquestrer l'excès de protéines BSP du plasma séminal de taureau par comparaison avec un diluant contenant du jaune d'œuf. Comme le plasma séminal de bélier contient moins de protéines BSP que le plasma séminal de taureau (Table II), la concentration de phospholipides dans le diluant Bioxcell<sup>®</sup> est peut-être suffisante pour que l'excès de protéines BSP de bélier soit séquestré. Ceci expliquerait pourquoi le diluant Bioxcell<sup>®</sup> est aussi efficace qu'un diluant contenant du jaune d'œuf pour la conservation des spermatozoïdes de bélier.

Il serait intéressant d'utiliser des liposomes contenant différents lipides synthétiques ou encore d'origine végétale dans les diluants. L'effet de liposomes contenant du cholestérol sur la protection des spermatozoïdes de taureaux a été étudié [165][239]. Des liposomes de PC, avec ou sans cholestérol, protégeaient les spermatozoïdes de taureau contre le choc dû au froid ainsi que durant la conservation à 4°C; cette protection était maximisée avec des liposomes constitués de PC seulement [239]. Par contre, des liposomes ne parvenaient pas à protéger les spermatozoïdes de façon aussi efficace que le jaune d'œuf, sauf ceux constitués de PS et de cholestérol [165]. La composition en phospholipides des liposomes semble importante afin d'obtenir une affinité optimale des lipides pour les protéines BSP. En effet, il a été montré par ITC que la protéine BSP1 a plus d'affinité pour des liposomes mixtes contenant 70 mol% de PC et 30 mol% de PE, par rapport à des liposomes contenant seulement de la PC [66]. L'interaction de la protéine BSP1 bovine avec différentes membranes artificielles a été étudiée par plusieurs équipes et il en ressort que l'affinité de la protéine pour les membranes dépend de leur composition en lipides, ainsi que de la technique utilisée (Table III). La composition des liposomes à ajouter aux diluants pourrait être semblable à celle de la monocouche de phospholipides (87% (m/m) de la monocouche) et cholestérol (13% (m/m) de la monocouche) des LDL du jaune d'œuf qui est composée de ces phospholipides : 72% (m/m) PC et 19% (m/m) d'autres lipides (PE, lyso-PC, lyso-PE et sphingomyéline) [163]. De plus, la quantité de ces liposomes dans un volume donné de diluant devrait être proportionnelle à celle que 20% de jaune d'œuf contient afin d'obtenir une protection semblable des spermatozoïdes.

Il serait possible de séquestrer les protéines BSP à l'aide d'autres protéines, tel qu'il a été montré dans cette thèse. En plus de l'affinité pour les protéines du lait, les protéines BSP peuvent se lier au fibrinogène [46], la calmoduline [57] et l'apolipoprotéine A-I [59]. Ces protéines pourraient donc être intégrées dans la composition de diluants. Il serait intéressant de vérifier si la nature de l'interaction des protéines BSP avec les différentes protéines énumérées ci-haut est similaire, ainsi que de savoir quelles sont la ou les parties des protéines BSP qui sont impliquées dans l'interaction avec d'autres protéines. Par exemple, différents domaines recombinants des protéines BSP (les domaines Fn2 et la portion N-terminal) pourraient être produits dans un système bactérien. Plusieurs techniques pourraient être utilisées afin de déterminer s'il y a une interaction entre les domaines recombinants et les protéines pour lesquelles les protéines BSP ont une affinité, telles que l'ITC, la chromatographie d'affinité, le pontage des protéines, la résonance plasmonique de surface, etc. Ceci permettrait de cibler des protéines possédant une forte affinité pour les protéines BSP. Des protéines recombinantes pourraient alors être produites, évitant ainsi le risque de transmission de maladies entre les espèces. Toutefois, les résultats présentés dans cette thèse montrent qu'aucune des protéines du lait n'a plus d'affinité que les autres pour les protéines BSP. Il semble toutefois que le complexe « micelle » de caséines soit le plus efficace pour protéger les spermatozoïdes. Des études préliminaires (Lusignan MF et Manjunath P, résultats non publiés) montrent qu'aucune des caséines individuelles n'a plus d'affinité que les autres pour les protéines BSP. De plus, il serait complexe et dispendieux de produire des micelles en utilisant des caséines recombinantes.

En résumé, il sera plutôt difficile de créer un diluant qui permet la protection complète des spermatozoïdes de mammifères, puisque même si la composition du diluant est fixe, il y aura toujours une variation dans la composition du plasma séminal entre les individus et entre les éjaculats d'un même individu. Par contre, l'uniformisation des diluants ainsi que l'adaptation de la composition du diluant pour chaque espèce permettra d'améliorer la conservation des spermatozoïdes de mammifères.

**Table III.** Interaction de la protéine BSP1 bovine avec différents systèmes.

Système	$K_a$	n	Technique d'étude	Référence
Micelles de caséines	$3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	caséine : 4,5 BSP1	ITC	Article 2.1.
$\alpha$ -lactalbumine	$2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$\alpha$ -lactalbumine : 0,8 BSP1	ITC	Article 2.1.
LDL du jaune d'œuf	$3,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	1,6 PC : BSP1	ITC	Article 2.3.
Choline	0,95 mM	1,8 PC : BSP1	Dialyse à l'équilibre	[240]
PC	ND	10-11 PC : BSP1	Spectroscopie de fluorescence et ESR	[64]
PC/PE 2 : 1 (mol : mol)	ND	15 PE : BSP1	Spectroscopie de fluorescence	[64]
PC/PS 2 : 1 (mol : mol)	ND	20 PS : BSP1	Spectroscopie de fluorescence	[64]
DMPC	ND	12 PC : BSP1	Spectroscopie de fluorescence	[65]
DMPC	ND	11 PC : BSP1	Turbidimétrie	[54]
DMPC/20% (m/m) cholestérol	$2,11 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$	ND	SPR	[241]
DMPA / 20% (m/m) cholestérol	$1,09 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	ND	SPR	[241]
DMPG / 20% (m/m) cholestérol	$5,89 \pm 0,43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	ND	SPR	[241]

PC	$81,4 \text{ M}^{-1}$	ND	Spectroscopie d'absorption	[242]
Lyso-PC	$2,02 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	ND	Spectroscopie d'absorption	[242]
POPC	$103 \text{ mM}^{-1}$	$10 \pm 1$	ITC	[66]
POPC/ POPE (7/3)	$463 \text{ mM}^{-1}$	23	ITC	[66]
POPC/ POPG (7/3)	$148 \text{ mM}^{-1}$	7	ITC	[66]
POPC/ cholestérol (7/3)	$66 \text{ mM}^{-1}$	92	ITC	[66]

Abréviations. DMPA : dimyristoylphosphatidic acid; DMPC : dimyristoylphosphatidylcholine; DMPG : dimyristoylphosphatidylglycerol; ESR : electron spin resonance; POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-choline; POPE : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; POPG: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-glycerol; SPR : surface plasmon resonance.



#### 4. Conclusion et perspectives

Nous avons montré dans cette thèse que les protéines BSP bovines interagissaient avec les protéines du lait. BSP1, qui possède une plus grande affinité pour les protéines de lait que BSP3 et BSP5, se lie à environ 95% des protéines totales du lait, soit les micelles de caséines, l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline. Les constantes d'affinité caractérisant l'interaction BSP1 : micelles de caséines et BSP1 :  $\alpha$ -lactalbumine ( $3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  et  $2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , respectivement) indique que l'interaction entre les protéines est de moins forte affinité que l'interaction entre BSP1 et les LDL du jaune d'oeuf ( $3,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Chaque molécule de caséine peut interagir avec 4-5 molécules de protéines BSP, par rapport à une  $\alpha$ -lactalbumine qui interagit avec environ une protéine BSP. Les caséines, les protéines prépondérantes dans le lait, ont une plus grande capacité de séquestrer des protéines BSP. L'interaction entre les protéines BSP et les protéines du lait est stable avant et après la congélation, indiquant que le lait protège les spermatozoïdes durant toute la durée de la conservation. Ces résultats nous ont permis de proposer un nouveau mécanisme expliquant comment le lait protège les spermatozoïdes bovins durant la conservation. L'élément clef de ce mécanisme est la séquestration des protéines BSP par les protéines du lait. Cette interaction protéine : protéine préviendrait l'effet néfaste qu'ont les protéines BSP sur la membrane plasmique des spermatozoïdes pendant la conservation *in vitro*. Nous démontrons pour la première fois que les caséines ne sont pas les seules protéines impliquées dans la protection des spermatozoïdes: les deux principales protéines du sérum (l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline) participeraient aussi à cette protection. Toutefois leur effet protecteur serait moins grand que celui fourni par les caséines, car elles sont en plus faible concentration dans le lait et elles ont une

capacité moins grande de lier les protéines BSP. Il serait intéressant de vérifier si la quantité de protéines est le seul facteur permettant au lait de protéger les spermatozoïdes. Des études pourraient comparer l'effet sur les fonctions des spermatozoïdes de différents diluants contenant des caséines ou une concentration équivalente de protéines du sérum à celle des caséines. De plus, il serait intéressant de vérifier, pour ces diluants, s'il y a moins de protéines BSP qui se lient à la membrane des spermatozoïdes et si l'efflux des lipides membranaires est diminué.

Nous avons montré que les protéines BSP retrouvées dans le plasma séminal de porc, de bélier et d'étalon avaient une affinité pour les protéines du lait. Ceci indique que ces protéines peuvent séquestrer les protéines BSP chez ces espèces, suggérant un mécanisme de protection des spermatozoïdes par le lait qui serait semblable à celui de l'espèce bovine. Toutefois, l'effet des protéines BSP de porc, d'étalon et de bélier sur les membranes n'est pas clairement défini. Il serait donc important d'étudier cet effet afin de savoir si les protéines BSP homologues sont aussi néfastes pour la conservation des spermatozoïdes que les protéines BSP bovines. La concentration de protéines BSP dans le plasma séminal des mammifères est variable. Elle peut être très élevée comme chez l'espèce bovine ou très faible comme chez l'espèce porcine. Il n'est pas connu si les autres familles de protéines du plasma séminal, telles les spermadhésines, sont néfastes lors de la conservation des spermatozoïdes. Il serait donc important d'étudier leur rôle afin de mieux comprendre comment le lait protège les spermatozoïdes chez les différentes espèces.

Les résultats présentés dans cette thèse ont permis de suggérer différentes stratégies qui pourraient être utilisées par l'industrie de l'insémination artificielle afin

d'améliorer la conservation des spermatozoïdes. La semence de mammifères est diluée de façon à obtenir un nombre final de spermatozoïdes donné, sans tenir compte du volume du plasma séminal dans l'échantillon. Certains éjaculats ne sont donc pas assez dilués et il n'y a alors pas assez d'agent protecteur dans le diluant pour séquestrer l'excès des protéines BSP. La semence pourrait être centrifugée puis diluée à la concentration voulue dans un diluant contenant un volume minimal de plasma séminal afin de préserver le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. De plus, il faudrait que la concentration d'agent protecteur dans le diluant soit adaptée à chaque espèce. Par exemple, la semence d'une espèce dont le plasma séminal est plus concentré en protéines BSP devrait être diluée avec un diluant contenant plus d'agent protecteur qu'une espèce dont le plasma séminal contient moins de protéines BSP.

Une meilleure connaissance du mécanisme de protection par le lait devrait permettre l'élaboration de diluants protecteurs exempts de produits d'origine animale. Des études pourraient être effectuées afin de trouver un composant synthétique ou d'origine végétale qui aurait la propriété de séquestrer les protéines BSP et qui pourrait donc remplacer le lait. A la lumière des résultats présentés dans cette thèse, une avenue intéressante serait d'ajouter au diluant des protéines recombinantes ayant une affinité pour les protéines BSP dans les diluants. En premier lieu, il serait important d'étudier quelle partie de la protéine BSP interagit avec les différentes protéines auxquelles elle peut se lier. De plus, il faudrait vérifier si les protéines pouvant lier les protéines BSP ont un élément commun dans leur structure ou dans leur séquence leur permettant cette interaction, ce qui permettrait de cibler des protéines candidates à utiliser dans des diluants.

## 5. Références

1. Knobil E, Neill JD. The physiology of reproduction. New York: Raven Press; 1988.
2. Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 103-115.
3. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1469: 197-235.
4. Parks JE, Arion JW, Foote RH. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 1987; 37: 1249-1258.
5. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 1990; 11: 73-88.
6. Ladha S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J Membr Biol* 1998; 165: 1-10.
7. White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fert Dev* 1993; 5: 639-658.
8. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998; 59: 7-11.
9. Topfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci* 2005.
10. Austin CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B* 1951; 4: 581-596.

11. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168: 697-698.
12. Travis AJ, Kopf GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 2002; 110: 731-736.
13. Jha KN, Kameshwari DB, Shivaji S. Role of signaling pathways in regulating the capacitation of mammalian spermatozoa. *Cell Mol Biol* 2003; 49: 329-340.
14. Parrish JJ. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 1989; 40: 1020-1025.
15. Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 195-204.
16. Lane ME, Thérien I, Moreau R., Manjunath P. Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol Reprod* 1999; 60: 169-175.
17. Thérien I, Bergeron A, Bousquet D, Manjunath P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 97-106.
18. Parrish JJ, First NL. Bovine in vitro fertilization. In: Dunbar BS, O'Rand MG (eds.), *A comparative overview of mammalian fertilization*. New York: Plenum Press; 1991: 351-361.
19. 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.

20. Wassarman PM, Litscher ES. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int J Dev Biol* 2008; 52: 665-676.
21. Miller DJ, Ax RL. Seminal plasma: what is it and why is it important. In: 12th technical conference on artificial insemination and reproduction; 1988. 97-107.
22. Acott TS, Hoskins DD. Bovine sperm forward motility protein. Partial purification and characterization. *J Biol Chem* 1978; 253: 6744-6750.
23. Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 133-150.
24. Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in Vitro. *Gamete Res* 1985; 12: 345-355.
25. Florman HM, First NL. Regulation of acrosomal exocytosis. II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Dev Biol* 1988; 128: 464-473.
26. Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 109-119.
27. Baas JW, Molan PC, Shannon P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1983; 68: 275-280.

28. Inskeep PB, Magargee SF, Hammerstedt RH. Alterations in motility and metabolism associated with sperm interaction with accessory sex gland fluids. *Arch Biochem Biophys* 1985; 241: 1-9.
29. Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 1993; 49: 1202-1207.
30. Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Smith RG, Forrest DW, Sprott LR, Ax RL. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci* 1998; 76: 2032-2039.
31. Dott HM, Harrison RA, Foster GC. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J Reprod Fertil* 1979; 55: 113-124.
32. Way AL, Griel LCJ, Killian GJ. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J Androl* 2000; 21: 213-219.
33. Shivaji S, Bhargava PM. Antifertility factors of mammalian seminal fluid. *Bioessays* 1987; 7: 13-17.
34. Strzezek J. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reprod Biol* 2002; 2: 243-266.
35. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* 1990; 42: 899-915.

36. 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.
37. Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl* 2006; 27: 201-211.
38. Schoneck C, Braun J, Einspanier R. sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal proteins aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *theriogenology* 1996; 45: 633-642.
39. Iwamoto T, Hiroaki H, Furuichi Y, Wada K, Satoh M, Osada T, Gagnon C. Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicle and codes for a sperm motility inhibitor protein. *FEBS Lett* 1995; 368: 420-424.
40. Robert M, Gagnon C. Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. *Biol Reprod* 1996; 55: 813-821.
41. Chang MC. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 1957; 179: 258-259.
42. Dostalova Z, Calvete JJ, Sanz L, Hettel C, Riedel D, Schoneck C, Einspanier R, Topfer-Petersen E. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994; 375: 457-461.



43. Robertson RT, Bhalla VK, Williams WL. Purification and the peptide nature of decapacitation factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 45: 1331-1336.
44. Eng LA, Oliphant G. Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol Reprod* 1978; 19: 1083-1094.
45. Killian G. Fertility factors in seminal plasma. In: 14th technical conference on artificial insemination and reproduction; 1992. 33-37.
46. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: Chrétien M, McKerns KW (eds.), *Molecular biology of brain and endocrine peptidergic systems*. New-York: Plenum Press; 1988: 259-273.
47. Nauc V, Manjunath P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biology Reprod* 2000; 63: 1058-1066.
48. Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. *Biol Reprod* 2009; 80: 394-397.
49. Calvete JJ, Mann K, Sanz L, Raida M, Topfer-Petersen E. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett* 1996; 399: 147-152.
50. Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Ying SY, Guillemin R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113: 861-867.

51. Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, Chrétien M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma (homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin). *Biochem J* 1987; 243: 195-203.
52. Wah DA, Fernandez-Tornero C, Sanz L, Romero A, Calvete JJ. Sperm Coating Mechanism from the 1.8 Å Crystal Structure of PDC-109-Phosphorylcholine Complex. *Structure* 2002; 10: 505-514.
53. Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 217-228.
54. Ramakrishnan M, Anbazhagan V, Pratap TV, Marsh D, Swamy MJ. Membrane insertion and lipid-protein interactions of bovine seminal plasma protein PDC-109 investigated by spin-label electron spin resonance spectroscopy. *Biophys J* 2001; 81: 2215-2225.
55. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 313-318.
56. Manjunath P, Sairam MR, Uma J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci Rep* 1987; 7: 231-238.
57. Manjunath P, Chandonnet L, Baillargeon L, Roberts KD. Calmodulin-binding proteins in bovine seminal plasma. *J Reprod Fert* 1993; 97: 75-81.

58. Ignatz GG, Lo MC, Perez CL, Gwathmey TM, Suarez SS. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 2001; 64: 1806-1811.
59. Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chrétien M, Chapdelaine A. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 1989; 264: 16853-16857.
60. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* 2002; 67: 1250-1258.
61. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 1992; 267: 10149-10155.
62. Manjunath P, Chandonnet I, Leblond E, Desnoyer L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50: 27-37. Erratum in: *Biol Reprod* 1994; 1950:1977.
63. Calvete JJ, Raida M, Sanz L, Wempe F, Scheit KH, Romero A, Topfer-Petersen E. Localization and structural characterization of an oligosaccharide O-linked to bovine PDC-109. Quantitation of the glycoprotein in seminal plasma and on the surface of ejaculated and capacitated spermatozoa. *FEBS Lett* 1994; 350: 203-206.
64. Muller P, Erlemann KR, Muller K, Calvete JJ, Topfer-Petersen E, Marienfeld K, Herrmann A. Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal

- plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *Eur Biophys J* 1998; 27: 33-41.
65. Gasset M, Magdaleno L, Calvete JJ. Biophysical study of the perturbation of model membrane structure caused by seminal plasma protein PDC-109. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374: 241-247.
66. Lassiseraye D, Courtemanche L, Bergeron A, Manjunath P, Lafleur M. Binding of bovine seminal plasma protein BSP-A1/-A2 to model membranes: lipid specificity and effect of the temperature. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 502-513.
67. Manjunath P, Sairam MR. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 1987; 241: 685-692.
68. Gasset M, Saiz JL, Laynez J, Sanz L, Gentzel M, Topper-Petersen E, Calvete JJ. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *Eur J Biochem* 1997; 250: 735-744.
69. Calvete JJ, Campanero-Rhodes MA, Raida M, Sanz L. Characterisation of the conformational and quaternary structure-dependent heparin-binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109. *FEBS Lett* 1999; 444: 260-264.
70. Romero A, Varela PF, Topfer-Petersen E, Calvete JJ. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of bovine seminal plasma PDC-109, a protein composed of two fibronectin type II domains. *Proteins* 1997; 28: 454-456.

71. 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.
72. Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1999; 61: 590-598.
73. Suarez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 2008; 52: 455-462.
74. Gwathmey T, Igotz G, Suarez S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 2003; 69: 809-815.
75. Gwathmey TM, Igotz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 2006; 75: 501-507.
76. 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.
77. Lefebvre J, Fan J, Chevalier S, Sullivan R, Carmona E, Manjunath P. Genomic structure and tissue-specific expression of human and mouse genes encoding homologues of the major bovine seminal plasma proteins. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 45-53.

78. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 1338-1344.
79. Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Topfer-Petersen E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 1995; 310: 615-622.
80. Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 1997; 407: 201-206.
81. Ménard M, Nauc V, Lazure C, Vaillancourt D, Manjunath P. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. *Mol Reprod Dev* 2003; 66: 349-357.
82. Greube A, Muller K, Topfer-Petersen E, Herrmann A, Muller P. Interaction of Fibronectin Type II Proteins with Membranes: The Stallion Seminal Plasma Protein SP-1/2. *Biochemistry* 2004; 43: 464-472.
83. Hadjisavas M, Armstrong DT, Seamark RF. Purification of a cell-cell adhesion regulator from porcine seminal vesicle fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1206-1216.

84. Plucienniczak G, Jagiello A, Plucienniczak A, Holody D, Strzezek J. Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54-kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 303-309.
85. Jonakova V, Manaskova P, Kraus M, Liberda J, Ticha M. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol Reprod Dev* 2000; 56: 275-277.
86. Jonakova V, Kraus M, Veselsky L, Cechova D, Bezouska K, Ticha M. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *J Reprod Fertil* 1998; 114: 25-34.
87. Lusignan MF, Bergeron A, Crete MH, Lazure C, Manjunath P. Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. *Biol Reprod* 2007; 76: 424-432.
88. Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 461-470.
89. Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 39.
90. Boisvert M, Bergeron A, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol Reprod* 2004; 70: 656-661.
91. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 23-53.

92. Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 2002; 57: 327-344.
93. Cheng P, Casida LE, Barrett GR. Effects of dilution on motility of bull spermatozoa and the relation between motility in high dilution and fertility. *J Anim Sci* 1949; 8: 81-88.
94. Maxwell WMC, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 1999; 52: 1353-1362.
95. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 481-492.
96. Holt WV. Fundamental aspect of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 53: 47-58.
97. Leibo SP, Bradley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon C (ed.) *The male gamete: from basic science to clinical applications*. Vienna: Cache River Press; 1999: 502-516.
98. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 1995; 38: 1-36.
99. Shannon P, Vishwanath R. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and theoretical model to explain the fertility differences. *Anim Reprod Sci* 1995; 39: 1-10.



100. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 871-891.
101. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 77-111.
102. Rigby SL, Brinsko SP, Cochran M, Blanchard TL, Love CC, Varner DD. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Anim Reprod Sci* 2001; 68: 171-180.
103. Pickett BW, Sullivan JJ, Byers WW, Pace MM, Remmenga EE. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil Steril* 1975; 26: 167-174.
104. Varner D, Blanchard T, Love C, Garcia M, Kenney RM. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoa motility parameters. *theriogenology* 1987; 28: 709-723.
105. Jasko D, Hathaway J, Schaltenbrand V, Simper W, Squires E. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *theriogenology* 1992; 37: 1241-1252.
106. Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 1997; 48: 907-917.
107. Sieme H, Harrison RA, Petrunkina AM. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci* 2008; 107: 276-292.

108. Aurich JE, Kuhne A, Hoppe H, Aurich C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 1996; 46: 791-797.
109. Moore AI, Squires EL, Graham JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 63: 2372-2381.
110. Foote RH. The history of artificial insemination: selected notes and notables. *Am Soc Anim Sci* 2002: 1-10.
111. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 143-172.
112. Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Breque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Homer HL. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 2008; 70: 1251-1259.
113. Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 1975; 40: 99-102.
114. Cooper TG (ed.). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition. Geneva: WHO Press; 2010.
115. Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril* 2005; 84: 1017.
116. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 3-22.
117. Parks JE, Graham J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992; 38: 209-222.

118. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Har J* 2000; 41: 187-196.
119. Parks JE, Meacham TN, Saacke RG. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. I. Selection of a PIPES-buffered diluent for evaluating the effect of egg yolk lipoproteins on sperm cholesterol and phospholipids. *Biol Reprod* 1981; 24: 393-398.
120. Darin-Bennet A, Poulos A, White I. The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull, and boar spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 1973; 26: 1409-1420.
121. Watson PF. The effect of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clarke A (eds.), *Effects of low temperature on biological membrane*. London: Harcourt Brace Jovanovich; 1981: 189-218.
122. Foulkes JA. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1977; 49: 277-284.
123. Cary JA, Madill S, Farnsworth K, Hayna JT, Duoos L, Fahning ML. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can Vet J* 2004; 45: 35-41.
124. Mazur P, Cole KW. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology* 1989; 26: 1-29.
125. Maxwell WM, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5: 613-638.

126. Bailey JL, Bilodeau J-F, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 2000; 21: 1-7.
127. Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 1997; 18: 461-468.
128. Maxwell WMC, Johnson LA. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 1997; 48: 209-219.
129. Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, Sullivan R. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein p25b. *J Androl* 2000; 21: 700-707.
130. Ollero M, Bescos O, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology* 1998; 49: 547-555.
131. Godman EE, Ellington JE, Foote RH. Reaction of fresh and frozen bull spermatozoa incubated with fresh and frozen bovine oviduct epithelial cells. *Reprod Nutr Dev* 1998; 38: 281-288.
132. Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 878-892.
133. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 2009; 10: 49-62.
134. Darin-Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 1977; 14: 466-470.

135. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membrane: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 1993; 265: 432-437.
136. Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 1985; 822: 267-287.
137. Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3199-3207.
138. Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Smith JF. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci* 1998; 51: 275-287.
139. de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; 2: 48-54.
140. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79: 829-843.
141. Aitken RJ, Baker MA, De Iuliis GN, Nixon B. New insights into sperm physiology and pathology. *Handb Exp Pharmacol* 2010; 198: 99-115.
142. Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod* 1991; 44: 398-403.
143. Griveau JF, Renard P, Le Lannou D. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 1994; 17: 300-307.

144. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* 2010; 2010.
145. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 282-288.
146. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 1992; 13: 232-241.
147. Phillips P, Lardy AL. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J Dairy Sci* 1940; 23: 399-404.
148. Kakar SS, Ganguli NC. Milk as an extender for semen: A review. *Indian J Anim Sci* 1978; 48: 777-790.
149. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B, Verkleij AJ. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 1993; 30: 32-44.
150. Sansone G, Nastri MJ, Fabbrocini A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 55-76.
151. Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 113-141.

152. Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, da Silva LD. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology* 2003; 59: 743-751.
153. Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. *J Androl* 2001; 22: 1012-1018.
154. Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Roldan ER. Sperm Cryopreservation in Three Species of Endangered Gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorr* and *G. dorcas neglecta*). *Biol Reprod* 2003; 69: 602-611.
155. Okada A, Igarashi H, Kuroda M, Terao K, Yoshikawa Y, Sankai T. Cryopreservation-induced acrosomal vesiculation in live spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Hum Reprod* 2001; 16: 2139-2147.
156. Hermansson U, Axner E. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 degrees C. *Theriogenology* 2007; 67: 1239-1248.
157. Powrie WD, Nakai S. The chemistry of eggs and egg products. In: Stadelman WJ, Cotterill OJ (eds.), *Egg science and technology*, 3 ed. Wesport: AVI publishing company; 1986: 97-138.

158. Watson PF. The protection of ram and bull spermatozoa by low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep freezing. *J Therm Biol* 1976; 1: 137-141.
159. Pace MM, Graham EF. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci* 1974; 39: 1144-1149.
160. Kampschmidt RF, Mayer DT, Herman HA. Lipid and liprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J Dairy Sci* 1953; 36: 733-742.
161. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2002; 57: 1695-1706.
162. Cook WH, Martin WG. Egg lipoproteins. In: Tria E, Scanu AM (eds.), *Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems*. New York: Academic Press; 1969: 579-615.
163. Kuksis A. Yolk lipids. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1124: 205-222.
164. Burley RW, Evans AJ, Pearson JA. Molecular aspects of the synthesis and deposition of hens' egg yolk with special reference to low density lipoprotein. *Poult Sci* 1993; 72: 850-855.
165. Graham JK, Foote RH. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 1987; 24: 42-52.



166. MacDonald BJ, Foulkes JA. A spectrofluorometric investigation, using 1-anilino-naphthalen-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 1981; 63: 407-414.
167. Watson PF. The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *J Reprod Fertil* 1975; 42: 105-111.
168. Quinn PJ, Chow PY, White IG. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil* 1980; 60: 403-407.
169. Foulkes JA, Sweasey D, Goodey RG. Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. *J Reprod Fertil* 1980; 60: 165-169.
170. Thun R, Hurtado M, Janett F. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* 2002; 57: 1087-1094.
171. van Wagendonk-de Leeuw AM, Haring RM, Kaal-Lansbergen LMTE, den Daas JHG. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* 2000; 54: 57-67.
172. Vishwanath R, Shannon P, Curson B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Anim Reprod Sci* 1992; 29: 185-194.
173. al-Somai N, Vishwanath R, Molan PC, Shannon P. Anionic and cationic components from protein aggregates in bovine seminal plasma and their effects on sperm motility. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 328-336.

174. Bergeron A, Manjunath P. The mechanism of sperm protection by egg yolk low density lipoproteins. In: Proceedings of the 20th NAAB technical conference on artificial insemination and reproduction; 2004; Milwaukee, WI, USA. 68-75.
175. Almquist JO, Flipse RJ, Thacker DL. Diluters for bovine semen. IV. Fertility of bovine spermatozoa in heated homogenized milk and skim milk. *J Anim Sci* 1954; 13: 1303-1307.
176. Saalman A, Munz S, Ellerbrock K, Ivell R, Kirchhoff C. Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules. *Mol Reprod Dev* 2001; 58: 88-100.
177. Nakagata N, Okamoto M, Ueda O, Suzuki H. Positive effect of partial zona-pellucida dissection on the in vitro fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility. *Biol Reprod* 1997; 57: 1050-1055.
178. Scobey MJ, Bielfeld P, Krussel JS, Jeyendran RS. Effect of milk-yolk on the fertilizing capacity of spermatozoa. *Andrologia* 1995; 27: 229-231.
179. Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 2002; 71: 13-23.
180. Flipse RJ, Patton S, Almquist JO. Diluters for bovine semen. III. Effect of lactenin and lactoperoxidase upon spermatozoan livability. *J Dairy Sci* 1954; 37: 1205-1211.
181. Amiot J, Fournier S, Leboeuf B, Paquin P, Simpson R. Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse

- du lait. In: Vignola CL (ed.) Science et technologie du lait, transformation du lait. Montréal: Presses Internationales Polytechnique; 2002: 1-73.
182. Brunner JR. Milk lipoproteins. In: Tria E, Scanu AM (eds.), Structural and functional aspects of lipoproteins in living system. London and New York: Academic Press; 1969: 545-615.
  183. Choong CH, Wales RG. The use of various diluents for deep-freezing bull spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 1963; 16: 896-904.
  184. Batellier F, Magistrini M, Fauquant J, Palmer E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology* 1997; 48: 391-417.
  185. Farrell HM, Jr., Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF, Swaisgood HE. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *J Dairy Sci* 2004; 87: 1641-1674.
  186. Choong CH, Wales RG. The effect of cold shock on spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 1962; 15: 543-551.
  187. Martin ICA. Diluents for the preservation of ram spermatozoa. I. Diluents used at 37°C and 5°C containing casein. *Aust J Biol Sci* 1966; 19: 645-653.
  188. O'Shea T, Wales RG. Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at 5°C on diluted ram and bull semen. *Aust J Biol Sci* 1966; 19: 871-882.
  189. Leboeuf B, Guillouet P, Batellier F, Bernelas D, Bonne JL, Forgerit Y, Renaud G, Magistrini M. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology* 2003; 60: 867-877.

190. Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol Reprod* 2007; 77: 120-126.
191. Holt C. Casein micelle size from elastic and quasi-elastic light scattering measurements. *Biochim Biophys Acta* 1975; 400: 293-301.
192. Schmidt DG, Both P, van Markwijk BW, Buchheim W. The determination of size and molecular weight of casein micelles by means of light-scattering and electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1974; 365: 72-79.
193. Griffin MC, Roberts GC. A <sup>1</sup>H-n.m.r. study of casein micelles. *Biochem J* 1985; 228: 273-276.
194. Schorsch C, Jones MG, Norton IT. Micellar casein gelation at high sucrose content. *J Dairy Sci* 2002; 85: 3155-3163.
195. Dalgleish D. Casein Micelles as colloids: surface structures and stabilities. *J Dairy Sci* 1998; 81: 3013-3018.
196. Ollero M, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology* 1998; 37: 1-12.
197. Crabo BG. Physiological aspects of stallion semen cryopreservation. In: *AAEP Proceedings*, vol. 47; 2001: 291-295.
198. Jeyendran RS, Graham EF. An evaluation of cryoprotective compounds on bovine spermatozoa. *Cryobiology* 1980; 17: 458-464.

199. Watson PF. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming GE (ed.) *Marshall's physiology of reproduction*, vol. 2. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1990: 747-869.
200. Foote RH, Kaproth MT. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. *J Dairy Sci* 2002; 85: 453-456.
201. Woelders H, Matthijs A, Engel B. Effects of trehalose, and sucrose osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 1997; 35: 93-105.
202. Aboagla EM, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod* 2003; 69: 1245-1250.
203. Sztejn JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 2001; 42: 28-39.
204. Thompson KA, Richa J, Liebhaber SA, Storey BT. Dialysis addition of trehalose/glycerol cryoprotectant allows recovery of cryopreserved mouse spermatozoa with satisfactory fertilizing ability as assessed by yield of live young. *J Androl* 2001; 22: 339-344.
205. Beconi MT, Francia CR, Mora NG, Affranchino MA. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 1993; 40: 841-851.
206. Foote RH. Survival of bull sperm in milk and yolk extenders with added catalase. *J Dairy Sci* 1962; 45: 907-910.

207. Killian G, Honadel T, McNutt T, Henault M, Wegner C, Dunlap D. Evaluation of butylated hydroxytoluene as a cryopreservative added to whole or skim milk diluent for bull semen. *J Dairy Sci* 1989; 72: 1291-1295.
208. Dionne J, Castonguay Y, Nadeau P, Desjardins Y. Amino acid and protein changes during cold acclimation of green-type annual bluegrass (*Poa annua* L.) ecotypes. *Crop Sci.* 2001; 41: 1862-1870.
209. Kruuv J, Glofcheski DJ. Protective effects of amino acids against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology* 1992; 29: 291-295.
210. Sanchez-Partida LG, Maxwell WM, Paleg LG, Setchell BP. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1992; 4: 113-118.
211. Trimeche A, Yvon JM, Vidament M, Palmer E, Magistrini M. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 52: 181-191.
212. Zhang BR, Buhr M, Kroetschd T, Leibo SP. Glycine betaine improves survival of fresh bovine spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2001; 13: 187-192.
213. Purdy PH, Graham EF. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 2004; 48: 36-45.
214. Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 2005; 51: 241-249.

215. Moce E, Blanch E, Tomas C, Graham JK. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod Dom Anim* 2010; 45 Suppl 2: 57-66.
216. Donoghue AM, Walker-Simmons MK. The influence of wheat dehydration-induced proteins on the function of turkey spermatozoa after twenty-four-hour in vitro storage. *Poult Sci* 1999; 78: 235-241.
217. Barth AD, Bowman PA. Determination of the Best Practical Method of Thawing Bovine Semen. *Can Vet J* 1988; 29: 366-369.
218. Santiago-Moreno J, Toledano-Diaz A, Pulido-Pastor A, Dorado J, Gomez-Brunet A, Lopez-Sebastian A. Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2006; 66: 1219-1226.
219. Dobrinski I, Lulai C, Barth AD, Post K. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 47: 291-296.
220. Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, Anton M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 2004; 61: 895-907.
221. Pagl R, Aurich JE, Muller-Schlosser F, Kankofer M, Aurich C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based

- extender for storage of equine semen at 5 degrees C. *Theriogenology* 2006; 66: 1115-1122.
222. Batellier F, Duchamp G, Vidament M, Arnaud G, Palmer E, Magistrini M. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 degrees C under aerobic conditions. *Theriogenology* 1998; 50: 229-236.
223. Muino R, Fernandez M, Pena AI. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Dom Anim* 2007; 42: 305-311.
224. Scholfield CR. Composition of soybean lecithin. *J Amer Oil Chem Soc* 1981; 58: 889-892.
225. Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Lundeheim N, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* 2003; 59: 1157-1170.
226. Paz PD, Estes MC, Alvarez M, Mata M, Chamorro CA, Anel L. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology* 2010; 74: 663-671.
227. Bousseau S, Brillard JP, Marguant-Le Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 1998; 50: 699-706.



228. Thibier M, Guerin B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 233-251.
229. Totic PH, Walton A. Effects of egg yolk and its constituents on the respiration and fertilizing capacity of spermatozoa. *J. Agri. Sci.* 1946; 37: 69-76.
230. Topfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 1998; 30: 217-224.
231. Calvete JJ, Nessau S, Mann K, Sanz L, Sieme H, Klug E, Topfer-Petersen E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. *Reprod Dom Anim* 1994; 29: 411-426.
232. Tedeschi G, Oungre E, Mortarino M, Negri A, Maffeo G, Ronchi S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6175-6179.
233. Bork P, Beckman G. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 1993; 231: 539-545.
234. Calvete JJ, Sanz L, Reinert M, Dostalova Z, Töpfer-Petersen E. Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. In: Jamieson BGM, Ausio, J., and Justine, J.-L. (ed.) *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*, vol. 166. Paris: Mém. Mus. natn, Hist. nat.; 1995: 515-524.
235. Dostalova Z, Calvete JJ, Sanz L, Topfer-Petersen E. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal,

- ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1200: 48-54.
236. Calvete JJ, Varela PF, Sanz L, Romero A, Mann K, Topfer-Petersen E. A procedure for the large-scale isolation of major bovine seminal plasma proteins. *Protein Expr Purif* 1996; 8: 48-56.
237. Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology. *anim Reprod Sci* 2008; 107: 268-275.
238. Liberda J, Ryslava H, Jelinkova P, Jonakova V, Ticha M. Affinity chromatography of bull seminal proteins on mannan-Sepharose. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 780: 231-239.
239. Parks JE, Meacham TN, Saacke RG. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids, and viability at 4 degrees C and 37 degrees C. *Biol Reprod* 1981; 24: 399-404.
240. Desnoyers L, Manjunath P. Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305: 341-349.
241. Thomas CJ, Anbazhagan V, Ramakrishnan M, Sultan N, Surolia I, Swamy MJ. Mechanism of membrane binding by the bovine seminal plasma protein, PDC-109: A surface plasmon resonance study. *Biophys J* 2003; 84: 3037-3044.

242. Anbazhagan V, Swamy MJ. Thermodynamics of phosphorylcholine and lysophosphatidylcholine binding to the major protein of bovine seminal plasma, PDC-109. FEBS Lett 2005; 579: 2933-2938.