

Université de Montréal

Les gènes et protéines BSP chez la souris et l'humain : clonage, caractérisation, expression
sous forme recombinante et étude des fonctions biologiques

par
Jasmine Lefebvre

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

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

avril 2009

© Jasmine Lefebvre, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Les gènes et protéines BSP chez la souris et l'humain : clonage, caractérisation, expression
sous forme recombinante et étude des fonctions biologiques

présentée par :

Jasmine Lefebvre

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry
(président-rapporteur)

Puttaswamy Manjunath
(directeur de recherche)

Gilles Bleau
(membre du jury)

Pierre Leclerc
(examineur externe)

Sylvie Lesage
(représentant du doyen)

RÉSUMÉ

L'infertilité affecte environ 15% des couples en âge de se reproduire. Dans près de la moitié des cas, des facteurs masculins sont à la base de l'infertilité, quoique les causes exactes demeurent souvent inconnues. Les spermatozoïdes de mammifères subissent une série d'étapes de maturation avant d'acquérir la capacité de féconder un ovocyte. Les premiers changements ont lieu à l'intérieur de l'épididyme, où les spermatozoïdes gagnent la capacité de se mouvoir ainsi que de reconnaître et d'interagir avec l'ovocyte. Suite à l'éjaculation, ils doivent subir une seconde série de modifications à l'intérieur du tractus génital femelle, nommée capacitation. Nous avons préalablement démontré que chez le bovin, la famille de protéines BSP (Binder of SPerm) est essentielle à la capacitation. Des homologues des BSP ont aussi été isolés du fluide séminal de porc, de bouc, de bélier, de bison et d'étalon. Malgré la détection d'antigènes apparentés aux BSP dans le fluide séminal de souris et d'humain, les homologues des BSP n'ont jamais été caractérisés chez ces espèces. Nous avons émis l'hypothèse que des homologues des BSP seraient exprimés chez la souris et l'humain et joueraient un rôle dans la maturation des spermatozoïdes.

Nous avons démontré que des séquences homologues aux BSP sont présentes dans les génomes murin et humain. Le génome murin contient trois séquences; *Bsph1*, *Bsph2a* et *Bsph2b*, tandis qu'une seule séquence (*BSPH1*) a été identifiée chez l'humain. Les séquences d'ADNc de *Bsph1*, *Bsph2a* et *BSPH1* ont été clonées, tandis que *Bsph2b* serait probablement un pseudogène. Les trois gènes sont exprimés uniquement dans l'épididyme et font partie d'une sous-famille distincte à l'intérieur de la famille des BSP. Chez les ongulés, les BSP sont exprimées par les vésicules séminales, sont ajoutées aux spermatozoïdes lors de l'éjaculation et représentent une proportion significative des protéines du plasma séminal. Au contraire, les BSP épидидymaires ne sont retrouvées qu'en faibles quantités dans le fluide séminal. L'étude de leur rôle dans les fonctions spermatiques était donc plus difficile que chez les ongulés, où l'isolement des protéines natives du plasma séminal à l'aide de techniques de chromatographie était possible.

Afin d'étudier sa fonction, nous avons exprimé BSPH1 recombinante dans *E. coli*. Les ponts disulfure des domaines de type-II caractéristiques de ces protéines ont fait en sorte que l'expression de BSPH1 fusionnée à une étiquette hexahistidine ou glutathion-S-transférase a donné lieu à des protéines insolubles dans les corps d'inclusion. La production de BSPH1 soluble a été possible grâce à l'ajout d'une étiquette thiorédoxine et l'expression

dans une souche au cytoplasme oxydatif. BSPH1 a été purifiée par affinité et sa liaison aux partenaires connus des BSP, la phosphatidylcholine, les lipoprotéines de faible densité et la membrane des spermatozoïdes, suggérait que la protéine recombinante possédait sa conformation native et pouvait être utilisée pour des essais fonctionnels.

La forme native de BSPH1 a été détectée dans le plasma séminal humain suite au fractionnement par gel filtration. La liaison de BSPH1 native à une colonne d'affinité à l'héparine a indiqué qu'elle partage aussi cette propriété de liaison avec la famille des BSP, et pourrait lier les GAGs semblables à l'héparine du tractus génital féminin. Une colonne d'immunoaffinité anti-BSPH1 a été préparée à l'aide d'anticorps générés contre des protéines recombinantes, et a permis d'isoler BSPH1 native à partir d'extraits de spermatozoïdes humains. Nos résultats montrent que BSPH1 native serait localisée dans les microdomaines « rafts » de la membrane. Sa masse moléculaire apparente était de 32 kDa, ce qui est supérieur à la masse prédite selon sa séquence en acides aminés, indiquant la présence probable de modifications post-traductionnelles, ou d'une migration anormale.

L'effet de BSPH1 recombinante et des anticorps anti-BSPH1 sur la motilité, la viabilité et la capacitation a aussi été étudié. Les deux dernières variables ont été mesurées par un essai de cytométrie en flux, optimisé dans cette étude. Aucun effet des protéines recombinantes ou des anticorps sur la motilité et la viabilité des spermatozoïdes n'a été noté. Quoiqu'une stimulation modeste, quoique significative, de la capacitation ait été observée à la plus faible concentration de BSPH1, les concentrations plus élevées n'ont pas montré d'effet. De la même manière, les anticorps anti-BSPH1 n'ont pas eu d'effet significatif sur la capacitation. Ces résultats suggèrent que BSPH1 produite dans *E. coli* n'affecte pas la capacitation de façon marquée. Cependant, puisque BSPH1 native possède probablement des modifications post-traductionnelles, une protéine recombinante produite dans des cellules de mammifères pourrait affecter les fonctions spermatiques. De manière alternative, les BSP épидидymaires remplissent peut-être un rôle différent dans les fonctions spermatiques que celles sécrétées par les vésicules séminales des ongulés.

Les résultats décrits dans cette thèse pourraient contribuer à améliorer le diagnostic de l'infertilité masculine, ainsi que les techniques de reproduction assistée et éventuellement, pourraient mener au développement de contraceptifs masculins.

Mots clés: protéines BSP, épидидyme, expression de protéines recombinantes, capacitation des spermatozoïdes, cytométrie en flux.

ABSTRACT

Infertility affects approximately 15% of couples of reproductive age. In nearly half the cases, male factors are responsible, although causes underlying male infertility often remain unknown. Mammalian sperm undergo a series of maturational steps before acquiring the capacity to fertilize an oocyte. The first changes take place inside the epididymis, where sperm gain motility and the ability to recognize and interact with the oocyte. After ejaculation, sperm go through a second maturation event named capacitation, taking place inside the female reproductive tract. We previously showed that in the bovine species, proteins of the BSP (Binder of Sperm) family are essential for capacitation. Homologs of these proteins have also been isolated from boar, ram, goat, bison and stallion seminal fluid. Although BSP-related antigens have been detected in mouse and human seminal fluid, BSP homologs have never been characterized in these species. We hypothesized that BSPs would indeed be expressed in mice and humans and could be involved in sperm maturation.

Our studies demonstrated that BSP-homologous sequences are present in the mouse and human genomes. The mouse genome contains three BSP-like sequences, *Bsph1*, *Bsph2a* and *Bsph2b*, whereas only one sequence (*BSPH1*) was identified in the human genome. The complete cDNA sequences of *Bsph1*, *Bsph2a* and *BSPH1* were cloned, whereas *Bsph2b* is probably a pseudogene. The two murine and sole human genes are expressed uniquely in the epididymis, and are part of a distinct sub-family within the BSP superfamily. The BSPs of ungulates are expressed in the seminal vesicles, are added to sperm upon ejaculation and represent a significant proportion of seminal plasma proteins. In contrast, BSP proteins expressed in the mouse and human epididymides are found in very small quantities in seminal fluid. The study of their role in sperm functions was therefore less straightforward than for ungulate species, where direct isolation of the native proteins from seminal plasma was feasible using various chromatography techniques.

In order to investigate the role of the human BSP protein, BSPH1, we expressed the recombinant protein in *E. coli*. Probably due to the multiple disulfide bonds within the fibronectin type-II domains characteristic of these proteins, expression of BSPH1 with a hexahistidine or glutathione-S-transferase tag gave rise to insoluble protein trapped inside bacterial inclusion bodies. Successful expression of soluble BSPH1 was achieved when the protein was fused to a thioredoxin tag and expressed in a bacterial strain that possesses an oxidizing cytoplasm. This protein was purified using affinity chromatography techniques

and tested for binding to known ligands of BSP proteins: phosphatidylcholine, low-density lipoproteins and the human sperm membrane. Since recombinant BSPH1 displayed all three binding properties, we concluded that it had assumed its native conformation and could be used in subsequent functional assays to determine its role in sperm functions.

The native form of BSPH1 was detected in human seminal plasma after fractionation on a gel filtration column. Native BSPH1 also bound to a heparin-affinity column, indicating that it shares this binding property with the BSP family and may also bind heparin-like GAGs of the female reproductive tract. An anti-BSPH1 immunoaffinity column was prepared using antibodies generated with bacterially expressed recombinant proteins and was used to isolate native BSPH1 from human sperm extracts. In addition, our results show that BSPH1 probably localizes to detergent-resistant microdomains of the human sperm membrane. Its apparent molecular weight was 32 kDa, which is superior to that predicted by its amino acid sequence. Therefore, BSPH1 probably undergoes post-translational modifications or migrates abnormally during electrophoresis.

The effect of recombinant BSPH1 protein and anti-BSPH1 antibodies on human sperm motility, viability and capacitation were also investigated. The latter two sperm functions were assayed using a flow cytometry technique optimized in this study. No effect of recombinant BSPH1 or antibodies on sperm motility or viability was noted. Although a modest yet significant stimulation of capacitation was observed at lower BSPH1 protein concentrations, higher concentrations showed no effect. In the same fashion, anti-BSPH1 antibodies showed no significant effect on capacitation. These results suggest that recombinant BSPH1 produced in *E. coli* does not appreciably affect capacitation. However, since native BSPH1 may be subject to post-translational modifications, it is possible that BSPH1 expressed in a mammalian system would affect sperm capacitation. Alternatively, epididymally expressed BSPs may play a somewhat different role in sperm functions than those secreted by the seminal vesicles of ungulates.

The results described in this thesis could aid in better diagnosing male infertility, improving assisted reproduction and eventually, developing male contraceptives.

Key words: BSP proteins, epididymis, recombinant expression, sperm capacitation, flow cytometry

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
REMERCIEMENTS	XIII
1. INTRODUCTION	1
1.1. Le spermatozoïde	1
1.1.1. La morphologie du spermatozoïde	2
1.1.2. La membrane plasmique des spermatozoïdes	3
1.1.3. Les microdomaines membranaires « rafts »	3
1.2. La maturation épидидymaire	4
1.2.1. Les protéines CRISP	6
1.2.2. La protéine P34H et ses orthologues	6
1.2.3. L'arylsulfatase A	7
1.2.4. La protéine SPAM1 (PH-20)	7
1.2.5. Les épидидymosomes	7
1.3. L'éjaculation	10
1.3.1. Le plasma séminal	11
1.4. La capacitation	11
1.4.1. L'efflux de cholestérol membranaire	13
1.4.2. La ré-organisation des microdomaines membranaires « rafts »	14
1.4.3. Le rôle du bicarbonate	14
1.4.4. Le rôle du calcium	15
1.4.5. L'hyperactivation	16
1.4.6. Le réservoir oviductal de spermatozoïdes	16
1.4.7. Le rôle des protéines <i>Binder of SPerm</i> (BSP)	17
1.5. La chémoattraction des spermatozoïdes	21
1.6. L'interaction spermatozoïde-ovocyte	22
1.7. La réaction acrosomale	24
1.7.1. Induction de la réaction acrosomale	25

1.7.2.	Détection et mesure de la réaction acrosomale	26
1.8.	La fusion spermatozoïde-ovocyte	27
1.9.	L'infertilité masculine	28
1.10.	Les techniques de reproduction assistée	29
1.11.	La contraception masculine	30
1.12.	Problématique du projet de recherche	30
1.13.	Hypothèse	30
1.14.	Objectifs expérimentaux	31
2.	ARTICLES	32
2.1.	Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals. Fan J, Lefebvre J and Manjunath P. <i>Gene</i>, 375: 63-74, 2006.	32
2.2	Genomic structure and tissue-specific expression of human and mouse genes encoding homologues of the major bovine seminal plasma proteins. Lefebvre J, Fan J, Chevalier S, Sullivan R, Carmona E and Manjunath P. <i>Molecular Human Reproduction</i>, 13(1): 45-53, 2007.	70
2.3.	Recombinant expression and affinity purification of a novel epididymal human sperm-binding protein, BSPH1. Lefebvre J, Boileau G and Manjunath P. <i>Molecular Human Reproduction</i>, 15(2): 105-14, 2009.	105
2.4.	The human Binder of SPerm Protein 1 (BSPH1): Detection in human seminal plasma and sperm extracts, localization to detergent resistant sperm membrane microdomains and effect on sperm capacitation. Lefebvre J and Manjunath P. Sera soumis à <i>Molecular Human Reproduction</i>, 2009.	144
3.	DISCUSSION	181
3.1.	Des séquences apparentées aux BSP sont présentes dans les génomes de souris et d'humain	181
3.2.	L'ARN messager des BSP chez la souris et l'humain est uniquement exprimé dans les épидидymes	183
3.3.	Analyse des séquences de BSPH1, BspH1 et BspH2a	185
3.4.	Production de la protéine BSPH1 recombinante dans <i>E. coli</i>	186
3.4.1.	Fusion aux étiquettes hexa-histidine et glutathion-S-transférase	186
3.4.2.	Expression dans la souche Origami B(DE3)pLysS	187
3.4.3.	Fusion à l'étiquette thiorédoxine	188

3.4.4.	Production extracellulaire de rBSPH1	189
3.4.5.	Clivage de l'étiquette thiorédoxine par l'entérokinase	190
3.5.	Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre BSPH1	191
3.6.	Liaison de rBSPH1 aux liposomes de phosphatidylcholine et à la membrane des spermatozoïdes humains	191
3.7.	Expression de <i>BSPH1</i> dans les cellules de mammifères HEK293	193
3.8.	Détection de BSPH1 native dans le plasma séminal humain et associée aux spermatozoïdes humains	193
3.8.1.	Détection dans le plasma séminal	193
3.8.2.	Détection dans les extraits spermatiques humains	195
3.8.3.	Détection de BSPH1 dans les microdomaines membranaires <i>rafts</i> des spermatozoïdes	195
3.9.	Poids moléculaire de BSPH1 native	197
3.10.	Étude du rôle de BSPH1 dans les fonctions spermatiques	198
4.	CONCLUSIONS	202
5.	PERSPECTIVES	204
6.	BIBLIOGRAPHIE	206

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Structure du spermatozoïde.....	3
Figure 2. Schéma de l'épididyme.	6
Figure 3. Représentation schématique du transfert des protéines des épидидyosomes aux spermatozoïdes épидидymaires.	9
Figure 4. Schéma du système reproducteur de l'homme.	10
Figure 5. Modèle illustrant la séquence possible des évènements lors de la capacitation.	13
Figure 6. Voies de signalisation impliquées dans la capacitation des spermatozoïdes.	15
Figure 7. Structure secondaire d'une protéine BSP (Binder of SPerm).	18
Figure 8. Structure tri-dimensionnelle de BSP1.	19
Figure 9. Mécanisme de la capacitation des spermatozoïdes bovins impliquant les protéines Binder of SPerm (BSP).	20
Figure 10. Schéma du tractus génital de la femme.	22
Figure 11. Schéma montrant la chémoattraction, l'interaction spermatozoïde-ovocyte, la réaction acrosomale et la fusion spermatozoïde-ovocyte.....	23
Figure 12. Schéma de la réaction acrosomale.	25
Figure 13. Profil typique de l'analyse des spermatozoïdes humains par FACS.	200
Tableau 1. Nouvelle nomenclature pour la famille des BSP.	17

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%	pourcentage
μ	micro (10 ⁻⁶)
μg	microgramme
μl	microlitre
°C	degré Celsius
aa	acide aminé
ADAM	« A Disintegrin And Metalloprotease »
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
AS-A	arylsulfatase-A
ATP	adénosine triphosphate
BSA	albumine de serum bovin
BSP	« Binder of Sperm »
BSPH	« Binder of SPerm Homolog »
CRISP	«Cysteine RIch Secretory Protein »
DTT	dithiothréitol
EST	« Expressed Sequence Tag »
FACS	« Fluorescence Activated Cell Sorter »
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
Fn2	domaines de type-II de la fibronectine
GAG	glycosaminoglycane
GPI	glycosyl phosphatidylinositol
GST	glutathion-S-transférase
HDL	lipoprotéine de haute densité (<i>High-Density Lipoprotein</i>)
HEK	« Human Embryonic Kidney »
His ₆	hexahistidine
ICSI	« IntraCyttoplasmic Sperm Injection »
IUI	insémination intrautérine
IVF	fécondation <i>in vitro</i>

kDa	kiloDalton
m	mètre
mM	millimolaire
M	molaire
MIF	« motility inhibitory factor »
RT	transcriptase inverse
PC	phosphatidylcholine
PCR	« polymerase chain reaction »
pH	potentiel d'hydrogène
PKA	protéine kinase A
PNA	agglutinine de <i>Arachis hypogea</i>
PSA	agglutinine de <i>Pisum sativum</i>
sAC	adénylate cyclase soluble
SGG	sulfatogalactosylglycérolipide
SPAM-1	« sperm adhesion molecule 1 »
trx	thiorédoxine
ZP	zone pellucide

REMERCIEMENTS

D'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Puttaswamy Manjunath, pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche et de m'avoir supervisée pendant ma formation doctorale. J'ai acquis énormément d'expérience à plusieurs niveaux au courant de mes études sous sa supervision.

Je remercie aussi tous mes collègues du centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, qui ont fait de mes études doctorales une expérience inoubliable. Plusieurs amitiés se sont façonnées au cours des années, et demeureront une partie importante de ma vie pour les années à venir. Merci à Dr. Annick Bergeron pour avoir révisé rigoureusement mon manuscrit.

Je tiens aussi à remercier ma famille et mes amis, qui m'ont soutenue tout au long de ce périple. Sans vos encouragements, l'atteinte de mon objectif n'aurait pas été possible.

1. INTRODUCTION

La reproduction sexuée chez les mammifères se résume, à sa plus brève expression, à la fécondation d'une cellule reproductrice haploïde femelle (ovocyte) par une cellule reproductrice haploïde mâle (spermatozoïde), afin de produire un zygote diploïde. Ces cellules reproductrices, nommées gamètes, diffèrent des cellules somatiques du reste de l'organisme sous plusieurs aspects. La principale différence est dans leur rôle unique : celui de permettre la propagation de l'espèce. Ces cellules ne se divisent pas et ne remplissent aucune autre fonction dans l'organisme. Selon le chromosome sexuel porté par le spermatozoïde (X ou Y), le zygote donnera lieu à un fœtus de sexe féminin ou masculin. Cette thèse portera uniquement sur le gamète mâle, le spermatozoïde, en suivant son chemin de sa genèse jusqu'au site de fécondation.

1.1. Le spermatozoïde

Les spermatozoïdes, porteurs de la contribution masculine au génome du nouvel être en devenir, sont des cellules ayant pour but unique de féconder l'ovocyte. Ils sont dépourvus de machinerie transcriptionnelle et traductionnelle, une conséquence de leur chromatine hautement condensée et de la présence que d'un cytoplasme résiduel. Toute leur énergie est consacrée à l'atteinte et à la pénétration de l'ovocyte. De ce fait, des mécanismes minutieusement régulés assurent qu'aucune dépense inutile d'énergie n'ait lieu, et garantissent que les spermatozoïdes subissent les modifications appropriées au bon endroit et au bon moment. D'abord, la production de ces cellules spécialisées a lieu à l'intérieur des tubules séminifères des testicules lors d'un processus nommé spermatogenèse. Sans entrer dans les détails, la spermatogenèse implique une série de divisions mitotiques suivies d'une méiose, ainsi qu'une étape finale nommée spermiogenèse, pendant laquelle la chromatine est condensée, les histones remplacées par des protamines et le cytoplasme en grande partie éliminé. La spermatogenèse donne normalement lieu à des proportions égales de spermatozoïdes portant un chromosome X ou Y. Les spermatozoïdes qui émergent des testicules ne subiront plus de modifications de type transcriptionnel ni traductionnel, mais seront sujets à des changements de leur membrane plasmique par l'effet de protéines sécrétées par l'épididyme et le tractus génital femelle. L'ensemble de ces modifications fera en sorte qu'il puisse se rendre jusqu'au lieu de fécondation, l'oviducte (trompes de fallope chez l'humain), reconnaître l'ovocyte,

interagir avec les récepteurs sur la zone pellucide, subir la réaction acrosomale, pénétrer la zone pellucide et, enfin, fusionner sa membrane plasmique avec celle de l'ovocyte.

1.1.1. La morphologie du spermatozoïde

La structure du spermatozoïde se divise grossièrement en deux parties; la tête et le flagelle (Figure 1). La tête comprend le noyau, l'acrosome et la membrane plasmique. L'acrosome est une organelle originaire de l'appareil de Golgi qui est unique au spermatozoïde. Il contient les enzymes hydrolytiques nécessaires à la dégradation des couches externes de l'ovocyte, soient l'acrosine (protéase à sérine) et la hyaluronidase (glycosidase). Outre l'enveloppe nucléaire et la membrane plasmique, le spermatozoïde possède deux membranes additionnelles dû à la présence de l'acrosome; la membrane acrosomale interne (près de l'enveloppe nucléaire) et la membrane acrosomale externe (près de la membrane plasmique) [1]. Tel que mentionné précédemment, le noyau contient de l'ADN extrêmement condensé associé à des protamines, et le complexe ADN-protamine est stabilisé par des ponts disulfure entre les protamines. La membrane plasmique du spermatozoïde contient environ 70% de phospholipides, le sulfatogalactosylglycérolipide (SGG) étant le glycolipide prédominant chez l'humain. Plusieurs changements dans la composition lipidique de la membrane plasmique ont lieu lors de la maturation épидидymaire et la capacitation.

De son côté, le le flagelle se divise en la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (Figure 1). La pièce intermédiaire contient les mitochondries responsables, en partie, de la production de l'ATP nécessaire au mouvement du spermatozoïde. Cette production d'ATP résulte de la phosphorylation oxydative, tandis qu'une deuxième source d'énergie est la glycolyse, qui s'effectue dans la pièce principale. Il a longtemps été supposé que les mitochondries étaient responsables à elles seules de fournir l'énergie nécessaire au mouvement des spermatozoïdes, mais des études récentes ont démontré l'implication de la glycolyse et d'enzymes glycolytiques spécifiques aux spermatozoïdes [2]. Le flagelle comprend aussi l'axonème, composante structurale responsable du mouvement qui contient un réseau de microtubules; les fibres denses externes qui confèrent l'élasticité et la force au flagelle et les protègent contre les dommages; et la gaine fibreuse externe. Bien que les spermatozoïdes de tous les mammifères possèdent ces caractéristiques générales, il existe des différences entre les espèces quant à la taille et la forme de la tête, et la longueur et la taille des composantes du flagelle.

1.1.2. La membrane plasmique des spermatozoïdes

La membrane plasmique des spermatozoïdes est subdivisée en domaines qui diffèrent dans leur composition et leur fonction [1]. Les principaux domaines de la surface de la tête du spermatozoïde sont : l'acrosome antérieur; le segment équatorial, qui recouvre l'acrosome; et la région post-acrosomale. Ensuite, il y a les régions de la membrane recouvrant la pièce intermédiaire, la partie principale et la partie terminale du flagelle. La composition et l'organisation des lipides de la membrane de ces domaines diffèrent, reflétant probablement les fonctions différentes assurées par chacun d'entre eux.

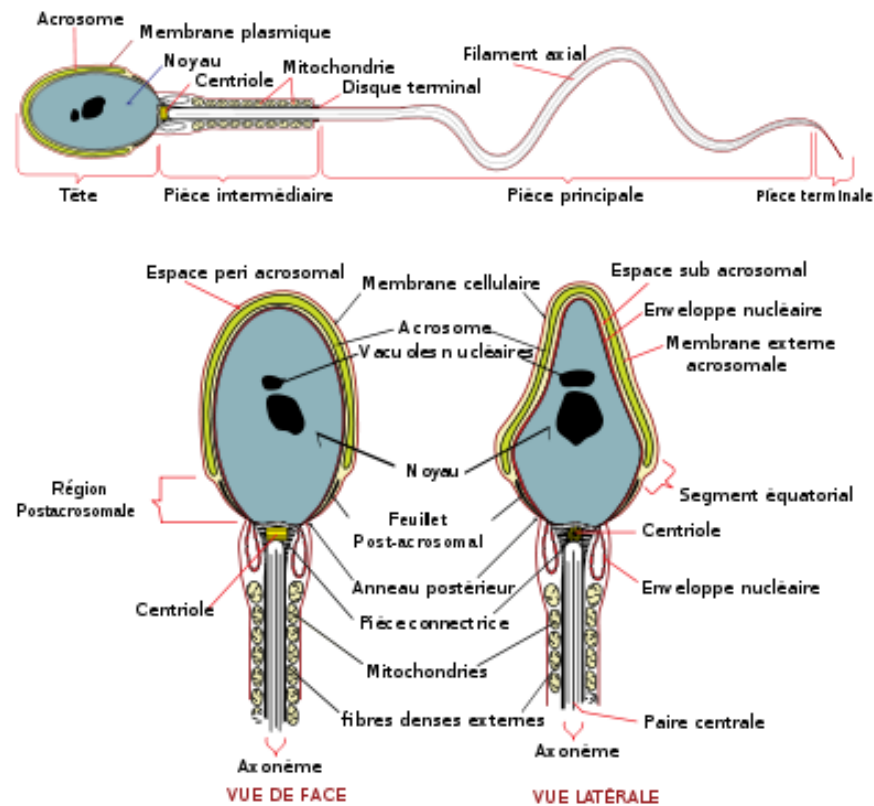


Figure 1. **Structure du spermatozoïde.** Tirée de : http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Complete_diagram_of_a_human_spermatozoa_fr.svg

1.1.3. Les microdomaines membranaires « rafts »

Au courant de la dernière décennie, le concept d'organisation de la membrane plasmique a drastiquement changé. L'idée d'une bicouche lipidique homogène a été réévaluée suite à la découverte de microdomaines membranaires, aussi appelés « lipid rafts », enrichis en cholestérol et en sphingolipides, qui sont présents dans le feuillet externe de la membrane plasmique [3]. Quoique l'existence de ces domaines demeure controversée, les

rafts sont définis comme étant des petits domaines hétérogènes et hautement dynamiques qui servent à compartimentaliser certains processus cellulaires [4]. La nouvelle définition de la membrane plasmique repose plutôt sur l'idée qu'il s'agirait d'une mosaïque de phases ordonnées et désordonnées, les domaines ordonnés étant résistants aux détergents et désignés comme *rafts*. Les *rafts* formeraient des plateformes organisationnelles qui affecteraient la distribution des protéines membranaires, l'activation de récepteurs et le déclenchement de voies de signalisation intracellulaires [5-8]. Plusieurs protéines impliquées dans la signalisation, autant membranaires qu'intracellulaires, sont associées avec ces microdomaines, ce qui indique que les *rafts* serviraient de lieux d'échaffaudage pour la transduction de signaux [9]. Les *rafts* peuvent être isolés des membranes cellulaires en exploitant leur insolubilité à froid dans le détergent Triton X-100, ainsi que leur faible densité de flottaison dans un gradient de sucrose [10]. La majorité des protéines retrouvées dans les *rafts* possèdent une ancre glycosyl phosphatidylinositol (GPI), quoique cette modification post-traductionnelle à elle seule ne détermine pas nécessairement la localisation d'une protéine dans les domaines *rafts*. Des études récentes ont démontré la présence de tels microdomaines dans la membrane plasmique des spermatozoïdes de différentes espèces de mammifères, tels que la souris [11], le cochon d'Inde [11], le taureau [13], le porc [14] et l'humain [15]. Le rôle potentiel de ces domaines dans la fécondation sera discuté dans la section 1.4.2.

1.2. La maturation épидидymaire

Chez la plupart des mammifères, l'ovulation n'est pas synchronisée avec la copulation. De ce fait, une population hétérogène de spermatozoïdes est nécessaire afin de favoriser l'atteinte de l'ovocyte par un spermatozoïde au bon stade de maturation [16]. L'organe masculin principalement responsable du maintien de cette hétérogénéité des gamètes est l'épididyme, dans lequel les spermatozoïdes subissent de nombreux changements et sont entreposés en attendant l'éjaculation. L'épididyme des mammifères est un organe segmenté composé d'un tubule unique, hautement circonvolé, divisé en trois régions; soient la tête, le corps et la queue. Chez l'homme, la longueur de l'épididyme déroulé est d'environ 3 à 4 m, tandis que l'épididyme de l'étalon mesure jusqu'à 80 m. Suite à la spermatogenèse, les spermatozoïdes immatures entrent dans la tête de l'épididyme afin de subir les premières étapes de maturation qui mèneront à l'acquisition de leur pouvoir fécondant [17, 18]. Les principales modifications apportées aux

spermatozoïdes lors de leur transit dans l'épididyme sont : des changements dans la composition lipidique de la membrane plasmique, dont le ratio cholestérol/phospholipides; une augmentation des charges nettes négatives et des ponts disulfure; et l'ajout, l'élimination et la modification de protéines de surface [16].

Chacune des régions de l'épididyme contribue à la concentration, la maturation, le transport et l'entreposage des spermatozoïdes [19, 20]. Ceci est rendu possible grâce à l'expression segmentaire de gènes dans l'épididyme; c'est-à-dire qu'il y a des différences notoires entre la nature et le taux d'expression de gènes dans chaque segment [21-23]. De ce fait, les spermatozoïdes entrent en contact avec un milieu qui diffère considérablement au fur et à mesure qu'ils avancent dans l'épididyme. Il est important de noter que la progression des spermatozoïdes de la tête à la queue de l'épididyme résulte d'un processus passif: n'ayant pas encore de motilité propre, ils suivent le flux des sécrétions épидидymaires. Ceci sert à conserver l'énergie des spermatozoïdes pour leur passage au travers du tractus génital femelle. Suite à leur séjour dans l'épididyme, les spermatozoïdes de mammifères deviennent aptes à se mouvoir, subir la capacitation et interagir avec l'ovocyte. Chez l'humain, le temps de transit épидидymaire est évalué à environ 2 à 6 jours [24], ce qui est plutôt court en comparaison avec un transit de 10 à 13 jours chez d'autres espèces [19]. Cette période correspond au temps qui s'écoule entre l'entrée de la cellule dans la tête de l'épididyme et son stockage dans la partie distale de la queue en attendant l'éjaculation.

Puisque les spermatozoïdes sont des cellules transcriptionnellement et traductionnellement inactives, les étapes de maturation extra-testiculaires ne sont pas contrôlées par le génome spermatique, mais sont plutôt effectuées par l'intermédiaire de protéines sécrétées par l'épithélium épидидymaire, souvent sous le contrôle des androgènes [25]. Ces protéines sont soit ajoutées à la membrane plasmique du spermatozoïde, soit impliquées dans le remodelage des protéines membranaires déjà présentes.

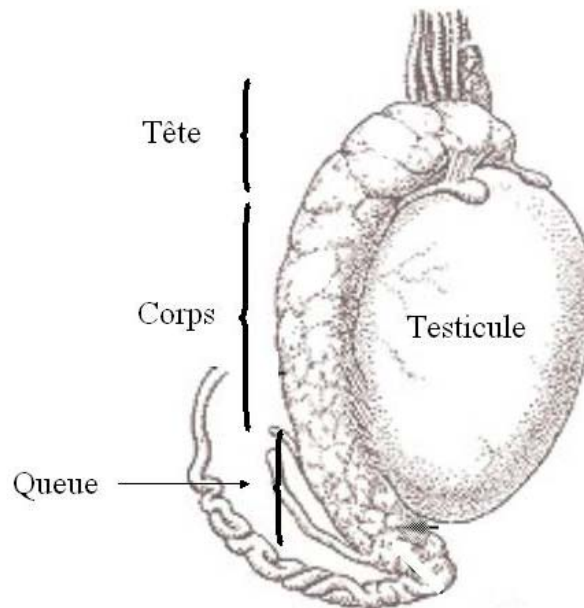


Figure 2. **Schéma de l'épididyme.** L'épididyme est un tubule circonvolé situé au dessus du testicule et divisé en 3 sections (tête, corps, queue) Tirée de : http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c3/Illu_testis_surface.jpg .

1.2.1. Les protéines CRISP

Parmi les protéines sécrétées par l'épithélium épидидymaire et qui se lient à la membrane plasmique des spermatozoïdes, on retrouve les protéines de la famille CRISP (Cysteine-Rich Secretory Proteins). La protéine DE, exprimée dans l'épididyme de rat et aussi connue sous le nom de CRISP1, a été la première protéine de cette famille à être identifiée [26]. CRISP1 de rat (rCRISP1) est synthétisée de manière androgène-dépendante par les cellules de la tête de l'épididyme et s'associe à la membrane plasmique des spermatozoïdes lors de leur maturation épидидymaire [27, 28]. Lors de la réaction acrosomale (voir section 1.7), rCRISP1 se relocalise de la région dorsale de la tête du spermatozoïde vers le segment équatorial [29], région impliquée dans la fusion avec la membrane plasmique de l'ovocyte [30, 31]. Des protéines homologues importantes pour la fécondation ont été décrites chez la souris et chez l'humain [32-35].

1.2.2. La protéine P34H et ses orthologues

Suite à la découverte qu'une protéine présente sur la membrane des spermatozoïdes de hamsters, P26h, montrait une affinité pour les glycoprotéines de la zone pellucide de l'ovocyte de hamster [36], un antigène apparenté, nommé P34H, a été découvert sur la membrane des spermatozoïdes humains [37]. Cette protéine est ajoutée à la membrane

plasmique des spermatozoïdes lors de leur passage dans l'épididyme, et des anticorps anti-P34H inhibent l'interaction avec la zone pellucide d'ovocytes humains [37]. En accord avec l'expression segmentaire de gènes épididymaires, l'ARN messager de P34H est seulement retrouvé au niveau du corps de l'épididyme humain [38]. Lors de l'éjaculation, P34H reste fortement associée aux spermatozoïdes et devient accessible lors de la capacitation; ceci per,et sa liaison à son récepteur situé sur la zone pellucide de l'ovocyte et l'enclenchement de la réaction acrosomale [39]. Des protéines orthologues à P34H existent aussi chez le hamster (P26h) et le taureau (P25b) [40, 41].

1.2.3. L'arylsulfatase A

L'arylsulfatase A (AS-A) est une protéine de liaison à la zone pellucide [42, 43] dotée d'une forte affinité pour le SGG, un glycolipide présent en grande quantité dans la membrane spermatique [44]. L'AS-A se retrouve dans le fluide épididymaire et s'associe avec les spermatozoïdes en transit dans l'épididyme grâce à sa liaison au SGG membranaire [45]. Ensemble, le SGG et l'AS-A sont impliqués dans la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide de l'ovocyte [43].

1.2.4. La protéine SPAM1 (PH-20)

La protéine SPAM1 (sperm adhesion molecule 1), aussi appelée PH-20, est l'antigène spermatique le plus hautement conservé chez les mammifères. SPAM1 se retrouve à la fois associée à la membrane plasmique et à la membrane acrosomale interne des spermatozoïdes [46]. Cette glycoprotéine fait partie de la famille des hyaluronidases et est impliquée dans différents aspects de la fécondation [46-49]. Malgré l'expression forte du gène encodant SPAM1 dans le testicule [50], des transcrits ont aussi été détectés en plus faibles quantités dans l'épididyme [51]. SPAM1 a été détectée dans l'épithélium épididymaire [52] ainsi que dans des vésicules du fluide épididymaire nommées épididymosomes (voir section 1.2.5) [53]. L'expression épididymaire de *SPAM1* a été rapportée chez la souris, le rat, le taureau, le macaque et l'humain [47].

1.2.5. Les épididymosomes

Tel qu'indiqué précédemment, l'épithélium épididymaire sécrète, sous l'influence des androgènes, des protéines qui interagissent avec les spermatozoïdes. Par contre, les mécanismes régissant l'interaction entre les spermatozoïdes et les protéines intraluminales de l'épididyme font encore l'objet de nombreuses études. Les protéines acquises par les

spermatozoïdes sont généralement des protéines périphériques, s'associant à la membrane plasmique par des interactions hydrophobes [54]. Au contraire, plusieurs protéines acquises pendant le transit épидидymaire des spermatozoïdes se comportent comme des protéines intégrales de la membrane plasmique et sont détachables seulement à l'aide de détergents. Ces protéines possèdent une ancre GPI [55, 56]. L'acquisition de ces protéines épидидymaires par la membrane plasmique des spermatozoïdes ne peut être due à la voie de sécrétion classique, puisque les protéines seraient insolubles dans le milieu intraluminal de l'épидидyme. De plus, selon la définition classique de la sécrétion mérocrine, une protéine possédant une ancre GPI doit transiter à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi afin d'être ancrée à la membrane plasmique par le GPI. Une alternative au mode classique de sécrétion, nommée sécrétion apocrine, a été décrite dans certains organes reproducteurs, dont la prostate [57]. Ce mécanisme de sécrétion donne naissance à des vésicules cytoplasmiques qui se détachent du pôle apical des cellules sécrétrices de l'épithélium épидидymaire et entrent dans le liquide intraluminal pour éventuellement libérer leur contenu [58]. Ces vésicules, nommées épидидyosomes, présentent une structure similaire aux exosomes, qui sont denses aux électrons et possèdent un diamètre d'environ 50 à 500 nm.

Les épидидyosomes, vésicules ayant un ratio cholestérol/phospholipides élevé avec la sphingomyéline comme phospholipide majoritaire [16], ont été retrouvés dans le fluide épидидymaire de plusieurs espèces de mammifères, incluant le hamster [56], la souris [59], le rat [60], le taureau [61] et l'homme [62]. Plusieurs des protéines décrites dans les sections précédentes ont été détectées dans les épидидyosomes de différentes espèces, dont CRISP1, P34H et ses orthologues et SPAM1 [61-63]. De plus, plusieurs autres protéines importantes pour la fertilité ont été décrites comme faisant partie de ces exosomes, tel que le « macrophage migration inhibitory factor » (MIF), qui est transloqué des épидидyosomes au flagelle du spermatozoïde en transit [60, 64]; les enzymes aldose reductase et sorbitol déshydrogénase, impliquées dans le voie des polyols et qui modulent la motilité [65, 66]; la protéine HE5, aussi nommée CD52 [67]; et la glutathion peroxidase GPX5 [68, 69].

Très récemment, la présence de microdomaines membranaires *rafts* dans les épидидyosomes bovins a été observée [13]. Cette étude a fait la démonstration du transfert de la protéine P25b, importante pour l'interaction spermatozoïde-ovocyte, depuis les *rafts*

des épидидyosomes vers les *rafts* de la membrane plasmique des spermatozoïdes. De la même façon, la protéine MIF, qui n'est pas associée aux *rafts* dans la membrane spermatique, n'a pas été retrouvée dans les *rafts* des épидидyosomes [70]. Il semblerait donc que les protéines acquises par les spermatozoïdes lors du transit épидидymaire se localisent de manière stratégique dans la membrane plasmique selon leurs fonctions.

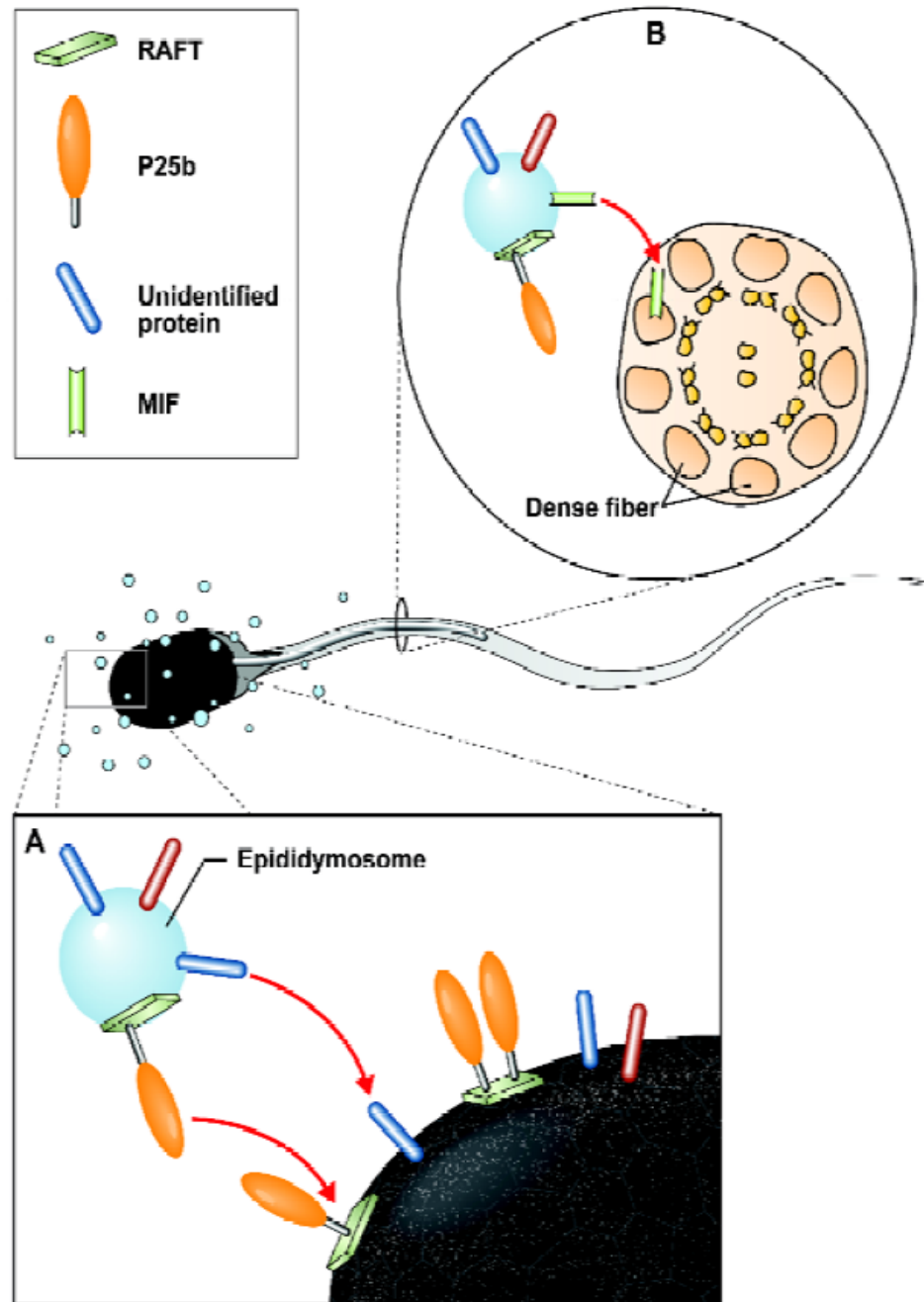


Figure 3. Représentation schématique du transfert des protéines des épидидyosomes aux spermatozoïdes épидидymaires. Tirée de [67].

1.3. L'éjaculation

Une fois le transit épидидymaire terminé, les spermatozoïdes sont stockés dans la partie distale de la queue de l'épididyme, en attente de l'éjaculation. Ce processus peut être divisé en deux parties, soient l'émission séminale et l'état d'excitation du système nerveux central [71]. L'émission séminale se définit comme la sortie de liquide séminal du pénis sans pulsations, tandis que l'éjaculation comme telle implique des mécanismes pulsatiles, et accompagne normalement l'orgasme. Pendant le processus d'éjaculation, les spermatozoïdes matures de la queue de l'épididyme, déjà en suspension dans des sécrétions testiculaires et épидидymaires, passent dans le canal déférent et sont mêlés aux sécrétions des glandes accessoires, dont la prostate et les vésicules séminales (Figure 4).

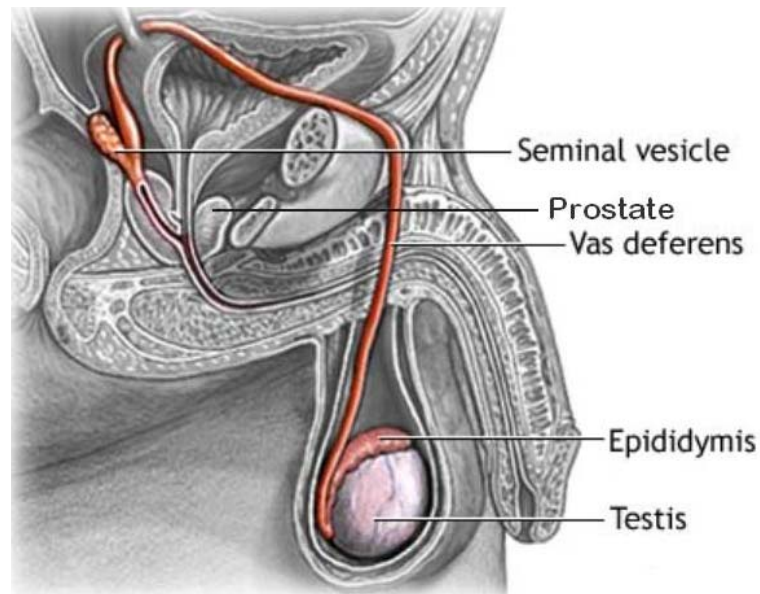


Figure 4. **Schéma du système reproducteur de l'homme.** Tirée de : http://assets.aarp.org/external_sites/adam/graphics/images/en/19073.jpg

Puisque la maturation épидидymaire requiert une durée minimale fixe, des éjaculations répétées mènent à une déplétion des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme sans affecter les nombres retrouvés dans la tête et le corps. La queue de l'épididyme humain ne possède pas une très grande capacité de stockage (correspondant à moins de deux éjaculats) [72]; donc, suite à des éjaculations répétées, l'éjaculat humain ne contient que très peu de spermatozoïdes.

Chez l'humain, l'éjaculat est déposé dans le vagin, près du col de l'utérus [73]. Les spermatozoïdes doivent donc traverser la glaire cervicale afin de pouvoir atteindre la cavité

utérine et ensuite se rendre jusqu'au site de fécondation. Au contraire, chez certaines espèces telles que les rongeurs, les cochons et les chevaux, l'éjaculat est déposé directement dans l'utérus, éliminant ainsi la barrière cervicale [73]. Chez les primates, immédiatement après l'éjaculation, le plasma séminal coagule et forme un gel semi-solide qui se liquéfie spontanément après environ 20 minutes [74]. La coagulation du plasma séminal humain est causée par l'action de protéases prostatiques qui agissent sur des protéines séménogélines sécrétées par les vésicules séminales, tandis que la liquéfaction est assurée par l'action prolongée des protéases. Chez les rongeurs, la coagulation de la semence est plus prononcée, formant un bouchon vaginal communément appelé « plug », utilisé comme indice visuel d'une copulation récente. Le rôle de la coagulation de la semence serait d'empêcher les spermatozoïdes de ressortir du tractus génital femelle, de favoriser le transport des spermatozoïdes au travers de la glaire cervicale et d'agir en tant que réservoir de spermatozoïdes qui sont relâchés graduellement.

1.3.1. Le plasma séminal

Le plasma séminal désigne la partie fluide de l'éjaculat; c'est-à-dire le liquide dans lequel baignent les spermatozoïdes. Ce liquide provient en grande partie des vésicules séminales (environ 60%) et de la prostate (30%) [75]. Les sécrétions des vésicules séminales étant plutôt alcalines, et celles de la prostate étant légèrement acides, il en résulte un pH du plasma séminal qui se situe entre 7,35 et 7,50 [76]. Ce pH légèrement alcalin assure la protection des spermatozoïdes dans le milieu acide du vagin (pH ~ 5). Le plasma séminal contient une concentration élevée de fructose, nutriment majeur des spermatozoïdes pendant leur séjour dans le tractus génital femelle. Il contient aussi de nombreuses protéines, la concentration protéique du plasma séminal humain variant entre 35 et 55 g/L. Le volume usuel d'un éjaculat humain est de 2 à 4 ml, avec une concentration spermatique considérée « normale » à partir de 20×10^6 spermatozoïdes par millilitre. Certaines protéines du plasma séminal jouent un rôle dans les étapes de maturation ayant lieu à l'intérieur du tractus génital femelle, l'ensemble desquelles se nomme capacitation.

1.4. La capacitation

Au moment de l'éjaculation, les spermatozoïdes de mammifères sont encore inaptes à la fécondation d'un ovocyte. Ils acquièrent la totalité de leur pouvoir fécondant suivant un séjour dans le tractus génital femelle, pendant lequel de nombreux changements

biochimiques et physiologiques surviennent, faisant tous partie d'un processus globalement appelé capacitation. Malgré sa découverte il y a plus de 50 ans par les équipes de recherche de Chang [77] et Austin [78], le processus de capacitation demeure encore mal compris. Cette combinaison d'événements séquentiels et concomitants, qui ciblent principalement la membrane plasmique du spermatozoïde, implique : la perte de composantes originaires du plasma séminal; la modification de la composition lipidique de la membrane plasmique; l'augmentation de la perméabilité au calcium; l'augmentation du pH intracellulaire; la redistribution des composantes de surface; l'augmentation de la motilité (hyperactivation); l'élévation de la concentration intracellulaire en AMP cyclique (AMPC); et l'induction de la phosphorylation sur tyrosines de protéines spermatiques [79, 80]. L'ordre dans lequel ces événements ont lieu n'est pas encore certain, mais plusieurs études menées par différents groupes permettent de proposer l'ordre plausible présenté à la figure 5.

Autant la tête du spermatozoïde (préparation pour la réaction acrosomale) que le flagelle (modifications de la motilité) sont affectés par la capacitation. La totalité des spermatozoïdes d'un éjaculat ne subissent pas la capacitation de manière synchrone, contribuant encore une fois au maintien d'une population hétérogène de gamètes, assurant sur une longue période la présence constante de spermatozoïdes prêts à féconder. Selon l'espèce, le temps nécessaire pour atteindre l'état de capacité diffère, variant d'une à deux heures chez la souris à six à sept heures chez l'humain [81]. Seulement les spermatozoïdes qui auront complété la capacitation au bon endroit du tractus génital femelle et au bon moment pourront subir la réaction acrosomale suite au contact avec les couches externes de l'ovocyte. Dans l'état actuel des connaissances, la façon la plus couramment utilisée pour mesurer la capacitation *in vitro* est d'induire la réaction acrosomale à l'aide d'agents physiologiques ou non-physiologiques (décrits dans la section 1.7.1). Les changements engendrés chez le spermatozoïde lors de la capacitation sont difficiles à détecter par microscopie, tandis que l'exocytose de l'acrosome est facilement détectable. Puisque la réaction acrosomale ne surviendrait que chez les spermatozoïdes capités, cette mesure indirecte de la capacitation est largement acceptée [79]. De plus amples détails sur la réaction acrosomale sont présentés à la section 1.7.

Quoique le site exact de la capacitation *in vivo* varie d'une espèce à l'autre, plusieurs études ont conclu que la capacitation est plus efficace lorsque les spermatozoïdes traversent l'utérus et l'oviducte. Les sécrétions recueillies de l'oviducte de femelles en période

ovulatoire s'avèrent les plus efficaces pour induire la capacitation [31]. Les spermatozoïdes de mammifères peuvent aussi subir la capacitation *in vitro*, suite à une incubation dans un milieu défini, contenant des sources d'énergie, des électrolytes et un accepteur de cholestérol. Cet accepteur est souvent l'albumine, protéine majeure des sécrétions du tractus génital femelle [82].

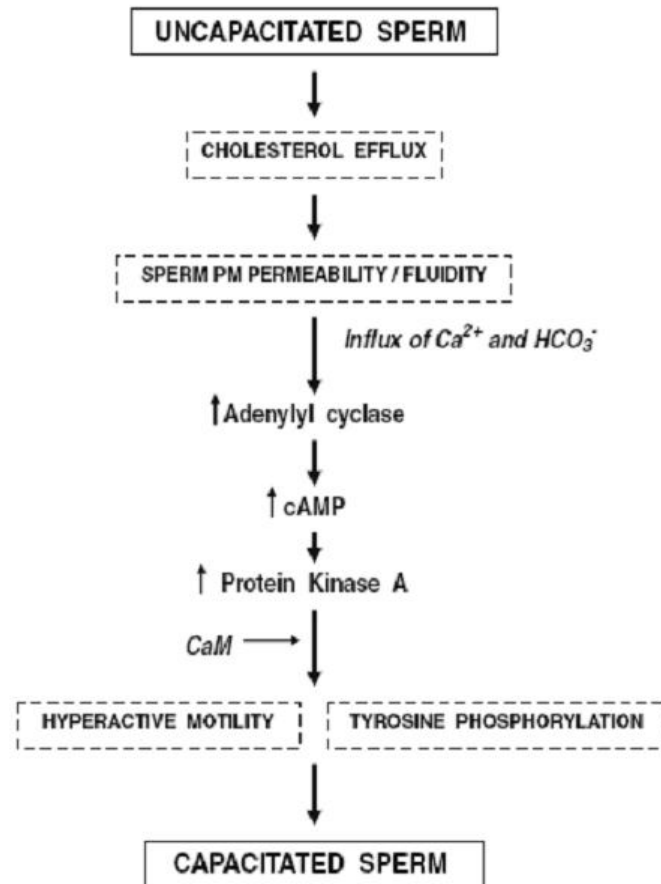


Figure 5. **Modèle illustrant la séquence possible des évènements lors de la capacitation.** Tirée de [83]

1.4.1. L'efflux de cholestérol membranaire

Un événement précoce de la capacitation est la perte de cholestérol par la membrane plasmique des spermatozoïdes [84]. Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes ont un ratio cholestérol/phospholipide élevé. Ce ratio diminue lors de la capacitation. Ceci résulte d'un mouvement du cholestérol membranaire vers des accepteurs lipidiques solubles. Ce mouvement est appelé efflux. Les accepteurs de cholestérol diffèrent d'une espèce à l'autre et incluent l'albumine, les lipoprotéines de haute densité (HDL) et les protéines de la

famille « Binder of SPerm » (BSP) (voir section 1.4.7). Puisque le cholestérol a un effet stabilisant sur les membranes [85], son efflux provoque une déstabilisation de la membrane plasmique et une augmentation de sa fluidité, ce qui contribue à l'état capacité du spermatozoïde qui se prépare à subir la réaction acrosomale.

1.4.2. La ré-organisation des microdomaines membranaires « rafts »

Des manipulations expérimentales telles que le traitement de cellules avec la β -cyclodextrine, qui provoque l'efflux de cholestérol membranaire, perturbent la signalisation intracellulaire [5]. Ceci a aussi été observé chez les cellules reproductrices [86]. Tel que décrit dans la section précédente, les spermatozoïdes perdent de leur cholestérol membranaire lorsqu'ils subissent la capacitation. Cet efflux de cholestérol contribue au déclenchement de la voie de signalisation AMPc-dépendante, qui mène à la phosphorylation sur tyrosines de certaines protéines spermatiques, et peut être mimée par l'ajout de β -cyclodextrine à un milieu qui ne supporte pas la capacitation [87]. Contrairement à d'autres types cellulaires, la perte de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes est corrélée avec l'activation de la signalisation. Ces changements pourraient être nécessaires afin de stimuler la phosphorylation sur tyrosines [87, 88] ou pour permettre la réaction acrosomale [89]. Des essais d'immunobuvardage sur des protéines de la membrane de spermatozoïdes murins non-capacités versus capacités ont démontré un déplacement de certaines protéines entre les microdomaines *rafts* détergent-insolubles et les fractions détergent-solubles [90, 91]. Une réorganisation des *rafts* a aussi été démontrée pendant la capacitation des spermatozoïdes humains [15].

1.4.3. Le rôle du bicarbonate

Le bicarbonate est un constituant important du milieu entourant les spermatozoïdes afin de permettre la capacitation. Par conséquent, les concentrations de cet ion sont plutôt faibles dans le fluide épидидymaire [92] et plus élevées dans le plasma séminal et dans le tractus génital femelle [93], ce qui prévient la capacitation précoce des spermatozoïdes dans l'épididyme. L'entrée du bicarbonate dans les spermatozoïdes est assurée par un co-transporteur membranaire $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ et induit l'augmentation du pH intracellulaire. Le bicarbonate contribue aussi à l'activation de l'adénylate cyclase soluble (sAC) [94] afin d'augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc, ce qui permet l'activation de la protéine kinase A (PKA), conduisant à la phosphorylation sur tyrosines de protéines

spermatiques [95]. Les voies de signalisation soupçonnées d'être impliquées dans la capacitation sont schématisées dans la figure 6.

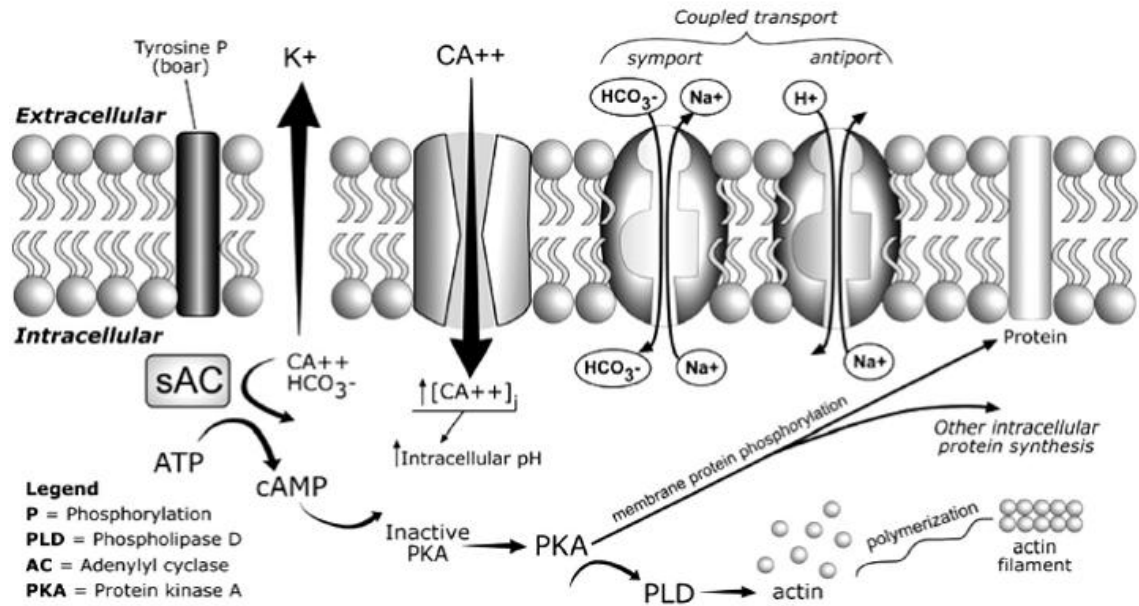


Figure 6. Voies de signalisation impliquées dans la capacitation des spermatozoïdes. Tirée de [96].

1.4.4. Le rôle du calcium

L'influx de calcium joue un rôle important dans la capacitation en contribuant directement à l'activation de la sAC, ce qui induit l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc, menant à l'activation de la PKA et de la phosphorylation sur tyrosines. Cette entrée de calcium cause aussi une hyperpolarisation de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Suite à une incubation de deux heures dans un milieu supportant la capacitation, la concentration intracellulaire de calcium dans les spermatozoïdes humains augmente de 70 à 250 nM [97]. Le calcium a aussi été démontré comme étant nécessaire à la capacitation de spermatozoïdes d'autres espèces telles que le taureau et le porc [98, 99]. L'entrée du calcium dans la cellule serait rendue possible grâce à l'augmentation de la perméabilité et de la fluidité de la membrane plasmique causée par l'efflux de cholestérol (Figure 5). Des canaux calciques voltage-dépendants de la membrane plasmique permettraient l'entrée de l'ion en même temps que l'inactivation de l'ATPase à calcium et la pompe sodium-calcium [100]. Les canaux calciques voltage-dépendants CatSper 1 et 2 sont localisés dans le flagelle, et les spermatozoïdes provenant

de souris déficientes en ces canaux ne présentent pas de motilité hyperactivée (voir section 1.4.5) et sont infertiles [101].

1.4.5. L'hyperactivation

Le terme hyperactivation est employé afin de décrire l'augmentation de la motilité que subissent les spermatozoïdes précédant la fécondation. Il s'agit d'une des étapes tardives de la capacitation, qui est caractérisée par un battement vigoureux et accéléré du flagelle [31]. L'hyperactivation a été observée chez toutes les espèces de mammifères étudiées jusqu'à présent [102]. Il y a des arguments convaincants indiquant que l'hyperactivation est requise pour qu'un spermatozoïde puisse pénétrer la zone pellucide. Cette augmentation de la motilité est principalement engendrée par une augmentation du calcium intracellulaire dans le flagelle, rendue possible par des canaux calciques membranaires appelés canaux CatSper [103]. En plus d'aider les spermatozoïdes à traverser le mucus visqueux de l'oviducte, l'hyperactivation aiderait le spermatozoïde à pénétrer la couche de cellules de cumulus entourant l'ovocyte, avec l'action concertée de l'hyaluronidase acrosomale [102].

1.4.6. Le réservoir oviductal de spermatozoïdes

Chez plusieurs mammifères, il y a formation d'un réservoir de spermatozoïdes qui s'attachent à l'épithélium de l'oviducte, près du site de fécondation [104]; les études démontrent que cet attachement prolonge leur durée de vie motile [105, 106]. Chez certaines espèces, il a été démontré que l'interaction implique une protéine exposée à la surface du spermatozoïde et un récepteur glycosylé de l'épithélium oviductal [104]. Chez le bovin, l'identité des protéines spermatiques responsables de l'attachement à l'épithélium a été déterminée et il s'agirait des protéines de la famille des BSP (voir la section 1.4.7) [106, 107]. Les récepteurs de l'épithélium oviductal qui lient les protéines BSP contiendraient du fucose et ont été identifiés comme faisant partie de la famille des annexines [108]. Lors de la capacitation, au moins un membre de la famille des BSP est perdu de la membrane des spermatozoïdes bovins [107], faisant en sorte que l'affinité des spermatozoïdes pour l'épithélium oviductal diminue. De façon concomitante à cette perte d'affinité pour les récepteurs épithéliaux, les spermatozoïdes deviendraient hyperactivés, ce qui leur permettrait de se détacher de l'épithélium et d'atteindre l'ovocyte. Quoiqu'il soit difficile d'étudier ce phénomène chez l'humain, des études *in vitro* ont fourni des indices de

formation d'un réservoir oviductal de spermatozoïdes et que l'hyperactivation serait nécessaire à leur détachement. Le détachement asynchrone des spermatozoïdes de l'épithélium oviductal contribuerait au maintien d'une population hétérogène de gamètes [109].

1.4.7. Le rôle des protéines *Binder of SPerm* (BSP)

Le plasma séminal de plusieurs espèces de mammifères contient des protéines de la famille des *Binder of SPerm* (BSP), anciennement appelée Bovine Seminal Plasma proteins. La définition de l'acronyme BSP a récemment été changée afin d'être en accord avec les normes de nomenclature [110]. Pour la suite du texte, les nouveaux noms attribués aux gènes et aux protéines de la famille des BSP seront utilisés. Par contre, deux des articles du second chapitre ont été publiés avant la modification de la nomenclature; alors par esprit de clarté, le Tableau 1 présente les anciennes et les nouvelles appellations des membres de cette famille. Le rôle des BSP dans la capacitation des spermatozoïdes a été étudié en détails chez l'espèce bovine [111]. À l'éjaculation, les protéines BSP interagissent avec les phospholipides portant un groupement choline de la membrane plasmique [112, 113] et y restent liées jusqu'au site de fécondation dans l'oviducte.

Tableau 1. **Nouvelle nomenclature pour la famille des BSP.** (adaptée de [110])

GenBank or Ensembl accession numbers	Species	Existing gene symbol	Proposed gene symbol	Proposed gene name	Aliases
NP_001001145	<i>Bos taurus</i>	<i>PDC-109^a</i>	<i>BSP1</i>	Binder of sperm 1	<i>PDC109^a</i> , <i>SVSP109^b</i> , <i>BSP-A1/A2</i>
NP_777265	<i>Bos taurus</i>	<i>SVS8^c</i>	<i>BSP3</i>	Binder of sperm 3	<i>BSP-A3</i>
ENSBTAG00000023432*	<i>Bos taurus</i>	<i>BSPH4</i>	<i>BSP4</i>	Binder of sperm 4	
NP_777267	<i>Bos taurus</i>	<i>BSPH1^d</i>	<i>BSP5</i>	Binder of sperm 5	<i>BSP-30kDa</i>
ENSBTAG00000004042*	<i>Bos taurus</i>	<i>BSPH5</i>	<i>BSPH1</i>	Binder of sperm homolog 1	
ENSBTAG000000040054*	<i>Bos taurus</i>	<i>BSPH6</i>	<i>BSPH2</i>	Binder of sperm homolog 2	
NA [†]	<i>Canis familiaris</i>	<i>CDK105</i>	<i>BSP1</i>	Binder of sperm 1	
NP_001075402	<i>Equus caballus</i>	<i>SPT^e</i>	<i>BSP1</i>	Binder of sperm 1	<i>SP-1^e</i> , <i>HSP1^e</i>
NP_001075347	<i>Equus caballus</i>	<i>SP2^f</i>	<i>BSP2</i>	Binder of sperm 2	<i>SP-2^f</i> , <i>HSP2^f</i>
NP_001121798	<i>Homo sapiens</i>	<i>hBSPH1</i>	<i>BSPH1</i>	Binder of sperm homolog 1	
ENSPTRG00000011220*	<i>Pan troglodytes</i>	<i>pBSPH1</i>	<i>BSPH1</i>	Binder of sperm homolog 1	
NP_001028590	<i>Mus musculus</i>	<i>mBSPH1</i>	<i>Bsph1</i>	Binder of sperm homolog 1	
XP_001079751	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>rBSPH1</i>	<i>Bsph1</i>	Binder of sperm homolog 1	
NP_001074411	<i>Mus musculus</i>	<i>mBSPH2</i>	<i>Bsph2a</i>	Binder of sperm homolog 2a	
NA [†]	<i>Mus musculus</i>	<i>mBSPH3</i>	<i>Bsph2b</i>	Binder of sperm homolog 2b	
NA [†]	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>rBSPH2</i>	<i>Bsph2</i>	Binder of sperm homolog 2	
NP_001075516	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<i>EP52C1^g</i>	<i>BSP1</i>	Binder of sperm 1	<i>EP52-C1^g</i>
NP_998997	<i>Sus scrofa</i>	<i>pB1^h</i>	<i>BSP1</i>	Binder of sperm 1	

Les propriétés biochimiques, structurales et moléculaires des protéines BSP ont été largement étudiées [114-116]. À l'exception d'une des protéines bovines, les protéines de cette famille sont plutôt petites, ayant un poids moléculaire d'environ 15 kDa [117, 118].

Ce sont presque toutes des protéines acides, avec des points isoélectriques variant de 4 à 5 [119], sauf pour la protéine porcine, qui a un point isoélectrique de 8,6 [120]. Quant aux modifications post-traductionnelles, le degré de glycosylation varie d'une protéine à l'autre [121], mais ne semble pas être essentiel pour que les protéines BSP exercent leur fonction dans la capacitation. En fait, malgré l'absence de glycosylation sur la protéine bovine BSP3, elle remplit les mêmes fonctions biologiques que les autres membres de la famille, BSP1 et BSP5, qui elles sont glycosylées. La signature structurale de cette famille de protéines est la présence d'un domaine N-terminal variable suivi de deux domaines de type-II, semblables aux domaines de liaison au collagène de la fibronectine (domaines Fn2), conservés et répétés en tandem. Ces domaines contiennent quatre cystéines chacun, qui forment deux ponts disulfure par domaine (Figure 7). Chaque protéine BSP contient donc quatre ponts disulfure. Les domaines Fn2 sont responsables de la liaison des protéines BSP aux HDL [122], aux glycosaminoglycans [123], aux phospholipides portant un groupement choline [112], au collagène et à la gélatine [118]. La structure tri-dimensionnelle de la protéine BSP1 liée à la phosphatidylcholine est présentée à la figure 8, et a été décrite dans un article rapportant sa cristallisation [124].

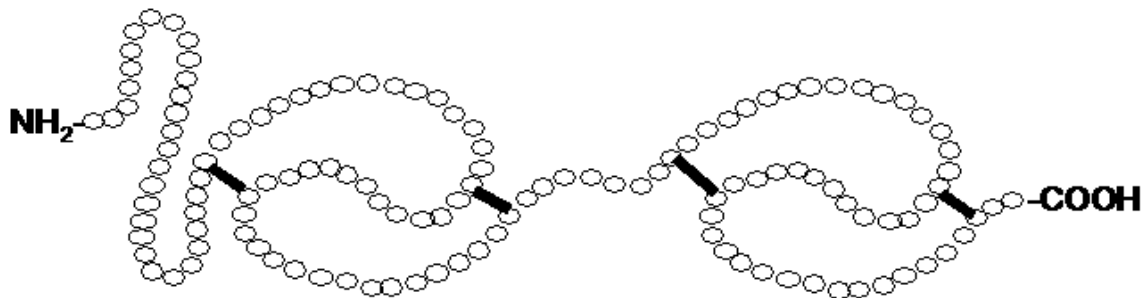


Figure 7. **Structure secondaire d'une protéine BSP (Binder of SPerm)**. Les quatre ponts disulfure sont représentés par des lignes noires. Adaptée de [121].

Des protéines homologues aux BSP sont aussi présentes dans le plasma séminal du porc, de l'étalon, du bouc, du bélier et du bison (pour une revue, voir [121]). Chez toutes ces espèces, les protéines BSP sont présentes en quantités relativement importantes dans le fluide séminal, variant de 1% à 60% des protéines totales du plasma séminal, selon l'espèce. Par conséquent, il a été possible d'étudier leurs fonctions biologiques suite à l'isolement du plasma séminal des protéines natives par chromatographie d'affinité [125-127]. Des antigènes apparentés aux BSP sont aussi présents chez le rat, la souris, et

l'humain, mais leur concentration dans le fluide séminal de ces espèces semble être beaucoup plus faible [128]. Le rôle des protéines BSP dans les fonctions spermatiques chez les rongeurs et chez l'humain n'a donc pas encore été étudié.

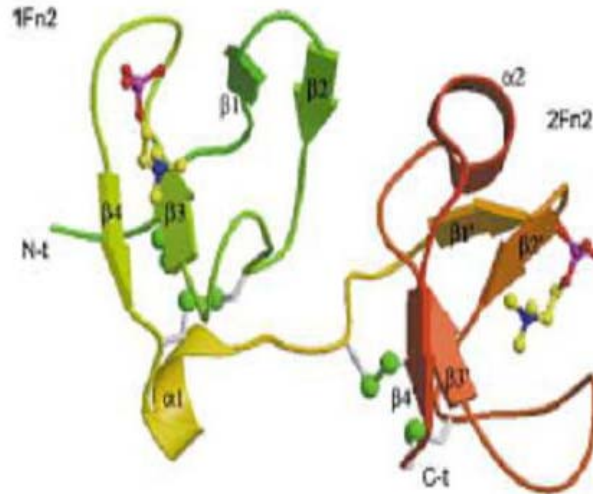


Figure 8. **Structure tri-dimensionnelle de BSP1.** Tirée de [124].

Chez le bovin, deux mécanismes de capacitation impliquant les protéines BSP ont été proposés (Figure 9) [121]. Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes entrent en contact avec le plasma séminal contenant les protéines BSP et ce, pour une courte durée d'environ 20 à 30 minutes. Cette interaction provoquerait un premier efflux lipidique, qui contribuerait à une légère déstabilisation de la membrane plasmique. La liaison des BSP aux phospholipides porteurs d'un groupement choline-de la membrane plasmique des spermatozoïdes ferait en sorte qu'une certaine quantité de ces protéines enroberait la membrane et pourrait la re-stabiliser lors du passage des spermatozoïdes au travers du mucus cervical. Une fois rendues au site de fécondation, les protéines BSP interagiraient avec les HDL et avec les glycosaminoglycans des fluides folliculaire et oviductal. L'interaction des BSP avec les HDL permettrait de stimuler l'efflux de cholestérol membranaire, tandis que leur interaction avec les glycosaminoglycans induirait l'activation de la voie de signalisation intracellulaire sAC/AMPC/PKA, menant à la phosphorylation sur tyrosines. Par conséquent, les protéines BSP contribuent de façon significative à l'état capacité des spermatozoïdes bovins [111, 121]. L'importance des homologues des BSP dans la capacitation des spermatozoïdes porcins a aussi été démontrée [127], tandis que leur rôle dans ce processus chez les autres espèces mentionnées précédemment est probable mais reste à être vérifié.

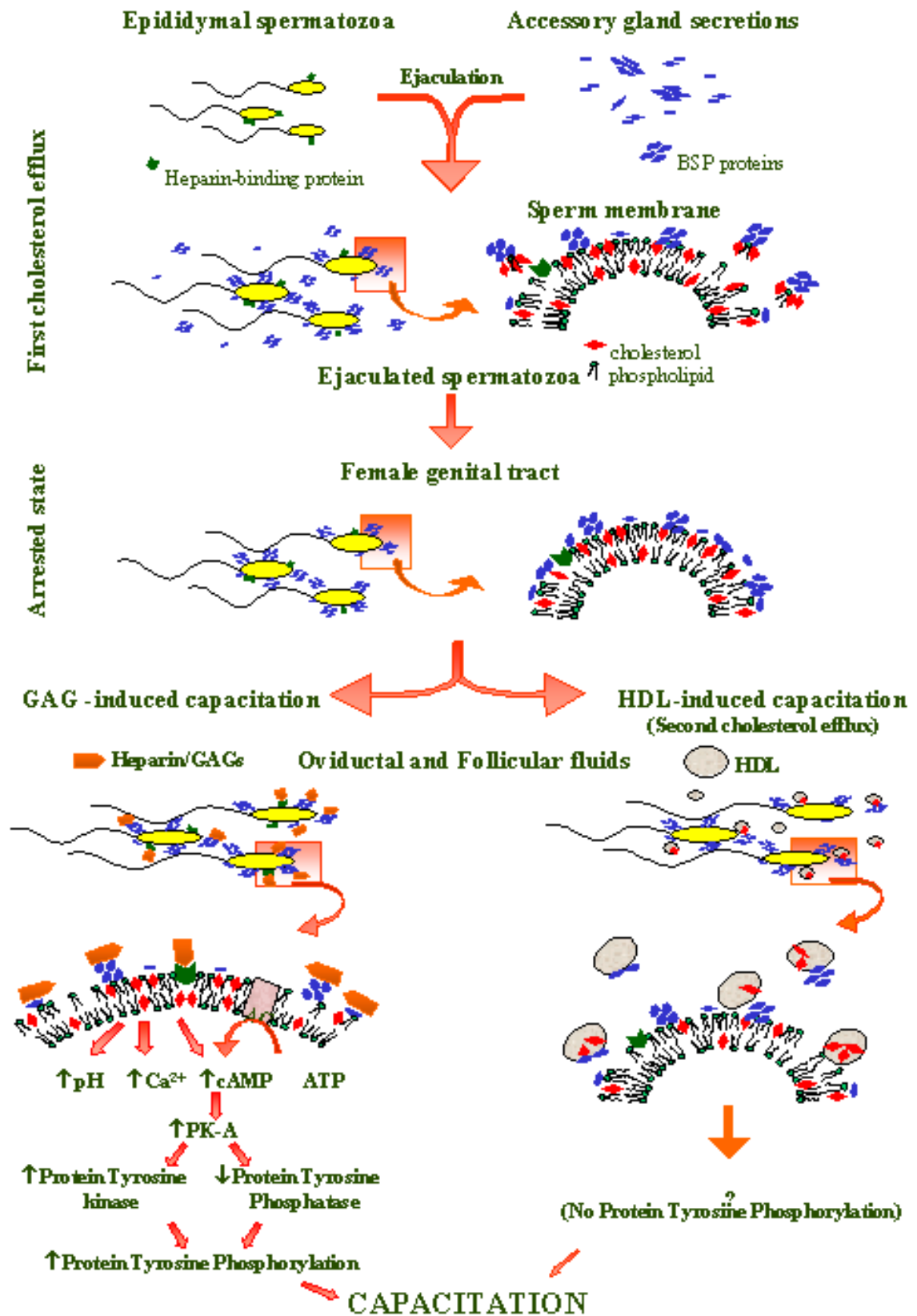


Figure 9. Mécanisme de la capacitation des spermatozoïdes bovins impliquant les protéines Binder of Sperm (BSP). Tirée de [121].

Bien que la stimulation de l'efflux de cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes par les protéines BSP soit bénéfique pour la fécondation, elle peut s'avérer néfaste dans le contexte de la conservation des spermatozoïdes pour l'insémination artificielle [129]. Un contact continu des spermatozoïdes avec les BSP engendre une perte trop importante de cholestérol membranaire, ce qui fragilise considérablement la membrane et la rend vulnérable aux chocs dûs au froid. Afin d'être cryopréservés, les spermatozoïdes de plusieurs mammifères sont d'abord dilués dans un milieu contenant un agent protecteur tel que le lait ou le jaune d'œuf. Il a récemment été démontré que le mécanisme par lequel ces composés protègent les spermatozoïdes implique la séquestration d'une grande partie des protéines BSP, ce qui les empêcherait de provoquer un efflux continu de cholestérol membranaire [130].

Une étude récente a proposé un rôle supplémentaire pour les protéines BSP, soit dans le contrôle du volume cellulaire pendant la maturation [131]. Lorsque les spermatozoïdes avancent dans l'épididyme, et surtout lors de l'éjaculation, ils sont sujets à des changements considérables dans l'osmolarité de leur environnement. Chez le bovin, l'osmolarité du fluide de la queue de l'épididyme est d'environ 353 mOsmkg^{-1} , comparé à 286 mOsmkg^{-1} dans le plasma séminal [132]. Plusieurs études ont examiné la façon dont les spermatozoïdes, tout comme plusieurs types cellulaires somatiques, arrivent à contrôler le gonflement engendré par des chocs osmotiques [133]. Lorsqu'incubés avec la protéine BSP1, protéine majeure du plasma séminal bovin, les spermatozoïdes épидидymaires bovins acquièrent une capacité augmentée à réguler leur volume cellulaire. Par contre, puisque les BSP ne sont pas exprimées dans l'épididyme chez l'espèce bovine, cette propriété n'est peut-être pas physiologique en ce qui a trait aux spermatozoïdes épидидymaires. Toutefois, il est possible que les BSP soient impliquées dans la régulation du volume cellulaire des spermatozoïdes lors de l'éjaculation et de leur transit dans l'appareil reproducteur féminin.

1.5. La chémoattraction des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes éjaculés dans le tractus génital femelle sont attirés par des facteurs chimiques libérés par l'ovocyte; un processus nommé chémoattraction. Malgré des études poussées chez les invertébrés marins, l'état des connaissances sur la chémoattraction des spermatozoïdes de mammifères demeure encore rudimentaire. La croyance générale, pendant de nombreuses années, était que les millions de spermatozoïdes déposés dans l'appareil reproducteur féminin compétitionnaient pour atteindre et féconder l'ovocyte.

Cependant, seuls quelques milliers de spermatozoïdes arrivent à entrer dans l'oviducte [134, 135], et parmi eux, seuls une centaine atteignent le site de fécondation (voir Figure 10). Il y a près de vingt ans, deux groupes de recherche indépendants ont établi que le fluide folliculaire contenait des substances qui entraînaient la chémoattraction des spermatozoïdes *in vitro* [136, 137]. Plus récemment, il a été démontré que l'ovocyte ainsi que la couche de cellules de cumulus qui l'entourent sécrètent des facteurs chémoattractants [138]. Quoiqu'il soit très difficile d'étudier ce phénomène *in vivo*, plusieurs candidats ont été proposés comme étant responsables de l'attraction du spermatozoïde par l'ovocyte. Parmi eux, on compte les molécules odorantes, la progestérone ainsi que certaines chémokines [139].

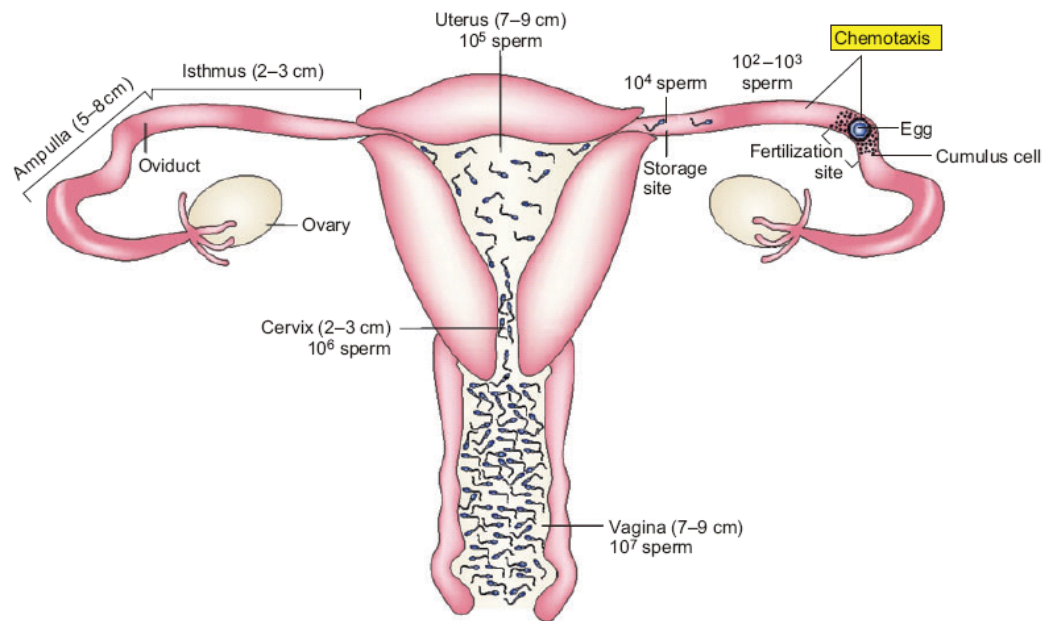


Figure 10. Schéma du tractus génital de la femme. Tirée de [140].

1.6. L'interaction spermatozoïde-ovocyte

Lorsqu'un spermatozoïde arrive au site de fécondation, il doit reconnaître l'ovocyte par l'entremise d'une interaction entre une/des protéines exposées à sa surface et un/des récepteurs présents sur la zone pellucide de l'ovocyte (Figure 11). Cette interaction doit être spécifique, puisque le spermatozoïde entretiendra une interaction beaucoup plus forte avec cette cellule qu'avec toutes les autres cellules rencontrées au cours de son transit dans l'appareil génital femelle. La zone pellucide (ZP) constitue une matrice de glycoprotéines extracellulaires qui entoure les ovocytes de tous les mammifères. Chez l'humain, la ZP est

composée de quatre glycoprotéines sulfatées, nommées ZP1, ZP2, ZP3 et ZPB [141]. Des expériences chez la souris ont démontré que ZP3 serait le ligand primaire des spermatozoïdes [142, 143], tandis que ZP2 serait un ligand secondaire pour les spermatozoïdes acrosome-réagis et serait important pour prévenir la polyspermie (pénétration de l'ovocyte par plus d'un spermatozoïde) [144, 145]. De son côté, ZP1 contribuerait à l'intégrité structurale de la matrice de la ZP [146-148]. Les souris femelles déficientes en ZP3 produisent des ovocytes sans ZP et sont infertiles [149, 150].

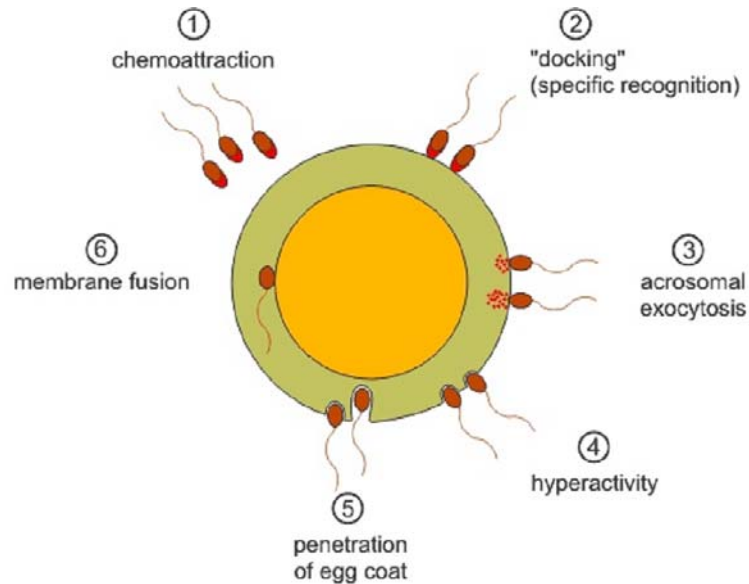


Figure 11. **Schéma montrant la chémoattraction, l'interaction spermatozoïde-ovocyte, la réaction acrosomale et la fusion spermatozoïde-ovocyte.** Tiré de : www.fz-juelich.de/isb/isb-1/Sperm_Physiology

Du côté du spermatozoïde, les protéines exposées à sa surface interagiraient avec les composantes de la ZP, notamment ZP3. La ou les protéines spermatiques responsables de l'interaction font toujours l'objet d'investigation. Plusieurs études ont démontré l'inhibition *in vitro* de l'interaction entre spermatozoïdes et ovocytes par l'ajout d'anticorps ciblant des protéines de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Par exemple, plusieurs des protéines décrites dans la section 1.2, dont les protéines CRISP [151], la protéine P34H et ses orthologues [37] ainsi que le complexe SGG/ASA [43] ont été démontrées comme étant impliquées dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte de cette manière. Une autre protéine, la β -1,4-galactosyltransférase (GalT), a été largement étudiée et était soupçonnée d'être le ligand spermatique de ZP3 [152, 153]. Cependant, malgré toutes les données *in vitro* impliquant ces molécules dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte, la validité de chaque

candidat a été remise en question suite à des analyses plus poussées. Par exemple, l'interruption du gène encodant la GalT [154], ainsi que de celui encodant l'ASA [155], n'a pas mené à l'infertilité des souris. La croyance actuelle est qu'aucune molécule ne serait responsable à elle seule de l'interaction entre les gamètes. Il existerait plusieurs molécules à la surface des spermatozoïdes possédant une affinité pour la ZP et qui pourraient compenser l'absence d'une autre. Plusieurs groupes de recherche soutiennent que les microdomaines membranaires *rafts* seraient des plateformes de molécules ayant une affinité pour la ZP. Lors de la capacitation, les *rafts* s'aggrègeraient sur la tête du spermatozoïde et permettraient une concentration de molécules d'adhésion au bon endroit menant ainsi à l'interaction avec la ZP [156-158]. Une explication possible pour la présence d'autant de molécules relativement redondantes sur le gamète mâle versus aucune redondance au niveau des molécules sur la surface de l'ovocyte relève de l'absence de compétition entre ovocytes pour l'interaction avec un spermatozoïde. Au contraire, les millions de spermatozoïdes éjaculés ne pouvant pas tous féconder l'ovocyte, une certaine compétition s'ensuit. Seuls les spermatozoïdes qui interagiraient de manière optimale avec les signaux biochimiques présents dans le tractus génital femelle pourraient réaliser la fécondation.

1.7. La réaction acrosomale

Immédiatement suivant l'interaction entre un spermatozoïde capacité et les couches externes de l'ovocyte, celui-ci doit subir un processus d'exocytose de son acrosome, appelée réaction acrosomale, nécessaire à la pénétration de la ZP [159]. Contrairement à la capacitation, un processus réversible, la réaction acrosomale est un événement irréversible, comme tout autre événement d'exocytose. Comme pour l'exocytose régulée chez les cellules somatiques, le calcium représente un médiateur essentiel de la réaction acrosomale [160]. Malgré cette similarité, la réaction acrosomale diffère des autres processus d'exocytose connus, et ce de plusieurs façons : les spermatozoïdes possèdent une seule vésicule sécrétoire; il se forme des points de fusion multiples entre la membrane acrosomale externe et la membrane plasmique; l'exocytose ne mène pas à une membrane fusionnée unique, mais plutôt à une vésiculation et à la perte véritable de membrane; et la réaction acrosomale est un événement singulier, sans recyclage membranaire suite à l'exocytose [161]. On considère que la réaction acrosomale remplit deux fonctions cruciales. La première est de libérer les enzymes protéolytiques contenues dans l'acrosome, dont l'acrosine et la hyaluronidase, qui servent à dégrader la zone pellucide pour permettre

au spermatozoïde d'atteindre la membrane plasmique de l'ovocyte (Figure 12). Ensuite, lorsque le contenu acrosomal s'est dispersé, une nouvelle membrane de surface du spermatozoïde s'en trouve exposée, soit la membrane acrosomale interne, nécessaire pour la fécondation.

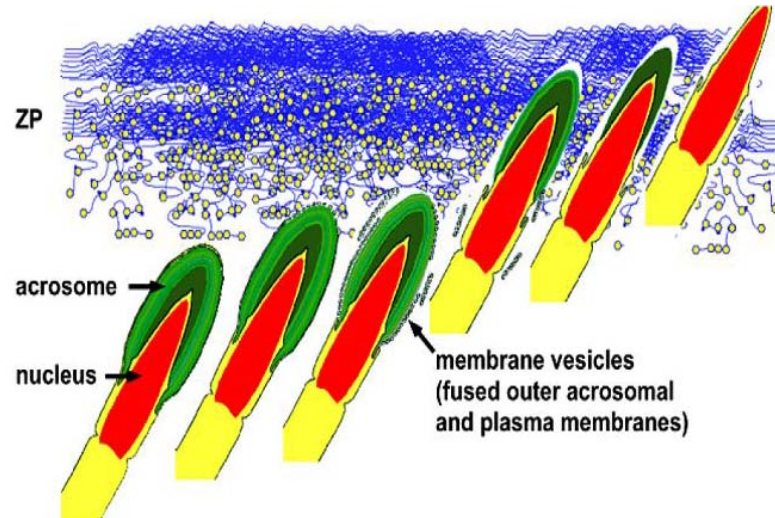


Figure 12. **Schéma de la réaction acrosomale.** Tirée de [157].

Tandis que l'exocytose est un processus rapide chez les cellules somatiques, de l'ordre des millisecondes, les enzymes acrosomales sont requises pendant une plus longue période, de l'ordre des minutes. Une étude récente a démontré, par imagerie microscopique en temps réel, que la réaction acrosomale est caractérisée par une fusion membranaire rapide suivie d'une dispersion exceptionnellement lente du contenu acrosomal, qui peut prendre jusqu'à 12 minutes [162]. Les spermatozoïdes qui subissent la réaction acrosomale de manière prématurée dans le tractus génital femelle avant de rencontrer l'ovocyte ne seraient pas en mesure de féconder. La réaction acrosomale constituerait donc une forme hautement adaptée d'exocytose.

1.7.1. Induction de la réaction acrosomale

Quoique l'état actuel des connaissances indique que le(s) ligand(s) primaire(s) des spermatozoïdes se retrouverait dans la ZP [163,164], plusieurs substances physiologiques et non-physiologiques sont en mesure d'induire une réaction acrosomale. Le composé non-physiologique le plus couramment utilisé est l'ionophore calcique A23187, qui agit en permettant l'équilibration de la concentration intracellulaire de calcium avec les taux extracellulaires de cet ion. Les composés dits physiologiques désignent ceux des fluides du

tractus génital femelle et avec lesquelles les spermatozoïdes pourraient entrer en contact lors de leur transit. Par exemple, il a été suggéré que la progestérone, hormone libérée à l'ovulation, pourrait induire la réaction acrosomale en interagissant avec la membrane plasmique des spermatozoïdes de manière récepteur-dépendante [165]. La lysophosphatidylcholine, une substance fusogénique qui perturbe les membranes et qui est retrouvée en concentration relativement élevée au site de fécondation [166] peut aussi induire la réaction acrosomale [167-169]. Des substances présentes dans le fluide folliculaire et sécrétées par les cellules du cumulus, telles que les prostaglandines, le sulphate de stérol et le glycosaminoglycans, ont aussi été impliquées dans le processus d'exocytose de l'acrosome [31, 170]. D'autres agonistes physiologiques potentiels sont le facteur de croissance épidermal, l'atriopeptine, le facteur d'activation des plaquettes et l'ATP [83]. Toutefois, les molécules à la surface du spermatozoïde qui interagiraient potentiellement avec ces substances physiologiques, soit *in vitro* ou *in vivo*, n'ont pas encore été identifiées.

1.7.2. Détection et mesure de la réaction acrosomale

Puisque la capacitation est un pré-requis pour qu'un spermatozoïde puisse subir la réaction acrosomale, il est possible de mesurer indirectement la capacitation par la détection de l'exocytose de l'acrosome. Généralement, l'intégrité de l'acrosome est mesurée à l'aide de lectines végétales couplées à des fluorochromes. Les deux lectines les plus utilisées sont l'agglutinine de *Pisum sativum* (PSA) [171-174] et l'agglutinine de *Arachis hypogaea* (PNA) [175]. La PSA a de l'affinité pour les molécules d' α -mannose et d' α -galactose du contenu acrosomal, et peut donc se lier à ces sucres seulement si la membrane plasmique du spermatozoïde est endommagée [176]. De son côté, la PNA lie le β -galactose associé à la membrane acrosomale externe [175].

Suite à l'induction de la réaction acrosomale par une des substances mentionnées ci-haut, les spermatozoïdes peuvent être marqués à l'aide d'une lectine fluorescente et l'intégrité acrosomale observée au microscope. Il est aussi possible de recourir à la cytométrie en flux qui permet d'évaluer un très grand nombre de cellules en très peu de temps, comparativement à l'analyse microscopique qui est fastidieuse et ne permet de compter que quelques centaines de spermatozoïdes pour chaque condition expérimentale. De plus, en utilisant des fluorochromes différents, la cytométrie en flux permet d'analyser plus d'un paramètre à la fois. Par exemple, il est possible d'évaluer l'intégrité acrosomale

par l'aglutinine de *pisum sativum* (PSA)-FITC et, en même temps, mesurer le pourcentage de cellules viables à l'aide de l'iodure de propidium. Ce dernier émet une fluorescence rouge intense lorsque lié à l'ADN. Les cellules vivantes ne laissent pas entrer cette molécule, tandis que les cellules mortes y sont perméables [171, 174]. La cytométrie en flux offre plusieurs autres avantages par rapport à l'évaluation microscopique. Cette technique est objective, ne permettant que très peu d'erreur relevant d'un biais humain, reproductible, précise, rapide et peu coûteuse [177]. Le cytomètre en flux permet de mesurer la quantité de fluorochrome absorbé par le spermatozoïde suite au marquage. Lorsque l'échantillon contenant les spermatozoïdes marqués est aspiré par le cytomètre, il se divise en gouttelettes individuelles, chacune ayant la capacité d'accueillir une seule cellule. Les gouttelettes passent une à la suite de l'autre dans le faisceau d'un laser, lequel provoque l'émission de fluorescence par les fluorochromes associés aux spermatozoïdes. Des tubes photomultiplicateurs, associés à des filtres ne laissant passer que des longueurs d'onde spécifiques, permettent de déterminer s'il y a présence ou non d'une cellule dans la gouttelette et de déterminer s'il y a de la fluorescence associée à la cellule. Non seulement le cytomètre permet-il de déterminer la présence ou l'absence d'un fluorochrome, mais il permet aussi de quantifier la fluorescence associée à chaque cellule. Enfin, puisque le cytomètre ne détecte que les fluorochromes associés à des cellules, il n'est pas nécessaire, avant l'analyse, de laver les cellules pour enlever les fluorochromes excédentaires. [177]. Des études comparatives effectuées avec des spermatozoïdes humains ont montré que la cytométrie en flux donne des résultats similaires à ceux obtenus par microscopie, avec l'avantage supplémentaire de pouvoir analyser environ 100 fois plus de cellules par échantillon [178].

1.8. La fusion spermatozoïde-ovocyte

La fusion spermatozoïde-ovocyte consiste en une fusion des membranes plasmiques des deux gamètes pour former une seule cellule. Contrairement à la division cellulaire, la fusion de deux cellules est un événement rare, restreint à certains types cellulaires. La fusion peut être divisée en trois étapes, soient la reconnaissance des membranes, l'apposition des membranes et le mélange des lipides membranaires [179]. De grands efforts ont été déployés afin d'identifier les protéines impliquées dans la fusion des membranes du spermatozoïde et de l'ovocyte.

Suite à la réaction acrosomale, une nouvelle membrane de surface est exposée chez le spermatozoïde, la membrane acrosomale interne, ce qui change la morphologie de la cellule. Malgré la perte de la majorité de la membrane plasmique et de la membrane acrosomale externe, une partie de la membrane plasmique qui recouvre l'acrosome, appelé segment équatorial, ne participe pas à la réaction acrosomale. Cette région de la membrane spermatique serait celle qui fusionne avec la membrane plasmique de l'ovocyte [31]. Certains membres de la famille ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) de protéines transmembranaires et multifonctionnelles sont soupçonnées de jouer un rôle important dans le processus de fusion, du côté du spermatozoïde [179]. Les deux candidats les mieux caractérisés sont ADAM2 (fertiline- β) et ADAM3 (cyritestine). La délétion ciblée des gènes encodant ADAM2 et 3 donne lieu à des souris mâles infertiles [180-182]. Par contre, les défauts des spermatozoïdes semblent avoir lieu en amont de la fusion spermatozoïde-ovocyte chez ces souris. Un rôle important pour une des protéines ADAM dans ce processus pourrait encore être possible, puisque plusieurs autres protéines de cette famille se retrouvent sur la surface des spermatozoïdes [183-186]. À ce jour, seulement deux protéines ont été démontrées comme étant nécessaires à la fusion spermatozoïde-ovocyte; la protéine spermatique IZUMO, ainsi que CD9 retrouvée à la surface de l'ovocyte [187].

1.9. L'infertilité masculine

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 15% des couples canadiens en âge de se reproduire sont infertiles; parmi ceux-ci, environ 40 % sont infertiles à cause d'un facteur masculin (<http://www.who.int/research/en/>). L'infertilité masculine peut se manifester de diverses manières. Chez certains patients, on trouve une incapacité ou une capacité réduite à produire des spermatozoïdes, résultant en l'absence ou la réduction significative du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat. D'autres produisent des spermatozoïdes morphologiquement anormaux ou ont la motilité réduite ou nulle. Notons que plusieurs anomalies peuvent coexister. Le nombre, la morphologie et la motilité des spermatozoïdes, ainsi que le volume, la viscosité et le pH d'un éjaculat peuvent facilement être mesurés en laboratoire et font partie du spermogramme dit traditionnel [188]. La capacité d'un spermatozoïde à reconnaître et à interagir avec l'ovocyte est absolument nécessaire à la fécondation, mais n'est pas facilement vérifiable dans le contexte d'analyses de routine. Cette cause d'infertilité masculine, ainsi que d'autres défauts non-détectables par le spermogramme, sont responsables d'environ 15% des cas

d'infertilité au Canada et sont désignés sous le vocable d'infertilité idiopathique ou plus simplement, d'infertilité inexpliquée.

1.10. Les techniques de reproduction assistée

Plusieurs méthodes de reproduction assistée ont été développées afin de pallier des problèmes d'infertilité et de permettre aux couples souffrant de troubles de fertilité de concevoir un enfant [189]. D'abord, la connaissance des éléments nécessaires à la capacitation des spermatozoïdes a permis de capaciter les spermatozoïdes *in vitro* et de transférer la population de gamètes capités à l'intérieur de la cavité utérine de la femme, plus près du site de fécondation. Cette approche se nomme insémination intrautérine (IUI) et peut fonctionner si le seul défaut des spermatozoïdes concerne la motilité, puisqu'elle surmonte l'obstacle de la traversée du mucus cervical visqueux. Dans les cas où l'IUI ne donne pas des résultats positifs, il n'est pas possible de savoir si cela est dû à l'incapacité des spermatozoïdes de se rendre jusqu'à l'ovocyte, ou à leur incapacité de s'y lier. Dans les cas de motilité sévèrement réduite, la technique de fécondation *in vitro* (IVF) peut traiter l'infertilité. Cette technique implique la mise en contact de spermatozoïdes capités avec un ovocyte dans une gouttelette de 50 à 1000 μL , permettant la plus grande opportunité de contact entre les gamètes. Encore une fois, si les spermatozoïdes ne peuvent pas se lier à l'ovocyte, cette technique sera sans succès. Une troisième méthode de reproduction assistée a été introduite en 1992 et a révolutionné le traitement de l'infertilité masculine. Cette approche se nomme injection intra-cytoplasmique d'un spermatozoïde ou ICSI. Un spermatozoïde unique est injecté directement à l'intérieur du cytoplasme de l'ovocyte [190]. L'ICSI assure un taux de fécondation plus élevé, et est donc devenue très populaire chez les couples consultant pour la reproduction assistée. Par contre, plusieurs médecins et scientifiques s'opposent à l'utilisation abusive de cette technique qui comporte certains risques. Les enfants les plus vieux nés suite à une conception par ICSI n'ont qu'une quinzaine d'années, alors les problèmes phénotypiques et les aberrations génétiques à long terme ne sont pas connus. Comparativement à l'IVF, l'ICSI résulte en un taux plus élevé de défauts génétiques et d'anomalies chromosomiques. Ceci n'est pas surprenant car les pères de ces enfants sont souvent des hommes souffrant de problèmes majeurs concernant la numération, la morphologie et la motilité des spermatozoïdes, dont les causes relèvent fréquemment d'anomalies chromosomiques des spermatozoïdes [189].

1.11. La contraception masculine

Malgré l'existence d'une panoplie de moyens de contraception féminine, près d'une grossesse sur deux est non-planifiée aux Etats-Unis [191]. Il existe très peu d'options en ce qui concerne la contraception masculine, qui se limitent au coït interrompu, au condom et à la vasectomie. Contrairement à la contraception féminine, où le but est de bloquer l'ovulation d'un ou de quelques ovocytes à chaque cycle menstruel, un contraceptif masculin devrait supprimer soit la production ou la fonction de millions de spermatozoïdes par éjaculation. Ceci rend la tâche plutôt complexe, et explique pourquoi aucun contraceptif masculin hormonal ou non-hormonal n'est présentement disponible sur le marché. L'identification des protéines requises pour la maturation des spermatozoïdes et à leur interaction avec l'ovocyte pourrait aider au développement d'un contraceptif masculin efficace, abordable, tolérable et réversible.

1.12. Problématique du projet de recherche

La compréhension des mécanismes menant à la fécondation est essentielle afin d'améliorer le diagnostic et le traitement de l'infertilité, ainsi que pour réguler la fertilité par le développement de contraceptifs. Chez le mâle, les spermatozoïdes doivent subir plusieurs étapes de maturation, qui font intervenir une panoplie de molécules provenant des tractus génitaux masculin et féminin, avant d'être aptes à la fécondation. L'identification des joueurs indispensables à l'acquisition du pouvoir fécondant du spermatozoïde devrait permettre le développement de meilleurs outils diagnostiques et favoriser le choix de la technique de reproduction assistée optimale, le cas échéant. De plus, ces molécules pourraient servir de cibles pour l'élaboration d'inhibiteurs de la fécondation ou de vaccins pour la contraception masculine.

1.13. Hypothèse

Les études antérieures portant sur l'espèce bovine ont établi que les protéines de la famille des BSP sont cruciales pour que les spermatozoïdes bovins puissent subir la capacitation et se rendre jusqu'au site de fécondation [121]. Puisque des homologues de ces protéines ont été retrouvées dans le plasma séminal de tous les autres mammifères étudiés jusqu'à présent [121], et que leur implication dans la capacitation des spermatozoïdes porcins a aussi été démontrée [127], il est plausible de croire que des protéines apparentées soient impliquées dans la maturation des spermatozoïdes humains. Contrairement au

taureau et au porc, chez lesquels les protéines BSP sont présentes en quantités significatives dans le plasma séminal, les homologues des BSP chez l'humain représentent une proportion négligeable du plasma séminal [128]. Cette contrainte a donc rendu très difficile l'étude de leurs fonctions biologiques. L'hypothèse de ce projet de recherche veut que des homologues des protéines BSP soient exprimés chez l'humain et jouent un rôle dans la maturation des spermatozoïdes.

1.14. Objectifs expérimentaux

Les objectifs expérimentaux de ce projet de recherche étaient de :

- 1) Vérifier si des séquences d'ADN partageant des similitudes avec les séquences des gènes des BSP bovines sont présentes dans les génomes murin et humain.
- 2) Caractériser l'expression des homologues des BSP chez la souris et l'humain et obtenir les séquences complètes en ADNc.
- 3) Produire et purifier la protéine recombinante humaine.
- 4) Produire des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine BSP humaine.
- 5) Détecter la protéine BSP native dans le plasma séminal et/ou les extraits spermatiques humains.
- 6) Vérifier l'effet de la protéine BSP humaine recombinante sur la motilité, la viabilité et la capacitation des spermatozoïdes humains, et développer un essai de cytométrie en flux pour mesurer la capacitation.

Ces travaux permettront de déterminer si, chez l'humain, l'homologue des protéines BSP joue un rôle dans la maturation des spermatozoïdes. Les résultats de cette étude contribueront donc à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'acquisition du pouvoir fécondant du spermatozoïde, et devraient faciliter le diagnostic et le traitement de l'infertilité masculine, ainsi que la régulation de la fertilité.

2. ARTICLES

2.1. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals. Fan J, Lefebvre J and Manjunath P. *Gene*, 375: 63-74, 2006.

Préambule:

La famille des protéines BSP (Binder of SPerm) représente les protéines majeures du plasma séminal bovin, et des homologues ont été détectés et/ou isolés par chromatographie d'affinité à partir du plasma séminal de tous les mammifères étudiés jusqu'à présent. Par contre, seuls les gènes encodant les trois protéines bovines avaient été caractérisés au moment de la parution du présent article. Puisque la signature structurale des protéines BSP est la présence des deux domaines Fn2 répétés en tandem, nous avons utilisé la séquence d'ADN encodant les domaines Fn2 de la protéine bovine BSP5 comme appât afin de chercher des séquences similaires dans tous les génomes séquencés. Cette étude a permis d'identifier trois nouveaux gènes de la famille des BSP chez le bovin, ainsi que des séquences d'ADN apparentées aux BSP dans les génomes de chimpanzé, de souris, de rat, de chien, de cheval et d'humain. Une analyse bioinformatique comparant les domaines Fn2 de toutes les protéines contenant ces domaines a permis de démontrer que les domaines Fn2 des protéines BSP possèdent des caractéristiques qui les différencient des protéines non-apparentées aux BSP. De plus, la famille des BSP a été subdivisée en trois sous-familles nommées *BSP*, *BSPH1* et *BSPH2*.

Ces travaux faisaient l'objet du projet de Fan J., lequel effectuait un stage post-doctoral dans le laboratoire. J'ai contribué à la conception d'idées et à l'interprétation des résultats et j'ai effectué les expériences de RT-PCR dont les résultats sont présentés à la figure 3. J'ai également écrit une partie significative du manuscrit, effectué la majorité de la révision et contribué à l'élaboration des idées de discussion. Les résultats de cette étude ont constitué la base de mon projet de doctorat, puisqu'ils ont permis de démontrer que des séquences correspondant à des homologues des BSP étaient présentes chez la souris et l'humain, justifiant l'étude de leur expression et de leurs fonctions.

Bovine seminal plasma proteins and their relatives: a new expanding superfamily in mammals

Keywords: BSP proteins, fibronectin type 2 domain, phylogeny, positive selection

Jinjiang Fan^a, Jasmine Lefebvre^{a,b} and Puttaswamy Manjunath^{a,b,c*}

^aGuy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Québec, *Canada* H1T 2M4; ^bDepartment of Biochemistry, University of Montreal and ^cDepartment of Medicine, University of Montreal, Québec, *Canada*

* Address for correspondence. Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 Boul. de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada, H1T 2M4.
Tel: 514-252-3562; Fax: 514-252-3430.

Abbreviations: BSP, bovine seminal plasma protein; Fn2, fibronectin type 2; NJ, Neighbor-joining; MP, Maximum parsimony; ML, Maximum likelihood; PCR, polymerase chain reaction; LRTs, Likelihood ratio tests; d_N , non-synonymous divergence; d_S , synonymous divergence

Running title: **BSP proteins in mammals**

Abstract

BSP proteins represent three major proteins of bovine seminal plasma: BSP-A1/-A2, -A3 and -30kDa. The BSP protein signature is characterized by two tandemly repeated fibronectin type 2 (Fn2) domains. Although classical affinity chromatography and protein sequencing have proven that the BSP protein homologs may be ubiquitous in mammals and functionally related to sperm capacitation, only the three bovine genes have been reported thus far. In this study, we report three new BSP protein-related genes from bovine, as well as other BSP protein-related DNA sequences from human, chimpanzee, mouse, rat, dog, horse and rabbit. Analysis of the relationships between all Fn2 domain-containing proteins revealed that the Fn2 domains found in BSP-related proteins have special features that distinguish them from non-BSP-related proteins. These features can be used to identify new BSP protein-related sequences. Further molecular evolutionary analysis of the BSP protein lineage revealed that all BSP proteins and their related sequences can be grouped into three subfamilies: *BSPH4*, *BSPH5* and *BSPH6*, which indicates that the BSP protein family is much bigger than previously envisioned. More interestingly, the three BSP proteins in bovine within the *BSPH4*-subfamily were shown to evolve rapidly. The ratio of nonsynonymous to synonymous substitutions was higher than 1. The analysis also indicated that the rate of evolution was heterogeneous between the first and second Fn2 domains of the genes. These data may reflect that some amino acids in BSP proteins are under a strong positive selection after gene duplication, suggesting that each BSP protein evolves rapidly, possibly to acquire new functions.

1. Introduction

Bovine seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, -A3 and -30kDa) and their homologs seem to be ubiquitous in mammals, as shown by classical affinity chromatography, protein sequencing, and radioimmunoassays (Leblond et al., 1993; Manjunath and Therien 2002; Nauc and Manjunath 2000). Their crucial roles in bovine sperm capacitation and in cholesterol and phospholipid efflux from epididymal sperm have been established (Therien et al., 1997; Therien et al., 1998; Therien et al., 1999). Additionally, all three proteins share identical or similar biochemical properties such as binding to gelatin, heparin, apolipoprotein A-I, glycosaminoglycans, choline phospholipids and low-density lipoproteins (Chandonnet et al., 1990; Desnoyers and Manjunath 1992; Manjunath et al., 1987; Manjunath et al., 1989; Manjunath et al., 2002). Although many genomes have been fully or almost completely sequenced hitherto, little is known about the BSP-encoding genes, the relationships among these genes and their precise roles in fertilization. Since the BSP protein signature is characterized by two tandemly repeated fibronectin type 2 (Fn2) domains, with a length of approximately 40 amino acids each, it is likely that we can recognize new members and/or homologs of BSP proteins through a simple comparison of the Fn2 domains. However, tracing the origin of Fn2 domains and distinguishing between Fn2 domains from the BSP protein family and those from other non-BSP-related proteins, such as gelatinases and fibronectins, can pose a significant challenge. More than 10 different types of non-BSP-related proteins contain one to three Fn2 domains. Due to the fact that most reproductive proteins have been shown to evolve rapidly (Swanson and Vacquier 2002), the comparison of sequence similarity alone is not enough to predict their origins and functions. Phylogenomics has been proposed as a powerful tool to tackle this problem (Eisen 1998; Eisen and Wu 2002) and has actually been used for the identification of several new gene families, such as DNA repair genes (Eisen and Hanawalt 1999),

receptor-like proteins (Fritz-Laylin et al., 2005), meiotic genes (Ramesh et al., 2005), DsbB-like thiol-oxidoreductases (Raczko et al., 2005), potassium channel genes (Moulton et al., 2003) and many others (Eisen and Fraser 2003; Sjolander 2004).

Although BSP proteins have been extensively studied since they were identified in bovine seminal plasma some 20 years ago (Esch et al., 1983; Manjunath et al., 1987), the only differences that have been demonstrated between the three BSP proteins are their relative abundance in bovine seminal plasma (approximately 37% for BSP-A1/-A2, compared to 4-5% for BSP-A3 and BSP-30kDa) (Nauc and Manjunath 2000), as well as some specific features related to the stimulation of phospholipid and cholesterol efflux (Therien et al., 1998; Therien et al., 1999). Since all three proteins stimulate *in vitro* capacitation to the same level under tested conditions (Therien et al., 1999), it is unclear what causes the differences in the stimulation of phospholipid and cholesterol efflux. It is likely that these differences could be related to other yet unrevealed biological functions, in addition to the stimulation of sperm capacitation.

Recent evolutionary analysis has shown that detecting signals of natural selection is the prevailing approach to understand the functions of new genes (Yang 2005). Natural selection is defined as purifying, neutral or positive selection depending on the ratio of nonsynonymous (amino acid changing) nucleotide substitutions to synonymous (amino acid preserving) nucleotide substitutions (Ka/Ks or d_N/d_S) for each codon in a given protein-coding DNA sequence alignment. Positive Darwinian selection is the most important driving force in rapid evolution, with a ratio higher than 1 being the criterion for positive selection. A positively selected amino acid site is one for which natural selection encourages the fixation of nonsynonymous substitutions. The identification of such positively selected sites can be of biomedical importance; for instance, an antigen with many positively selected sites might be an unsuitable vaccine candidate (de Oliveira et al.,

2004). In addition, this approach has been used to predict the residues in glutathione transferase that are capable of driving functional diversification (Ivarsson et al., 2003) and to reveal the functional patches of primate TRIM5 α in species-specific retroviral inhibition (Sawyer et al., 2005).

The functions of proteins under rapid evolution can also be revealed through comparative structural modeling, which has been applied in the study of reproductive proteins in *Drosophila* (Mueller et al., 2004). Our research has been motivated by the need to recognize new BSP protein-related genes in several recently sequenced mammalian genomes, and to characterize their relationships and potential functions in reproduction. Given the crucial role of BSP proteins in bovine sperm capacitation and fertilization, it is of fundamental importance to characterize BSP-related genes and proteins from other mammals, especially humans, in order to better understand the mechanisms underlying fertility.

2. Materials and methods

2.1. Genomic DNA sources

Bovine, mouse, rat, chimpanzee and human genomic sequences were retrieved from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) and relevant genome sequencing projects. The sequences used for the analysis in this study were based on the presence of one or two repeats of Fn2 domains, each domain consisting of four conserved cysteine residues, which form two disulfide bonds (Baker 1985; Seidah et al., 1987). In addition, orthologous genes containing Fn2 domains, such as the 72 kDa type IV collagenase and matrix metalloproteinase-9, were mainly selected from human, mouse and bovine. A total of 52 representative sequences were selectively retained. Accession numbers for the genes used in the following analysis are shown in Table 2, online.

2.2. Phylogenetic analyses

Protein and DNA sequences from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) were aligned using Clustal X (Thompson et al., 1997). Codon-based alignment was made manually with the introduction of small indels and/or gaps to optimize the alignment. Unrooted neighbor-joining (NJ) trees and maximum parsimony (MP) analyses were performed using the MEGA3 software with options of pairwise deletion and the Dayhoff PAM matrix model (Kumar et al., 2004). Maximum likelihood (ML) analyses were performed using Phylip 3.6 (the Phylogeny Inference Package) (Felsenstein 2004). Bootstrap support values for NJ and MP trees were obtained from 1000 replicates and support for ML trees was from 100 replicates.

2.3. Total RNA extraction, RT-PCR and DNA sequencing

Total RNA was extracted from tissues using the Trizol reagent (Invitrogen). 2 µg total RNA (except epididymis where 1.3 µg was used) was treated with DNase (NEBL) and

subjected to first-strand cDNA synthesis using the SuperscriptTM III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The RT reaction was performed in a PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) for 10 min at 25 °C, 50 min at 50 °C and 5 min at 85 °C. 2 µL of the first-strand reaction was used as a template for the subsequent PCR amplification with the following gene-specific primers: *BSPH4* (BSPH4RN: 5'-CCTGTGTTTGGGAATCTTTG-3', BSPH4FN: 5'-ACCAAGACCTTTTAG TAAC-3'); *BSPH5* (BSPH5-RaceR: 5'-CTATAGAGACGGGATCTTCC-3', BSPH5-RaceF: 5'-TGTCCTTGTTATAATTCCGG-3'); *BSPH6* (BSPH6RN: 5'-ATTTGTGTATGACGACATCG-3', BSPH6FN: 5'-TTTCCGTCTTTGTTATAATC-3'); *bE12* (bE12-RaceR: 5'-ACCAGAGCC ATCTACGACGGACG-3', bE12-RaceF: 5'-ACCAATGAGGAAATTCTGGTGTGTCG-3') and the *GAPDH* control (btGAPDG-R: 5'-ATCCTGCCAACATCAAGTGG-3', btGAPDH-F: 5'-ACCTGGTCCTCAGTGTAGCC-3'). PCR was performed in a PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) with the following parameters: one cycle of denaturation for 3 min at 94 °C, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 55 °C for 45 s and elongation at 72 °C for 1 min and one cycle of final elongation for 7 min at 72 °C. PCR products were visualized on a 1.5% agarose gel. The resulting bands were excised from the gel, purified using a gel purification kit (Qiagen) and sequenced in both directions to confirm their identity using the ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.4. Estimation of positive selection

Maximum likelihood analysis using a codon-based substitution model was performed with the CODEML program in the PAML 3.14 software package (Yang 1997). This was done to infer the posterior probability that a particular codon in an alignment was in a particular category (*i.e.*, undergoing a specific selective pressure). Generally, codon

sites with P values of >0.95 are accepted as being significantly allocated to that class. The ratio of nonsynonymous (K_a or d_N) to synonymous (K_s or d_S) nucleotide substitution rates (ω) was estimated using the method of Nei and Gojobori in the implementation of K-Estimator v6.1 (Comeron 1999). Likelihood ratio tests (LRTs) of the data were performed by using different sets of site-specific (NS sites) models as follows: M0 (one-ratio) vs. M3 (discrete); M1 (two-state, neutral, $\omega > 1$ disallowed) vs. M2 (selection, similar to model 1 but $\omega > 1$ allowed) and M7 (fit to a beta distribution, $\omega > 1$ disallowed) vs. M8 (similar to model 7 but $\omega > 1$ allowed). In all cases, permitting sites to evolve under positive selection gave a much better fit to the data (Table 1). These analyses also identified certain amino acid residues with high posterior probabilities (>0.95) of having evolved under positive selection.

2.5. Mapping of positively selected sites on a 3-D model

The deduced protein sequence of BSP-30kDa was submitted to the SWISS-MODEL server (Automated Comparative Protein Modeling Server, Version 3.5) (Schwede et al., 2003) for comparative protein structure modeling. All BSP-30kDa models were subsequently generated based on the template of PDC-109 (PDB accession number: 1H8P) using Swiss-PdbViewer 3.7 (Guex and Peitsch 1997; Schwede et al., 2003).

3. Results and Discussion

3.1. Three new members of the BSP protein family in bovine

Available bovine genome sequences have brought about the re-evaluation of the previously defined BSP protein family, which was thought to consist of three genes encoding the three major proteins of bovine seminal plasma (Manjunath 1984; Manjunath et al., 1987; Manjunath et al., 1988). The BSP family seems to be distributed strictly in mammals and there have been no reports so far about orthologous genes in non-mammal organisms. Using the deduced amino acid sequences of the two tandemly repeated Fn2 domains as a query, the bovine genome sequences in EMBL and GenBank (<http://www.ebi.ac.uk/embl> and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) were thoroughly searched. Four new Fn2 domain-containing proteins in the bovine genome were identified. The pairwise comparison of the deduced amino acid sequences of the new BSP protein homologs (BSPHs) with the three known BSP proteins showed that each protein contains two or four Fn2 domains (Fig. 1A). The phylogenetic analysis showed, with a strong bootstrap support, that three of the four new BSP-related sequences (*BSPH4*, *BSPH5* and *BSPH6*) are clustered into a clade that contains the three known BSP proteins, whereas the fourth sequence (*bE12*) is in an unresolved position (Fig. 1B). Since the presumed exons have a higher or lower d_N/d_S ratio than the neighbouring exon regions, we assumed that the three newly discovered BSPH sequences are portions of BSP-related genes. The fourth gene was assumed to be the counterpart of the human E12 gene because of their highly conserved sequences (see section 3.3). Taken together, these results suggest that there are three new BSP-related sequences and one *E12* homolog in the bovine genome.

3.2. The Fn2 domains found in BSP-related proteins are unique

To extend our concept that BSP-related Fn2 domains are different from the Fn2 domains found in non-BSP-related proteins, we thoroughly searched the translated and

genome sequences in EMBL and GenBank, using the deduced amino acid sequence of the Fn2 domains in the BSP-30kDa encoding gene as a query. From the total number of sequences with a hit, 52 representative sequences were used for the analysis (Table 2; Fig. 7, online).

The phylogenetic relationships between the different Fn2 domain-containing proteins were analyzed in a NJ tree using a single Fn2 domain sequence of each protein (Fig. 1B). Support for the topology was estimated from 1000 bootstrap replicates and nodes occurring in more than 50% of the replicates are indicated. The main branch, with a strong statistical support, is the BSP protein clade (Fig. 1B), indicating that this approach can be used for the genome-wide identification of new BSP-related proteins in the future. In addition, this study shows that E12 and its homologs, which were previously described as BSP-related proteins (Saalman et al., 2001), are actually distantly related to BSP proteins (see section 3.3).

3.3. Bovine *E12*, containing four Fn2 domains, is not closely related to BSP proteins

E12 was first described in humans as a sperm-binding protein of epididymal origin containing four tandemly arranged Fn2 domains (Saalman et al., 2001). Here, we showed that the bovine *E12* ortholog (*bE12*) is highly conserved, displaying 80-86% identity in amino acid sequence to other *E12* orthologs (Fig. 8, online). Interestingly, there is no *E12* homolog in the mouse and rat genomes, suggesting that this gene may have been lost in these organisms. Nevertheless, the phylogenetic analysis indicates that E12 homologs form a very distinct clade from BSP protein homologs (Fig. 1B), suggesting that they would represent members of a separate family of sperm-coating proteins.

The human expressed sequence tags showed that *E12* is also widely expressed in tissues other than epididymis and testis, such as brain (accession number: BF696501), eye (accession number: BM690865, BM690040, BM663735, BM661759) and placenta/

choriocarcinoma (accession number: BG478994, BC015598, AAH15598). *E12* may therefore be involved in a more general function such as collagen-binding or protein-protein interactions in the extracellular matrix.

3.4. The BSP protein clade is composed of three subfamilies: *BSPH4*, *BSPH5* and *BSPH6*

To obtain a better resolution of the BSP protein clade in the NJ tree, a phylogenetic reconstruction was performed using the two tandemly repeated Fn2 domains of genes from this group (Fig. 2; Fig. 10, online). Results showed that the BSP protein clade clearly has three subfamilies, each of which can be represented by one of the three new homologous genes from bovine, *BSPH4*, *BSPH5* and *BSPH6* (Fig. 2). These three major subfamilies are indicated in the NJ tree (Fig. 2), with bootstrap support ranging from 61% to 99%. Phylogenetic trees produced with MP and ML methods displayed the same major topology with three groups (Fig. 2). Support for the major nodes obtained using the three different methods are indicated. Each clade contains between one and four bovine genes, suggesting that duplication and gene diversification have been frequent in the evolution of BSP protein-encoding genes.

The first subfamily (*BSPH4*) includes three previously identified bovine BSP protein-encoding genes, BSP-A1/-A2 or PDC-109, BSP-A3, and BSP-30kDa. This subfamily also includes one gene from rabbit (EP52c1), two equine genes (SP1 and SP2), one canine gene (CDK105) and the boar pB1 gene. In addition, seven new BSP protein members from human, chimpanzee, mouse and rat are all distantly related to the *BSPH4* subfamily. In contrast, one gene from human (*hBSPH1*), one from chimpanzee (*pBSPH1*), one of the three genes from mouse (*mBSPH1*) and one of the two genes from rat (*rBSPH1*) belong to the *BSPH5* subfamily, whereas *mBSPH2*, *mBSPH3* and *rBSPH2* are in the *BSPH6* subfamily.

The expression of the three new bovine genes in the male reproductive tract has been confirmed by RT-PCR and DNA sequencing (see section 3.5), whereas the expression of several of the new genes from other species was confirmed by searching the EST database (accession numbers: BY721041 and BB073190 for *mBSPH1*, as well as BY721134, AV381075, BB073010, BU961078 and AV379540 for *mBSPH2*). The remaining genes were discovered from their corresponding genomic sequences.

The phylogenetic analyses also revealed the absence of the *BSPH4* subfamily in human, chimpanzee, mouse and rat (Fig. 2), indicating that either the *BSPH4* subfamily evolved recently or that its orthologous counterparts are present in those species but have not yet been identified. The topology of the tree indicates that the duplications that gave rise to *BSPH4*, *BSPH5* and *BSPH6* occurred before the divergence of the lineages, which led to the modern mammals described in this study.

3.5. Tissue-specific expression of the four bovine genes: *BSPH4*, *BSPH5*, *BSPH6*, and *E12*

RT-PCR was performed with gene-specific primers to confirm the tissue-specific expression of *BSPH4*, *BSPH5* and *BSPH6* as well as the expression of *bE12* (Fig. 3). *BSPH4* was detected exclusively in the seminal vesicles, whereas *BSPH5* was detected in epididymis and with lower intensity in the testis. *BSPH6* expression was detected in the epididymis and expression of the bovine E12 homolog was detected in the epididymis, as expected, but also weakly in the testis. Samples for which the RT reaction was performed without reverse transcriptase served as negative controls (data not shown). Expression of the *GAPDH* gene was used as an internal control. In the case of epididymal *GAPDH*, the intensity of the band is weaker because a lower quantity of total RNA was used for the RT reaction (1.3 µg instead of 2 µg). The PCR products, corresponding to the partial transcripts of each *BSPH* gene, were confirmed by DNA sequencing and pairwise sequence comparisons (Fig. 3). These results strongly suggest that the new BSP protein homologous

genes and *bE12* are actively transcribed in male reproductive tissues, while no transcription was detected in non-reproductive tissues such as heart, intestine, kidney, liver and lung (Fig. 3). Further functional characterization of each gene is underway through recombinant expression of each protein and relevant immunological localization.

3.6. Evidence that BSP proteins are under positive selection and that the two Fn2 domains are under heterogeneous selection pressure

The nucleotide substitution rates within the BSP protein family were studied by comparing orthologous and paralogous genes between bovine, stallion, boar, mouse, rat, chimpanzee and human. The non-synonymous divergence (d_N) between pairs of genes is a good indicator of their functional conservation. Lower d_N/d_S ratios (<1) indicate purifying selection, whereas higher d_N/d_S ratios (>1) indicate positive selection, which means that advantageous mutations have occurred in the diversifying selection of the two duplicates. Similar d_N/d_S ratios ($=1$) indicate a lack of functional constraint, as synonymous substitutions are expected to be nearly neutral (Yang and Nielsen 2000). However, different parts of a gene may have different evolutionary selection pressures, which make the interpretation of d_N/d_S ratios complicated for a complete gene. Nevertheless, we first estimated an average d_N/d_S ratio from the Nei-Gojobori method (Nei and Gojobori 1986) for each pair of BSP- and BSP-related genes. The average estimated d_N/d_S ratio for the *BSPH4*, *BSPH5* and *BSPH6* subfamilies was 0.612 ± 0.308 , 0.194 ± 0.087 and 0.361 ± 0.117 (mean \pm SD), respectively (Fig. 4A). The d_N/d_S ratio of the *BSPH4* subfamily is significantly different from that of *BSPH5* ($P < 0.001$) and *BSPH6* ($p = 0.006$). Hence, we conclude that the *BSPH4* subfamily evolves faster than the other two subfamilies, indicating either a lower functional constraint or an accelerated rate of evolution for some sites in this group. Strikingly, the only genes under positive selection within the highly

divergent *BSPH4* subfamily are BSP-A1/-A2, BSP-A3 and BSP-30kDa, based on a pairwise comparison. This high divergence may be caused by positive selection of several beneficial mutations.

It has been suggested that regulatory genes are often divided into domains that are characterized by slowly and rapidly evolving sequences (Filip and Mundy 2004). To check for heterogeneity in evolutionary rates along BSP protein-encoding genes, the distribution of nucleotide diversity based on nonsynonymous substitutions along the genes was studied using a sliding window of 130 sites with 5 bp steps. This analysis included four bovine genes in the *BSPH4* subfamily. The distribution of nonsynonymous rates shown in Figure 6B suggests two relatively conserved domains (Fn2 A and Fn2 B), one close to the N-terminus and one close to the C-terminus of the protein, as shown schematically under each graph. Although both of these domains are important for the interaction with choline phospholipids on the bovine sperm surface (Wah et al., 2002), Fn2 domain A from the three pairs (BSP-A1/-A2 vs. BSP-A3, BSPA1/-A2 vs. BSP-30kDa, BSP-A3 vs. BSP-30kDa) showed significantly higher Ka/Ks ratios than Fn2 domain B in all comparisons. These results suggest that the three BSP protein-encoding genes are under strong positive selection and that selection pressure is different between these two Fn2 domains. Although the rapid evolution of mammalian sex-related genes has been well documented, we are showing for the first time that BSP proteins are evolving under diversifying selection.

3.7. Five potential sites under positive selection in the BSP genes, four of which are distributed at the edge of the phosphorycholine binding pocket in Fn2 domain A

To detect positively selected amino acid sites, we used the likelihood ratio tests (LRT) of Goldman and Yang (1994). Synonymous substitutions in protein-encoding genes are generally free from natural selection and are used frequently as a measurement of the neutral mutation rate (Kimura 1983). Estimation was performed by assuming either a single

ratio (M0) for all branches in the *BSPH4* subfamily or assuming different ratios for each branch (M1, M2, M3, M7 and M8). The log likelihood value for the one-ratio model (M0) was -1,666.241, while the strictly neutral model (M1), assuming a different ratio for each branch, resulted in a log likelihood of -1,600.333 (Table 1). Twice the log likelihood difference was used to test whether the free-ratio model fit the data significantly better than the one-ratio model. The free-ratio model resulted in a significantly better fit at the 1% level ($\chi^2_{1\%} = 9.21$, $df = 2$). This indicates that the positive Darwinian selection on BSP proteins was not evenly distributed across the entire length of the genes tested.

We next investigated models in which the d_N/d_S ratio is allowed to vary among different classes of sites (models M1–M3, M7 and M8; Table 1; Yang et al. 2000). The LRT statistic for comparison of the neutral (M1), selection (M2) and discrete (M3) models rejected M1 in favour of M2 and M3 (Table 1). These tests suggest that sites under positive selection are present in these genes. Application of the discrete model (M3) suggests that nearly 30% of sites ($\omega_2 = 2.121$, $f_2 = 0.296$) are potentially positively selected sites. Over 40% of the sites detected by model M8 are under positive selection with $\omega_1 (d_N/d_S) = 1.863$ (Table 1).

We used the Bayes theorem to calculate the posterior probabilities of ω classes for each site. Sites with a high probability of coming from the $\omega > 1$ class are likely to be under positive selection. The M3 and M8 models predicted that three and eight sites, respectively, had a probability greater than 95% (Table 1). Of these 8 sites, 5 were located in Fn2 domain A and 3 were in Fn2 domain B (Fig. 5A; Fig. 9, online). The results using PAML suggest that heterogeneous selection occurs between these two tandemly repeated domains, which is consistent with the results obtained using the more conventional pairwise d_N/d_S ratios.

Since the identification of sites subjected to positive selection may be important for the binding properties of BSP proteins, we mapped all the potential sites under positive selection on a 3-D model of BSP-30kDa. This allowed us to schematically illustrate their relationship to two established phosphorylcholine binding pockets (Desnoyers and Manjunath 1994; Wah et al., 2002) (Fig. 5B and C). Interestingly, the sites under positive selection in Fn2 domain A are all located at the edge of the phosphorylcholine-binding pocket, whereas the sites under positive selection in Fn2 domain B are dispersed on the opposite side of the pocket (Fig. 5C). The results indicate that the positively selected sites in Fn2 domain A may affect the protein's binding affinity to choline phospholipids, whereas the positively selected sites in Fn2 domain B may not be involved in the ligand-binding properties of the pocket. This may reflect some differences in the features of ligand-binding affinity in the o-phosphorylcholine complex of PDC-109 (BSP-A1/-A2) (Wah et al., 2002), BSP-A3 and BSP-30kDa.

3.8. A proposed model of functional diversification in BSP proteins

The location of the sites under positive selection was mapped on a homology model of BSP-30kDa. Most predicted sites formed a single patch around the phosphorylcholine-binding pocket of Fn2 domain A (Fig. 6). A model was proposed to illustrate that the ligand-binding pocket in Fn2 domain A of BSP proteins may loosely bind choline phospholipids and/or factors involved in sperm-egg interaction. On the other hand, the binding pocket in Fn2 domain B could maintain a more conserved function, such as the tight association with phosphorylcholine for adhesion to the surface of sperm (Fig. 6). Since many reproductive proteins evolve rapidly and the driving forces for evolution are the selection pressures, which include sperm competition, cryptic female choice and sexual conflict (Swanson and Vacquier 2002), the functional diversification of BSP proteins described here may indicate some relevant roles in these respects, which will need further

clarification. We will extend the analysis to include the comparison of polymorphisms and divergence at nonsynonymous and synonymous sites through site-directed mutagenesis, as such studies more directly address biological diversification in the duplicated genes (Ohno 1970). These analyses will provide insight into the functional diversification of BSP protein-encoding genes.

In summary, Fn2 domains in BSP proteins and their relatives have special features that are different from the Fn2 domains in non-BSP-related proteins. The method established here has proven to be powerful and efficient to identify new BSP-related genes from emerging genomes. The BSP protein lineage can be divided into three groups, which are represented by the *BSPH4*, *BSPH5* and *BSPH6* subfamilies. Expression of the three new bovine genes was confirmed in tissues of the male reproductive tract by RT-PCR and DNA sequencing. A strong evidence of positive selection in the *BSPH4* lineage was provided. Furthermore, there seems to be heterogeneity in selection pressures between Fn2 domains A and B. Five amino acid sites under positive selection were estimated using different selection models and a model for the biological function of BSP proteins was proposed. However, it remains to be determined whether or not natural selection and/or rapid evolution of the variable Fn2 domain A are the main factors driving diversification of BSP protein-encoding genes.

Acknowledgments

We thank the Canadian Institutes of Health Research for their financial support.

References

- Anisimova, M., Bielawski, J.P., Yang, Z., 2001. Accuracy and power of the likelihood ratio test in detecting adaptive molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1585-1592.
- Baker, M.E., 1985. The PDC-109 protein from bovine seminal plasma is similar to the gelatin-binding domain of bovine fibronectin and a kringle domain of human tissue-type plasminogen activator. *Biochem Biophys Res. Commun.* 130, 1010-1014.
- Chandonnet, L., Roberts, K.D., Chapdelaine, A., Manjunath, P., 1990. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 313-318.
- Comeron, J.M., 1999. K-Estimator: calculation of the number of nucleotide substitutions per site and the confidence intervals. *Bioinformatics.* 15, 763-764.
- de Oliveira, T., Salemi, M., Gordon, M., Vandamme, A.M., van Rensburg, E.J., Engelbrecht, S., Coovadia, H.M., Cassol, S., 2004. Mapping sites of positive selection and amino acid diversification in the HIV genome: an alternative approach to vaccine design? *Genetics* 167, 1047-1058.
- Desnoyers, L., Manjunath, P., 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J. Biol. Chem.* 267, 10149-10155.
- Desnoyers, L., Manjunath, P., 1994. Major proteins of bovine seminal fluid bind to insulin-like growth factor-II. *J. Biol. Chem.* 269, 5776-5780.
- Eisen, J.A., 1998. Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. *Genome Res.* 8, 163-167.
- Eisen, J.A., Fraser, C.M., 2003. Phylogenomics: intersection of evolution and genomics. *Science* 300, 1706-1707.
- Eisen, J.A., Hanawalt, P.C., 1999. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat. Res.* 435, 171-213.
- Eisen, J.A., Wu, M., 2002. Phylogenetic analysis and gene functional predictions: phylogenomics in action. *Theor. Popul. Biol.* 61, 481-487.

- Esch, F.S., Ling, N.C., Bohlen, P., Ying, S.Y., Guillemin, R., 1983. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res. Commun.* 113, 861-867.
- Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6. 2004. Distributed over the World Wide Web, Seattle.
- Filip, L.C., Mundy, N.I., 2004. Rapid evolution by positive Darwinian selection in the extracellular domain of the abundant lymphocyte protein CD45 in primates. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1504-1511.
- Fritz-Laylin, L.K., Krishnamurthy, N., Tor, M., Sjolander, K.V., Jones, J.D., 2005. Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and Arabidopsis. *Plant Physiol* 138, 611-623.
- Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Higgins, D.G., Bleasby, A.J., Fuchs, R., 1992. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 189-191.
- Ivarsson, Y., Mackey, A.J., Edalat, M., Pearson, W.R., Mannervik, B., 2003. Identification of residues in glutathione transferase capable of driving functional diversification in evolution. A novel approach to protein redesign. *J. Biol. Chem.* 278, 8733-8738.
- Kimura, M. *The Neutral Theory of Molecular Evolution.* 1983. Cambridge, U.K., Cambridge Uni. press.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150-163.
- Leblond, E., Desnoyers, L., Manjunath, P., 1993. Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 443-449.

- Manjunath,P., 1984. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. In: Sairam MR, Atkinson LE (Eds.), *Gonadal Proteins and Peptides and Their Biological Significance*. Singapore: World Science Publishing, pp. 78-84.
- Manjunath,P., Baillargeon,L., Marcel,Y.L., Seidah,N.G., Chretien,M., Chapdelaine,A., 1988. Diversity of novel proteins of gonadal fluids. In: McKerns KW, Chretien M (Eds.), *Molecular Biology of Brain and Endocrine Systems*. New York: Plenum Press., pp. 259-273.
- Manjunath, P., Marcel, Y.L., Uma, J., Seidah, N.G., Chretien, M., Chapdelaine, A., 1989. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J. Biol. Chem.* 264, 16853-16857.
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Menard, M., 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.* 67, 1250-1258.
- Manjunath, P., Sairam, M.R., Uma, J., 1987. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci. Rep.* 7, 231-238.
- Manjunath, P., Therien, I., 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.* 53, 109-119.
- Moulton, G., Attwood, T.K., Parry-Smith, D.J., Packer, J.C., 2003. Phylogenomic analysis and evolution of the potassium channel gene family. *Receptors. Channels* 9, 363-377.
- Mueller, J.L., Ripoll, D.R., Aquadro, C.F., Wolfner, M.F., 2004. Comparative structural modeling and inference of conserved protein classes in *Drosophila* seminal fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 13542-13547.
- Nauc, V., Manjunath, P., 2000. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol. Reprod.* 63, 1058-1066.

- Nei, M., Gojobori, T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3, 418-426.
- Ohno, S., 1970. *Evolution by Gene Duplication*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Ozhogina, O.A., Trexler, M., Banyai, L., Llinas, M., Patthy, L., 2001. Origin of fibronectin type II (FN2) modules: structural analyses of distantly-related members of the kringle family: the kringle domain of neurotrypsin as a potential link between FN2 domains and kringles. *Protein Sci.* 10, 2114-2122.
- Raczko, A.M., Bujnicki, J.M., Pawlowski, M., Godlewska, R., Lewandowska, M., Jagusztyn-Krynicka, E.K., 2005. Characterization of new DsbB-like thiol-oxidoreductases of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* and classification of the DsbB family based on phylogenomic, structural and functional criteria. *Microbiology* 151, 219-231.
- Ramesh, M.A., Malik, S.B., Logsdon, J.M., Jr., 2005. A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr. Biol.* 15, 185-191.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics.* 19, 2496-2497.
- Saalman, A., Munz, S., Ellerbrock, K., Ivell, R., Kirchhoff, C., 2001. Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 88-100.
- Sawyer, S.L., Wu, L.I., Emerman, M., Malik, H.S., 2005. Positive selection of primate TRIM5alpha identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2832-2837.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M.C., 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3381-3385.

- Seidah, N.G., Manjunath, P., Rochemont, J., Sairam, M.R., Chretien, M., 1987. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem J.* 243, 195-203.
- Sjolander, K., 2004. Phylogenomic inference of protein molecular function: advances and challenges. *Bioinformatics.* 20, 170-179.
- Swanson, W.J., Vacquier, V.D., 2002. The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat. Rev. Genet.* 3, 137-144.
- Therien, I., Moreau, R., Manjunath, P., 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 59, 768-776.
- Therien, I., Moreau, R., Manjunath, P., 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 61, 590-598.
- Therien, I., Soubeyrand, S., Manjunath, P., 1997. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.* 57, 1080-1088.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Wah, D.A., Fernandez-Tornero, C., Sanz, L., Romero, A., Calvete, J.J., 2002. Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109-phosphorylcholine complex. *Structure. (Camb.)* 10, 505-514.
- Yang, Z., 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput. Appl Biosci.* 13, 555-556.
- Yang, Z., 2005. The power of phylogenetic comparison in revealing protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 3179-3180.

Yang, Z., Nielsen, R., 2000. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* 17, 32-43.

Figure Legends:

Fig. 1. Relationships among BSP proteins and three new BSP-related proteins from bovine. (A) Deduced amino acid sequence alignment of two Fn2 domains from the BSP- and BSP-related genes. Upside-down arrowheads indicate the 4 cysteine residues in each domain, which is the hallmark of the Fn2 domain. Black solid lines highlight Fn2 domains A and B in BSP proteins and in the three new predicted BSP protein homologs, as well as Fn2 domains 3 and 4 of bE12. Residues that show 100 percent conservation, 80 percent or greater conservation, and 60 percent or greater conservation are highlighted in black, dark grey and light grey, respectively. The top two conservation levels are also distinguished by either upper or lower case characters or numbers on the consensus line below the alignment. Similar amino acids are defined by Higgins (Higgins et al., 1992) as being grouped in the same class as identity. Dashes indicate gaps introduced to facilitate alignment. (B) The Fn2 domains found in BSP proteins and BSP-related proteins are different from those found in other Fn2 domain-containing proteins. NJ trees of single Fn2 domains from representative proteins, including BSP proteins and their relatives. The E12 proteins are in a separate group from BSP proteins, whereas BSP proteins and their close relatives are grouped into one clade with a strong bootstrap support (790 in 1000 replicates). The first number indicates the NJ bootstrap values and the second number indicates the MP bootstrap values for 1000 replicates. The estimated genetic distance is proportional to the horizontal length of each branch. In the schematic representation, Fn2 domains are green and the colors assigned to other domains are indicated. CIMR, cation-independent mannose-6-phosphate receptor repeat; SMART domain, simple modular architecture research tool domain (<http://smart.embl-heidelberg.de>). The GenBank accession numbers and other abbreviations used here are listed in Table 2, online.

Fig. 2. The BSP clade is composed of three subfamilies. NJ trees of the two Fn2 domains of BSP-related proteins, showing that BSP proteins and their relatives are separated into three subfamilies: *BSPH4*, *BSPH5* and *BSPH6*. Bootstrap values from 1000 replicates for NJ (1st number), 1000 replicates for MP (2nd number) and 100 replicates for ML (3rd number) are indicated at the nodes and were used to assess the robustness of the trees. Only bootstrap values larger than 50% are shown and the bold numbers indicate the three main branches. Genetic distance is indicated as the number of substitutions per amino acid site. Expression data shown on the right is based on data found in the literature as well as the RT-PCR experiments presented in this paper.

Fig. 3. Expression analysis and tissue distribution of the newly identified bovine BSP protein homologs: *BSPH4*, *BSPH5*, *BSPH6* and *bE12*. Total RNA was extracted from tissues and analysed by RT-PCR, as described in the methods section. The expression of the *GAPDH* gene was used as an internal control. All amplicons were sequenced to confirm their identities. E, epididymis; SV, seminal vesicles; T, testis; H, heart; I, intestine; K, kidney; Li, liver; Lu, lung.

Fig. 4. Evidence of positive selection within the BSP clade. (A) The number of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (d_N) are plotted against the number of synonymous substitutions per synonymous site (d_S) for the *BSPH4*, *BSPH5* and *BSPH6* lineages. The values of each pairwise comparison for the different lineages are indicated in black, grey and white as indicated below the figure. The dotted line shows the neutral expectation of $d_N = d_S$. (B) Sliding window analysis of substitution rates Ka/Ks (d_N/d_S) shows the heterogeneity of positive selection between Fn2 domains A and B. The grey curve illustrates that a 130-bp window was moved along the BSP protein-encoding sequence in 5-bp steps and the Ka/Ks ratio was computed for each window, then plotted at its median position using K-estimator 6.1 (Comeron 1999). The d_N and d_S substitution rate

estimates for pairwise comparisons of BSP-A1/-A2, BSP-A3, BSP-30kDa and *BSPH4* were obtained using the method of Nei and Gojobori as implemented in DnaSP 4.0 (Rozas et al., 2003).

Fig. 5. Distribution of putative positively selected sites in BSP protein sequences. (A) Amino acid sites under positive selection were detected in proteins of the *BSPH4* lineage. The abscissa indicates the amino acid sites counted from the positions of the amino acid alignment in the *BSPH4* lineage. The ordinate indicates the value of posterior probability for each amino acid site under model M3 above the abscissa and under model M8 below the abscissa. Dotted lines indicate the 80%, 90% and 95% significance levels. Positive selection was assigned to the amino acid sites in red, green and blue in the graph when the corresponding values exceeded that of the dotted line. The amino acid sites with the same prediction based on the two models were indicated in red ($p > 95\%$ in model M8), green ($p > 90\%$ in model M3) and blue ($p > 80\%$ in model M3) and indicated in the sequence alignment within a red rectangle. (B) Three-dimensional models of BSP-30kDa based on homology modeling using BSP-A1/-A2 (also named as PDC-109) as a template (1H8P). Stick and ball structures of the side-chains of 5-6 hydrophobic amino acid residues revealed the two potential hydrophobic pockets in Fn2 domains A and B. (C) Codons identified as being under positive selection with high posterior probabilities ($P > 0.95$) are highlighted on a surface model of BSP-30kDa. Amino acid sites inferred to be evolving under positive selection are displayed as space-filled molecules and marked by name and position. The figure was prepared with the program Swiss-PdbViewer 3.7b2.

Fig. 6. Proposed model for domain-specific binding activity based on the diversifying selection between the Fn2 domains of BSP proteins. Mapping of the potential positively selected sites within the two Fn2 domains of BSP proteins suggests that Fn2 domain A would have a more relaxed binding specificity than that of Fn2 domain B. Fn2 domain A

could therefore be involved in binding factors for sperm-egg interaction and capacitation, whereas Fn2 domain B would mediate the interaction with choline phospholipids for adhesion purposes. The positively selected sites at the edge of the phosphorylcholine-binding pocket in Fn2 domain A are highlighted using a dotted green arrow.

Table 1
Maximum log likelihood scores, parameter estimates and likelihood ratio test (LRT) statistics of models for positive selection within BSP protein-encoding genes

Evolutionary model	Parameter estimates ^a	Positively selected sites ^b	Log Likelihood	LRT ^c $p(LRT=\chi^2, df=2)$ ^d
One ratio (M0)	$\omega_0=0.639, f_0=1.000$	None observed	-1666.241	
Neutral (M1)	$\omega_0=0.050, f_0=0.408$ $\omega_1=1.000, f_1=0.592$	None allowed	-1600.333	131.816 ^f (0)
Positive (M2)	$\omega_0=0.059, f_0=0.391$ $\omega_1=1.000, f_1=0.353$ $\omega_2=2.239, f_2=0.256$	20R, 44T	-1596.678	7.310 ^e (2.6 x 10 ⁻²)
Discrete (M3)	$\omega_0=0.056, f_0=0.384$ $\omega_1=0.913, f_1=0.320$ $\omega_2=2.121, f_2=0.296$	20R, 35S, 44T	-1596.668	7.330 ^e (2.6 x 10 ⁻²)
Beta (M7)	$p=0.179, q=0.132$	None allowed	-1601.903	
Beta& ω (M8)	$p_0=0.603, p=0.284$ $q=0.641$ $p_1=0.397, \omega_1=1.863$	11R, 13Y, 20R , 35S, 44T , 59T, 69L, 71I	-1596.784	10.238 ^f (6.0 x 10 ⁻³)

^aFree parameters estimated by maximum likelihood within each model are shown for reference. ω (d_N/d_S) is the ratio of nonsynonymous (d_N) to synonymous (d_S) mutation rates; f is the proportion of sites assigned to each class of ω . The M7 model assumes a beta distribution $\beta(p, q)$ within ω limited between 0 and 1. For the M8 models p_0 is the proportion of sites that come from the beta distribution $\beta(p, q)$ and p_1 is the proportion of sites under positive selection ($\omega > 1$).

^bBayesian posterior probability (p) that a site is under positive selection ($p \geq 0.95$); sites in boldface have $p \geq 0.99$.

^cTwice the improvement in maximum log likelihood between the current and previous models: $2\Delta L = 2(L_1 - L_0)$. L_1 = log likelihood of the more general model; L_0 = log likelihood of the more specific model (a specific case of the general model).

^d $p(LRT = \chi^2, df = 2)$. The LRT statistic, when measured between models with nested parameters, is conservatively distributed as χ^2 , with degrees of freedom equal to the number of additional parameters estimated by the larger model (Anisimova et al., 2001).

^eSignificant at the 5% level ($\chi^2_{5\%} = 5.99, df = 2$) and ^fsignificant at the 1% level ($\chi^2_{1\%} = 9.21, df = 2$).

Fig. 1 Fan et al. 2006

A

```

▼          *          ▼          20          ▼          *          ▼          4          ▼          *
BSP-A1/-A2 : CVFFPVYRNRKHFDC TVHGSLFFWCs--LDADYVGRWKYCAQRDYA---- : 44
BSP-A3      : CVFFFIYGNKKYFDC TLHGSLFFWCs--LDADYVGRWKYCTRNDYA---- : 44
BSP-30kDa   : CAFFFTYKGGKYYMCTRKNSVLLWCs--LDTEYCGNWKFC TERDEP---- : 44
BSPH4       : CVFFFTYKGIKFFNCTSRDSIFLWCs--LSADYVGRWKYCTRKT DYA---- : 44
BSPH5       : CIFFFVYDDIVVYSCVSVRSDYAWCs--IDEMFQGRWRYCTAKDPP---- : 44
BSPH6       : CFFFERYRDGIFHDCVQFRVKHKWCs--LNETYCGYWKYCS EEDFA---- : 44
bE12        : CIFPATYRNHVVSECLEDENNKLWCPTTENMDKDGKWSL CADTRISLVP : 50
      C FFF Y          WCs          G W C d

```

Fn2-A (3)

```

▼          60          ▼          *          ▼          8          ▼          *          ▼
BSP-A1/-A2 : --KCVFFFIYGGKRYETCTTKIGSMWMS-WCSLSPNYDKDRAWKYC : 86
BSP-A3      : --KCVFFFIYEGKSYDTCIIIGSTFMNYWCsLSSNYDEDGVWKYC : 87
BSP-30kDa   : --ECVFFFIYRKKSYESCTRVHSFFWRWCsLTSNYDEDRKAWKYC : 87
BSPH4       : --KCVFFFIYGNKSYQTCTKTGSVTKRSWCsLSPNFDEDRAWKYC : 87
BSPH5       : --SCTFFFLYRNKYFFKCTKEGYVLSRSWCsLTRDYNKDGKWKCC : 87
BSPH6       : --KCVFFFWYRHLLIYWGCTEDGDSFGKAWCsLTRNYNKRDRVWKYC : 87
bE12        : GFPCHFFFFMYKNKNYFNCINKGSKENLLWCATSNYDREDHTWVYC : 95
      C FFF Y k 5 Ct g          WCs13 151 D WkyC

```

Fn2-B (4)

Fig. 1 Fan et al. 2006

B

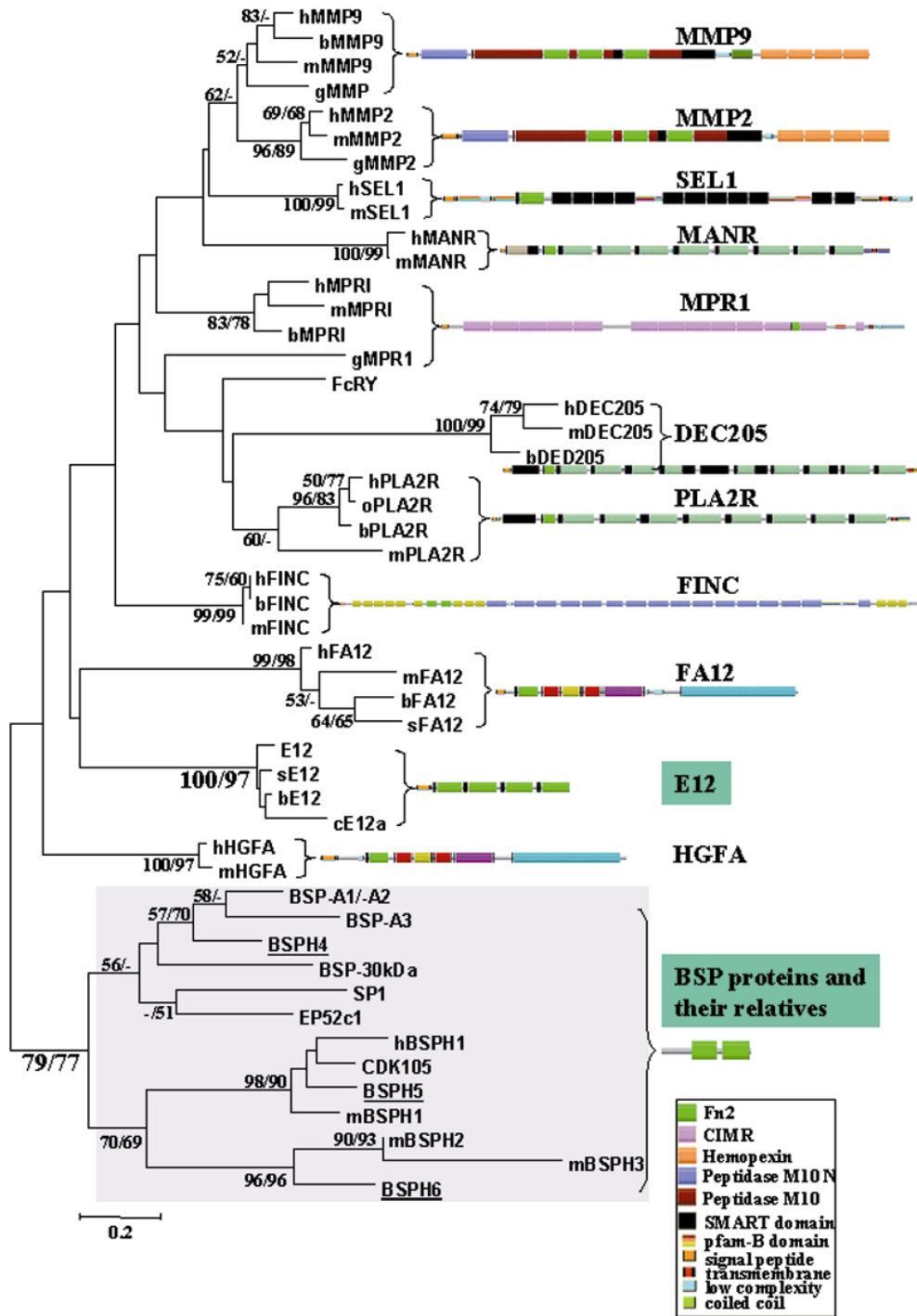


Fig. 2 Fan et al. 2006

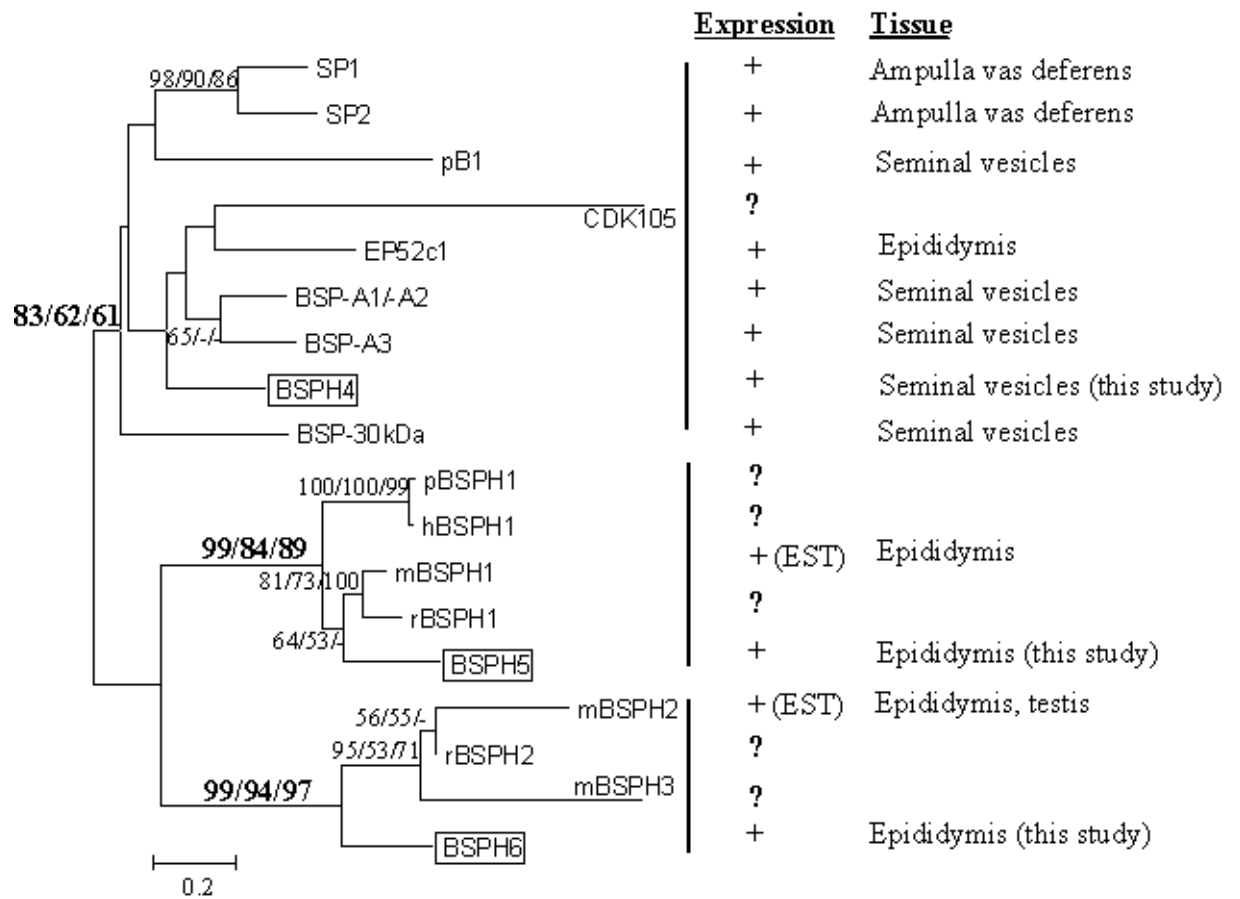


Fig. 4 Fan et al. 2006

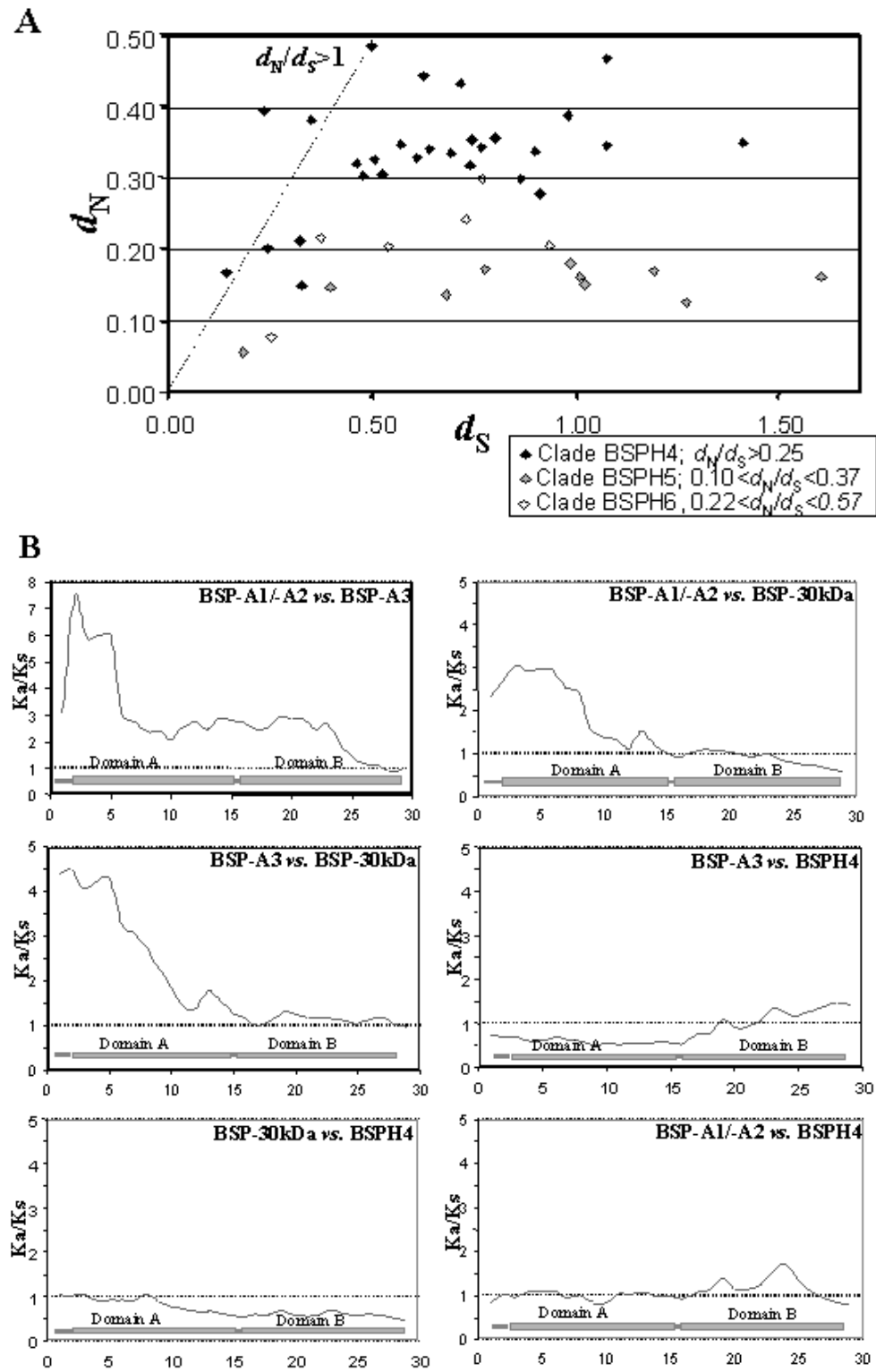
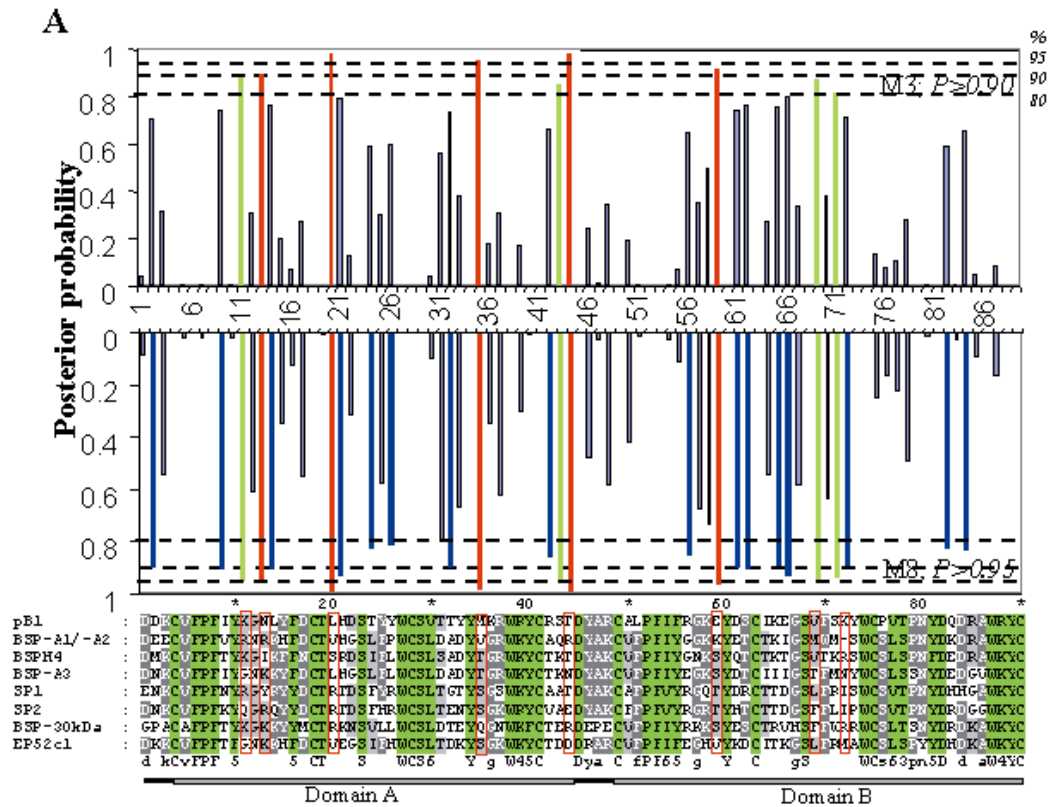
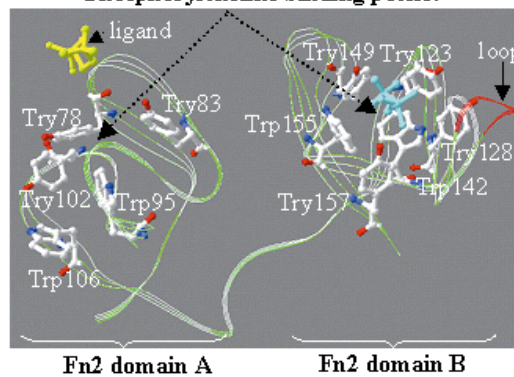


Fig. 5 Fan et al. 2006



B Phosphorylcholine binding pocket



C

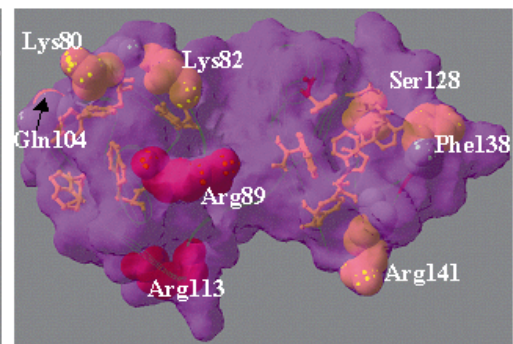
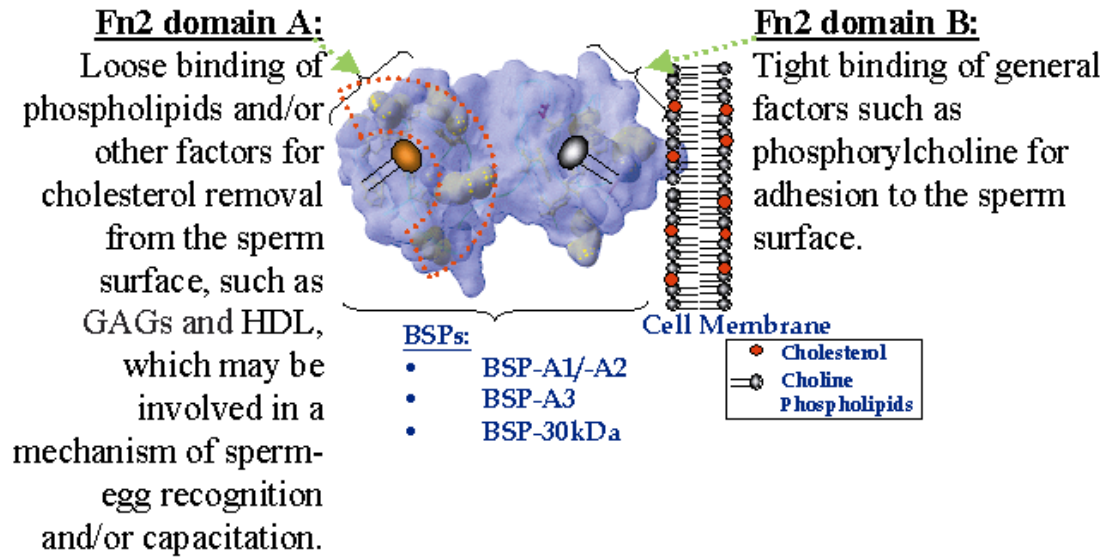


Fig. 6 Fan et al. 2006



2.2 Genomic structure and tissue-specific expression of human and mouse genes encoding homologues of the major bovine seminal plasma proteins. Lefebvre J, Fan J, Chevalier S, Sullivan R, Carmona E and Manjunath P. *Molecular Human Reproduction*, 13(1): 45-53, 2007.

Préambule:

Dans l'article précédent, nous avons décrit, dans les génomes murin et humain, des séquences similaires à celles correspondant aux BSP. Ici, l'objectif était de caractériser l'expression des homologues murins et humain des BSP. Nous avons cherché dans les bases de données de « expressed sequence tags » (EST) et avons identifié des ESTs provenant des épидидymes de souris et correspondant aux séquences partielles de deux des trois gènes murins, soient *Bsph1* et *Bsph2a*. Ces résultats ont été confirmés par RT-PCR; de plus, nous avons observé que l'expression était restreinte au système reproducteur masculin, plus spécifiquement à l'épididyme. Chez l'humain, l'expression a aussi été détectée seulement dans l'épididyme, quoique les contraintes limitant l'obtention de matériel humain n'ont pas permis d'étudier un grand nombre de tissus périphériques. Les séquences complètes d'ADNc des deux gènes murins et du gène humain ont été clonées, à l'aide de 3' et 5' RACE, et l'organisation intron/exon des gènes a été déterminée. À partir des séquences en acides aminés déduites pour les protéines encodées, nous avons noté la présence de motifs caractéristiques des protéines BSP, incluant les deux domaines de type-II semblables à ceux de la fibronectine, lesquels sont la signature structurale de cette famille. Des modèles des structures tridimensionnelles des homologues murins et humain des BSP ont été générés à partir de la structure connue de la protéine BSP1. L'expression épидидymaire de *Bsph1*, *Bsph2a* et *BSPH1*, contrairement à l'expression par les vésicules séminales chez les ongulés, implique que les produits de ces gènes pourraient jouer un rôle différent des autres BSP dans la reproduction.

J'ai planifié et effectué les expériences présentées aux figures 1, 2 et 4 ainsi qu'au tableau III de l'article. Fan J. a été responsable de l'étude des jonctions intron/exon des gènes ainsi que de la modélisation présentée à la figure 3. Chevalier S. a fourni l'ARN de cellules prostatiques humaines et Sullivan R. l'ARN épидидymaire humain utilisé pour les expériences de RT-PCR. Carmona E. m'a conseillée quant aux techniques de biologie moléculaire. J'ai fait l'interprétation des résultats et écrit la totalité du manuscrit.

Genomic structure and tissue-specific expression of human and mouse genes encoding homologs of the major bovine seminal plasma proteins

Jasmine Lefebvre¹, Jinjiang Fan¹, Simone Chevalier², Robert Sullivan³, Euridice Carmona¹
and Puttaswamy Manjunath^{1,4}

¹*Guy-Bernier Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, H1T 2M4 Canada;* ²*Department of Surgery, McGill University Health Center Research Institute, Montreal, Quebec, H3G 1A4 Canada;* ³*Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Ste-Foy, Quebec, G1V 4G2 Canada.*

⁴To whom correspondence should be addressed at: Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boulevard de l'Assomption, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada. Tel.: +1 514 252 3562 or +1 514 252 3400 (ext. 3329). Fax: +1 514 252 3430.

Running Title: BSP protein homologs in mouse and human

Key words: BSP protein homolog/cDNA cloning/mRNA expression/epididymis/sperm functions

Abstract

Sperm capacitation is a maturation event that takes place in the female reproductive tract and is essential for fertilization. A family of phospholipid-binding proteins present in bovine seminal plasma (BSP proteins) binds the sperm membrane at ejaculation and promotes bovine sperm capacitation. Homologs of these proteins have also been isolated from boar, ram, goat, bison and stallion seminal fluid, suggesting that BSP proteins and their homologs are conserved among mammals. However, there have been no reports on BSP-homologous proteins in mice and humans to date. A search of the mouse and human genomes, using the nucleic acid sequences of BSP proteins, revealed the presence of three BSP-like sequences in the mouse genome, named *mBSPH1*, *mBSPH2* and *mBSPH3* (mouse BSP Homolog 1-3), and one sequence in the human genome (*hBSPH1*). Mouse epididymal expressed sequence tags corresponding to partial sequences of *mBSPH1* and *mBSPH2* were identified. The entire cDNA sequences of *mBSPH1* and *mBSPH2* from mouse epididymis and *hBSPH1* from human epididymis were obtained by 5'-/3'-RACE and encode predicted proteins containing 2 tandemly repeated fibronectin type II domains, which is the signature of the BSP family of proteins. Using RT-PCR, it was revealed that *mBSPH1*, *mBSPH2* and *hBSPH1* mRNA is expressed only in the epididymis. Expression of *mBSPH3* was not detected in any tissue, and probably represents a pseudogene. This work shows, for the first time, that BSP homologs are expressed in mouse and human and may be involved in sperm capacitation in these species.

Introduction

Mammalian sperm acquire the capacity to fertilize an oocyte through a complex series of molecular modifications. After testicular spermatogenesis, immature sperm enter into the epididymis to undergo the first maturation events necessary for the acquisition of their fertilizing ability (Cooper, 1995). Numerous proteins are secreted by the epididymal epithelium and added to the sperm membrane at this stage, and several membrane proteins and receptors are exposed. The complex assortment of molecules found on the sperm head after maturation is crucial for sperm to undergo capacitation, reach the site of fertilization, recognize the oocyte, bind to oocyte surface receptors and finally fuse with the oocyte (Cooper, 1995; Jones, 1998).

Despite the maturation steps having occurred during epididymal transit, mammalian sperm emerging from the male reproductive tract are still incapable of fertilizing an oocyte. Complete fertilizing potential is acquired during a second maturation process that takes place in the female reproductive tract and is named capacitation (Austin, 1951; Chang, 1951). In spite of years of investigations, sperm capacitation is still poorly understood. This multistep process involves several biochemical and ultrastructural changes in the sperm membrane (Yanagimachi, 1994). Sperm undergoing capacitation exhibit: loss of adsorbed proteins originating from seminal plasma (SP), modification of membrane lipid composition, increased permeability to Ca^{2+} , increased intracellular pH, redistribution of surface proteins, changes in intramembranous particle distribution, increased sperm motility (hyperactivation), increased adenylate cyclase and cyclic-adenosine monophosphate (cAMP) and an increased tyrosine phosphorylation of a group of signalling proteins (for reviews, see (de Lamirande *et al.*, 1997; Visconti and Kopf, 1998)). Only those sperm having completed capacitation in the proper time and place will be capable of

undergoing the acrosome reaction and fertilizing an oocyte. In the bovine species, a family of seminal plasma proteins (Bovine Seminal Plasma proteins) bind to the sperm membrane upon ejaculation and are essential for sperm capacitation (Manjunath and Therien, 2002).

BSP proteins (BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 and BSP-30kDa) are secreted by the seminal vesicle epithelial cells as part of the semen and constitute approximately 60% of total bovine seminal plasma proteins. BSP-A1 and -A2 differ only in their degree of glycosylation and are considered as one chemical entity, named BSP-A1/-A2 or PDC-109 (Esch *et al.*, 1983). The biochemical properties and structure of these proteins have been thoroughly characterized (Manjunath *et al.*, 1988). Each BSP protein contains two homologous type II domains (Fn2 domains) (Fan *et al.*, 2006), that are responsible for the binding of these proteins to choline phospholipids, glycosaminoglycans (GAGs), collagen and gelatin (Manjunath *et al.*, 1987, 1988, 2006). BSP proteins can also bind to high- and low-density lipoproteins (Manjunath *et al.*, 1989, 2002; Therien *et al.*, 2001). The cloning and sequencing of the cDNA corresponding to the BSP proteins has been reported (Kemmer and Scheit, 1988; Salois *et al.*, 1999). Recently, three new BSP-related genes (*BSPH4*, *BSPH5* and *BSPH6*) were identified in the bull, and their expression in the seminal vesicles (*BSPH4*), epididymis and testis (*BSPH5*, *BSPH6*) was ascertained (Fan *et al.*, 2006).

Homologs of BSP proteins have been characterized from the seminal fluid of boar, stallion, goat, bison and ram (reviewed in (Manjunath *et al.*, 2006)), indicating that they are conserved among mammals and probably share similar roles in sperm capacitation. However, there have been no reports to date revealing the presence of BSP family proteins in mice or humans. The present study was aimed at characterizing BSP-homologous genes in these species.

Materials and methods

Materials

Human epididymis, testis and seminal vesicles were obtained through our local organ transplantation program. Donors were 28-48 years of age with no medical pathologies affecting reproductive function. Tissues were collected while artificial circulation was maintained to preserve organs assigned for transplantation. Seminal vesicle tissue was obtained from patients undergoing prostatectomy by laparoscopy under general anaesthesia. Tissues were immediately sent to the laboratory, dissected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. All procedures were approved by the ethical committee of Laval University. Human prostate was obtained with informed consent from benign prostatic hyperplasia patients undergoing laser resection of the prostate at the McGill University Health Centre.

Animal use, tissue collection and RNA extraction

Mice were maintained and handled according to the guidelines of the Animal Care Committee at the Guy-Bernier Research Centre. Mouse tissues were collected immediately after sacrifice and snap-frozen in liquid nitrogen. Tissues were stored at -80 °C until RNA extraction. Total RNA from human testis and caput epididymal tissues was isolated as explained in (Legare *et al.*, 1999). Human prostate RNA was prepared using the RNeasy Minikit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), according to the manufacturer's specifications. Human seminal vesicle and mouse tissue RNA were extracted using the Trizol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions.

Cloning of mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1 cDNA

To determine the internal sequences (Fn2 domains) of *mBSPH1* and *hBSPH1*, PCR products resulting from the amplification of mouse or human epididymal cDNA were excised from the agarose gel, purified using the Qiaex II gel purification kit (Qiagen) and sequenced using the Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). PCR primers (Table I) were designed according to the partial Fn2 domain cDNA sequences obtained from a BLAST search of the mouse and human genomes using the BSP nucleic acid sequences. The missing 5'- and 3'-ends were obtained using the 5'- and 3'-RACE Systems for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen), according to manufacturer's instructions.

Briefly, for 5'-RACE of *mBSPH1*, first-strand cDNA was synthesized using total mouse epididymal RNA and *mBSPH1* Gene-Specific Primer 1 (GSP1) (Table I). PCR-amplification was performed using *mBSPH1* GSP2 (Table I) and the Abridged Anchor Primer (AAP) (supplied in kit). The PCR conditions were: one cycle: 94 °C- 2 min; 35 cycles: 94 °C- 45 s, 55 °C- 45 s, 72 °C- 1 min 30 s; one cycle: 72 °C, 7 min. A nested amplification was performed using a nested *mBSPH1* PCR primer (Table I) and the Abridged Universal Amplification Primer (AUAP) (supplied in kit), under the same conditions. For 3'-RACE, first-strand cDNA was synthesized using total mouse epididymal RNA and the Adapter Primer (supplied in kit). PCR amplification was performed using *mBSPH1* GSP3 and AUAP primers under the same conditions.

For 5'-RACE of *hBSPH1*, first-strand cDNA was synthesized using total human epididymal RNA and *hBSPH1* GSP1 (Table I). cDNA was PCR-amplified using *hBSPH1* GSP2 and AAP primers, under identical PCR conditions as for *mBSPH1*. A semi-nested

amplification was performed using the Universal Amplification Primer (supplied in kit), under the same conditions except with only 30 cycles. For 3'-RACE, first-strand cDNA was synthesized using total human epididymal RNA and the Adapter Primer. A first PCR amplification was performed using *hBSPH1* GSP3 (Table I) and AUAP primers, under the same conditions as for *mBSPH1* 3'-RACE. A semi-nested PCR was performed using a nested *hBSPH1* primer and AUAP.

The open reading frame (ORF) and 3'-untranslated region of *mBSPH2* were obtained by sequencing a commercially available EST (ATCC #9075483). The 5'-end was obtained by 5'-RACE using the system described above. Briefly, first-strand synthesis was performed using total mouse epididymal RNA and *mBSPH2* GSP1 (Table I). cDNA was PCR-amplified using *mBSPH2* GSP2 (Table I) and AAP primers, under the same conditions described above. A semi-nested amplification was performed using *mBSPH2* GSP2 and the Universal Amplification Primer, under the same PCR conditions except with only 30 cycles.

The final 5'- and 3'-RACE products were subcloned into pCR2.1 (Invitrogen) and sequenced. The open reading frames of *mBSPH1*, *mBSPH2* and *hBSPH1* mRNA were identified using the ORF Finder tool from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). The cDNA sequences of *mBSPH1*, *mBSPH2* and *hBSPH1* were deposited into GenBank under accession numbers DQ227498, DQ227499 and DQ227497, respectively. The full cDNA sequences of each gene were compared with the genomic sequences using the BLAST2 algorithm and each pairwise match was then mapped onto the chromosome. Intron/exon boundaries were determined by the exact match of the cDNA with the genomic sequences and the consensus boundary (GT/AG) (Shapiro and Senapathy, 1987).

Analysis of predicted protein sequences

The presence of potential signal peptides within the mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1 protein sequences as well as the expected cleavage sites were examined using the SignalP 3.0 software (Bendtsen *et al.*, 2004). A search for potential *O*-glycosylation sites was performed using NetOGlyc 3.1 (Julenius *et al.*, 2005). To compare sequence similarity, the amino acid sequences were aligned with those of BSP-A1/-A2 and BSP-A3 (GenBank numbers: P02784 and P04557) using the ClustalW method (Thompson *et al.*, 1994). Similarity was calculated according to the PAM250 matrix. The sequences of mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1 were submitted to the SWISS-MODEL server (Automated Comparative Protein Modeling Server, Version 3.0) (Schwede *et al.*, 2003) for comparative protein structure modeling. All homology models were generated based on the template of BSP-A1/-A2 (PDC-109; PDB accession number: 1H8P) using Swiss-Pdb Viewer 3.7 (Schwede *et al.*, 2003; Guex and Peitsch, 1997) and MOLMOL 2K.2 (Koradi *et al.*, 1996).

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR reactions were performed with the Superscript-III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) according to manufacturer's protocol. Briefly, 2 µg total RNA from each tissue was treated with DNase (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) and reverse transcribed. 2 µL of the first-strand reaction was used as a template for PCR amplification with gene-specific primers. The *mBSPH1*, *mBSPH2* and *hBSPH1* gene fragments were amplified using primers designed as described above according to the partial Fn2-domain cDNA sequences (Table I). A mouse β -*actin* gene fragment was amplified as a control for *mBSPH1* and *mBSPH2*, whereas a human γ -*actin* gene fragment was amplified as a control for *hBSPH1* using the primers described in Table I. PCR conditions were: one cycle: 94 °C- 3 min; 35 cycles: 94 °C- 45 s, 55 °C- 45 s, 72 °C- 1 min;

one cycle: 72 °C, 7 min. The RT-PCR products were analyzed in 1.5% agarose gels containing ethidium bromide.

Results and Discussion

Presence of BSP-homologous sequences in the mouse and human genomes

BSP proteins play a crucial role in bovine sperm capacitation and homologs of these proteins have been isolated and characterized from the seminal fluid of numerous species. Quite recently, we performed an extensive bioinformatics analysis of all proteins containing Fn2 domains in fully or partially sequenced genomes of several mammalian species, and found that those contained within BSP-related proteins are unique compared to other Fn2-containing proteins, thus allowing the identification of many yet unidentified BSP-related sequences (Fan *et al.*, 2006).

The mouse genome was searched for BSP-related sequences, allowing the identification of three BSP-related genes on chromosome 7, designated *mBSPH1* (mouse BSP Homolog 1), *mBSPH2* and *mBSPH3*. In a similar fashion, the recently updated human genome shotgun assembly (Istrail *et al.*, 2004) was searched, yielding one hit with a score of 47% identity in predicted amino acid sequence. The human BSP-homologous gene was named *hBSPH1* (human BSP Homolog 1) and is orthologous to *mBSPH1* (Fan *et al.*, 2006). Based on the mapping data from the shotgun assembly, the *hBSPH1* gene is located in loci along chromosome 19.

In order to verify whether the newly identified sequences are actively transcribed genes, the EST database was searched using the mouse BSP-homologous gene sequences and several ESTs of epididymal origin were identified (GenBank accession numbers: BY721041 and BB73190 for *mBSPH1*; BY721134, AV381075, BB073010, BU961078 and AV379540 for *mBSPH2*). However, there were no ESTs sharing sequence similarity with *mBSPH3*. The epididymal expression of *mBSPH1* and *mBSPH2* was confirmed by RT-PCR, although no expression was detected for *mBSPH3* (see below), which seemingly represents a pseudogene.

Full cDNA sequences of mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1

The full-length mRNAs encoded by *mBSPH1* and *hBSPH1* were obtained by RT-PCR of epididymal RNA followed by 5'- and 3'-RACE and are shown in Figure 1 (A and C). The *mBSPH1* cDNA sequence (DQ227498) is 716 bp in length with an ORF of 402 bp (including the stop codon), encoding a predicted protein of 133 amino acids. In the case of *hBSPH1* (Figure 1C), the entire cDNA (DQ227497) spans 654 bp, with a complete ORF of 399 bp (including the stop codon), coding for a predicted protein of 132 amino acids. The cDNA sequence of *mBSPH2* (Figure 1B) was obtained by sequencing a commercially available EST, which allowed the determination of the entire ORF as well as the 3'-untranslated region, whereas the sequence of the 5'-untranslated region was obtained by 5'-RACE. The complete cDNA sequence of *mBSPH2* (DQ227499) is 530 bp in length, with an ORF of 396 bp encoding a protein of 131 amino acids.

Intron/exon organization of the mouse and human BSP-homologous genes

The mouse *mBSPH1* gene spans 24 kb of chromosome 7 and consists of 5 exons and 4 introns. A similar organization was observed for *mBSPH2*, also on chromosome 7, which contains 5 exons and 4 intronic sequences spanning approximately 21 kb. In the case of *hBSPH1*, the 26 kb genomic DNA sequence found on chromosome 19 encompasses 6 exons and 5 introns. The intron/exon splice sites as well as the sizes of each intron and exon for *mBSPH1*, *mBSPH2* and *hBSPH1* are indicated in Table II. All intron-exon boundaries were consistent with the GT/AG rule for eukaryotic splice junctions (Shapiro and Senapathy, 1987).

The non-coding regions of the *mBSPH1*, *mBSPH2* and *hBSPH1* genes were analyzed by the blastx and blastn programs, revealing that introns in *mBSPH1* (introns 2 and 3) and in *mBSPH2* (intron 2) encoded a reverse transcriptase that may have originated

from L1-retrotransposable elements (Martin, 1995; Shehee *et al.*, 1987; Goodier *et al.*, 2001). In addition, homologous fragments of the *Plasmodium yoelii yoelii* hypothetical protein PY07367 coding sequence (XP_728215) (Carlton *et al.*, 2002) were also evident within intron 1 of both *mBSPH1* and *mBSPH2*, a situation that may have resulted from the mobilization of retrotransposons or from horizontal gene transfer from the rodent malaria parasite DNA. The introns in the human *hBSPH1* gene were rich in *Alu* repeat elements (Claverie and Makalowski, 1994; Jurka and Milosavljevic, 1991). These mobile and repeat elements, as the main components of the mouse and human genomes, may play a role in the evolution of BSP-homologous genes.

Chromosomal mapping of the mouse and human BSP-homologous genes

Mapping of the mouse BSP-homologous genes revealed that the *mBSPH1* and *mBSPH2* coding strands are arranged in a “head-to-head” orientation on chromosome 7, suggesting that the two genes may share a common promoter and/or regulatory elements (Doerwald *et al.*, 2004; Trinklein *et al.*, 2004). Moreover, the human and mouse BSP homologous genes map to syntenic segments of their respective genomes, which signifies that orthologous genes are present in the same order and indicates a common evolutionary origin. The BSP homologous genes are found in large syntenic segments of the chromosomes, which share the same gene order, although there are differences in the spacing between each gene. Since there is but a single BSP-homologous gene in human, it is possible that the mouse *mBSPH2* and *mBSPH3* sequences arose from gene duplication. Our previous studies indicated that there is also a single BSP-homologous gene in the genomes of other primates such as chimpanzee and monkey (Fan *et al.*, 2006). The syntenic mapping of the human and mouse BSP-homologous genes suggests that the mouse may be a good model to study the functions of human genes in reproductive biology.

Putative signal peptides in the mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1 predicted proteins

The cDNA sequences determined for *mBSPH1*, *mBSPH2* and *hBSPH1* were translated and the predicted protein sequences are also indicated in Figure 1. In bovine, the BSP protein sequences contain signal peptides targeting the proteins for secretion. Similarly, BSP-homologs identified in other species also are secreted proteins. Using the SignalP 3.0 server, it was revealed that the mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1 protein sequences contain 20-, 22- and 17-amino acid predicted signal peptides, respectively, at the N-terminus of the immature proteins (expected cleavage sites indicated in Figure 1). The predicted amino acid structures strongly suggest the presence of two Fn2 domains, which are responsible for the binding of BSP proteins to the sperm membrane (Manjunath *et al.*, 1994) as well as to other extracellular ligands such as lipoproteins (Manjunath *et al.*, 1989, 2002) and glycosaminoglycans (Therien *et al.*, 2005). Consequently, mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1 should be secreted proteins.

Molecular characteristics of the mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1 predicted proteins

After cleavage of the putative signal peptide of mBSPH1, the mature protein would contain 113 amino acids (including the eight cysteines characteristic of the BSP-family Fn2 domains), with a predicted molecular weight of 13.8 kDa and an isoelectric point (pI) of 5.12 (Figure 1A). Mature mBSPH2 would be a 109-residue protein, with a calculated molecular weight of 12.8 kDa and a pI of 6.46, and would also contain the eight characteristic cysteine residues (Figure 1B). In the case of the human protein, the predicted length of the mature protein is 115 amino acids, accounting for a theoretical molecular weight of 13.8 and a pI of 8.10. The porcine BSP-homolog, pB1, is also a basic protein with a pI of 8.6 (Jonakova *et al.*, 1998). Mature hBSPH1 contains nine cysteine residues (Figure 1C), in contrast to bovine, porcine and murine BSP proteins, which contain eight. The N-terminal cysteine is expected to be free, since the eight others are found within the

Fn2 domains and would therefore be participating in intramolecular disulfide bridges. The free cysteine may participate in intermolecular disulfide bridges with other hBSPH1 molecules or with distinct proteins. Alternatively, despite the predictions, the N-terminal cysteine may not be part of the mature protein.

Analysis of potential O-glycosylation of mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1

BSP-A1, BSP-A2 and BSP-30kDa are glycoproteins, whereas BSP-A3 does not contain any carbohydrate (Calvete *et al.*, 1996; Manjunath and Sairam, 1987; Manjunath *et al.*, 1988). Porcine pB1 and equine SP-1 are also glycosylated proteins (Calvete *et al.*, 1995, 1997). In all cases, the carbohydrate linkage was shown to be *O*-glycosidic. Therefore, we analyzed the predicted protein sequences of the three new BSP homologs for potential *O*-glycosylation sites. Of the 10 serine/threonine residues in mature mBSPH1, the 14 Ser/Thr residues found in mBSPH2 and the 14 Ser/Thr residues in hBSPH1, none displayed significant scores with respect to *O*-glycosylation. The BSP homologs from mice and human are therefore not expected to be glycosylated.

mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1 display features characteristic of the BSP family

In order to compare the amino acid sequences, the sequences of mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1 were aligned with those of bovine BSP-A1/-A2 and BSP-A3 (Figure 2A). The newly identified BSP-homologs share many conserved motifs with the bovine BSP proteins, especially surrounding the cysteine residues. The –C-X-F-P-F- motif (where X is usually valine or another non-polar amino acid), found at the first cysteine residue of each Fn2 domain, is characteristic of BSP-family proteins (Esch *et al.*, 1983; Seidah *et al.*, 1987; Calvete *et al.*, 1996, 1997; Plucienniczak *et al.*, 1999; Villemure *et al.*, 2003; Bergeron *et al.*, 2005). As seen in Figure 2A, the –W-C-S-L- motif, which borders the third cysteine of each Fn2 domain, is preserved in the mouse and human proteins. In addition, the –W-

(K/R)-Y-C- motif, which surrounds the fourth cysteine of each Fn2 domain, is found in the new homologs, except for a slight change in the 2nd Fn2 domain of mBSPH2 and in the 1st Fn2 domain of hBSPH1. The conserved tryptophan and tyrosine residues are thought to be important for forming the hydrophobic cluster which lines the phosphorylcholine binding pocket, as was shown for BSP-A1/-A2 (PDC-109) (Wah *et al.*, 2002). Many other single amino acids are also conserved throughout the sequences (Figure 2A).

A schematic representation of the domain organization of the mouse and human BSP-homologous proteins is shown in Figure 2B. The mature proteins are predicted to have a variable N-terminal extension followed by Fn2 domain A, a short linker peptide, Fn2 domain B and a variable C-terminal extension. This domain repartition is strikingly similar to that of the bovine BSP proteins, except for the absence of a C-terminal extension in the bovine proteins. In addition, with the exception of the variable N-terminal domain, all domains of the mouse and human homologs are composed of the same number of amino acids as those found in the bovine proteins (Fn2A, 38 residues; linker, 7 residues; Fn2B, 42 residues). The boar (pB1; NP_998997) and stallion (SP1, SP2; CAE46515, CAE46517) BSP homologs also share a highly similar domain organization.

In order to visualize the three-dimensional organization of the predicted mouse and human BSP-homologs, we created homology models of mBSPH1, mBSPH2 and hBSPH1 (Figure 3) based on the available crystal structure of BSP-A1/-A2 (PDC-109; PDB accession number: 1H8P) (Wah *et al.*, 2002). Phosphorylcholine, a known ligand of BSP proteins (is shown in the figure within the presumed choline binding pocket. The important sequence similarity together with the identical domain and three-dimensional organization indicates that the newly identified proteins from mouse and human belong to the BSP family.

The mouse and human BSP homologs share strong sequence similarity to the bovine proteins

The percent identity and similarity among the new homologs as well as between these proteins and bovine BSP-A1/-A2 and BSP-A3 were calculated and are presented in Table III. mBSPH1 shares 35-40% identity and 53-55% similarity with the bovine proteins and with mBSPH2. It is most similar to hBSPH1 (56% identity and 78% similarity), which was expected since *mBSPH1* and *hBSPH1* are orthologous genes (Fan *et al.*, 2006). Similarly, hBSPH1 shares 33-41% identity and 54-56% similarity with the bovine proteins and mBSPH2, but is most similar to its ortholog, mBSPH1. mBSPH2 shares 33-37% identity and 50-56% similarity with the bovine, mouse and human proteins. When these calculations are performed on the sequences of the Fn2 domains (excluding the variable N- and C-terminal sequences), the values obtained are on average 10 points higher than those calculated for the entire proteins (data not shown). The Fn2 domains of hBSPH1 are 47-48% identical in amino acid sequence to BSP-A1/-A2 and BSP-A3, which is the value that was obtained when the initial search of the human genome was performed. The high level of conservation within the Fn2 domains suggests a conservation of the characteristic binding properties of BSP proteins, which are conferred by the Fn2 domains, and may also indicate shared biological functions.

Reproductive tissue-specific expression of mouse and human BSP-homologous mRNA

In order to assess the expression pattern of the BSP-homologous genes, RT-PCR was performed with RNA isolated from mouse and human tissues. Using the genomic sequences obtained in the BLAST search described above, primers for PCR amplification of the new mouse and human BSP-homologous genes were designed within the predicted exons (exons 3 and 4 for *mBSPH1* and *mBSPH2*; exons 4 and 5 for *hBSPH1*) encoding the Fn2 domains (Table I). As shown in Figure 4A, expression of *mBSPH1* and *mBSPH2*

mRNA was detected solely in the mouse epididymis. As expected, our results indicate that *mBSPH3* is not an actively transcribed gene, since expression was not detected in any tissue using several different primer pairs and numerous experimental conditions (data not shown).

Since the bioinformatics analysis indicated that *hBSPH1* is orthologous to *mBSPH1*, we predicted expression of this gene in the human epididymis. Indeed, *hBSPH1* mRNA is expressed in the human epididymis and also weakly in testis, but not in prostate or seminal vesicles (Figure 4B). No expression was detected in brain, intestine or lung; therefore results suggest the restriction of expression to the male reproductive tract. However, due to difficulties in obtaining human material, other tissues were not yet examined. For all RT-PCR experiments, samples for which the RT reaction was performed without reverse transcriptase served as a negative control (data not shown). The PCR products, corresponding to the partial transcripts of the *mBSPH1*, *mBSPH2* and *hBSPH1* genes, were confirmed by DNA sequencing, as described in the methods section.

A recent molecular evolutionary analysis revealed that all BSP-related sequences could be grouped into three sub-families: BSPH4, which is expressed in seminal vesicles, BSPH5 and BSPH6, which are expressed in the epididymis and testis (Fan *et al.*, 2006). The BSPH4 sub-family includes BSP-A1/-A2, BSP-A3 and BSP-30 kDa, which are all expressed in the seminal vesicles. On the other hand, human *hBSPH1* and mouse *mBSPH1* are included within the BSPH5 subfamily, and mouse *mBSPH2* is in the BSPH6 subfamily. Thus, the expression of these genes in the epididymis is consistent with the phylogenetic predictions.

Potential biological functions for the mouse and human BSP homologs

In the bovine species, BSP proteins are intimately involved in the process of sperm capacitation (reviewed in (Manjunath and Therien, 2002)), and BSP homologs from other mammals are also believed to play similar roles. The present study has identified BSP homologous genes in mice and human, the mRNA of which are expressed in the epididymis, differing from the seminal vesicle expression seen in other species. This may be due to species-specific differences in sperm maturation, since, in contrast to bull semen, mouse and human semen is known to coagulate after ejaculation, in which case sperm coating by seminal plasma proteins would be highly inefficient. Our preliminary experiments indicate almost undetectable levels of BSP-homologous antigens in human seminal plasma, consistent with the idea that the contact between sperm and hBSPH1 would be taking place inside the epididymis, where a small number of sperm reside for a long period. Thus, organisms that express BSPs in the epididymis need not synthesize them in excess to coat the sperm surface, unlike in other species where large amounts of BSP homologs are produced by the seminal vesicles and added to sperm at ejaculation.

On the other hand, the mouse and human BSP-homologs may fulfill somewhat different biological functions than those exerted by BSP proteins from other species. Numerous studies have shown that proteins secreted by the epididymis associate with the sperm membrane during epididymal transit and confer the ability to interact or fuse with the oocyte (Sullivan, 1999; Weerachayanukul *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2001). BSP-homologous proteins may also be added to sperm during epididymal transit and remain there until sperm enter the female reproductive tract and are ready to undergo capacitation, in which case BSP homologs in mice and human could fulfill a similar role to that of the bovine BSP proteins.

In summary, we have shown for the first time that mice and humans also express homologs of the major bovine seminal plasma proteins. The full cDNA sequences and genomic structure of the mouse and human BSP homologs were determined and mapped to syntenic segments of mouse chromosome 7 and human chromosome 19. Expression of these genes seems to be restricted to tissues of the male reproductive tract, namely the epididymis, strongly suggesting a role in sperm maturation. Based on the known role of BSP proteins in sperm capacitation, a similar role is predicted for the mouse and human BSP homologs. Further studies are underway in order to characterize these proteins and confirm their biological implications.

Acknowledgements

This work was funded by the Canadian Institutes of Health Research. J. Lefebvre is a recipient of a Doctoral Training Award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We thank Dr Yves Paquette and Josée Tessier for their advice in troubleshooting, as well as Dr Lucie Hamel for the isolation of human prostate RNA.

References

- Austin CR (1951) Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 4, 581-596.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G and Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340, 783-795.
- Bergeron A, Villemure M, Lazure C and Manjunath P (2005) Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 71, 461-470.
- Calvete JJ, Mann K, Sanz L, Raida M and Topfer-Petersen E (1996) The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett* 399, 147-152.
- Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M and Topfer-Petersen E (1995) Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 310, 615-622.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L and Topfer-Petersen E (1997) Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 407, 201-206.
- Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, Kooij TW, Pertea M, Silva JC, Ermolaeva MD, Allen JE, Selengut JD, Koo HL *et al.* (2002) Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* 419, 512-519.
- Chang MC (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168, 697-698.
- Claverie JM and Makalowski W (1994) Alu alert. *Nature* 371, 752.
- Cohen DJ, Ellerman DA, Busso D, Morgenfeld MM, Piazza AD, Hayashi M, Young ET, Kasahara M and Cuasnicu PS (2001) Evidence that human epididymal protein ARP plays a role in gamete fusion through complementary sites on the surface of the human egg. *Biol Reprod* 65, 1000-1005.
- Cooper TG (1995) Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation. *Adv Exp Med Biol* 377, 87-101.

- de Lamirande E, Leclerc P and Gagnon C (1997) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3, 175-194.
- Doerwald L, van Rheede T, Dirks RP, Madsen O, Rexwinkel R, van Genesen ST, Martens GJ, de Jong WW and Lubsen NH (2004) Sequence and functional conservation of the intergenic region between the head-to-head genes encoding the small heat shock proteins alphaB-crystallin and HspB2 in the mammalian lineage. *J Mol Evol* 59, 674-686.
- Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Ying SY and Guillemin R (1983) Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 113, 861-867.
- Fan J, Lefebvre J and Manjunath P (2006) Bovine seminal plasma proteins and their relatives: a new expanding superfamily in mammals. *Gene* 375, 63-74.
- Goodier JL, Ostertag EM, Du K and Kazazian HH, Jr. (2001) A novel active L1 retrotransposon subfamily in the mouse. *Genome Res* 11, 1677-1685.
- Guex N and Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Istrail S, Sutton GG, Florea L, Halpern AL, Mobarry CM, Lippert R, Walenz B, Shatkay H, Dew I, Miller JR *et al.* (2004) Whole-genome shotgun assembly and comparison of human genome assemblies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1916-1921.
- Jonakova V, Kraus M, Veselsky L, Cechova D, Bezouska K and Ticha M (1998) 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* 114, 25-34.
- Jones R (1998) Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 73-84.
- Julenius K, Molgaard A, Gupta R and Brunak S (2005) Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15, 153-164.
- Jurka J and Milosavljevic A (1991) Reconstruction and analysis of human Alu genes. *J Mol Evol* 32, 105-121.

- Kemme M and Scheit KH (1988) Cloning and sequence analysis of a cDNA from seminal vesicle tissue encoding the precursor of the major protein of bull semen. *DNA* 7, 595-599.
- Koradi R, Billeter M and Wuthrich K (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* 14, 51-55, 29-32.
- Legare C, Gaudreault C, St-Jacques S and Sullivan R (1999) P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis. *Endocrinology* 140, 3318-3327.
- Manjunath P and Therien I (2002) Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 53, 109-119.
- Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chretien M and Chapdelaine A (1988) Diversity of Novel Proteins in Gonadal Fluids. In McKerns KW and MC (eds) *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems*. Plenum Press, New York, USA, pp. 259-273.
- Manjunath P, Sairam MR and Uma J (1987) Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosciences Reports* 7, 231-238.
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J and Fan J (2006) Seminal plasma proteins: Functions and interaction with protective agents during semen preservation. In Roldan ER and Gomendio M (eds) *Society for Reproduction and Fertility Supplement*. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, UK, in press.
- Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chretien M and Chapdelaine A (1989) Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 264, 16853-16857.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A and Menard M (2002) Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* 67, 1250-1258.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E and Desnoyers L (1994) Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 50, 27-37.
- Manjunath P and Sairam MR (1987) Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 et BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 241, 685-692.

- Martin SL (1995) Characterization of a LINE-1 cDNA that originated from RNA present in ribonucleoprotein particles: implications for the structure of an active mouse LINE-1. *Gene* 153, 261-266.
- Plucienniczak G, Jagiello A, Plucienniczak A, Holody D and Strzezek J (1999) Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54-kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 52, 303-309.
- Salois D, Menard M, Paquette Y and Manjunath P (1999) Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. *Biol Reprod* 61, 288-297.
- Schwede T, Kopp J, Guex N and Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31, 3381-3385.
- Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR and Chretien M (1987) Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem J* 243, 195-203.
- Shapiro MB and Senapathy P (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 15, 7155-7174.
- Shehee WR, Chao SF, Loeb DD, Comer MB, Hutchison CA, 3rd and Edgell MH (1987) Determination of a functional ancestral sequence and definition of the 5' end of A-type mouse L1 elements. *J Mol Biol* 196, 757-767.
- Sullivan R (1999) Interaction between sperm and epididymal secretory proteins. In Gagnon C (ed) *The Male Gamete. From Basic Science to Clinical Applications*. Cache River Press, Vienna, IL, USA, pp. 93-104.
- Therien I, Bousquet D and Manjunath P (2001) Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biol Reprod* 65, 41-51.
- Therien I, Bergeron A, Bousquet D and Manjunath P (2005) Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Reprod Dev* 71, 97-106.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

- Trinklein ND, Aldred SF, Hartman SJ, Schroeder DI, Otilar RP and Myers RM (2004) An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res* 14, 62-66.
- Villemure M, Lazure C and Manjunath P (2003) Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 39.
- Visconti PE and Kopf GS (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59, 1-6.
- Wah DA, Fernandez-Tornero C, Sanz L, Romero A and Calvete JJ (2002) Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109-phosphorylcholine complex. *Structure (Camb)* 10, 505-514.
- Weerachatanukul W, Xu H, Anupriwan A, Carmona E, Wade M, Hermo L, da Silva SM, Rippstein P, Sobhon P, Sretarugsa P *et al.* (2003) Acquisition of arylsulfatase A onto the mouse sperm surface during epididymal transit. *Biol Reprod* 69, 1183-1192.
- Yanagimachi R (1994) Mammalian Fertilization. In Knobil E and Neill J, D. (eds) *The Physiology of Reproduction* 2nd edition. Raven Press, New York, USA, pp. 189-317.

Table I. Oligonucleotide primers used in this study

Name	Sequence (5'-3')	Experimental Use
mBSPH1-F/mBSPH1-GSP3	AGATGGTGCATGTGTCTTTCC	RT-PCR/3'-RACE
mBSPH1-R/mBSPH1-GSP2	CTCATCACTCTATAACAATATTTCC	RT-PCR/5'-RACE
mBSPH1-GSP1	CTCTCTACAACCAGTTATCTTC	5'-RACE
mBSPH1-nested	CACCTCTCCATCCTCTGTGCAATC	5'-RACE
mBSPH2-F	CCAAAGTGTATTTCCCTTTCC	RT-PCR
mBSPH2-R/mBSPH2-GSP1	CATTTGGAGGAACATCTGATGTATC	RT-PCR/5'-RACE
mBSPH2-GSP2	CTAAAAATTGTTAGGAGAACATTGC	5'-RACE
hBSPH1-F/hBSPH1-GSP3	AGATGGGGAGTGTGTCTTTCC	RT-PCR/3'-RACE
hBSPH1-R/hBSPH1-GSP1	CAGTATTCCAAATTCGGTCC	RT-PCR/5'-RACE
hBSPH1-GSP2	CATCATCAGTACACTCCCAGTAG	5'-RACE
hBSPH1-nested	GACTGCATCAAGTCCAAGGCAAGAC	3'-RACE
β -actin-F (mouse)	CCCCCTGAACCCTAAGGCCA	RT-PCR
β -actin-R (mouse)	TCCCTCTCAGCTGTGGTGGT	RT-PCR
γ -actin-F (human)	CCTGAAGTACCCCATGAGC	RT-PCR
γ -actin-R (human)	GTTGGCGTACAGGTCTTTGC	RT-PCR

Table II. Nucleotide sequences of the exon/intron boundaries of the *mBSPH1*, *mBSPH2*, and *hBSPH1* genes.

<i>xon</i>	Size (bp)	<i>Exon-intron junction</i>		
		5'-splice sequence	Intron size (bp)	3'-splice sequence
<i>mBSPH1</i>				
				actggatgccAGGCCTGCAA
1	124	CAAGTAGAAG <u>gt</u> aagggatg	7223*	tgtttttc <u>ag</u> ATTATTATGC
2	21	CCAACTATAG <u>gt</u> gagtgtgt	12026	aatfttttc <u>ag</u> AGTCTTTAAT
3	30	GAGACAGAAG <u>gt</u> aagttgat	1824	gttctttt <u>ag</u> ATGGTGCATG
4	132	GCTCTTCAG <u>gt</u> aagtgctt	689	ccttttac <u>ag</u> ACTATGCTCC
5	408	GGTTGTGGGatftaagatg		
<i>mBSPH2</i>				
				ctcctgtgtgTGCCATCTGC
1	86	CTGAATGCAG <u>gt</u> gaggtgaa	10155*	tgcttttc <u>ag</u> AATTGATCTC
2	33	CCAGAACAAG <u>gt</u> aagcaacc	4479	tgfttttc <u>ag</u> AGATTTCTAC
3	141	ACAGCACAGG <u>gt</u> aagaatcc	217	ttctctgc <u>ag</u> ATCCCCAAA
4	148	CTCCTAACAA <u>gt</u> aagacaat	1359	ttcacctc <u>ag</u> TTTTTAGGTA
5	122	TTCTCTTATCaacattgatg		
<i>hBSPH1</i>				
				ttttccaagaAGCCTCCCTG
1	161	GTTATTTTAA <u>gt</u> atfttcttt	11067	tgfttttc <u>ag</u> ATGAATTATC
2	21	TCAACTGTGG <u>gt</u> gagttgat	1321	tatfttttc <u>ag</u> AAACTATAAC
3	30	GAAGTTACAG <u>gt</u> aagtcgat	2065	ttttctct <u>ag</u> ATGGGGAGTG
4	132	AGTGCAGAAG <u>gt</u> gagtgctc	518	tcctctgc <u>ag</u> ATTTTGCAAA
5	145	GTGAATGATG <u>gt</u> gagattta	8500	tttggggtt <u>ag</u> GTTTGCTTGC
6	164	TTTCTCCAGCatttctagca		

The nucleotide sequence of each exon/intron boundary and the sizes of the exon and intron are shown. Exon sequences are in upper case letters; intron sequences are in lower case letters and the boundary-conserved nucleotides are underlined.

*The intron contains ambiguous nucleotides or an unsequenced region.

Table III. Comparison of the degree of identity and similarity between the new mouse and human BSP-homologs and the bovine BSP proteins

	BSP-A1/-A2	BSP-A3	mBSPH1	mBSPH2	hBSPH1
<i>BSP-A1/-A2</i>	-	75	53	54	54
BSP-A3	61	-	53	50	55
mBSPH1	43	38	-	55	78*
mBSPH2	37	36	34	-	56
hBSPH1	41	38	56	33	-

Predicted protein sequences were aligned according to ClustalW (Thompson et al., 1994) and identities and similarities were calculated. The similarity matrix used was PAM250. Values for percent identity are on the left side of the table below the diagonal and those for percent similarity are indicated on the right side above the diagonal.

* Highest similarity

Figure legends

Figure 1. cDNA and deduced amino acid sequences of the mouse and human BSP homologs. The cDNA sequences of (A) *mBSPH1*, (B) *mBSPH2* and (C) *hBSPH1* were obtained as described in the methods section. The predicted signal peptide is indicated in bold italic letters and the position of the predicted cleavage site is marked by an upside-down arrow. The 8 characteristic cysteine residues constituting the 2 Fn2 domains are circled.

Figure 2. Analysis of the *mBSPH1*, *mBSPH2* and *hBSPH1* predicted proteins. (A) Relationships between BSP proteins and the mouse and human BSP homologs. The amino acid sequences of each new BSP homolog were deduced from their cDNA sequences and aligned with the sequences of BSP-A1/-A2 (P02784) and BSP-A3 (P04557). Upside-down arrowheads indicate the four cysteine residues in each Fn2 domain. Black solid lines underline the sequences corresponding to the Fn2 domains. Identical amino acids are highlighted in black, whereas similar amino acids are highlighted in grey. Characteristic motifs conserved throughout the BSP family are indicated below the alignment. (B) Schematic representation of the domain structure of the *mBSPH1*, *mBSPH2* and *hBSPH1* predicted proteins. Sp, signal peptide; Fn2A, 1st Fn2 domain; Fn2B, 2nd Fn2 domain.

Figure 3. Ribbon representation of homology models of the mouse and human BSP homologs. A potential ligand, phosphorylcholine, is represented in ball and stick structure. The figure was prepared with Swiss-PdbViewer 3.7b2 (Guex and Peitsch, 1997) and MOLMOL 2K.2 (Koradi *et al.*, 1996). The BSP-A1/-A2 (PDC-109; PDB accession number: 1H8P) template is from (Wah *et al.*, 2002), in which chains PDC-109 A and PDC-109 B correspond to 2 monomers, because this protein forms dimers when associated with phosphorylcholine.

Figure 4. mRNA expression analysis of the mouse and human BSP homologs. Total RNA from mouse or human tissues was prepared as described in the Methods section, and subjected to RT-PCR. **(A)** Expression of *mBSPH1* and *mBSPH2*. **(B)** Expression of *hBSPH1*. The expression of the mouse β -actin or the human γ -actin gene was used as an internal control. E, epididymis; T, testis; P, prostate; SV, seminal vesicles; Ov, ovary; Od, oviduct; U, uterus; B, brain; I, intestine; H, heart; K, kidney; Li, liver; Lu, lung.

Figure 1

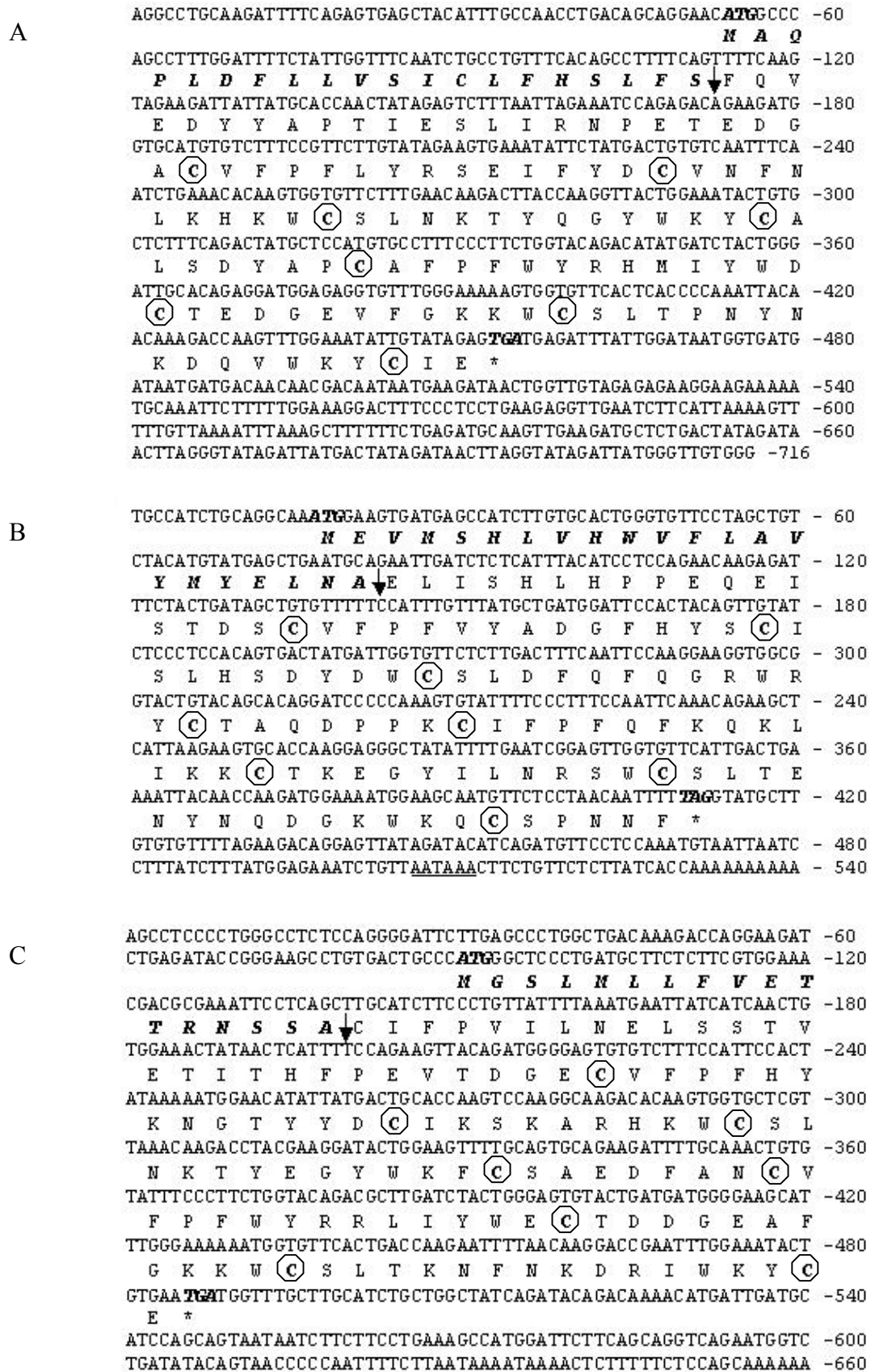
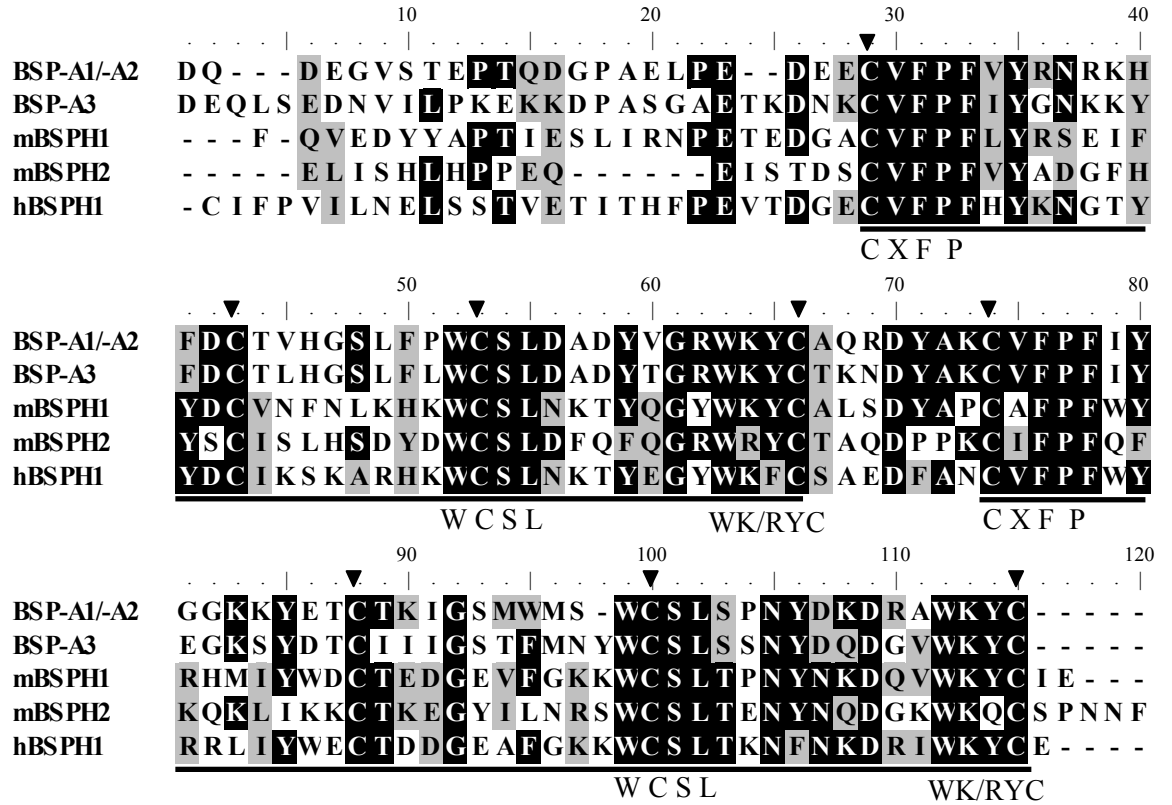


Figure 2

A



B

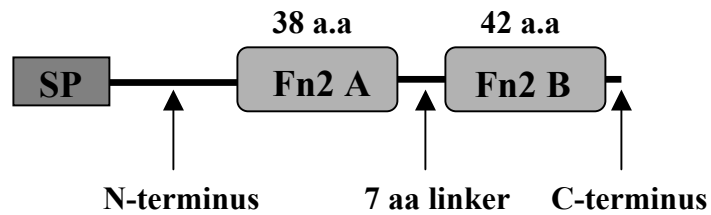


Figure 3

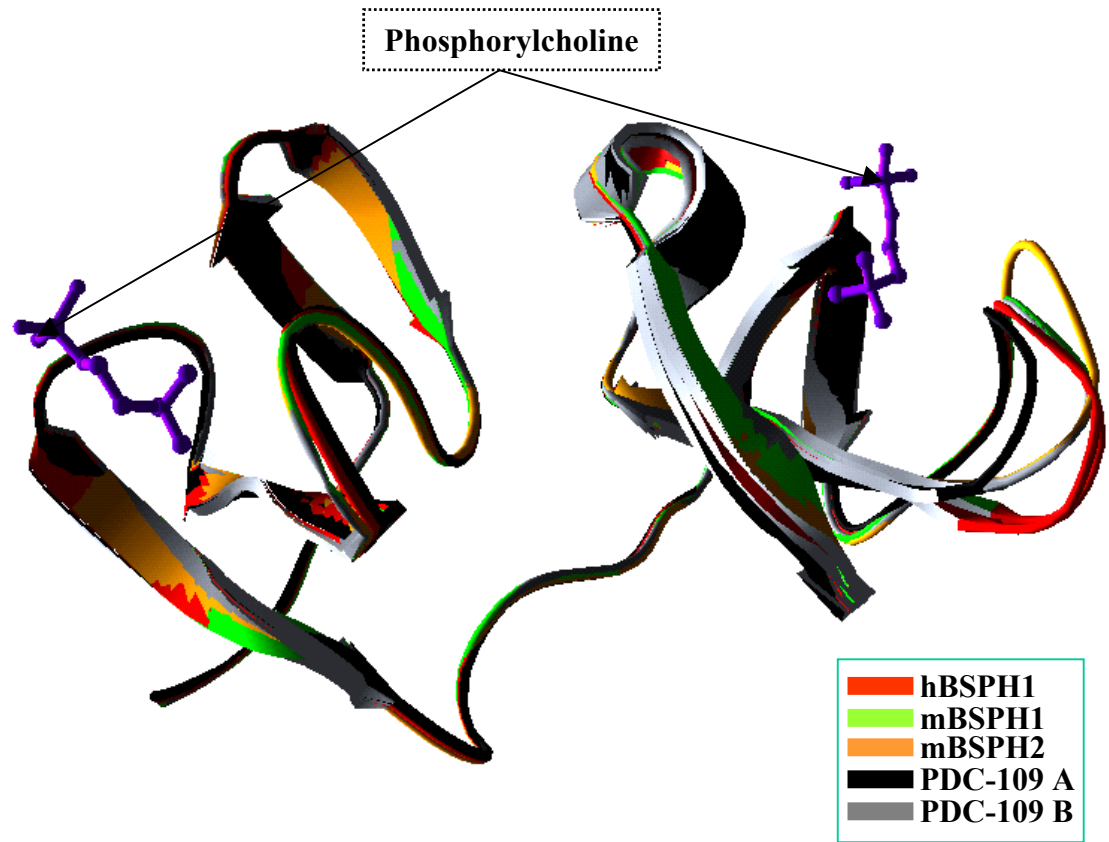
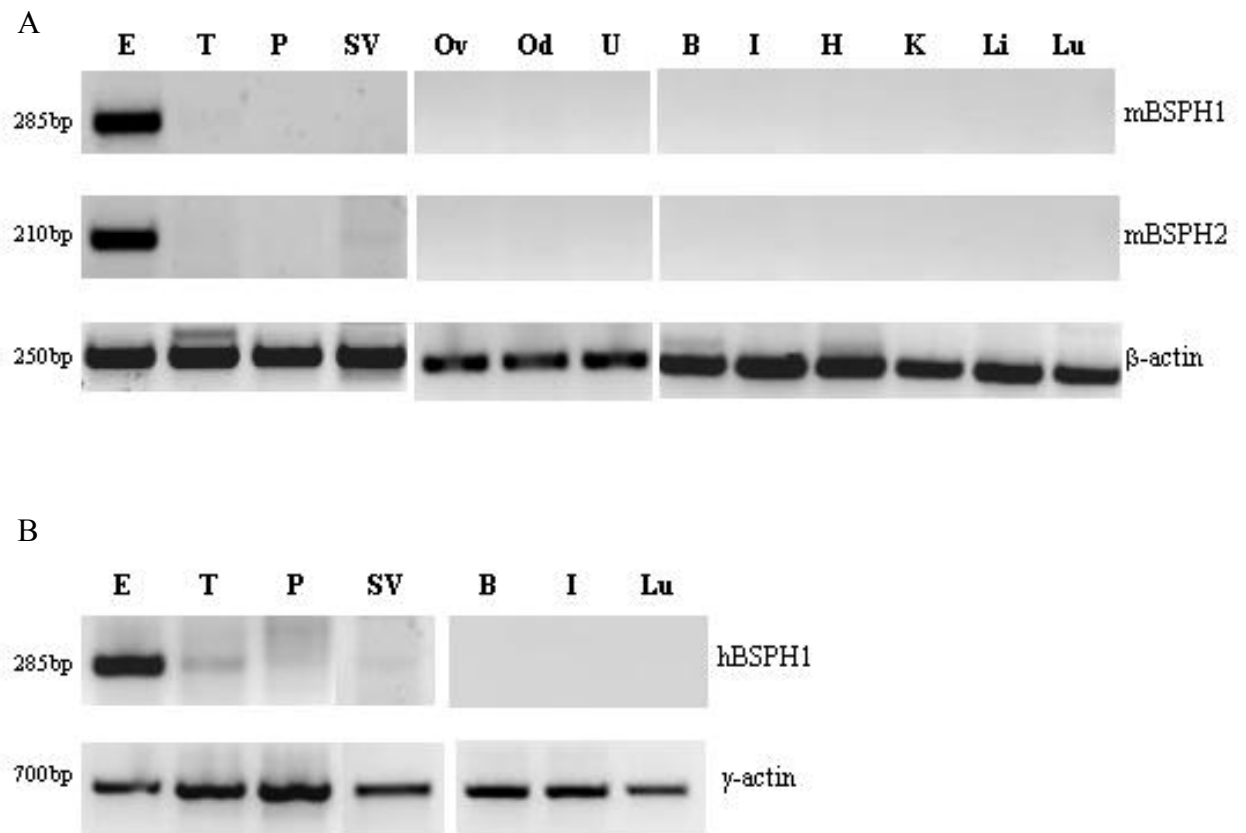


Figure 4



2.3. Recombinant expression and affinity purification of a novel epididymal

human sperm-binding protein, BSPH1. Lefebvre J, Boileau G and Manjunath P.

Molecular Human Reproduction, 15(2): 105-14, 2009.

Préambule:

Les travaux précédents avaient démontré que l'homologue humain des BSP, BSPH1, était exprimé dans l'épididyme. Puisque l'obtention de fluide épидидymaire humain en quantités suffisantes pour l'isolement de la protéine native et l'étude de ses fonctions était presque impossible, nous avons produit la protéine recombinante dans un système bactérien. Les multiples ponts disulfure des domaines de type-II de la protéine ont rendu la tâche difficile, les premiers essais avec une étiquette hexa-histidine ou glutathion-S-tranférase donnant lieu à des protéines insolubles à l'intérieur des corps d'inclusion bactériens. Ces protéines ont tout de même été utilisées afin de générer des anticorps polyclonaux dirigés contre BSPH1 et contre BspH1. Nous avons donc exprimé la protéine dans la souche Origami B(DE3)pLysS, qui possède un cytoplasme oxydatif favorisant la formation de ponts disulfure. Quoiqu'une amélioration dans le rendement en protéines solubles ait été observée, la protéine était agrégée et précipitait lors d'étapes de purification subséquentes. L'obtention de protéines solubles a été possible grâce à l'expression de BSPH1 en fusion avec une étiquette thioredoxine et l'expression dans la souche Origami B(DE3)pLysS. La protéine recombinante purifiée liait les partenaires connus des protéines BSP, tel que la phosphatidylcholine, les lipoprotéines de faible densité du jaune d'œuf et la membrane plasmique des spermatozoïdes humains, indiquant qu'elle possédait probablement sa conformation native. Cette approche a aussi permis d'exprimer l'orthologue murin de BSPH1, BspH1, sous forme soluble, indiquant que cette stratégie pourrait s'appliquer à toutes les protéines de la famille des BSP, et possiblement aux autres protéines possédant des domaines de type-II.

J'ai planifié et effectué toutes les expériences présentées dans cet article. J'ai interprété les résultats et écrit la totalité du manuscrit. Boileau G. m'a conseillée en matière de production de protéines recombinantes.

Recombinant expression and affinity purification of a novel epididymal human sperm-binding protein, BSPH1

Jasmine Lefebvre^{1,2}, Guy Boileau² and Puttaswamy Manjunath^{1,3,4}

¹*Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital,* ²*Department of Biochemistry and*

³*Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, H1T 2M4 Canada*

⁴To whom correspondence should be addressed at: Centre de Recherche, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boulevard de l'Assomption, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada. Tel.: +1 514 252 3562 or +1 514 252 3400 (ext. 3329). Fax: +1 514 252 3430

RunningTitle: Expression of a human epididymal sperm-binding protein

Key words: epididymal protein/BSP proteins/Fn2 domains/recombinant protein expression/thioredoxin

Abstract

Mammalian sperm undergo a series of maturation steps before acquiring fertilization competence. Our previous work demonstrated the importance of Binder of Sperm (BSP) proteins in bovine sperm capacitation. Recent studies identified a BSP-homologous DNA sequence in the human genome (*BSPH1*) and mRNA expression in the epididymis. The aim of this study was to develop an efficient method to express and purify recombinant human BSPH1. BSPH1 accumulates in inclusion bodies when expressed with an N-terminal hexahistidine tag in BL21(DE3) *E.coli* cells. Similar to other BSP proteins, BSPH1 contains 2 fibronectin type-II (Fn2) domains, each consisting of 2 disulfide bonds. Therefore, when expressed in Origami B(DE3)pLysS cells, a strain favouring disulfide bond formation, an improvement in soluble protein yield was observed. However, protein was aggregated, which complicated subsequent purification steps. Expression of GST-tagged BSPH1 in both cell types also led to accumulation in inclusion bodies. Finally, successful production of soluble and active protein was achieved when BSPH1 was expressed as a His₆-thioredoxin-tagged protein. Recombinant protein bound phosphatidylcholine liposomes, low-density lipoproteins and human sperm, therefore displayed binding activities common to all BSP-family proteins, which may indicate similar biological function(s). This approach was also successful in producing the murine ortholog of BSPH1 in the soluble and active form. Thus, fusion to thioredoxin and expression in Origami B(DE3)pLysS cells may constitute a strategy applicable to all BSP-family proteins, and possibly to other proteins containing Fn2 domains. This work is important in order to elucidate the role of BSPH1 in human sperm functions and fertility.

Introduction

Sperm cells, carriers of the paternal contribution to the future embryo's genome, are transcriptionally and translationally silent cells; a consequence of their highly condensed chromatin and the presence of little cytoplasm. Therefore, modifications inflicted upon sperm during their transit through the epididymis and female reproductive tract are brought about by secreted proteins, which associate with the sperm plasma membrane. In order to fertilize an oocyte, mammalian sperm must go through two successive maturation steps; the first occurring in the epididymis, referred to as epididymal maturation, and the second taking place inside the female reproductive tract, called capacitation. The bulk of modifications undergone by sperm during epididymal maturation affect the plasma membrane, notably with the addition and rearrangement of surface proteins necessary for sperm to undergo capacitation and interact with the oocyte (Cooper, 1995; Jones, 1998).

Following epididymal maturation and ejaculation, mammalian sperm undergo a complex series of modifications inside the female reproductive tract, collectively referred to as sperm capacitation (Austin, 1951; Chang, 1951). Events occurring during capacitation include changes in the plasma membrane lipid composition, increased permeability to Ca^{2+} , increased intracellular pH, redistribution of surface proteins, increased sperm motility, increased adenylyl cyclase activity and cyclic AMP as well as an increased tyrosine phosphorylation of a group of signalling proteins (for reviews, see (de Lamirande *et al.*, 1997; Visconti and Kopf, 1998; Visconti *et al.*, 2002)). A family of sperm-binding proteins secreted by the seminal vesicles has been shown to be essential for capacitation in the bovine species (Manjunath and Therien, 2002). These proteins, originally named Bovine Seminal Plasma (BSP) proteins, bind to sperm upon ejaculation due to their interaction with sperm membrane choline phospholipids (Desnoyers and Manjunath, 1992; Manjunath

et al., 1994). Very recently, the genes encoding BSP proteins were renamed, the BSP acronym now standing for “Binder of SPerm” (Manjunath *et al.*, 2008). When sperm arrive at the site of fertilization, BSP proteins interact with follicular and oviductal fluid capacitation factors, high-density lipoproteins (HDL) and glycosaminoglycans, and induce cholesterol efflux and intracellular signalling pathways, respectively, significantly contributing to the capacitated state of spermatozoa (reviewed in (Manjunath and Therien, 2002; Manjunath *et al.*, 2007)).

BSP proteins have been thoroughly characterized at the biochemical, structural and molecular levels (Kempe and Scheit, 1988; Manjunath *et al.*, 1988; Salois *et al.*, 1999). The signature of the BSP family of proteins is the presence of two tandemly arranged fibronectin type-II domains (Fn2 domains), similar to those found in the gelatin-binding domain of fibronectin (Fan *et al.*, 2006). These domains each contain four cysteine residues, which in turn form two disulfide bridges per domain (Figure 1). Thus, each BSP protein contains four disulfide bonds. Fn2 domains are responsible for the binding of BSP proteins to HDL (Manjunath *et al.*, 1989), glycosaminoglycans (Therien *et al.*, 2005), choline phospholipids (Desnoyers and Manjunath, 1992), collagen and gelatin (Manjunath *et al.*, 1987). BSP-homologous proteins are also present in the seminal fluids of boar, stallion, goat, ram and bison (reviewed in (Manjunath *et al.*, 2007). In all of the previously mentioned species, BSP-like proteins are present in the seminal fluid in relatively large quantities (ranging from 1% to 60% of total seminal plasma proteins). Consequently, the study of their biological functions was made possible by affinity purification of the native proteins directly from seminal plasma, followed by subsequent incubation of the purified proteins with sperm for functional assays (Lusignan *et al.*, 2007; Therien *et al.*, 1997; Therien *et al.*, 1995). Recently, we have shown that BSP homologues are also expressed in

mice and human (Lefebvre *et al.*, 2007). However, in these species, BSP-like proteins are expressed in the epididymis and represent a minute proportion of seminal plasma proteins. This renders the task of purifying sufficient quantities of the native protein quite complex, thus favouring the use of recombinant technology.

DNA sequences containing one or more repeats of Fn2 domains are found in more than 100 genes in numerous mammalian genomes (Fan *et al.*, 2006). The phylogeny of Fn2 domain containing proteins has been thoroughly described (Fan *et al.*, 2006), and indicates the existence of at least 12 different families encompassing more than 50 proteins. Despite the presence of Fn2 domains in a wide array of proteins, such as extracellular matrix proteins, membrane-associated proteins, matrix metalloproteases (MMPs), seminal fluid proteins and serine proteases (Ozhogina *et al.*, 2001), very few of these have been successfully expressed in a recombinant system. Moreover, of those expressed, very few studies report high-yield soluble expression, and most resorted to the solubilization and refolding of recombinant protein from insoluble inclusion bodies (Banyai *et al.*, 1990; Jani *et al.*, 2005; Tordai and Patthy, 1999). Hence, efforts aimed at developing an efficient strategy to produce soluble recombinant Fn2 domain-containing proteins are warranted.

The objective of the present study was to express and purify the recombinant human BSP protein, BSPH1 (previously named hBSPH1), which contains 2 Fn2 domains, in order to facilitate the examination of its biological role in sperm functions. Since BSP proteins are essential for bovine and porcine sperm capacitation, it is justified to hypothesize that the human counterpart would be involved in human sperm functions. However, the unavailability of native protein has made the confirmation of this hypothesis impossible. The soluble expression of recombinant human BSPH1 and murine BspH1 (ortholog of BSPH1) will allow the investigation of the role of this protein in sperm functions and

fertility. In addition, BSP proteins have been shown to be detrimental in the context of sperm storage and cryopreservation (Manjunath *et al.*, 2007). Therefore, purified recombinant proteins will be useful in investigating the effect of BSPH1 and Bsph1 on sperm storage in the mouse and human species, respectively.

Materials and methods

Materials

Plasmids pET15b and pET32a, as well as *E.coli* host strains BL21(DE3)pLysS and Origami B(DE3) pLysS and His-bind resin were from Novagen (EMD Biosciences, La Jolla, CA, USA). pGEX-5x-1 expression vector, Sephacryl S-100 and *Taq* DNA polymerase were from GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada), while *Pfu* DNA polymerase was from Fermentas (Burlington, ON, Canada). Restriction enzymes were from New England BioLabs (Beverly, MA, USA). QIAprep Spin Miniprep Kit and Qiaex II gel extraction kit were from Qiagen (Mississauga, ON, Canada). TA Cloning kit and T₄ DNA ligase were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). For western blotting, the His-Probe monoclonal antibody was from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA), whereas the goat anti-mouse IgG and goat anti-rabbit IgG were from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada), and the chemiluminescence reagent was from Perkin-Elmer (Boston, MA, USA). Freund's adjuvant (complete and incomplete) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor tablets were from Roche (Manheim, Germany). Finally, the B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent was from Pierce (Rockford, IL, USA), and all other chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

Cloning of cDNA sequences into expression vectors

For expression of BSPH1 with an N-terminal His-tag, human epididymal cDNA was used as a template for polymerase chain reaction (PCR) amplification of *BSPH1*. In order to clone into the expression vector pET15b, the following oligonucleotide primers were employed: BSPH1-F(*Nde*I) 5'-GCG CAT ATG TGC ATC TTC CCT GTT ATT TTA AAT G-3' and BSPH1-R(*Bam*HI) 5'-GCA GGA TCC TCA TTC ACA GTA TTT CCA AAT TCG-3'.

For expression of BSPH1 with an N-terminal GST-tag, human epididymal cDNA was once again used as a template for PCR, using the following primers: BSPH1-F(*Bam*HI) 5'-GCG GGG ATC CTC ATC TTC CCT GTT ATT TTA AAT G-3' and BSPH1-R(*Xho*I) 5'-CGC CTC GAG TCA TTC ACA GTA TTT CCA AAT TCG-3'. The restriction sites added during PCR amplification allowed subsequent cloning into to pGEX-5x-1 expression vector.

For expression of BSPH1 fused to thioredoxin, the pET15b-BSPH1 plasmid was used as a DNA template. The following primers were used, which allowed subsequent cloning into the expression vector pET32a: BSPH1-F2(*Bam*HI) 5'-GCA GGA TCC ATC TTC CCT GTT ATT TTA AAT G-3' and BSPH1-R(*Xho*I).

PCR amplification was performed using *Pfu* DNA polymerase, under the following conditions: 94°C, 3 min; 33 cycles of 94°C, 45s; 60°C, 45s; 72°C, 1 min and 1 cycle of 72°C, 7 min. *Taq* DNA polymerase was added to PCR reactions during the final elongation step, in order to allow subsequent TA sub-cloning into pCR2.1. Sub-cloned *BSPH1* sequences were excised from pCR2.1 using the appropriate restriction enzyme pairs mentioned above, while the expression vectors were linearized using the same enzymes. Digested inserts and vectors were run on a 1% agarose gel, gel-purified using the Qiaex II gel extraction kit and then ligated overnight using T₄ DNA ligase. Ligation reactions were transformed into competent DH5α cells, and plasmid DNA was isolated using the QIAprep Spin Miniprep Kit. Sequences were confirmed using the Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Protein expression in E.coli

Plasmids were transformed into BL21(DE3)pLysS or Origami B(DE3)pLysS competent cells using standard methods (Sambrook and Russel, 2001). Transformed

bacteria were grown overnight on LB-agar plates containing 100 µg/ml ampicillin, after which single colonies were used to inoculate liquid LB medium containing the same antibiotic. For protein expression, 300 ml to 1 L liquid LB medium was inoculated with 1/100 volume of overnight culture; bacteria were grown at 37°C with shaking at 200 rpm until the OD₆₀₀ reached 0.6-0.8 and then IPTG was added to induce expression. An IPTG concentration of 1 mM was used to induce expression of His-tagged and thioredoxin-fused BSPH1 in BL21(DE3) pLysS cells for 3 h at 30°C, as well as in Origami B(DE3)pLysS cells when induction was performed at 16°C for 16 h. In the case of 3-4 h inductions of Origami B(DE3)pLysS cells at 30°C, 0.2 mM IPTG was used, whereas 0.1 mM IPTG was used to induce expression of GST-tagged BSPH1 in both cell types. Following induction, cells were harvested by centrifugation at 5 000 x g for 10 min at 4°C. 1 ml aliquots of bacterial suspensions were removed before and after induction, pelleted by centrifugation and resuspended in 100 µl sample buffer. 10 µl of each were used in electrophoresis and western blot experiments.

Ni²⁺ affinity chromatography

Cell pellets were resuspended in B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent and processed according to manufacturer's instructions, except that the cell lysate was subjected to sonication (3 cycles of 10 s on ice) before centrifugation at 15 000 x g for 15 minutes to separate the soluble and insoluble fractions. Supernatant was loaded onto a His-Bind column, prepared and equilibrated according to manufacturer's instructions. Unless otherwise specified, washing and elution were performed as described in the Novagen protocol handbook. All samples were analyzed by SDS-PAGE and western blotting.

Protein electrophoresis and western blotting

SDS-PAGE in 15% gels was performed according to Laemmli (Laemmli, 1970) using the Mini Protean 3 apparatus from Bio-Rad. Gels were either stained with

Coomassie Brilliant Blue, or transferred electrophoretically to Immobilon-P PVDF membranes (Millipore, Nepean, ON, Canada). Immunodetection was performed using either a His-Probe monoclonal antibody at a concentration of 1:1000, affinity-purified antibodies against a synthetic peptide corresponding to the 15 C-terminal amino acids of the deduced sequence of BSPH1 (1:1000), or affinity-purified antibodies against His₆-tagged recombinant BSPH1 (1:2000). Goat anti-mouse IgG (1:3000) and goat anti-rabbit IgG (1:10 000) were used as secondary antibodies, then blots were revealed using a chemiluminescence reagent and a Fuji LAS-3000 image analyzer (Fujifilm; Stamford, CT, USA).

Generation of antiserum against human BSPH1

A 15 amino acid peptide corresponding to the C-terminus of BSPH1 (SLTKNFKDRIWKYCE) was synthesized and conjugated to keyhole limpet hemocyanin at the Sheldon Biotechnology Centre (Montreal, QC, Canada). New Zealand rabbits were injected hypodermically with a mixture of 200 µg conjugated peptide dissolved in 100 µl 50 mM PBS, 400 µl sterile 0.9% NaCl and 500 µl Freund's complete adjuvant. Boosts were performed at 20-day intervals over a period of 88 days, with 200 µg of the same antigen in the same mixture, except using Freund's incomplete adjuvant. Bleedings were performed 15 days after each injection. Antiserum from the third boost was used for the present study.

In the case of antibodies raised against the whole protein, His₆-tagged BSPH1 was expressed as described earlier and inclusion bodies were isolated according to the instructions in the Novagen protocol handbook. For each injection, ~ 175 µg protein equivalent was run on a 10% SDS-PAGE gel. 15 µg protein was run in another lane, which was cut from the gel and stained with Coomassie Brilliant Blue. After staining, the gels were aligned and the portion of the unstained gel corresponding to BSPH1 protein was

excised. Gel slices were minced in 1 ml saline solution and homogenized using a polytron. An equal volume of Freund's complete (1st injection) or incomplete (subsequent injections) adjuvant was added and the solution was emulsified. New Zealand rabbits were immunized as described earlier. Both antisera were passed through a Protein-A-Sepharose column to purify the antibodies. Using the concentrations mentioned earlier, both antibodies gave similar results in western blots. Animals were treated in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care.

Binding to phosphatidylcholine liposomes

Liposomes of phosphatidylcholine (PC) were prepared as described in (Desnoyers and Manjunath, 1992). Briefly, 8 mg PC (Doosan Serdary Research Laboratories; Englewood Cliffs, NJ, USA) in chloroform was evaporated under N₂ until a thin film was formed in the bottom of a glass test tube (~ 30 minutes, 10-20 psi). PC was then resuspended in 2 ml Buffer A (10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 7.5) and the tube was sonicated in a Branson Ultrasonic water bath (Model 3510) for approximately 20 seconds at room temperature (lipids formed an opalescent suspension). Large multilamellar liposomes were sedimented by ultracentrifugation at 100 000 x g (32 300 rpm), at 25°C for 30 minutes in a Sorvall T-865 rotor. The pellet containing liposomes was resuspended in Buffer B (10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, pH 7.5), to obtain a lipid concentration of 4 mg/ml. To verify the binding of BSPH1 (20 µg), BSA (10 µg) and crude bovine seminal plasma proteins (cBSP; 20 µg) to PC liposomes, the indicated amounts of protein were incubated with liposomes (equivalent to 300 µg PC), in a total volume of 300 µl Buffer B. Incubations were carried out for 30 minutes at room temperature, after which liposomes were sedimented once again at 100 000 x g (32 300 rpm), at 25°C for 45 minutes. Equivalent fractions of supernatant (proteins precipitated with trichloroacetic acid) and pellet were analyzed by SDS-PAGE.

Binding to egg yolk LDL

LDL were isolated from hen's egg yolk as described previously (Manjunath *et al.*, 2002), dialyzed extensively against 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 and dosed according to the modified Lowry procedure (Markwell *et al.*, 1978). Purified Trx-BSPH1 (150 µg), Trx (150 µg) or crude bovine seminal plasma proteins (100 µg) were incubated with 200 µg LDL for 90 minutes at room temperature on a nutating platform. The density of the protein-lipoprotein solution was then increased to 1.21 g/L using KBr and the solutions were transferred to Quick Seal tubes and ultracentrifuged for 18 hours at 60 000 rpm, 20°C. After centrifugation, the samples were separated into top, middle and bottom fractions and analyzed by western blotting with the appropriate antibodies.

Binding to human sperm

Human ejaculated sperm were obtained from healthy volunteers, allowed to liquefy at 37°C for 30 minutes and sperm were counted. Sperm were separated from seminal plasma by centrifugation at 1500 x g, 10 min, RT and washed 3 times with 1 ml PBS. Purified Trx-BSPH1 or Trx alone (150 µg) were incubated with 150×10^6 washed human sperm for 1 h at RT on a nutating platform. As a control, sperm were incubated in PBS in the absence of protein. The sperm suspensions were then centrifuged 1500 x g, 10 min, RT and the supernatant was removed and kept aside for analysis. Sperm were then washed twice with 1 ml PBS, then incubated with 200 µl lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% SDS, 1% Triton-X-100, 50 mM DTT, protease inhibitor cocktail) and sonicated for 10 s at 50% amplitude. Lysed sperm were then centrifuged at 10 000 x g, 15 min, 4°C, in order to separate the supernatant containing the sperm-extracted proteins from the pellet containing cell debris. 100 µl Laemmli buffer was added to the pellet, which was then resuspended and boiled. All fractions, including 20 µl of the pellet

fraction was loaded onto the gel and analyzed in a western blot with the appropriate antibodies.

Results and discussion

The production of soluble and highly purified recombinant eukaryotic proteins in *Escherichia coli* can be a difficult task, due to numerous obstacles including inclusion body formation, misfolding and protein aggregation, which can mainly be attributed to the absence of eukaryotic chaperones. Nevertheless, *E. coli* remains the expression host of choice due to its rapid growth, high-level protein production, ease in manipulation, as well as low cost. The most commonly used method for protein expression in *E. coli* is to produce the recombinant protein in fusion with an affinity tag, rendering subsequent affinity purification a reasonably simple task (for a review, see (Terpe, 2003). The polyhistidine (His) tag is frequently used due to its small size (6-10 amino acid residues), which rarely interferes with protein activity, thus precluding the need for tag removal, as well as the possibility of a one-step purification method using immobilized metal-affinity chromatography (Porath *et al.*, 1975). However, many proteins are produced as insoluble aggregates, which can sometimes be overcome by fusion to soluble protein partners, such as glutathione-S-transferase (GST), maltose-binding protein, thioredoxin and many others (for a review, see (Terpe, 2003). Success in producing soluble, active protein is largely target protein-specific; therefore, there is no magical protocol applicable to every protein. In the absence of previously published protocols, production of soluble recombinant proteins becomes somewhat of a “trial and error” exercise.

Expression of His₆-tagged human BSPH1 in BL21(DE3)pLysS E. coli

Our initial strategy to produce recombinant BSPH1 was to express it in fusion with an N-terminal hexahistidine tag in BL21(DE3) pLysS *E. coli* cells, the most common method to produce recombinant proteins. However, as seen in Figure 2 A, the majority of His-tagged BSPH1 expressed from the pET15b expression vector accumulated in inclusion

bodies. This is most probably due to the presence of four disulfide bridges in the predicted protein structure (Figure 1). The *E.coli* cytoplasm is not an ideal environment for the oxidation of sulfhydryl groups to form stable disulfide bonds. Consequently, proteins harbouring multiple disulfide bonds are often incorrectly folded when expressed in *E.coli*. In fact, previous attempts at expressing Fn2 domain containing proteins in *E.coli* also resulted in the accumulation of these proteins in inclusion bodies (Banyai *et al.*, 1990; Jani *et al.*, 2005; Tordai and Patthy, 1999). Protein expression in the form of inclusion bodies can offer certain advantages. Primarily, recombinant protein trapped in inclusion bodies can accumulate to levels representing more than 30% of the cellular proteins. They can easily be separated from other organelles by low-speed centrifugation, protect proteins from proteolytic degradation and contain very few contaminating proteins (high purity) (Singh and Panda, 2005). However, in order to recover active protein, the inclusion bodies must first be solubilized and the recombinant protein correctly refolded and purified. Optimizing refolding conditions can prove to be a very time-consuming and tedious task. Nevertheless, we attempted a refolding strategy for His-tagged BSPH1, since the protein was abundant, and refolding of recombinant Fn2 domain-containing proteins, MMP-2 and fibronectin, has already been accomplished (Banyai *et al.*, 1990; Jani *et al.*, 2005; Tordai and Patthy, 1999). Incubation with reducing agents, such as 5 mM DTT or 10 mM tris(hydroxypropyl)phosphine, in addition to 8 M urea, was necessary to promote solubilization of the inclusion bodies (data not shown). Dialyzing denatured and reduced protein against buffer devoid of urea resulted in considerable protein precipitation and dialysis against buffer containing 2.5% or 5% glycerol kept some protein in solution, although most of it precipitated (data not shown). Examples in the literature show that disulfide-containing proteins require a more complex refolding strategy to allow proper formation of disulfide bonds (Fischer *et al.*, 1992; Leung and Ho, 2006; Vallejo and Rinas,

2004). In our hands, the approach that achieved the most success in obtaining soluble protein was a step-wise dialysis, which allowed the gradual removal of urea and included a redox system (mixture of oxidized and reduced glutathione) at an intermediate urea concentration (2 M). In addition, a low protein concentration (100 µg/ml) was used in order to minimize aggregation and promote refolding. Although a significant quantity of recombinant His-BSPH1 was rendered soluble using this method, the “refolded” protein did not exhibit properties characteristic of BSP-family proteins, such as binding to gelatin, phosphorylcholine and sperm (data not shown), suggesting that it had not regained its native conformation. This is not uncommon, as protein solubility is not an absolute indicator of correct folding (Dyson *et al.*, 2004) (Vallejo and Rinas, 2004). After refolding from inclusion bodies, some recombinant proteins show no activity despite being in the soluble form (Huang *et al.*, 1998).

Expression of His₆-tagged human BSPH1 in Origami B(DE3)pLysS E.coli

In a second attempt to produce soluble His-BSPH1, we expressed pET15b-BSPH1 in the Origami B(DE3)pLysS bacterial strain from Novagen. In contrast to most *E.coli* strains, this genetically modified strain ($\Delta trxB$ and Δgor) favours the formation of disulfide bonds in its oxidizing cytoplasm (Bessette *et al.*, 1999; Prinz *et al.*, 1997). When cells were induced at 30°C, recombinant protein accumulated in inclusion bodies (Figure 2 B), as seen with BL21(DE3)pLysS cells. However, when induction was performed at 16°C for 16 h, a significant increase of soluble His-BSPH1 was observed (Figure 2 C). The *Tenebrio molitor* thermal hysteresis protein, which contains 16 cysteines, was successfully expressed in this strain at low induction temperature and extended induction times (Bar *et al.*, 2006). The soluble fraction obtained after cell lysis was subjected to nickel affinity chromatography, which allowed the recovery of partially purified protein (data not shown).

Due to the presence of several contaminants in the His-Bind eluate, we sought to further purify the recombinant protein by reversed-phase high-performance liquid chromatography (rp-HPLC). However, His-tagged BSPH1 eluted from the HPLC column in multiple peaks (data not shown). This suggested that the protein was aggregated, and that aggregates of different sizes eluted in different peaks due to their different hydrophobicities. It has been proposed that the presence of imidazole often results in protein aggregation (Hefti *et al.*, 2001). Thus, we resolved to attempt purification of His-BSPH1 directly from cell lysates using gel-filtration chromatography, in order to separate our target protein according to its molecular weight. Whether we separated lysate proteins under basic (50 mM ammonium bicarbonate) or acidic (50 mM acetic acid), our protein consistently behaved like a high molecular weight aggregate, eluting in the first peak (data not shown). Thus, it seemed that His-BSPH1 was incorrectly folded, leading to protein aggregation, possibly due to hydrophobic interactions or intermolecular disulfide bonding.

Expression of GST-tagged human BSPH1

The 26-kDa glutathione S-transferase (GST) tag is also widely used as a fusion partner in the production of recombinant proteins in *E.coli*. This large tag confers several advantages, such as the possibility of single-step purification using immobilized glutathione (Smith and Johnson, 1988), as well as enhanced solubility and protection against intracellular protease cleavage. We cloned the cDNA encoding BSPH1 into the pGEX-5x-1 expression vector, which adds a N-terminal GST-tag, and induced expression of the fusion protein in BL21(DE3) pLysS and Origami B(DE3)pLysS cells with IPTG. The GST-BSPH1 molecule was completely insoluble in BL21(DE3)pLysS (data not shown) and in Origami B(DE3)pLysS (Figure 2 D).

Expression of His₆-thioredoxin-tagged human BSPH1

Fusion of recombinant proteins to *E.coli* thioredoxin (*trxA*) was first undertaken with the rationale that it was a protein normally present in the *E.coli* cytoplasm, and that it could be overexpressed in the soluble form to levels nearing 40% of cellular proteins (LaVallie *et al.*, 1993; Lunn *et al.*, 1984). High-level expression of a soluble and functional Fn2 domain of MMP-2 was achieved in *E.coli*, using fusion to thioredoxin (Peisley and Gooley, 2007), validating an attempt at expressing BSPH1 as a thioredoxin fusion. When expressed in BL21(DE3) pLysS cells at 30°C (Figure 3 A) or at room temperature (data not shown), the thioredoxin-BSPH1 fusion protein was mostly insoluble (> 90%), although part of it could be seen in the soluble fraction. A considerable increase in soluble protein (approximately 70% of expressed rBSPH1 found in the supernatant) was obtained when expression was induced in Origami B(DE3)pLysS cells, irrespective of whether induction was performed for 4 hours at 30°C or for 16 hours at 16°C (Figure 3 B). The absence of thioredoxin reductase in the genetically modified strain allows for the accumulation of oxidized thioredoxins and the formation of disulfide bridges in the bacterial cytoplasm (Bessette *et al.*, 1999; Prinz *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1998). As seen in Figure 3 B, a significant amount of recombinant protein remained insoluble in inclusion bodies. Soluble yield could potentially be improved by co-expression of human protein disulfide isomerase (PDI), which would catalyze disulfide bond formation and isomerization. Zhao *et al.* (Zhao *et al.*, 2000) expressed the human cardiac-specific homeobox protein, which contains six cysteine residues, in *E.coli*, and obtained approximately 50% soluble protein. When co-expressed with PDI, soluble yield increased to > 90%. Since our method allowed the recovery of sufficient soluble protein, we did not seek to further enhance soluble expression. The pET32a expression vector used to express BSPH1 as a thioredoxin fusion also adds a hexahistidine tag; therefore we could use Ni²⁺-affinity chromatography for purification (Figure 3 C). As seen in previous attempts at purifying recombinant BSPH1

using elution with 1 M imidazole, eluted proteins were prone to aggregation and precipitation during storage (not shown). However, we found that elution with a lower imidazole concentration (400 mM) was sufficient to recover our protein from the column, and protein remained in solution during extended storage periods (more than 2 weeks) at 4°C.

Expression of His₆-thioredoxin-tagged murine BspH1

We also sought to determine whether the strategy employed to produce soluble recombinant BSPH1 could be extrapolated to other BSP-family proteins. The same procedure was repeated to express the murine ortholog of BSPH1, BspH1 (previously named mBSPH1). As seen in Figure 3 D, murine BspH1 was also produced in the soluble form in significant quantities when fused to thioredoxin.

Binding properties of recombinant human BSPH1

Binding to phosphatidylcholine liposomes. In order to verify if recombinant BSPH1 was active, its ability to bind phosphatidylcholine (PC) liposomes was verified. As seen in Figure 4 A, BSPH1 is seen only in the pellet fraction (liposomes) following incubation and ultracentrifugation, indicating that the protein bound to the PC liposomes. As a positive control, we also tested the binding of crude bovine seminal plasma proteins (cBSP) to PC liposomes. The major protein of cBSP is BSP1 (previously named BSP-A1/-A2), which has a molecular weight of 15-16 kDa. As seen in Figure 4 A, there is a 15-16 kDa doublet in the pellet fraction, indicating that these proteins also bound to PC liposomes. On the other hand, BSA did not bind to PC-liposomes, as seen by its presence in the supernatant after incubation and ultracentrifugation. To rule out the possibility that binding of BSPH1 to PC liposomes could be mediated by thioredoxin, we expressed thioredoxin alone and incubated purified protein with PC liposomes. As seen in Figure 4 A, thioredoxin alone

does not bind to PC liposomes, since it is completely found in the supernatant after incubation with liposomes and ultracentrifugation.

Binding to LDL. Another property of BSP proteins is that they bind to certain lipoproteins, notably LDL. It has been shown that in bovine, the interaction between BSP proteins and LDL from hen's egg yolk present in extenders used for semen cryopreservation is essential for sperm protection against cold shock (Bergeron *et al.*, 2004). We sought to determine whether recombinant BSPH1 also displayed this binding property. To test this, we incubated Trx-BSPH1 with LDL isolated from egg yolk, and then floated the lipoproteins by ultracentrifugation of the protein-lipoprotein solution in the presence of KBr added to achieve a density of 1.21 g/L. Using this technique, proteins that have bound to LDL will be found in the top portion of the tube following ultracentrifugation, whereas unbound proteins will be found in the middle and bottom fractions. As shown in Figure 4 B (top panel), we detected recombinant BSPH1 in the top layer after incubation with LDL and ultracentrifugation, signifying that some of the protein had indeed bound to LDL. A signal is also present in the lane corresponding to the bottom fraction, indicating that a portion of the protein did not bind to the lipoprotein. Knowing that the binding capacity of LDL for BSP proteins is very high (Manjunath *et al.*, 2002), it is unlikely that the BSP protein binding sites on LDL were saturated. A portion of Trx-BSPH1 may not have bound to LDL due to incorrect folding or inaccessibility of the binding sites. As controls, Figure 4 B (middle and bottom panels) show that Trx alone binds LDL very weakly, indicating that binding of Trx-BSPH1 to LDL is not due to the thioredoxin tag, and that the bovine BSP proteins bind LDL strongly.

Binding to human sperm. The most important binding property tested was binding to the sperm membrane. Recombinant BSPH1 was incubated with human sperm, after

which sperm were washed and the sperm membrane proteins extracted. As seen in Figure 4 C (top panel), an immunoreactive band is observed in the lanes corresponding to extracted sperm proteins, while no reaction is seen in wash fractions. An intense band is observed in the lane corresponding to the supernatant after centrifugation of the sperm-recombinant protein mixture. This could signify that only a portion of our protein is correctly folded and retains sperm-binding activity, and/or that excess protein was added in comparison to the number of binding sites present on the quantity of sperm used for the experiment. Also, knowing that *BSPH1* mRNA is expressed in the epididymis (Lefebvre *et al.*, 2007), sperm are likely come into contact with this protein during epididymal transit. Upon ejaculation, sperm are mixed with seminal plasma, a fluid containing numerous sperm-binding proteins that could mask BSPH1 binding sites. As a control, we incubated thioredoxin with human sperm and repeated the same procedure. As seen in Figure 4 C (middle panel), only a very faint signal is observed in the sperm-extracted proteins after incubation of sperm with thioredoxin, indicating that thioredoxin alone does not or very weakly binds to human sperm. In addition, sperm incubated in the absence of recombinant protein (negative control) were analysed in the same way, and no immunoreaction was observed (Figure 4 C, bottom panel). As a positive control, the binding of cBSP proteins to human sperm was also verified. As expected, these proteins indeed bind to human sperm (data not shown). Thus, the BSPH1 protein produced as a thioredoxin fusion was soluble and active, as shown by its ability to bind PC liposomes, LDL and human sperm.

Despite several studies comparing the efficiency of different fusion tags (GST, maltose-binding protein, thioredoxin, etc.), the mechanism behind the solubilizing effect of fusion tags on target proteins remains unclear (Dyson *et al.*, 2004; Hammarstrom *et al.*, 2006). In the case of thioredoxin, it has been proposed that it could exert its effect either by

acting as a covalently linked chaperone, aiding in protein folding, or as an oxidoreductase, which would catalyze the formation of correct disulfide bonds. A literature survey on thioredoxin-fused recombinant proteins suggests that proteins devoid of disulfide bonds can be successfully produced in the soluble form in *E.coli* cells bearing a reducing cytoplasm (ex. BL21) (Liu *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007), suggesting a role for thioredoxin in protein folding. On the other hand, most proteins containing disulfide bridges require not only fusion to thioredoxin, but also expression in genetically modified *E.coli* strains having an oxidizing cytoplasm (ex. Origami B(DE3), BL21(DE3), AD494(DE3)), for soluble expression (Peisley and Gooley, 2007; Xiong *et al.*, 2005) (Lauber *et al.*, 2001; Lehmann *et al.*, 2003; Moura-da-Silva *et al.*, 1999). This would suggest that thioredoxin could also be catalyzing proper disulfide bond formation. However, in certain cases, proteins harbouring single or multiple disulfide bridges were successfully expressed in the soluble form in BL21(DE3) cells (Cui *et al.*, 2007; Yuan and Hua, 2002; Zhao *et al.*, 2000). In the present study, His-tagged BSPH1 was not expressed in the soluble form in BL21(DE3)pLysS cells, and only a slight improvement was seen with expression in Origami B(DE3)pLysS cells. However, fusion to thioredoxin dramatically improved soluble expression in Origami B(DE3)pLysS cells, with minimal improvement in BL21(DE3)pLysS cells. This suggests that thioredoxin promotes the solubility of BSPH1 by catalyzing proper disulfide bond formation, although it could also be acting as a molecular chaperone.

In conclusion, after a considerable amount of optimization and troubleshooting, an efficient method for recombinant expression of soluble BSPH1 has been developed. Recombinant BSPH1 protein was shown to be active by its ability to bind PC liposomes, LDL and human sperm, which reflects its potential biological function in sperm maturation,

similarly to the bovine BSP proteins. The strategy developed here was also successful in producing recombinant murine Bsph1, strongly suggesting its application for all BSP-homologous proteins. In addition, this method could be used to express Fn2 domains contained in non BSP-related proteins. Purified recombinant BSPH1 will aid in establishing the biological role of this protein, a task that was previously impossible due to the unavailability of native protein. For example, purified recombinant BSPH1 will be added to washed ejaculated human sperm to study its effect on sperm capacitation, motility and viability. In addition, the possible role of this epididymal protein in promoting sperm-egg interaction will be investigated. Since BSP proteins are known to promote cholesterol and phospholipid efflux from bovine sperm during capacitation, the effect of recombinant proteins on lipid efflux will also be verified. In the same way, studies can be conducted using recombinant mouse Bsph1 and murine epididymal sperm. Since BSPH1 and Bsph1 are orthologs, results generated in mouse can be extrapolated to human. Studying the role of BSPH1 in human sperm functions may identify a new factor involved in human fertility, which can be beneficial for infertility diagnosis and for the future development of male contraceptives.

Funding

This work was funded by the Canadian Institutes of Health Research [MOP-86510 to P.M.]. J. Lefebvre is a recipient of a Doctoral Training Award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Acknowledgements

We thank Dr Yves Paquette for his advice in cloning and troubleshooting.

References

- Austin CR (1951) Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 4, 581-596.
- Banyai L, Trexler M, Koncz S, Gyenes M, Sipos G and Patthy L (1990) The collagen-binding site of type-II units of bovine seminal fluid protein PDC-109 and fibronectin. *Eur J Biochem* 193, 801-806.
- Bar M, Bar-Ziv R, Scherf T and Fass D (2006) Efficient production of a folded and functional, highly disulfide-bonded beta-helix antifreeze protein in bacteria. *Protein Expr Purif* 48, 243-252.
- Bergeron A, Crete MH, Brindle Y and Manjunath P (2004) 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, 708-717.
- Bessette PH, Aslund F, Beckwith J and Georgiou G (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13703-13708.
- Chang MC (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168, 697-698.
- Cooper TG (1995) Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation. *Adv Exp Med Biol* 377, 87-101.
- Cui T, Gao Y, Liew OW, Pua CM and Gutte B (2007) Efficient preparation of an acyclic permutant of kalata B1 from a recombinant fusion protein with thioredoxin. *J Biotechnol* 130, 378-384.

- de Lamirande E, Leclerc P and Gagnon C (1997) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3, 175-194.
- Desnoyers L and Manjunath P (1992) Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 267, 10149-10155.
- Dyson MR, Shadbolt SP, Vincent KJ, Perera RL and McCafferty J (2004) Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol* 4, 32.
- Fan J, Lefebvre J and Manjunath P (2006) Bovine seminal plasma proteins and their relatives: a new expanding superfamily in mammals. *Gene* 375, 63-74.
- Fischer B, Sumner I and Goodenough P (1992) Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 3-13.
- Hammarstrom M, Woestenenk EA, Hellgren N, Hard T and Berglund H (2006) Effect of N-terminal solubility enhancing fusion proteins on yield of purified target protein. *J Struct Funct Genomics* 7, 1-14.
- Hefti MH, Van Vugt-Van der Toorn CJ, Dixon R and Vervoort J (2001) A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal Biochem* 295, 180-185.
- Huang KX, Huang QL, Wildung MR, Croteau R and Scott AI (1998) Overproduction, in *Escherichia coli*, of soluble taxadiene synthase, a key enzyme in the Taxol biosynthetic pathway. *Protein Expr Purif* 13, 90-96.
- Jani M, Tordai H, Trexler M, Banyai L and Patthy L (2005) Hydroxamate-based peptide inhibitors of matrix metalloprotease 2. *Biochimie* 87, 385-392.

- Jones R (1998) Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 73-84.
- Kemme M and Scheit KH (1988) Cloning and sequence analysis of a cDNA from seminal vesicle tissue encoding the precursor of the major protein of bull semen. *DNA* 7, 595-599.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lauber T, Marx UC, Schulz A, Kreuzmann P, Rosch P and Hoffmann S (2001) Accurate disulfide formation in *Escherichia coli*: overexpression and characterization of the first domain (HF6478) of the multiple Kazal-type inhibitor LEKTI. *Protein Expr Purif* 22, 108-112.
- LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF and McCoy JM (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N Y)* 11, 187-193.
- Lefebvre J, Fan J, Chevalier S, Sullivan R, Carmona E and Manjunath P (2007) Genomic structure and tissue-specific expression of human and mouse genes encoding homologs of the major bovine seminal plasma proteins. *Mol Hum Reprod* 13, 45-53.
- Lehmann K, Hoffmann S, Neudecker P, Suhr M, Becker WM and Rosch P (2003) High-yield expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2. *Protein Expr Purif* 31, 250-259.
- Leung MY and Ho WK (2006) Substitution of serine for non-disulphide-bond-forming cysteine in grass carp (*Ctenopharygodon idellus*) growth hormone improves in vitro oxidative renaturation. *J Biochem Mol Biol* 39, 150-157.

- Liu Q, Lin J, Liu M, Tao X, Wei D, Ma X and Yang S (2007) Large scale preparation of recombinant human parathyroid hormone 1-84 from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 54, 212-219.
- Lunn CA, Kathju S, Wallace BJ, Kushner SR and Pigiet V (1984) Amplification and purification of plasmid-encoded thioredoxin from *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* 259, 10469-10474.
- Lusignan M-F, Bergeron A, Lazure C and Manjunath P (2007) Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. *Biology of Reproduction* 76, 424-432.
- Manjunath P, Sairam MR and Uma J (1987) Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosciences Reports* 7, 231-238.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E and Desnoyers L (1994) Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 50, 27-37 [published erratum appears in *Biol Reprod* 1994; 50, 977].
- Manjunath P and Therien I (2002) Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 53, 109-119.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A and Menard M (2002) Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* 67, 1250-1258.
- Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chretien M and Chapdelaine A (1989) Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 264, 16853-16857.

- Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chrétien M and Chapdelaine A (1988) Diversity of Novel Proteins in Gonadal Fluids. In McKerns KW and Chrétien M (eds) *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic systems*. Plenum Press, New York, pp. 259-273.
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J and Fan J (2007) Seminal plasma proteins: Functions and interaction with protective agents during semen preservation. In Roldan ER and Gomendio M (eds) *Society for Reproduction and Fertility Supplement*. Nottingham University Press, pp. 217-228.
- Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS and Wright MW (2008) New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol Reprod*, papers in press. Published on October 15, 2008 as DOI:10.1095/biolreprod.108.074088
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL and Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87, 206-210.
- Moura-da-Silva AM, Linica A, Della-Casa MS, Kamiguti AS, Ho PL, Crampton JM and Theakston RD (1999) Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: expression in *Escherichia coli* and inhibition of the platelet-collagen interaction. *Arch Biochem Biophys* 369, 295-301.
- Ozhogina OA, Trexler M, Banyai L, Llinas M and Patthy L (2001) Origin of fibronectin type II (FN2) modules: structural analyses of distantly-related members of the kringle family: the kringle domain of neurotrypsin as a potential link between FN2 domains and kringles. *Protein Sci* 10, 2114-2122.
- Peisley AA and Gooley PR (2007) High-level expression of a soluble and functional fibronectin type II domain from MMP-2 in the *Escherichia coli* cytoplasm for solution NMR studies. *Protein Expr Purif* 53, 124-131.

- Porath J, Carlsson J, Olsson I and Belfrage G (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
- Prinz WA, Aslund F, Holmgren A and Beckwith J (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* 272, 15661-15667.
- Salois D, Menard M, Paquette Y and Manjunath P (1999) Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. *Biol Reprod* 61, 288-297.
- Singh SM and Panda AK (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 99, 303-310.
- Smith DB and Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Stewart EJ, Aslund F and Beckwith J (1998) Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *Embo J* 17, 5543-5550.
- Sun Z, Lu W, Tang Y, Zhang J, Chen J, Deng H, Li X and Liu JN (2007) Expression, purification and characterization of human urodilatin in *E. coli*. *Protein Expr Purif* 55, 312-318.
- Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 523-533.
- Therien I, Soubeyrand S and Manjunath P (1997) Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod* 57, 1080-1088.

- Therien I, Bleau G and Manjunath P (1995) Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 52, 1372-1379.
- Therien I, Bergeron A, Bousquet D and Manjunath P (2005) Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Reprod Dev* 71, 97-106.
- Tordai H and Patthy L (1999) The gelatin-binding site of the second type-II domain of gelatinase A/MMP-2. *Eur J Biochem* 259, 513-518.
- Vallejo LF and Rinas U (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact* 3, 11.
- Visconti PE and Kopf GS (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59, 1-6.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S and Diekman AB (2002) Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 53, 133-150.
- Xiong C, Hixson PM, Mendoza LH and Smith CW (2005) Cloning and expression of rabbit interleukin-15. *Vet Immunol Immunopathol* 107, 131-141.
- Yuan LD and Hua ZC (2002) Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 25, 300-304.
- Zhao JH, Xu Z and Hua ZC (2000) Expression of human cardiac-specific homeobox protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 18, 316-319.

Figure legends

Figure 1. Two-dimensional structure of BSP-family proteins. The four disulfide bridges are designated by black bars.

Figure 2. Expression of His- and GST-tagged BSPH1 in *E.coli* (A) Anti-His Western blot of BL21(DE3)pLysS bacterial lysates before (0h) and after (3h) induction of His₆-BSPH1 expression with 1 mM IPTG (prepared as described in Material and methods), as well as supernatant and pellet after cell lysis (10 µl of each were loaded). (B) Anti-His western blot of Origami B(DE3)pLysS bacterial lysates before (0h) and after (3h) induction of His₆-BSPH1 expression with 0.2 mM IPTG at 30°C, supernatant and pellet after cell lysis (equivalent volumes loaded). (C) Anti-His western blot of Origami B(DE3)pLysS bacterial lysates before (0h) and after (16h) induction of His₆-BSPH1 expression with 0.5 mM IPTG at 16°C, as well as 10 µg of supernatant and pellet proteins after cell lysis. (D) Anti-BSPH1 western blot of Origami B(DE3)pLysS bacterial lysates before (0h) and after (16h) induction of GST-BSPH1 expression with 0.1 mM IPTG at 16°C, as well as supernatant and pellet after cell lysis (20 µg of each loaded). S, supernatant; P, pellet.

Figure 3. Expression of thioredoxin-BSPH1 in *E. coli*. (A) Anti-His western blot of BL21(DE3)pLysS bacterial lysates before (0h) and after (3h) induction with 0.2 mM IPTG at 30°C, as well as supernatant and pellet after cell lysis (equivalent volumes loaded). (B) Anti-His western blot of Origami B(DE3)pLysS bacterial lysates before (0h) and after (4h) induction with 0.2 mM IPTG at 30°C, as well as supernatant and pellet after cell lysis (equivalent volumes loaded). Cells were also induced for 16h at 16°C with 1 mM IPTG, after which cells were lysed and supernatant and pellet tested in a Western blot (equivalent volumes loaded). (C) Coomassie-stained SDS-PAGE gel of column fractions following purification of Trx-BSPH1 on a His-Bind column. Bacterial lysates were prepared and

volumes equivalent to 0.2% and 0.6% of the total volumes of supernatant and pellet were loaded. Approximately 0.3% of the total volume of each of the column fractions was loaded. **(D)** Induction of thioredoxin-tagged murine BspH1 expression in *E. coli*. Coomassie-stained SDS-PAGE gel of bacterial extracts before (0h) and after (16h) induction with 1 mM IPTG at 16°C, as well as supernatant (0.5% of total volume loaded) and pellet (2% of total volume loaded) after cell lysis. Arrows indicate the position of the band of interest. std, low molecular weight standard; S, supernatant; P, pellet; FT, flow-through; W1; first wash; W2, second wash; E, elution.

Figure 4. Activity of BSPH1 produced as a thioredoxin fusion. **(A)** Binding of recombinant BSPH1 to PC liposomes. BSA, BSPH1, Trx and cBSP were incubated with PC liposomes, ultracentrifuged and equivalent amounts of supernatants (S) and pellets (P) were analyzed by SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. **(B)** Binding of recombinant BSPH1 to egg yolk LDL. Trx-BSPH1, Trx and crude bovine seminal plasma proteins (cBSP) were incubated with LDL. The density of the solution was then increased to 1.21 g/L with KBr and the lipoproteins were floated by ultracentrifugation. Equivalent proportions of top (T), middle (M) and bottom (B) fractions were analyzed by western blotting with the appropriate antibodies (top panel, anti-BSPH1; middle panel, anti-His; bottom panel, anti-BSP1). **(C)** Binding of recombinant BSPH1 to human sperm. Washed human sperm were incubated with purified Trx-BSPH1 (top panel), Trx (middle panel) or in the absence of recombinant protein (bottom panel). Sperm suspensions were centrifuged and supernatant (S) was removed. Sperm were washed twice with 1 ml PBS (PBS₁, PBS₂), and then sperm proteins were extracted with sperm lysis buffer. S, PBS washes, 10 µl (spz₁₀) and 25 µl (spz₂₅) sperm-extracted proteins as well as a sample of the pellet

following sperm proteins extraction (P) were analyzed in a western blot with anti-BSPH1 antibodies (top and bottom panels) or anti-His antibodies (middle panel).

Figure 1

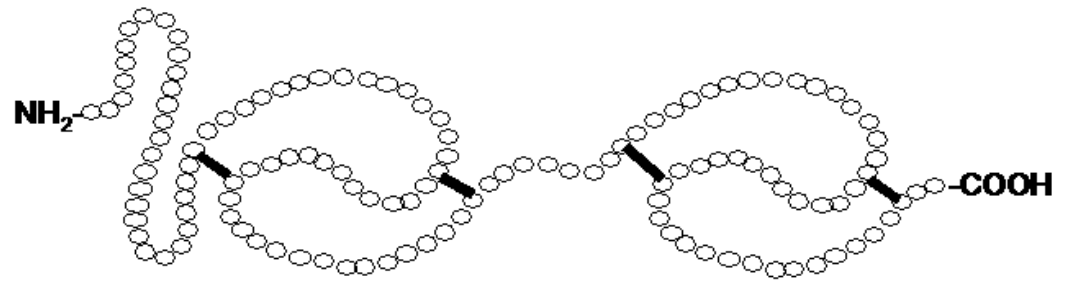


Figure 2

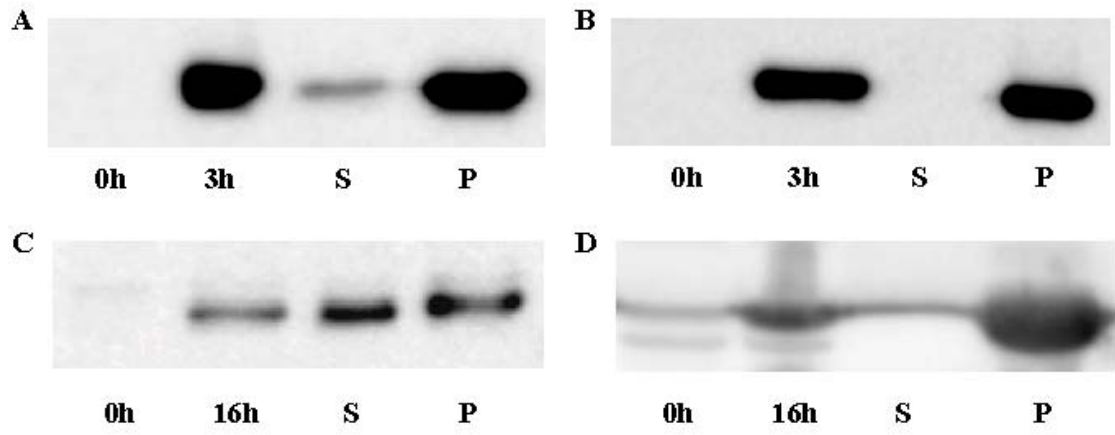


Figure 3

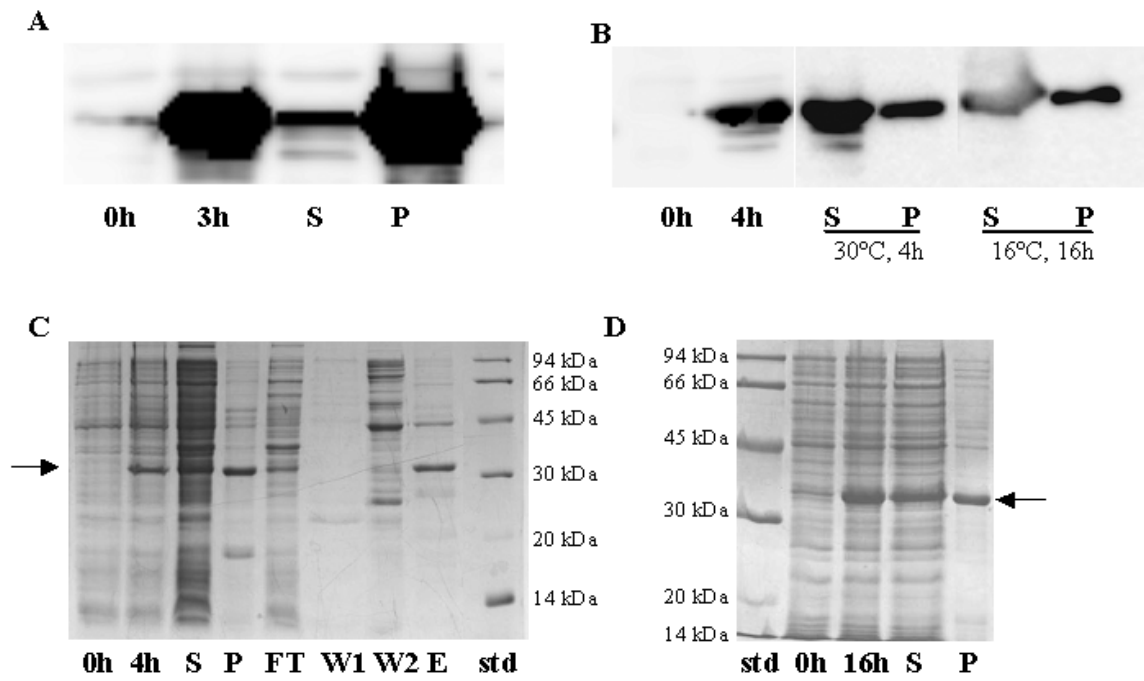
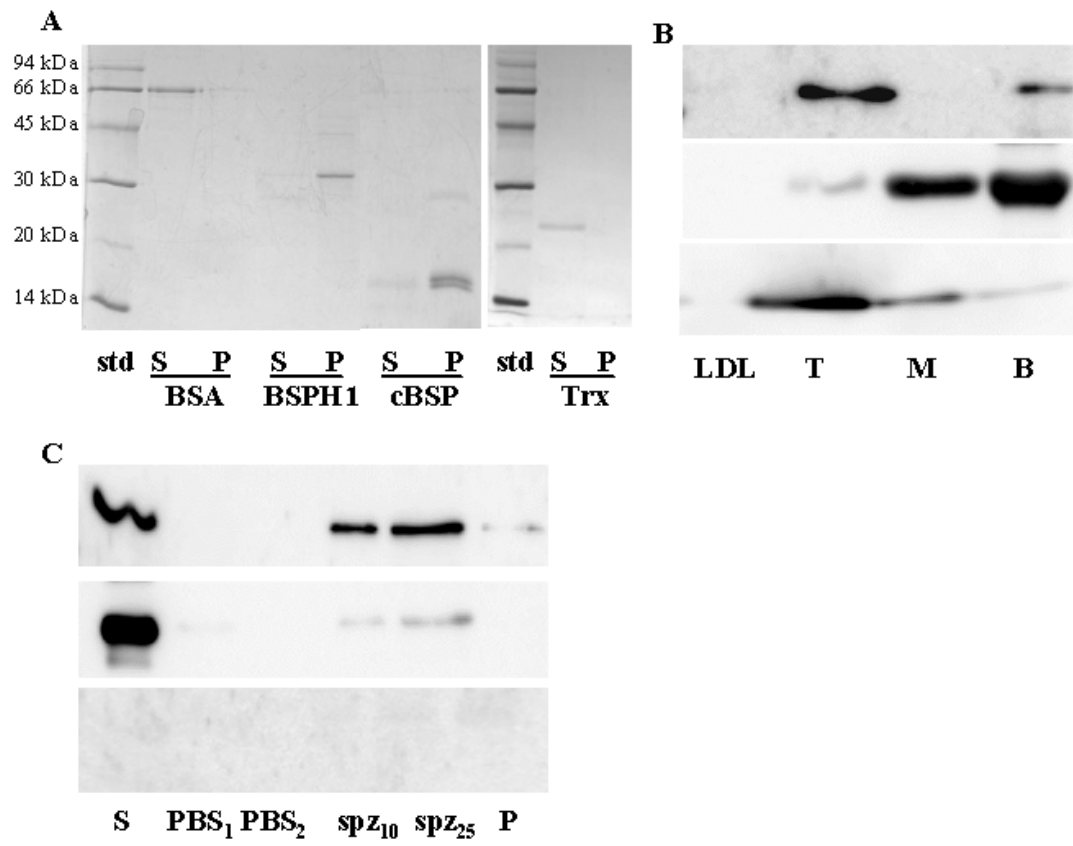


Figure 4



2.4. The human Binder of SPerm Protein 1 (BSPH1): Detection in human seminal plasma and sperm extracts, localization to detergent resistant sperm membrane microdomains and effect on sperm capacitation. Lefebvre J and Manjunath P. Sera soumis à *Molecular Human Reproduction*, 2009.

Préambule:

Les travaux présentés dans l'article précédent ont permis d'obtenir la protéine BSPH1 recombinante en quantités suffisantes pour effectuer l'étude de ses fonctions. Par contre, la protéine native n'avait encore jamais été détectée ou caractérisée. Dans cette étude, nous avons d'abord détecté la présence des protéines immunoréactives par immunobuvardage suite au fractionnement des protéines du plasma séminal humain par gel-filtration. De plus, il a été possible de détecter BSPH1 native suite à la chromatographie sur colonne d'affinité héparine-sépharose des protéines du plasma séminal, indiquant qu'elle partage aussi cette propriété de liaison avec la famille des BSP, et pourrait lier les GAGs semblables à l'héparine présents dans le tractus génital féminin. À l'aide des anticorps anti-BSPH1 générés dans l'étude précédente, nous avons couplé une colonne d'immunoaffinité, ce qui a permis d'isoler BSPH1 native à partir d'extraits de spermatozoïdes humains. Nos résultats indiquent que BSPH1 serait présente en faibles quantités dans le fluide séminal humain. De plus, nous avons montré que BSPH1 native serait localisée dans les microdomaines « rafts » de la membrane plasmique des spermatozoïdes. La masse moléculaire apparente de BSPH1 native était de 32 kDa, ce qui est supérieur à la masse prédite par sa séquence en acides aminés. Il est donc probable que BSPH1 subisse des modifications post-traductionnelles. L'effet de la protéine BSPH1 recombinante sur la motilité, la viabilité et la capacitation des spermatozoïdes humains a aussi été vérifié. Un essai de cytométrie optimisé dans cette étude a permis de mesurer la viabilité et la capacitation des spermatozoïdes suite à l'incubation avec la protéine recombinante ou les anticorps anti-BSPH1. Aucun effet n'a été observé sur la motilité et la viabilité des cellules. À la plus faible concentration étudiée, un effet minime mais significatif de BSPH1 recombinante a été noté sur la capacitation. Cependant, aucun effet n'a été observé à une concentration plus élevée, et les anticorps anti-BSPH1 n'ont pas eu d'effet sur cette fonction spermatique. Il semblerait donc que la protéine BSPH1 recombinante n'exerce pas d'influence marquée sur la capacitation des spermatozoïdes humains. Par contre, puisque la protéine native subit

probablement des modifications post-traductionnelles, une protéine recombinante produite dans des cellules de mammifères pourrait exercer un effet plus prononcé. De manière alternative, les BSP exprimés par les épидидymes des rongeurs et de l'humain pourraient remplir un rôle différent de celui des BSP des ongulés. Une grande partie des protéines ajoutées aux spermatozoïdes dans l'épididyme sont importantes pour la reconnaissance et l'interaction spermatozoïde-ovocyte, alors les BSP épидидymaires pourraient être impliquées à ce processus.

J'ai planifié et accompli toutes les expériences présentées dans cet article et effectué l'interprétation des résultats. J'ai aussi optimisé l'essai de cytométrie en flux utilisé pour mesurer la viabilité et la capacitation des cellules, et écrit la totalité du manuscrit.

Detection of the human Binder of SPerm protein 1 (BSPH1) in human seminal plasma and detergent-resistant microdomains of the sperm plasma membrane, and effect on human sperm capacitation

Jasmine Lefebvre^{1,2} and Puttaswamy Manjunath^{1,3,4}

¹*Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital,* ²*Department of Biochemistry and*

³*Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, HIT 2M4 Canada*

⁴To whom correspondence should be addressed at: Centre de Recherche, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boulevard de l'Assomption, Montréal, Québec, HIT 2M4, Canada. Tel.: +1 514 252 3562 or +1 514 252 3400 (ext. 3329). Fax: +1 514 252 3430

RunningTitle: BSPH1 and human sperm capacitation

Key words: epididymal protein/BSP proteins/seminal plasma/detergent resistant microdomains /sperm capacitation/fertility

Abstract

Before mammalian sperm can fertilize an oocyte, a complex series of maturational events must previously occur; the first set of which take place in the epididymis and the second inside the female genital tract. Epididymal maturation is essential for sperm to gain motility as well as oocyte recognition and binding ability, whereas capacitation is induced by factors present inside the female reproductive tract and triggers hyperactivated motility and intracellular signalling events. Previous studies have established the pivotal contribution of the Binder of Sperm (BSP) proteins to the capacitation of bovine and porcine sperm. More recently, it was shown that a member of the BSP family, named BSPH1, is present in humans. Although expression of the *BSPH1* gene was detected in the human epididymis and the recombinant protein has been expressed, the native BSPH1 protein has yet to be characterized. The aim of this study was to detect and characterize native BSPH1 in human seminal plasma and/or sperm. We report that BSPH1 is present in relatively low amounts in human seminal plasma and sperm extracts. Furthermore, sperm-associated BSPH1 localizes to detergent-resistant microdomains of the plasma membrane. A flow cytometry approach was developed to investigate the effect of BSPH1 and anti-BSPH1 antibodies on human sperm capacitation. Contrarily to ungulate BSP proteins produced by the seminal vesicles, human BSPH1 secreted by the epididymis does not seem to play a significant role in capacitation, but may rather be involved in other sperm functions such as sperm-egg interaction. The elucidation of the role of BSPH1 and other epididymal proteins in human sperm maturation is crucial to diagnose male infertility, design novel contraceptives and improve assisted reproductive technology.

Introduction

The mammalian sperm cell embarks upon a long maturational journey starting from its production in testicular spermatogenesis until the moment it reaches its final destination, the ovulated egg. When leaving the testis, the spermatozoon is incapable of displaying motility, of recognizing the oocyte or binding to its extracellular coat. These abilities are acquired in part during transit through the epididymis, as well as inside the female reproductive tract. The complete subset of modifications undergone by spermatozoa while inside the female tract are collectively referred to as capacitation (Austin, 1951, Chang, 1951). Events occurring during capacitation include: changes in the plasma membrane lipid composition, increased permeability to Ca^{2+} , increased intracellular pH, redistribution of surface proteins, increased sperm motility, increased adenylyl cyclase activity and cyclic AMP as well as an increased tyrosine phosphorylation of a group of signalling proteins (for reviews, see (de Lamirande, *et al.*, 1997, Visconti and Kopf, 1998, Visconti, *et al.*, 2002)).

Another membrane modification occurring in the sperm of many mammals during capacitation is the reorganization of membrane microdomains. Lipid rafts are highly dynamic detergent-resistant membrane microdomains that are rich in glycosphingolipids, sphingomyelin, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, cholesterol and numerous signaling proteins (Edidin, 2003, Foster, *et al.*, 2003). It is believed that lipid rafts could function as scaffolds for the induction of intracellular signaling events (Foster, *et al.*, 2003). Recent studies have demonstrated the presence of lipid rafts in the plasma membranes of mouse (Travis, *et al.*, 2001, Nixon, *et al.*, 2009), guinea pig (Travis, *et al.*, 2001), bull (Girouard, *et al.*, 2008), boar (Shadan, *et al.*, 2004) and human sperm (Cross, 2004). Lipid rafts can be isolated from membrane extracts by exploiting their insolubility in cold Triton X-100 as well as their low buoyant density in sucrose gradients (Gidwani, *et al.*, 2001).

An early event of sperm capacitation is cholesterol loss from the sperm membrane, a consequence of efflux to acceptors present in female reproductive tract fluids (Zarintash and Cross, 1996). It has been shown experimentally that treating cells with efflux-stimulating agents disrupts intracellular signalling (Brown and London, 1998), an observation that has also been made in reproductive cells (Belton, *et al.*, 2001). Contrarily to what is seen in somatic cells, cholesterol loss from the mammalian sperm membrane correlates with activation of intracellular signaling, changes that may be required to stimulate the tyrosine phosphorylation events accompanying capacitation (Visconti, *et al.*, 1999a, 1999b) and the acrosome reaction (Ward and Kopf, 1993). Reorganization of lipid rafts upon capacitation has been observed in the sperm of many species, including mouse (Thaler, *et al.*, 2006) and human (Cross, 2004).

In the bovine species, a family of closely related proteins originating from the seminal vesicles have been shown to be required for bovine sperm capacitation (Manjunath, *et al.*, 2007). The Binder of SPerm (BSP) proteins are characterized structurally by a variable N-terminal segment followed by two tandemly arranged fibronectin type-II (Fn2) domains, which are responsible for their binding to various molecules (Fan, *et al.*, 2006). The importance of BSP proteins in capacitation has been demonstrated for both bovine and porcine sperm (Lusignan, *et al.*, 2007, Therien, *et al.*, 1995, Therien, *et al.*, 2005, Therien, *et al.*, 1997). BSP proteins bind to sperm upon ejaculation due to their interaction with sperm membrane choline phospholipids (Desnoyers and Manjunath, 1992, Manjunath, *et al.*, 1994). When sperm arrive at the site of fertilization, BSP proteins interact with follicular and oviductal fluid capacitation factors, high-density lipoproteins (HDL) and glycosaminoglycans (GAGs), and induce cholesterol efflux and intracellular signalling pathways, respectively; significantly contributing to the capacitated state of spermatozoa (reviewed in (Manjunath, *et al.*, 2007, Manjunath and Therien, 2002)). BSP-homologous

proteins are also present in the seminal fluids of boar, stallion, goat, ram and bison (reviewed in (Manjunath, *et al.*, 2007)). In these species, the availability of native protein in relatively large quantities, ranging from 1% to 60% of total seminal plasma proteins, allowed the straightforward study of their biological functions.

Recently, we have shown that BSP homologues are also expressed in mice and human (Fan, *et al.*, 2006, Lefebvre, *et al.*, 2007). However, in these species, BSP-like proteins are expressed in the epididymis and represent a minute proportion of seminal plasma proteins. Despite difficulties in producing soluble and functional recombinant protein, mainly due to the presence of the multiple disulfide bonds in the Fn2 domains, we were recently successful in establishing a production and purification scheme, which allowed preliminary functional characterization of the human BSPH1 protein (Lefebvre, *et al.*, 2009). Since BSP proteins are essential for bovine and porcine sperm capacitation, it is justified to hypothesize that the human counterpart could be involved in human sperm capacitation and/or other sperm functions. The aims of this study were first, to detect the native protein in ejaculated human sperm and/or seminal plasma and second, to verify the effect of the recombinant protein and antibodies directed against this protein on human sperm motility, viability and capacitation. The latter two sperm functions were evaluated by flow cytometry, a technique that allows a rapid, objective, reproducible and unbiased means of measuring multiple sperm parameters at once, combined with low costs and increased accuracy (Graham, 2001). Comparative studies with human sperm have demonstrated that flow cytometry gives similar results to those obtained with fluorescence microscopy, with the added advantage of analyzing tens of thousands of sperm per sample as compared to only a few hundred per sample by microscopy (Miyazaki, *et al.*, 1990).

Materials and methods

Materials

Percoll was from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden), whereas calcium ionophore A23187 and FITC-conjugated lectin from *Pisum sativum* were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Propidium iodide was purchased from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). For western blotting, PVDF membrane was from Millipore (Nepean, ON, Canada), goat anti-rabbit IgG from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada), whereas the chemiluminescence reagent was from Perkin-Elmer (Boston, MA, USA). All other chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

Ethanol precipitation of human seminal plasma proteins

Fifteen ml of pooled human semen was centrifuged at 1500 x g, 10 min at room temperature to separate seminal plasma from sperm, supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis IL, USA) and subjected to ethanol precipitation as described in (Bergeron, *et al.*, 2005). Briefly, nine volumes of cold ethanol were slowly added to the seminal plasma, which was left stirring for 2 h at 4°C. Precipitated proteins were then recovered by centrifugation at 5000 x g for 10 min at 4°C. The protein pellet was washed 3 times in 10 volumes of cold ethanol, after which the final pellet was resuspended in minimal 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized. Crude human seminal plasma proteins were stored at 4°C and the required quantities were weighed out for each chromatography experiment.

Gel filtration chromatography of human seminal plasma proteins

All chromatography steps were performed at 4°C. An aliquot of 5 mg protein was solubilized in 4 ml of 50 mM ammonium bicarbonate or 50 mM acetic acid, depending on

the experiment. After centrifugation at 10 000 x *g* for 10 minutes at 4°C, supernatant was loaded onto a Sephacryl S-100 column (1.5 x 90 cm) that had been previously equilibrated with the appropriate buffer. Fractions of 3 ml were collected at a flow rate of 20 ml/h and absorbance was monitored at 280 nm. Protein-containing fractions were collected, pooled and analyzed by western blotting.

Heparin-sepharose affinity chromatography of human seminal plasma proteins

Ten mg crude human seminal plasma proteins were solubilized in 12.5 ml PBS and centrifuged at 10 000 x *g* for 10 minutes at 4°C. Not all protein went into solution; therefore approximately 6.5 mg was loaded onto the heparin-sepharose column (0.5 x 2.5 cm), which had been previously equilibrated with PBS at 4°C. Loading and elution were performed at a flow rate of 20 ml/h. Unadsorbed proteins were washed with 150 mM phosphate-buffered saline (PBS) and bound proteins were eluted successively with 1 M NaCl in PBS and 7 M urea in PBS. Protein-containing fractions were collected, pooled and analyzed by western blotting.

Coupling of anti-BSPH1 antibodies to Affi-Gel Hz

A solution containing ~ 10 mg protein A-sepharose-purified polyclonal anti-BSPH1 antibodies (Lefebvre, *et al.*, 2009) was dialysed against 0.05 M sodium acetate, pH 4.5, then concentrated to 3 ml using a 3000 MWCO centrifugal filter device (Millipore Nepean, ON, Canada). The antibodies were then oxidized by adding 1/50 volume sodium periodate (0.5 M) and gently mixing for 1 h at RT, after which 1/20 volume glycerol was added and mixing was continued for an additional 10 minutes. Oxidized immunoglobulins were then extensively dialyzed against 0.05 M sodium acetate, pH 4.5. Five ml of Affi-Gel Hz was transferred to a Buchner funnel and washed with 3 volumes of cold isopropanol (-20°C). The gel was then washed with 10 volumes of cold distilled water (4°C) and 10 volumes of

0.05 M sodium acetate, pH 4.5. The moist gel cake was then transferred to a 50 ml Falcon centrifuge tube to which the dialyzed antibody solution was added. The tube was kept on an end-over-end shaker overnight at 4°C. The gel was transferred to a small column and washed successively with 3 bed volumes of phosphate buffer containing 0.5 M NaCl, pH 7.0 and 2 bed volumes 0.1 M glycine-HCl, pH 2.5. The column was equilibrated with PBS before use.

Immunoaffinity chromatography of human sperm extracts

Human ejaculated sperm obtained from healthy volunteers were separated from seminal plasma by centrifugation at 1500 x g, 10 min, room temperature and washed 3 times with 1 ml PBS. Sperm pellets were frozen at -20°C until a sufficient quantity was obtained. A total of 5 billion sperm cells were solubilized in 0.1 M NaOH and dialyzed against 150 mM PBS containing 5 mM EDTA and 0.05% CHAPS. The solution was then centrifuged at 10 000 x g, 10 min, 4°C and the supernatant was loaded onto the Affi-Gel Hz-anti-BSPH1 column kept at 4°C. Loading was performed overnight at a flow rate of 5 ml/h whereas flow was increased to 20 ml/h for elution. Unadsorbed proteins were washed with PBS and bound proteins were eluted with 0.1 M glycine-HCl, pH 2.5. Protein-containing fractions were collected, pooled and analyzed by western blotting.

Isolation of detergent-resistant membrane microdomains

DRM were prepared as described in (Girouard, *et al.*, 2008). Briefly, human ejaculated sperm obtained from healthy volunteers were separated from seminal plasma and washed 3 times with PBS. Approximately 500×10^6 sperm were treated in cold TNE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) containing 1% (v/v) Triton X-100, for 30 min on ice. A first centrifugation step was performed at 2000 x g for 5 min in order to remove any unlysed sperm and particulates. In the short DRM isolation method,

the supernatant was centrifuged again at 16 000 x g for 30 min at 4°C. The supernatant containing Triton-soluble proteins was collected and the pellet washed twice, then dispersed in TNE buffer by sonication.

For the longer isolation method, the supernatant from the low-speed centrifugation was subjected to sonication to release DRM from the Triton-insoluble material and then mixed with an equal volume of 85% (w/v) sucrose. The resulting solution was deposited into the bottom of Beckman Ultra-Clear centrifuge tubes (11 x 60 mm) and overlaid with 2.4 ml of 35% (w/v) sucrose and 1 ml of 5% (w/v) sucrose. The samples were ultracentrifuged at 200 000 x g (44 200 rpm) for 16h at 4°C in a SW60Ti rotor (Beckman), after which 11 x 400 µl fractions were recovered starting at the top of each tube, as described in (Girouard, *et al.*, 2008) and schematized in Figure 2 B. For western blot analysis, protein samples were prepared by chloroform/methanol precipitation according to (Wessel and Flugge, 1984). Briefly, 1 volume sample was mixed with 4 volumes of methanol, 1 volume of chloroform and 3 volumes of deionized water. Samples were vortexed and centrifuged for 1 min at 9 000 x g. The upper phase was discarded and 3 volumes methanol were added to the bottom phase. After mixing, samples were centrifuged a second time at 9 000 x g for 2 minutes. The supernatants were discarded and the pellets allowed to air-dry for ~ 15 min, before being resuspended in Laemmli buffer.

Protein electrophoresis and western blotting

SDS-PAGE in 10 or 15% gels was performed according to Laemmli (Laemmli, 1970) using the Mini Protean 3 apparatus from Bio-Rad. Gels were either stained with Coomassie Brilliant Blue, or transferred electrophoretically to Immobilon-P PVDF membranes (Millipore, Nepean, ON, Canada). Membranes were blocked for 2 hours at 37°C in PBS containing 1.1% BSA and X% Tween-20, then incubated with affinity-purified polyclonal

antibodies against His₆-tagged recombinant BSPH1 (1:1000) for 1 hour at 37°C (Lefebvre, *et al.*, 2009). Goat anti-rabbit IgG (1:10 000) were used as secondary antibodies (1 hour, 37°C), then blots were revealed using a chemiluminescence reagent and a Fuji LAS-3000 image analyzer (Fujifilm; Stamford, CT, USA). In all western blot experiments, a control was included in which primary antibodies were omitted. In all cases, the band of interest was not detected in controls (data not shown).

Protein expression and purification of recombinant BSPH1 in E. coli

Expression of rBSPH1 was induced in Origami B(DE3)pLysS *E. coli* transformed with pET32a-BSPH1 using 1mM IPTG, as described in (Lefebvre, *et al.*, 2009). Protein was purified using a His-Bind column, prepared and equilibrated according to manufacturer's instructions. The eluate was dialyzed against 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.8, and subsequently loaded onto a S-protein Sepharose column (Novagen), according to manufacturer's instructions. Bound proteins were eluted using a 0.2 M citrate solution, pH 2.0, neutralized with NaOH, then dialyzed against ammonium bicarbonate and lyophilized. Lyophilized protein was resuspended in 150 mM PBS and their concentration measured using the modified Lowry procedure (Markwell, *et al.*, 1978).

Human sperm capacitation

Semen was obtained from healthy volunteers who had respected a 48 h abstinence period and signed an informed consent as requested by the ethics board of the Maisonneuve-Rosemont Hospital. Only samples with normal semen parameters according to World Health Organization criteria were used (WHO, 1999). Semen was allowed to liquefy for 30 minutes at 37°C, then was layered on top of a Percoll gradient (95-65-40-20% layers) made isoosmotic with HEPES-balanced saline (Lawson, *et al.*, 2008) and was centrifuged for 30 minutes at 2000 x g, 20°C. Spermatozoa at the 65-95% interface and in

the 95% Percoll layer were pooled and diluted to 20×10^6 cells/ml in Biggers, Whitten and Whittingham medium (BWW) (Biggers, *et al.*, 1971) devoid of bicarbonate and BSA and containing 1 mM CaCl_2 and 25 mM Hepes (pH 8.0) (de Lamirande and Lamothe, 2009). To verify the effect of recombinant BSPH1 (rBSPH1) on capacitation, sperm cells were incubated at 37°C in BWW either devoid of bicarbonate and BSA (non-capacitating media) or in the presence of 1.5% BSA and 10 mM bicarbonate (capacitating media), supplemented with different concentrations of rBSPH1 (0 to 60 $\mu\text{g/ml}$). Alternatively, to investigate the effect of anti-BSPH1 antibodies, sperm were incubated in the same fashion, except with different concentrations of polyclonal anti-BSPH1 antibodies, ranging from 0 to 60 $\mu\text{g/ml}$. In separate tubes, sperm were also treated with 60 $\mu\text{g/ml}$ thioredoxin or with 60 $\mu\text{g/ml}$ of protein A-sepharose-affinity-purified immunoglobulins from normal rabbit serum as controls. Capacitation was carried out for 4 hours, after which sperm were analysed for motility by microscopic evaluation. Sperm were washed with 500 μL Hepes buffered saline (HBS) and then the acrosome reaction was induced by adding calcium ionophore A23187 (stock solution: 0.2 mM in DMSO) to a final concentration of 10 μM in BWW and incubating at 37°C for 30 minutes. Control samples were incubated in BWW containing 0.1 % (v/v) DMSO. After washing with 500 μL HBS, sperm were prepared for analysis of viability and acrosomal integrity by flow cytometry.

Flow cytometric evaluation of sperm viability and acrosomal integrity

Following capacitation and acrosome reaction, washed sperm were resuspended in 500 μL PBS and incubated with PSA-FITC at a final concentration of 2.5 $\mu\text{g/ml}$ for 15 minutes at room temperature, in the dark. Sperm were centrifuged for 5 min at 3500 rpm and the supernatant was discarded. Pellets were resuspended in 1 ml PBS and 10 μL of 100 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide was added to achieve a final concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$. Sperm cells

were analyzed using a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur FACS (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) with a FL4 530/30 nm band-pass filter, allowing the collection of fluorescence data in logarithmic mode and light-scatter data in linear mode. For each sample, the characteristic flame-shaped region in the forward light scatter/side light scatter (FSC/SSC) dot plot corresponding to the sperm population was gated (Muratori, *et al.*, 2000, 2003). Thirty thousand events were recorded for each sample at a rate of 200-600 events per second. Data were analyzed using the Cell Quest software. For each experiment, controls were: untreated and unstained cells, untreated cells stained with each fluorochrome separately, untreated cells stained with both fluorochromes, cells not treated with antibodies but for which the acrosome reaction was induced, and cells treated with antibodies but without induction of the acrosome reaction.

Statistical analysis

Results are shown as the mean \pm SD of 3 experiments. Analysis of variance and the Student's *t* test were used to assess statistically significant differences between the investigated variables.

Results and discussion

The wide array of proteins exposed on the mammalian sperm surface play a pivotal role in guiding the male gamete through the long voyage from the testis to its ultimate target in the oviduct, the oocyte. It is highly unlikely that a single factor would be solely responsible for overseeing such a fundamental mission; therefore the current belief is that the key to successful fertilization resides in optimal collaboration and cross talk between several major and a number of lesser, potentially redundant proteins (Nixon, *et al.*, 2009). Sperm acquire the majority of their surface-exposed proteins during their transit through the epididymis, and these proteins can be shed, rearranged or exposed at ejaculation, during capacitation or upon acrosomal exocytosis. Proteins of the Binder of Sperm family have been linked to achievement of capacitation in the bovine and porcine species (Manjunath, *et al.*, 2007, Lusignan, *et al.*, 2007).

BSPH1 is detected in human seminal plasma and sperm extracts

Due to the low concentration of BSP antigens in human seminal plasma, directly subjecting whole seminal plasma to western blotting with anti-BSPH1 antibodies did not allow detection of the native BSPH1 protein (data not shown). However, when ethanol precipitated crude human seminal plasma proteins were subjected to gel filtration chromatography under acidic conditions (50 mM acetic acid), immunoreactive bands were detected in several column fractions (Figure 1A). Gel filtration separates proteins according to their molecular weight; therefore the presence of immunoreactive proteins in more than one peak suggests that BSPH1 may either be aggregating under the experimental conditions, present in several oligomeric forms or part of a complex with other proteins. Since electrophoresis was performed under denaturing and reducing conditions, the band of interest appeared at the same apparent molecular weight in all fractions displaying

immunoreactivity. Interestingly, the apparent molecular mass of native BSPH1 was of approximately 32 kDa, whereas its predicted molecular mass is of 14 kDa (Lefebvre, *et al.*, 2007). This could imply that BSPH1 undergoes post-translational modifications. When gel filtration was performed under basic conditions (50 mM ammonium bicarbonate), all immunoreactivity was observed in the first peak, corresponding to high molecular weight proteins (Figure 1B). Therefore, alkaline pH seems to favor the aggregation or oligomerization of BSPH1. This is not surprising since the predicted isoelectric point of BSPH1 is 8.10 (Lefebvre, *et al.*, 2007), which is approximately the pH of the 50 mM ammonium bicarbonate buffer and could explain the greater tendency towards aggregation in this environment. Thus, we were able to detect a protein that reacted specifically with anti-BSPH1 antibodies in human seminal plasma after fractionation on a gel filtration column. However, this method did not allow us to isolate a significant amount of protein for subsequent functional studies, consistent with the previous finding that BSP-related antigens are present in very low concentrations in human seminal plasma (Leblond, *et al.*, 1993).

In another attempt to isolate native BSPH1 protein from human seminal plasma, we took advantage of the known interaction of BSP proteins with heparin-like GAGs (Manjunath, *et al.*, 1988, Therien, *et al.*, 2005), and subjected seminal plasma proteins to heparin-sepharose affinity chromatography. As seen in the elution profile in Figure 1C, a major peak of unadsorbed proteins was washed out of the column with PBS, whereas 1 M NaCl was used to elute proteins with intermediate affinity for heparin, followed by elution with 7 M urea to displace tightly bound proteins. Western blotting of column fractions detected BSPH1-immunoreactive proteins in the urea-eluted sample, indicating that this protein bound strongly to heparin. Once again, this technique allowed detection of BSPH1

but not isolation of a sufficient amount of protein for further characterization. However, this experiment provided the additional information that similarly to BSP proteins from other species, human BSPH1 binds to heparin and therefore probably also binds to heparin-like GAGs. This finding is of biological significance since GAGs are present in human follicular and oviductal fluids (Agostini, 2006, Eriksen, *et al.*, 1999, Hamamah, *et al.*, 1996). Although controversial, heparin and heparin-like GAGs may be involved in human sperm capacitation and acrosome reaction (Valencia, *et al.*, 1984, Sabeur, *et al.*, 1998). Very few studies have investigated the effect of heparin-like GAGs in human sperm functions. Human sperm are believed to possess binding sites for heparin on their plasma membrane (Delgado, *et al.*, 1982). In the bovine species, we have previously shown that sperm-bound BSP proteins act as docking sites for heparin-like GAGs present in follicular fluid, thus promoting bovine sperm capacitation (Therien, *et al.*, 1995, Therien, *et al.*, 2005).

In humans, the gene encoding the BSP family member, BSPH1, is expressed in the epididymis (Lefebvre, *et al.*, 2007); thus, sperm presumably come into contact with this protein during epididymal transit. Consequently, the majority of BSPH1 present in semen may be associated with the sperm membrane. Moreover, BSP proteins are known to bind phosphorylcholine moieties of the bovine sperm plasma membrane (Desnoyers and Manjunath, 1992, Manjunath, *et al.*, 1994). To investigate this hypothesis, we solubilized human sperm cells in 0.1 M NaOH, then dialyzed against buffer containing CHAPS and loaded the protein solution onto an anti-BSPH1 immunoaffinity column. As seen in Figure 1D, lowering the pH to 2.5 in order to disrupt the antibody-antigen interaction allowed the elution of a very small amount of proteins. Despite the low quantity, western blotting showed the presence of two BSPH1 immunoreactive bands in this fraction, in the molecular

weight range of 30 to 32 kDa, consistent with what was detected in seminal plasma. The presence of two distinct bands may be due to differences in the degree of glycosylation, as is the case for the bovine BSP1 protein (Manjunath and Sairam, 1987), or to other post-translational modifications. Taken together, these results indicate that BSPH1 is present in human seminal plasma and sperm extracts, though the concentration of this antigen seems to be very low. Since human seminal plasma is rich in proteolytic activity, degradation of BSPH1 by proteases may be an explanation for its presence in low quantity in this biological fluid.

BSPH1 is present in detergent-resistant microdomains of the human sperm membrane

Since many proteins important for fertilization have been shown to localize to detergent-resistant microdomains (DRM) of the sperm plasma membrane (Nixon, *et al.*, 2009, Girouard, *et al.*, 2008), we sought to verify whether BSPH1 was also present in these domains. In our first attempt, we lysed ejaculated, non-capacitated sperm in a buffer containing 1% (v/v) Triton X-100 and then separated Triton-insoluble (T-I) from Triton-soluble (T-S) material (Girouard, *et al.*, 2008, Reyes-Moreno, *et al.*, 2007). As shown in Figure 2A, when T-I and T-S material was subjected to electrophoresis and western blotting with anti-BSPH1 polyclonal antibodies, a immunoreactive band was seen only in the T-I fraction. In order to verify whether BSPH1 localizes specifically to DRM fractions, we next separated Triton-containing sperm lysates using sucrose density gradient ultracentrifugation. Following ultracentrifugation, eleven fractions were collected according to the scheme shown in Figure 2B and adapted from (Girouard, *et al.*, 2008). We detected an immunoreactive band at the same molecular weight as previously, in fraction 4, which corresponds to DRM (Figure 2C). There was also a less intense band detectable in T-S fraction 11, which may indicate that whereas the majority of sperm membrane BSPH1

localizes to DRM, a small portion of the protein pool remains in non-raft regions of the membrane. Since many sperm membrane proteins are known to change their localization during capacitation (Cross, 2004, Thaler, *et al.*, 2006), it is also possible that the T-S BSPH1 observed was due to the spontaneous capacitation of a small proportion of the sperm in the semen sample used to prepare DRM. Moreover, components present in seminal plasma can stimulate sperm membrane cholesterol efflux when sperm are exposed to seminal plasma for extended periods (Manjunath, *et al.*, 2007), thus provoking the reorganization of membrane microdomains. Since sperm were exposed to seminal plasma for a period of approximately 30 to 45 minutes before centrifugation, some cholesterol efflux is bound to have occurred, potentially accounting for the partitioning of BSPH1 to both T-S and T-I membrane fractions. An interesting future experiment would be to isolate DRM from capacitated sperm and verify whether the majority of BSPH1 shifts from T-I to T-S membrane domains.

Many possible explanations can be put forth to rationalize the difference in molecular weight observed between the DRM-associated protein and the predicted mass of BSPH1. Of the potential post-translational modifications, the most plausible in this case would be glycosylation, phosphorylation and/or the presence of a GPI anchor. Several members of the BSP family, including bovine, porcine and equine proteins, have been shown to be *O*-glycosylated to different extents (Calvete, *et al.*, 1995, Calvete, *et al.*, 1996, Calvete, *et al.*, 1997, Manjunath and Sairam, 1987, Manjunath, *et al.*, 1988). In the case of human BSPH1, sequence analysis does not predict the presence of *O*-glycosylation (Lefebvre, *et al.*, 2007), although a potential *N*-glycosylation site is present according to the NetNGlyc 1.0 Server. Treatment of recombinant protein with glycosidase or PNGaseF could help address this question. According to NetPhos 2.0 server predictions, there are four prospective serine,

two threonine and two tyrosine phosphorylation sites in the BSPH1 amino acid sequence. Since many DRM-associated proteins are GPI-anchored (Muniz and Riezman, 2000), BSPH1 may undergo this post-translational modification. Available prediction tools, such as the big-PI Predictor, were not in favor of this hypothesis. However, it is known that the GPI signal is relatively weakly defined by experimental data (Eisenhaber, *et al.*, 1998), therefore treatment of the protein with phospholipase C would be necessary to verify this possibility.

Effect of BSPH1 on human sperm capacitation

Despite the useful information provided by the structural and biochemical characterization of BSPH1, the most interesting results arise from functional assays. Given the known involvement of BSP proteins in bovine and porcine sperm capacitation, we investigated the possible participation of BSPH1 in the capacitation of human sperm. The many advantages associated to the use of flow cytometry for the detection and quantification of membrane-associated molecules prompted our decision to optimize a human sperm capacitation assay assessable by this method. Ejaculated human sperm were incubated with various concentrations of recombinant BSPH1 protein in media devoid of BSA and bicarbonate, or supplemented with these capacitation factors. Alternatively, sperm were incubated with different concentrations of anti-BSPH1 polyclonal antibodies in the same way. After 4 hours incubation, acrosomal status was analyzed by flow cytometry following induction of acrosome reaction with calcium ionophore A23187. Since acrosomal exocytosis habitually occurs only in capacitated sperm, measurement of acrosome reaction is an indirect evaluation of capacitation. Staining with propidium iodide allowed for the concomitant assessment of cell viability, thus providing the possibility to distinguish between true acrosomal exocytosis and that attributable to cell death. Incubation

with rBSPH1 or with anti-BSPH1 antibodies did not significantly affect sperm motility (data not shown) or viability when compared to control (Figure 3 A), excluding the possibility that the effects on acrosomal exocytosis could be indirectly due to inhibition/stimulation of other sperm functions.

As seen in Figure 3B, incubation of human ejaculated sperm with rBSPH1 proteins did not significantly increase the proportion of acrosome-reacted sperm in comparison with controls in most experimental conditions. A modest yet significant stimulation was observed at the lowest concentration tested, 20 $\mu\text{g/ml}$ rBSPH1; however, no stimulation was observed at 60 $\mu\text{g/ml}$. Only at very high concentrations of rBSPH1 (100 $\mu\text{g/ml}$) was any stimulation of capacitation noted (data not shown). This probably does not represent a true stimulation since the increase of PSA-FITC fluorescence was accompanied by a concomitant increase in propidium iodide staining, reflecting increased cell death. Since BSP proteins are known to stimulate the continuous efflux of cholesterol and phospholipids from the sperm membrane (Therien, *et al.*, 1998, Therien, *et al.*, 1999), the decrease in viability may be due to excessive loss of membrane lipids. We also expressed thioredoxin alone to be used as a control, in order to ascertain that any observed effects were not due to this fusion tag. As expected, thioredoxin alone had no effect on motility, viability or capacitation when compared to control.

Since very low amounts of BSP antigens are detected in human seminal plasma, the addition of high concentrations of rBSPH1 to the media is not necessarily a very physiological situation. BSPH1 protein probably binds to the sperm membrane in the epididymis; therefore only sperm-bound protein would be present in ejaculated semen. In view of this, we sought to investigate the effect of anti-BSPH1 antibodies on human sperm capacitation, with the hypothesis that antibodies would prevent the interaction of sperm-

bound BSPH1 with capacitation factors. Similarly to what was observed with rBSPH1, anti-BSPH1 antibodies had no significant effect on the percentage of acrosome-reacted sperm (Figure 3B). These results differ from what was previously reported for the bovine BSP proteins, where addition of exogenous protein strongly stimulated sperm capacitation and anti-BSP antibodies inhibited this sperm function (Therien, *et al.*, 1995, Therien, *et al.*, 1997, Lane, *et al.*, 1999). However, one major difference between the experiments conducted in bovine and those presented in this study is that bovine epididymal sperm were used, whereas we had no choice but to use human ejaculated sperm, for obvious reasons. In bovine, BSPs are secreted by the seminal vesicles, implying that epididymal sperm have never come in contact with these proteins and represent an ideal cell population with which to examine their role. In human, *BSPH1* mRNA is detected in the caput epididymis; therefore the ideal sperm population for studies using exogenous BSPH1 proteins would be cells collected proximal to the caput, either in the vas efferens or the proximal segment. When the effect of anti-BSPH1 antibodies were used to inhibit ejaculated sperm capacitation, it is possible that seminal plasma factors were masking the native protein, limiting access of the antibody. However, if BSPH1 were involved in capacitation, it would likely be surface-exposed in order to interact with extracellular factors. In natural mating, passage through the cervical mucus could displace seminal plasma factors and expose this protein.

In addition, our results with human seminal plasma and sperm indicate that the native BSPH1 would have a molecular weight of approximately 32 kDa, suggesting the presence of post-translational modifications. The recombinant protein used in this study was expressed in *E. coli*; therefore is devoid of glycosylation and/or other modifications. It is possible that BSPH1 expressed in a mammalian system would exert a more pronounced

effect on human sperm functions. Our results could also imply that BSPH1 plays a somewhat different role in human sperm maturation than BSP proteins from other species. Recent studies have proposed that BSPs from humans and rodents would have arisen from a gene duplication event (Fan, *et al.*, 2006, Tian, *et al.*, 2009), and are part of a distinct sub-family of genes than those encoding the ungulate BSP proteins. Since gene duplication often brings about neofunctionalization (Tian, *et al.*, 2009), it is not unlikely that the epididymis-expressed human and rodent BSPs may be playing a different role in fertilization than those expressed in the seminal vesicles of ungulates. Given the known involvement of many proteins secreted by the epididymal epithelium in sperm-egg interaction and fusion (Boue, *et al.*, 1994, Cohen, *et al.*, 2007, Myles and Primakoff, 1997, Tantibhedhyangkul, *et al.*, 2002, Martin-DeLeon, 2006), it is justified to hypothesize that BSPH1 could be involved in one or both of these processes. The difficulty in obtaining human oocytes has precluded the possibility of investigating this avenue; however future studies will directly address this issue.

In conclusion, native BSPH1 was detected for the first time in human seminal plasma and sperm extracts. Sperm membrane-bound BSPH1 was shown to localize to Triton-insoluble membrane fractions, suggesting localization in lipid rafts. As measured by flow cytometry, recombinant BSPH1 produced in *E. coli* and anti-BSPH1 antibodies did not demonstrate a pronounced effect on sperm capacitation, indicating that BSPH1 may be involved in other sperm functions. Alternatively, protein expressed in a mammalian system could exhibit different effects. A better understanding of the events guiding the human sperm cell to fertilization will allow the improvement of assisted reproductive techniques as well as a better diagnosis of male infertility and the development of male contraceptives.

Funding

This work was funded by the Canadian Institutes of Health Research [MOP-86510 to P.M.]. J. Lefebvre is a recipient of a Doctoral Training Award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Acknowledgements

We thank Nathalie Henley for her advice regarding the optimization of the flow cytometry assay.

References

- Agostini AI (2006) An unexpected role for the anticoagulant heparan sulfate proteoglycans in reproduction. *Swiss Medical Weekly* 136,583-590.
- Austin CR (1951) Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 4,581-96.
- Belton RJ, Jr., Adams NL and Foltz KR (2001) Isolation and characterization of sea urchin egg lipid rafts and their possible function during fertilization. *Mol Reprod Dev* 59,294-305.
- Bergeron A, Villemure M, Lazure C and Manjunath P (2005) Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 71,461-70.
- Biggers JD, Whitten WK and Whittingham DG (1971) The culture of mouse embryos in vitro. In Daniel JC (ed) *Methods in Mammalian Embryology*. Freeman, San Francisco, 86-116.
- Boue F, Berube B, De Lamirande E, Gagnon C and Sullivan R (1994) Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein. *Biol Reprod* 51,577-87.
- Brown DA and London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14,111-36.
- Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M and Topfer-Petersen E (1995) Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 310 (Pt 2),615-22.
- Calvete JJ, Mann K, Sanz L, Raida M and Topfer-Petersen E (1996) The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett* 399,147-52.

- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L and Topfer-Petersen E (1997) Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 407,201-6.
- Chang MC (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168,697-8.
- Cohen DJ, Da Ros VG, Busso D, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N and Cuasnicu PS (2007) Participation of epididymal cysteine-rich secretory proteins in sperm-egg fusion and their potential use for male fertility regulation. *Asian J Androl* 9,528-32.
- Cross NL (2004) Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol Reprod* 71,1367-73.
- de Lamirande E, Leclerc P and Gagnon C (1997) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3,175-94.
- de Lamirande E and Lamothe G (2009) Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 46,502-10.
- Delgado NM, Reyes R, Huacuja L, Merchant H and Rosado A (1982) Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. *Arch Androl* 8,87-95.
- Desnoyers L and Manjunath P (1992) Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 267,10149-55.
- Edidin M (2003) The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32,257-83.
- Eisenhaber B, Bork P and Eisenhaber F (1998) Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng* 11,1155-61.

- Eriksen GV, Carlstedt I, Morgelin M, Uldbjerg N and Malmstrom A (1999) Isolation and characterization of proteoglycans from human follicular fluid. *Biochem J* 340 (Pt 3),613-20.
- Fan J, Lefebvre J and Manjunath P (2006) Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals. *Gene* 375,63-74.
- Foster LJ, De Hoog CL and Mann M (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100,5813-8.
- Gidwani A, Holowka D and Baird B (2001) Fluorescence anisotropy measurements of lipid order in plasma membranes and lipid rafts from RBL-2H3 mast cells. *Biochemistry* 40,12422-9.
- Girouard J, Frenette G and Sullivan R (2008) Seminal plasma proteins regulate the association of lipids and proteins within detergent-resistant membrane domains of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 78,921-31.
- Graham JK (2001) Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 68,239-47.
- Hamamah S, Wittemer C, Barthelemy C, Richet C, Zerimech F, Royere D and Degand P (1996) Identification of hyaluronic acid and chondroitin sulfates in human follicular fluid and their effects on human sperm motility and the outcome of in vitro fertilization. *Reprod Nutr Dev* 36,43-52.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227,680-5.
- Lane M, Therien I, Moreau R and Manjunath P (1999) Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol Reprod* 60,169-75.

- Lawson C, Goupil S and Leclerc P (2008) Increased activity of the human sperm tyrosine kinase by the cAMP-dependent pathway in the presence of calcium. *Biol Reprod* 79,657-666.
- Leblond E, Desnoyers L and Manjunath P (1993) Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 34,443-9.
- Lefebvre J, Fan J, Chevalier S, Sullivan R, Carmona E and Manjunath P (2007) Genomic structure and tissue-specific expression of human and mouse genes encoding homologues of the major bovine seminal plasma proteins. *Mol Hum Reprod* 13,45-53.
- Lefebvre J, Boileau G and Manjunath P (2009) Recombinant expression and affinity purification of a novel epididymal human sperm-binding protein, BSPH1. *Mol Hum Reprod* 15,105-14.
- Lusignan MF, Bergeron A, Crete MH, Lazure C and Manjunath P (2007) Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. *Biol Reprod* 76,424-32.
- Manjunath P and Sairam MR (1987) Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 241,685-92.
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J and Fan J (2007) Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65,217-28.
- Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chretien M and Chapdelaine A (1988) Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In M. Chretien and K. McKerns, W. (eds)

- Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems*. Plenum Press, New York, 259-273.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E and Desnoyers L (1994) Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 50,27-37.
- Manjunath P and Therien I (2002) Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 53,109-19.
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL and Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87,206-10.
- Martin-DeLeon PA (2006) Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Mol Cell Endocrinol* 250,114-21.
- Miyazaki R, Fukuda M, Takeuchi H, Itoh S and Takada M (1990) Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. *Arch Androl* 25,243-51.
- Muniz M and Riezman H (2000) Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J* 19,10-5.
- Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G and Maggi M (2000) Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 21,903-12.
- Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G and Baldi E (2003) Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl* 24,253-62.

- Myles DG and Primakoff P (1997) Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* 56,320-7.
- Nixon B, Bielanowicz A, McLaughlin EA, Tanphaichitr N, Ensslin MA and Aitken RJ (2009) Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa. *J Cell Physiol* 218,122-34.
- Reyes-Moreno C, Sharif-Askari E, Girouard J, Leveille C, Jundi M, Akoum A, Lapointe R, Darveau A and Mourad W (2007) Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling. *J Biol Chem* 282,19473-80.
- Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI and Overstreet JW (1998) Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote* 6,103-11.
- Shadan S, James PS, Howes EA and Jones R (2004) Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 71,253-65.
- Tantibhedhyangkul J, Weerachayanukul W, Carmona E, Xu H, Anupriwan A, Michaud D and Tanphaichitr N (2002) Role of sperm surface arylsulfatase A in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biol Reprod* 67,212-9.
- Thaler CD, Thomas M and Ramalie JR (2006) Reorganization of mouse sperm lipid rafts by capacitation. *Mol Reprod Dev* 73,1541-9.
- Therien I, Bleau G and Manjunath P (1995) Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 52,1372-9.
- Therien I, Moreau R and Manjunath P (1999) Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 61,590-8.

- Therien I, Bergeron A, Bousquet D and Manjunath P (2005) Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Reprod Dev* 71,97-106.
- Therien I, Soubeyrand S and Manjunath P (1997) Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod* 57,1080-8.
- Therien I, Moreau R and Manjunath P (1998) Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 59,768-76.
- Tian X, Pascal G, Fouchecourt S, Pontarotti P and Monget P (2009) Gene Birth, Death, and Divergence: The Different Scenarios of Reproduction-Related Gene Evolution. *Biol Reprod* 80,616-621.
- Travis AJ, Merdiushev T, Vargas LA, Jones BH, Purdon MA, Nipper RW, Galatioto J, Moss SB, Hunnicutt GR and Kopf GS (2001) Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Dev Biol* 240,599-610.
- Valencia A, Wens MA, Merchant H, Reyes R and Delgado NM (1984) Capacitation of human spermatozoa by heparin. *Arch Androl* 12 Suppl,109-13.
- Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA and Kopf GS (1999a) Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214,429-43.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG and Kopf GS (1999b) Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm.

beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* 274,3235-42.

Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S and Diekman AB (2002) Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 53,133-50.

Visconti PE and Kopf GS (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59,1-6.

Ward CR and Kopf GS (1993) Molecular events mediating sperm activation. *Dev Biol* 158,9-34.

Wessel D and Flugge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138,141-3.

WHO (1999) *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge University Press, Cambridge UK.

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

Figure legends

Figure 1. Detection of BSPH1 in human seminal plasma and sperm extracts. **(A)** Gel-filtration of alcohol-precipitated human seminal plasma proteins under acidic conditions (50 mM acetic acid). Protein-containing fractions were collected and pooled. **(B)** Gel-filtration of human seminal plasma proteins under basic conditions (50 mM ammonium bicarbonate). **(C)** Heparin-sepharose chromatography of human seminal plasma proteins. **(D)** Immunoaffinity chromatography of human sperm extracts on an Affi-Gel Hz-anti-BSPH1 column. Insets, anti-BSPH1 western blot of eluted proteins from each peak.

Figure 2. Detection of BSPH1 in detergent-resistant microdomains of the human sperm membrane. **(A)** Human sperm Triton-X-100-insoluble material was separated from Triton-soluble proteins as described in material and methods (short method), then equivalent quantities of both fractions were subjected to western blotting with anti-BSPH1 antibodies. **(B)** Schematic representation of the distribution of sperm subcellular compartments following discontinuous sucrose gradient ultracentrifugation of Triton-X-100-treated sperm (Girouard, *et al.*, 2008). **(C)** Ejaculated human sperm were washed and treated with 1% Triton-X-100, and then lysates were subjected to discontinuous sucrose gradient ultracentrifugation. Fractions were collected as shown in (B) and subjected to chloroform/methanol precipitation followed by western blotting with anti-BSPH1 antibodies. +, recombinant thioredoxin-tagged BSPH1; T-S; Triton-soluble fraction; T-I, Triton-insoluble fraction.

Figure 3. Effect of rBSPH1 and anti-BSPH1 antibodies on the capacitation of human sperm. Ejaculated sperm were incubated under non-capacitating (NC, grey bars) or capacitating (C, black bars) conditions (see text), in the absence (medium alone, BW) or presence of different concentrations of recombinant BSPH1 protein, thioredoxin (TRX),

anti-BSPH1 antibodies (α -BSPH1) or normal rabbit serum immunoglobulins (NRS IgG), for 4 h, then acrosome reaction was induced by calcium ionophore A23187 for 30 minutes. Viability and acrosomal integrity were analyzed by flow cytometry after staining with PSA-FITC and propidium iodide. **(A)** Percent viable cells. **(B)** Percent acrosome-reacted sperm induced by ionophore A23187. Results represent mean \pm SD of 3 experiments and 30 000 sperm assayed per sample. Significant differences vs. control (without protein or antibodies): * $P < 0.05$.

Figure 1

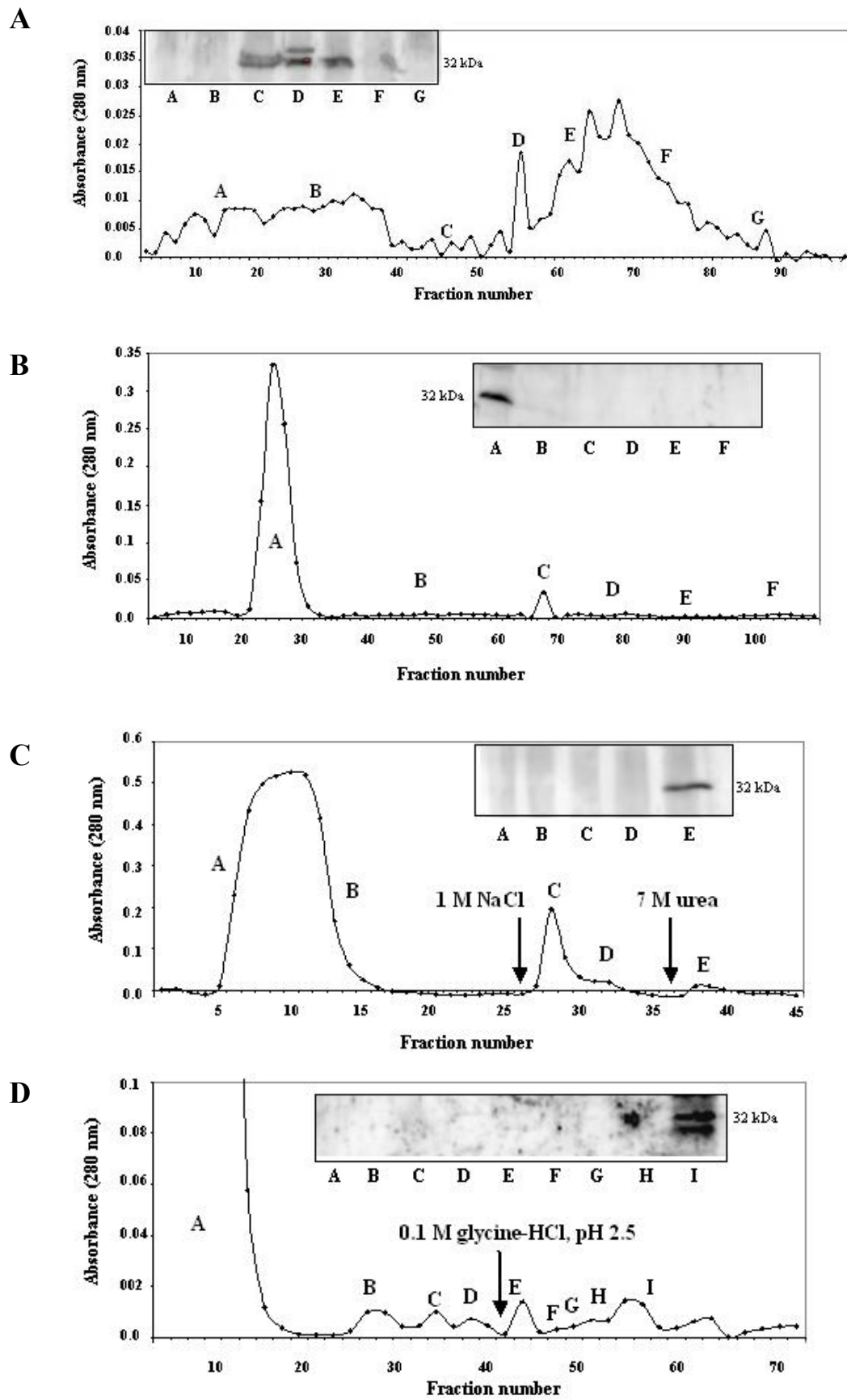


Figure 2

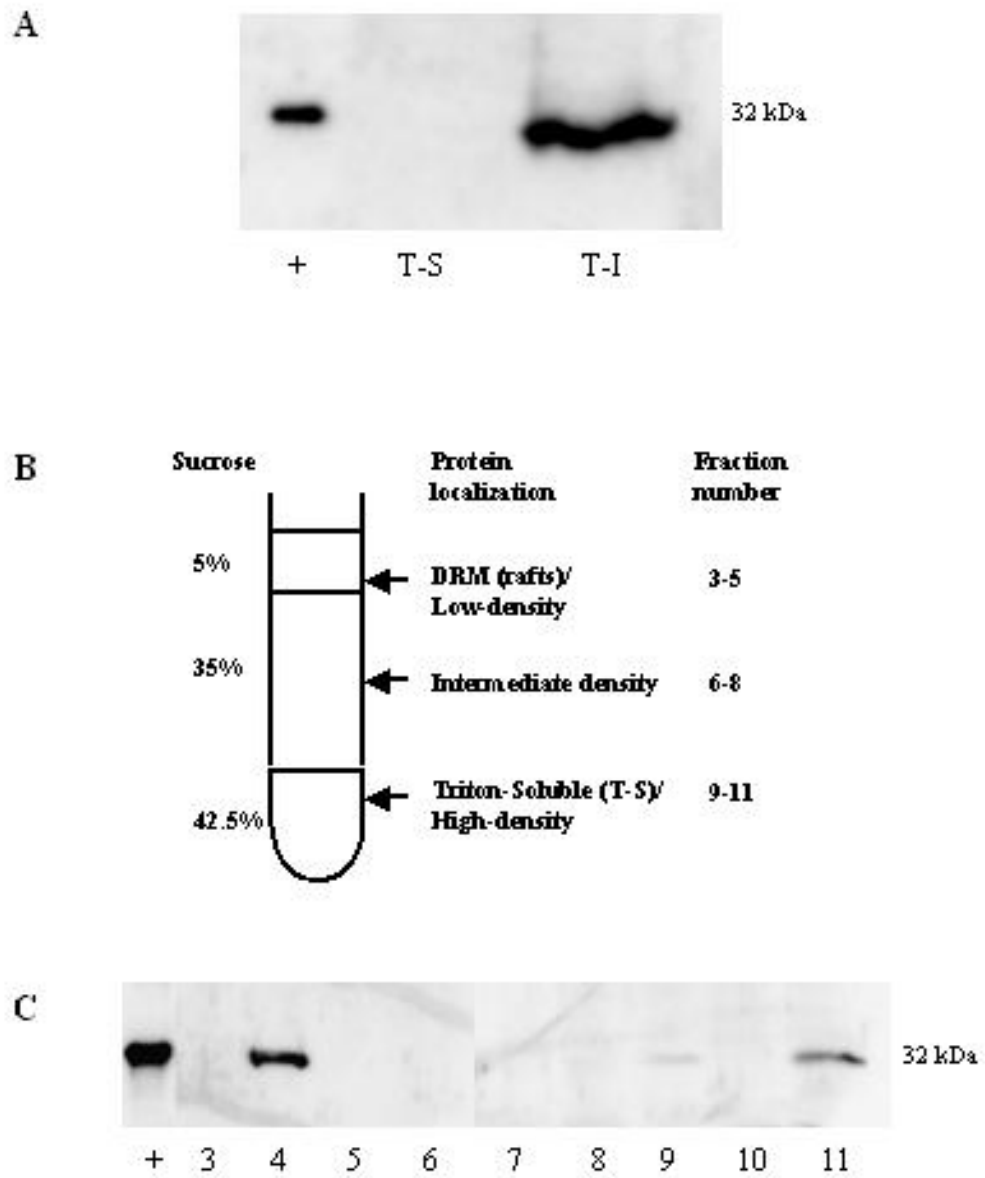
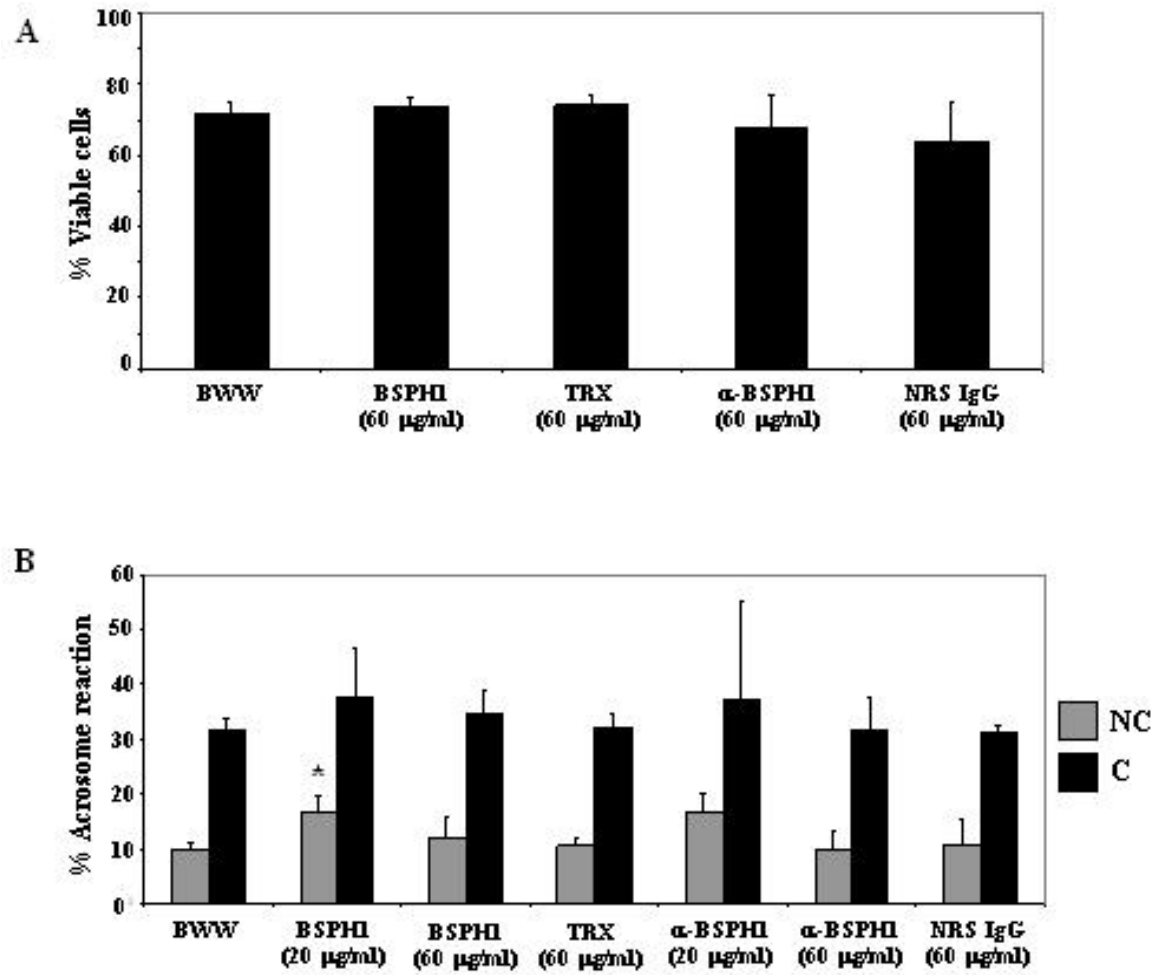


Figure 3



3. DISCUSSION

Les spermatozoïdes de mammifères entrent en contact avec une pléthore de molécules pendant leur odyssée vers l'ovocyte. Parmi celles-ci, nous retrouvons les constituants du fluide épидидymaire, et des sécrétions des glandes accessoires ainsi que des sécrétions du tractus génital femelle, dont plusieurs à modifier la membrane plasmique du spermatozoïde afin qu'il devienne apte à la fécondation. Lors du transit épидидymaire, les spermatozoïdes acquièrent la capacité de se mouvoir et subissent une réorganisation de leurs protéines de surface de façon à pouvoir ultérieurement reconnaître et interagir avec l'ovocyte. Malgré ceci, les spermatozoïdes fraîchement éjaculés sont toujours incapables de féconder. La totalité du pouvoir fécondant n'est acquis qu'après un séjour dans le tractus génital femelle, la durée duquel varie entre les espèces. L'ensemble des modifications apportées au spermatozoïde pendant son passage dans l'appareil femelle se nomme capacitation. Chez l'humain, la capacitation requiert de 4 à 6 heures [192].

Une suite d'investigations menées chez l'espèce bovine a permis de démontrer l'importance d'une famille de protéines du plasma séminal bovin, nommées protéines BSP, dans la capacitation [121]. Des protéines homologues aux BSP ont été isolées et caractérisées à partir du fluide séminal de nombreuses autres espèces [121]. Par conséquent, les BSP semblent être ubiquitaires dans le plasma séminal des mammifères. Malgré cela, seuls les gènes encodant les trois protéines bovines (BSP1, BSP3 et BSP5) ont été caractérisés et aucune étude n'a démontrée la présence de membres de la famille des BSP chez la souris et l'humain. Afin de vérifier si les BSP sont importantes pour la maturation des spermatozoïdes murins et humains, la détection de leur expression dans ces espèces constituait une étape préalable nécessaire. Les objectifs de cette étude étaient donc d'abord de caractériser l'expression des gènes des homologues des BSP chez la souris ainsi que chez l'humain. Ensuite, le clonage des ADN complémentaires de ces gènes a permis d'obtenir leurs séquences complètes et de produire la recombinante humaine et d'examiner son rôle dans la maturation des spermatozoïdes humains.

3.1. Des séquences apparentées aux BSP sont présentes dans les génomes de souris et d'humain

La signature structurale des protéines BSP est la présence de deux domaines Fn2 répétés en tandem (voir Figures 7 et 8, section 1.4.7). Puisque le pourcentage de similarité

entre les séquences des BSP est le plus élevé à l'intérieur de ces domaines, ces séquences conservées ont été utilisées pour sonder l'ensemble des séquences traduites et génomiques présentes dans les bases de données EMBL et GenBank. Depuis cette étude, la nomenclature utilisée pour désigner les membres de la famille des BSP a été modifiée ([110]; Tableau 1, section 1.4.7}. Au total, 52 séquences partageant des similitudes avec les domaines Fn2 de BSP5 ont été retenues pour l'analyse. Les relations phylogénétiques entre les séquences recueillies ont été étudiées à l'aide d'un arbre de type « neighbour-joining ». Cette analyse a permis de classer les séquences en différents embranchements, la branche majeure correspondant à la famille des BSP (article 2.1, figure 1B). Un fort support statistique appuyait la classification des séquences apparentées aux BSP dans un embranchement distinct des autres familles de gènes contenant des séquences Fn2, indiquant que les domaines Fn2 des BSP sont différents de ceux retrouvés dans d'autres familles de protéines. De plus, nous avons démontré qu'une autre famille de protéines possédant quatre domaines Fn2 et impliquées dans la reproduction, les homologues de la protéine E12 [193], fait partie d'un embranchement différent et n'est pas étroitement reliée aux BSP. Cette méthode a aussi permis de repérer des nouvelles séquences homologues aux BSP dans les génomes du bovin, de la souris, du rat, du chimpanzé et de l'humain. De plus, l'embranchement des BSP a été divisé en trois sous-familles, *BSP*, *BSPH1* et *BSPH2*, indiquant que la famille des BSP compte plus de membres que ce qui était préalablement connu (article 2.1, figure 2).

À l'aide des bases de données de « expressed sequence tags » (EST) ainsi que par analyse de l'expression par RT-PCR (article 2.1, figure 3), nous avons confirmé l'expression des trois nouveaux gènes bovins (*BSP4*, *BSPH1* et *BSPH2*) et de plusieurs des gènes identifiés chez d'autres espèces dans le système reproducteur masculin. En fait, la sous-famille *BSP*, qui regroupe les trois gènes bovins préalablement identifiés (*BSP1*, *BSP3* et *BSP5*), est exprimée dans les vésicules séminales. Les embranchements *BSPH1*, comprenant un gène murin (*Bsph1*) et un gène humain (*BSPH1*), ainsi que *BSPH2*, comprenant un second gène murin (*Bsph2a*), sont exprimés dans l'épididyme. L'ensemble de ces résultats supportait l'hypothèse de la présence de protéines de la famille des BSP chez la souris et l'humain, justifiant des investigations plus approfondies.

3.2. L'ARN messager des BSP chez la souris et l'humain est uniquement exprimé dans les épидидymes

Malgré l'identification de séquences apparentées aux BSP dans les génomes murin et humain, il était nécessaire de vérifier si ces gènes étaient effectivement exprimés. Des analyses par RT-PCR à partir d'ARN total extrait de tissus murins ont permis d'établir que les homologues des BSP étaient uniquement exprimés dans de l'épididyme (article 2.2, figure 4). Parmi les trois séquences repérées lors de l'analyse du génome, seulement deux d'entre elles, *Bsph1* et *Bsph2a*, semblent être exprimées. La troisième séquence, *Bsph2b*, correspond probablement à un pseudogène. Chez l'humain, malgré le nombre plus restreint de tissus périphériques étudiés, l'expression de *BSPHI* semble aussi être restreinte à l'épididyme (article 2.2, figure 4). Puisque *BSPHI* et *Bsph1* sont orthologues, l'expression de *BSPHI* dans les tissus périphériques n'était pas attendue. L'expression des homologues des BSP dans de l'épididyme représente une différence importante par rapport aux autres espèces chez lesquelles les BSP ont été caractérisées. En fait, chez les ongulés les BSP sont sécrétées par les vésicules séminales et représentent une proportion significative des protéines du plasma séminal [121].

Tel que mentionné dans l'introduction, chaque segment de l'épididyme exprime des gènes différents et le niveau d'expression d'un même gène peut varier selon le segment [21, 22]. Afin de vérifier si l'expression des homologues murins des BSP était régulée de cette manière, nous avons extrait l'ARN total des différents segments d'épididymes de souris et synthétisé l'ADNc. À l'aide d'amorces spécifiques aux gènes *Bsph1*, *Bsph2a* et β -actine, nous avons amplifié l'ADNc par PCR et comparé l'intensité des bandes pour chaque segment (résultats non-publiés). Quoique seulement semi-quantitative, cette expérience nous a permis de constater que *Bsph1* est exprimé préférentiellement dans la tête de l'épididyme alors qu'aucune expression n'a été détectée dans les deux autres segments; *Bsph2a* semble être exprimé plus fortement dans le corps, faiblement dans la queue et pas du tout dans la tête. Dans le cas de *BSPHI*, nous n'avons pas réussi à obtenir des échantillons de chaque segment épидидymaire. Comme l'ARN utilisé provenait de la tête, le gène *BSPHI* est exprimé au moins dans ce segment. Puisque *BSPHI* et *Bsph1* sont orthologues, il est probable que leurs profils d'expression se ressemblent, mais l'expression de *BSPHI* dans les autres segments épидидymaires reste à vérifier.

Diverses hypothèses peuvent être proposées pour expliquer les différences d'expression des BSP selon les tissus; ceci relève vraisemblablement de différences inter-espèces dans le processus maturationnel des spermatozoïdes. Tel que mentionné dans la section 1.3, la semence murine et humaine coagule suite à l'éjaculation, ce qui rendrait un contact entre les protéines BSP et la membrane plasmique des spermatozoïdes inefficace si ces protéines devaient être ajoutées aux spermatozoïdes lors de l'éjaculation. Au contraire, cette coagulation ne se produit pas chez les ongulés, donc la sécrétion des BSP par les vésicules séminales permet une association de ces protéines avec les spermatozoïdes dès le moment de l'éjaculation. Chez la souris et l'humain, un contact plus prolongé entre les BSP et les spermatozoïdes serait possible à l'intérieur de l'épididyme, où les gamètes résident pendant plusieurs jours. Des mesures par radioimmunoessai n'ont révélé que des taux très faibles d'antigènes apparentés aux BSP dans le plasma séminal humain [128], supportant l'idée que les BSP se retrouveraient plutôt dans le fluide épидидymaire. L'analyse phylogénétique des gènes encodant les BSP a permis de montrer que la sous-famille des gènes *BSP*, exprimée dans les vésicules séminales, est présente chez tous les mammifères sauf la souris et l'humain. L'absence de protéines BSP dans les sécrétions des vésicules séminales serait associée à la coagulation de la semence, laquelle préviendrait un contact efficace des protéines avec les gamètes mâles.

Tel qu'indiqué dans la section 1.2.5, plusieurs protéines acquises par les spermatozoïdes lors de leur transit épидидymaire sont transférées par des vésicules nommées épидидyosomes. La libération de ces protéines est assurée par un mécanisme alternatif au mode classique de sécrétion, nommée sécrétion apocrine [57]. Puisque les protéines BSP humaine et murines seraient sécrétées par les cellules épithéliales de l'épididyme et se comportent comme des protéines membranaires des spermatozoïdes [124], il serait possible que les BSP soient transférées à la membrane plasmique des spermatozoïdes épидидymaires murins et humains par le biais des épидидyosomes. Cette hypothèse reste à vérifier.

L'expression des BSP dans l'épididyme chez la souris et l'humain soulève la possibilité que ces protéines pourraient exercer un rôle différent de celui décrit chez le taureau et le porc. Plusieurs protéines sécrétées par l'épithélium de l'épididyme s'associent à la membrane plasmique des spermatozoïdes en transit et leur confèrent la capacité de reconnaître, d'interagir ou de fusionner avec l'ovocyte. Par exemple, la protéine P34H et

ses orthologues, les protéines CRISP, l'arylsulfatase A et la protéine SPAM-1, sont toutes ajoutées à la membrane des spermatozoïdes lors de leur passage dans l'épididyme et permettent aux gamètes mâles de féconder l'ovocyte [26, 33, 34, 37-41, 45, 47, 194]. L'analyse phylogénétique des gènes de la famille des BSP suggère que la présence des trois sous-familles serait due à un événement de duplication d'un gène *BSP* ancestral qui aurait eu lieu avant la divergence des mammifères, et qui aurait donné naissance aux sous-familles *BSPH1/BSPH2* épидидymaires. La duplication des gènes représente une source essentielle de nouveaux gènes avec des fonctions nouvelles ou altérées. Ceci peut donner lieu à deux scénarios différents : soit la néofonctionalisation, lorsque la copie évolue vers une nouvelle fonction; soit la sousfonctionalisation, où les fonctions ancestrales sont partagées entre les nouvelles copies du gène [195]. Il est donc fort possible que les gènes *Bsph1* et *Bsph2a* chez la souris et *BSPH1* chez l'humain remplissent des fonctions différentes dans la maturation des spermatozoïdes que les gènes de la sous-famille *BSP* chez les ongulés. Au contraire, la seule différence pourrait concerner le tissu d'expression : l'expression épидидymaire étant plus efficace que l'expression par les vésicules séminales chez la souris et l'humain, étant donné les différences dans la coagulation de la semence.

L'hypothèse que les protéines BSP puissent participer à la capacitation des spermatozoïdes chez l'humain et la souris ne peut être négligée, car il est possible que les BSP soient ajoutées à la membrane plasmique dans l'épididyme et qu'elles y restent associées jusqu'au site de fécondation, où elles pourraient potentialiser la capacitation. Il existe un membre de la famille des protéines CRISP, soit CRISP2, qui est exprimé dans le testicule de souris, contrairement aux autres membres de la famille qui sont exprimés dans l'épididyme. Malgré cette différence, CRISP2 exerce le même rôle que les CRISP épидидymaires, soit un rôle dans la fusion spermatozoïde-ovocyte [196].

3.3. Analyse des séquences de BSPH1, Bsph1 et Bsph2a

La comparaison des séquences prédites en aa des homologues murins et humains des BSP a permis de déterminer qu'il s'agissait bel et bien de protéines de la famille des BSP (article 2.2, figures 1, 2). La signature structurale de ces protéines est la présence des deux domaines Fn2 arrangés en tandem et séparés par une séquence de sept acides aminés conservée d'une protéine à l'autre. Nous retrouvons cet arrangement dans la séquence des protéines BSPH1, Bsph1 et Bsph2a. Une des différences entre les séquences des protéines murines et humaines et celles des protéines bovines est la présence d'une extension C-

terminale chez les premières. BSPH1 n'a qu'un seul résidu suite au second domaine Fn2, tandis que BspH1 en a deux et BspH2a en compte 5. La signification de la présence d'une extension C-terminale n'est pas encore connue.

3.4. Production de la protéine BSPH1 recombinante dans *E. coli*

3.4.1. Fusion aux étiquettes hexa-histidine et glutathion-S-transférase

La séquence complète de l'ADNc encodant *BSPH1* a été clonée dans des vecteurs permettant l'expression de la protéine recombinante en bactéries. Puisque la protéine BSP3 bovine exerce le même rôle que BSP1 et BSP5 dans la capacitation, et ce malgré l'absence de glycosylation, nous avons choisi de produire BSPH1 recombinante (rBSPH1) dans *E. coli*, qui n'effectue pas cette modification post-traductionnelle. Pour de nombreuses raisons dont le faible coût, la croissance rapide et la facilité de manipulation, *E. coli* demeure un hôte d'expression de choix pour l'expression de protéines hétérologues. Par contre, l'expression de BSPH1 en fusion avec une étiquette hexahistidine (His₆) ou glutathion-S-transférase (GST), dans les bactéries *E. coli* BL21(DE3)pLysS (article 2.3, figure 2), n'a produit qu'une quantité négligeable de protéines recombinantes solubles. En effet, l'absence de chaperones moléculaires eucaryotiques, de modifications post-traductionnelles spécialisées, de la capacité d'être ciblées vers des compartiments cellulaires spécifiques ou de former des complexes avec des protéines stabilisatrices, constitue un obstacle important au bon repliement des protéines exprimées dans un système bactérien lorsque celles-ci requièrent des conditions particulières. Les problèmes de solubilité demeurent l'obstacle le plus fréquemment rencontré lorsque *E. coli* est utilisé comme hôte d'expression [197]. Dans nos travaux, de nombreux paramètres ont été optimisés afin d'augmenter le rendement en protéines solubles, incluant l'induction de l'expression à faible température, la variation de la concentration d'IPTG utilisée et l'utilisation de différentes méthodes de lyse cellulaire. Aucune de ces modifications n'a donné les résultats escomptés.

Parfois, l'expression d'une protéine sous forme de corps d'inclusion peut offrir certains avantages. D'abord, la protéine d'intérêt peut s'accumuler à plus d'un tiers de la totalité des protéines cellulaires, et n'est accompagnée que de très peu de protéines contaminantes. Il est possible d'induire le repliement de la protéine d'intérêt *in vitro*, en l'exposant d'abord à des conditions dénaturantes et en changeant progressivement le milieu environnant des protéines de façon à favoriser l'atteinte de la conformation native. Cette

pratique, communément appelée « refolding », peut mener à une protéine correctement repliée et qui peut retrouver ou non son activité biologique. L'élaboration d'une telle stratégie dépend de la protéine à l'étude. On peut, par chance, opter pour une méthode d'amblée gagnante. De manière plus réaliste, on risque de consacrer beaucoup de temps à essayer différentes méthodes et des suites d'étapes jugées logiques, pour finalement ne rien obtenir de fonctionnel. Nous avons tenté de réaliser le « refolding » de rBSPH1, ce qui impliquait une première étape de dénaturation des protéines des corps d'inclusion à l'aide de l'urée 8 M, condition communément utilisée dans la littérature. Il a été nécessaire d'ajouter un agent réducteur, le dithiothréitol, afin de favoriser la solubilisation de His₆-rBSPH1. Une dialyse directe contre des solutions ne contenant aucun agent dénaturant ou réducteur donnait nécessairement lieu à la précipitation, et ce même en présence de glycérol à 5%. Étant donné les nombreuses cystéines dans la structure primaire, nous devons utiliser une technique de repliement plus complexe, et avons finalement réussi à maintenir rBSPH1 en solution en procédant à une dialyse par étapes. La concentration protéique de l'échantillon devait être relativement faible (~ 100 µg /ml) afin de prévenir l'agrégation et la précipitation. Cette approche a permis d'enlever graduellement l'urée et le DTT, et d'incorporer une étape de dialyse contre une solution de concentration intermédiaire en urée et contenant un système rédox (mélange de glutathion oxydé et réduit). Le système rédox avait pour but de promouvoir le réarrangement des ponts disulfure de manière à retrouver la conformation native [198, 199]. Malheureusement, cette stratégie n'a permis de récupérer qu'une protéine soluble mais non-fonctionnelle, ce qui déjà a été observé pour d'autres protéines [200]. En fait, quoique la solubilité dans le tampon de « refolding » soit nécessaire pour qu'une protéine puisse se replier, cela ne garantit pas qu'elle retrouvera sa conformation native [201].

3.4.2. Expression dans la souche *Origami B(DE3)pLysS*

Puisque le problème de solubilité relevait probablement du mauvais appariement des ponts disulfure de la protéine dans le cytoplasme réducteur des bactéries [199], nous avons exprimé les deux constructions dans une souche génétiquement modifiée (*Origami B(DE3) pLysS*) qui possède un cytoplasme plus oxydatif. Quoique cette souche ait permis d'obtenir une plus grande proportion de protéines solubles, le rendement total en protéines était beaucoup plus faible (article 2.3, figure 2). De plus, la protéine récupérée n'était soluble que de façon éphémère. Toute manipulation subséquente pouvait mener à sa précipitation,

ce qui rendait la tâche de purifier cette protéine extrêmement difficile. La chromatographie d'affinité, la filtration sur gel et la chromatographie liquide à haute performance ont été utilisées dans le but de purifier la protéine rBSPH1 produite dans les bactéries Origami B(DE3)pLysS, mais aucune de ces techniques n'a permis d'obtenir des quantités suffisantes de protéines purifiées.

3.4.3. Fusion à l'étiquette thiorédoxine

La prochaine tactique était d'inclure un partenaire de fusion soluble, la thiorédoxine (trx), qui peut augmenter de manière significative le rendement en protéines solubles [202]. Lorsque sur-exprimée seule en bactéries, elle peut constituer jusqu'à 40% des protéines totales cellulaires et demeurer complètement soluble [202]. De plus, la trx peut réduire les effets toxiques de certaines protéines recombinantes sur les cellules hôtes ainsi que prévenir la dégradation protéolytique de la protéine cible [203]. L'utilisation de la trx comme protéine de fusion de façon concomitante à l'expression dans la souche Origami B(DE3) pLysS, déficiente en thiorédoxine réductase, permet la formation des ponts disulfure dans le cytoplasme de *E. coli*, par l'accumulation de trx oxydée qui peut fonctionner en tant que thiol oxydase [204-206]. Après de nombreuses tentatives infructueuses, la fusion BSPH1-trx a finalement permis d'obtenir une protéine soluble en quantités significatives (article 2.3, figure 3). Grâce à l'ajout concomitant d'étiquettes His₆ et S-tag par l'utilisation du vecteur pET32a, nous avons réussi à purifier la protéine de fusion en éliminant la majorité des contaminants. La colonne S-bind (qui lie l'étiquette S-tag) ayant une plus faible capacité de liaison, nous avons d'abord procédé à une première étape de purification sur colonne de nickel, suivi d'une dialyse et d'une étape de purification sur la colonne S-bind.

La stratégie développée ici, soit celle d'exprimer BSPH1 en fusion avec la trx, pourrait s'appliquer aux autres protéines de la famille des BSP. Lors de cette étude, nous avons aussi exprimé l'orthologue murin de BSPH1, BspH1, de la même manière. En fait, la protéine murine était exprimée en plus grande quantité sous la forme soluble que la protéine humaine (article 2.3, figure 3). Les études avec la protéine murine revêtent une extrême importance : ce modèle permettra de réaliser des expériences hautement révélatrices du rôle possible de BSPH1 chez l'humain.

En plus de permettre un meilleur rendement en protéines solubles, la trx peut offrir d'autres avantages pour la purification. Lorsque sur-exprimée, la trx peut être purifiée

rapidement, simplement en chauffant les lysats cellulaires à 85°C pendant quelques minutes [207]. Alors que la trx demeure soluble, la majorité des protéines d'*E. coli* précipitent, permettant une purification significative. De plus, puisque la trx de *E. coli* réside normalement dans des sites osmo-sensibles près de la périphérie interne de la membrane [208], il est possible de relâcher la protéine dans le milieu extracellulaire en provoquant un choc osmotique [207]. Malheureusement, ces propriétés ne sont pas toujours transmises à la protéine d'intérêt qui lui est fusionnée. Nous avons tenté de purifier trx-BSPH1 à l'aide de ces stratégies, mais sans succès (résultats non-présentés). Toutefois, la stratégie décrite plus haut, qui impliquait les colonnes de nickel et S-bind, permettait un rendement et un degré de pureté adéquats.

Une façon d'augmenter davantage la proportion de rBSPH1 soluble aurait été de co-exprimer la protéine avec des chaperones moléculaires qui contribuent à son repliement [209-211]. La « protein disulfide isomerase », qui aide au bon appariement des ponts disulfure, est un exemple. De manière alternative, certains partenaires de fusion tels que la « maltose-binding protein » permettent de diriger la sécrétion de la protéine d'intérêt vers le périplasma oxydatif [207], favorisant son bon repliement. Il est difficile de prévoir quelle stratégie est la plus prometteuse. Néanmoins, une étude approfondie de la protéine d'intérêt, permet souvent de mieux cibler les partenaires de fusion et les conditions d'induction et de purification. Malheureusement, il n'existe pas de protocole miracle applicable à toutes les protéines.

3.4.4. Production extracellulaire de rBSPH1

Le problème d'insolubilité des protéines recombinantes exprimées en bactéries peut parfois être surmonté par la perméabilisation de la paroi bactérienne afin de libérer les protéines vers le milieu extracellulaire, puisque *E. coli* ne possède pas de machinerie permettant de sécréter les protéines vers le milieu de fermentation [212]. En retenant les protéines hétérologues à l'intérieur du cytoplasme bactérien, elles deviennent vulnérables aux attaques par les protéases et deviennent difficiles à isoler et purifier. La parathormone a été exprimée dans *E. coli* en fusion avec la trx, en ajoutant du Triton-X-100 au milieu de fermentation au même moment que l'ajout d'IPTG [213], ce qui a occasionné la relâche de la protéine recombinante dans le milieu extracellulaire. De plus, le rendement total était beaucoup plus élevé qu'avec la production intracellulaire. Nous avons tenté cette expérience avec les bactéries *E. coli* BL21(DE3) et Origami B(DE3), transformées avec le

vecteur pET32a-BSPH1. Dans le premier cas, l'ajout de Triton-X-100 aux cellules en croissance logarithmique n'a pas permis de détecter rBSPH1 dans le milieu de fermentation (résultats non-publiés). Cependant, la technique a fonctionné pour les cellules Origami B(DE3) et nous avons pu récupérer le milieu de culture et purifier la protéine recombinante. Par contre, le rendement était moindre qu'avec à la production intracellulaire, et la majorité de la protéine demeurait intracellulaire malgré la perméabilisation. L'absence de ponts disulfure dans la parathormone explique peut-être les plus grandes difficultés rencontrées dans nos manipulations.

3.4.5. Clivage de l'étiquette thiorédoxine par l'entérokinase

Lorsqu'un partenaire de fusion est de taille considérable et/ou pourrait interférer dans les essais biologiques, il est habituel de le cliver avant de passer aux étapes subséquentes [214]. Dans notre cas, le vecteur pET32a contient une séquence codant pour un site de clivage par l'entérokinase; nous avons donc tenté le clivage grâce à cette enzyme afin de récupérer la protéine BSPH1 sans acides aminés supplémentaires. La digestion permettait de retrouver la protéine BSPH1 au le poids moléculaire attendu de 14 kDa, mais seulement en faible proportion comparativement à la protéine de fusion de 32 kDa, indiquant que la digestion était incomplète. Nous avons fait varier les conditions de clivage, mais les modifications n'ont pas permis d'augmenter l'efficacité de la digestion. L'ajout d'agents dénaturants en faibles concentrations peut favoriser l'accessibilité de l'enzyme à sa cible [215]. L'ajout de peroxyde d'hydrogène ou d'agents réducteurs peuvent aussi améliorer l'efficacité du clivage [216]. Nous avons tenté d'effectuer le clivage en présence de 1 M urée, de 0,2 M H₂O₂ ou de 1 mM DTT, mais l'augmentation du rendement en protéine clivée était minime (résultats non- présentés). Une autre façon de cliver l'étiquette trx est d'effectuer une digestion sur colonne [217, 218]. Cette méthode consiste à immobiliser la protéine d'intérêt sur une colonne d'affinité et de faire circuler l'enzyme dans la colonne. Lors du clivage, la protéine d'intérêt est décrochée de la résine tandis que l'étiquette y reste liée. Par contre, la protéine d'intérêt élue de la colonne avec l'entérokinase, nécessitant une seconde étape de purification. Nous avons tenté cette méthode en immobilisant notre protéine sur une colonne d'immunoaffinité (voir section 3.5), mais le rendement obtenu était encore plus faible que lors de la digestion conventionnelle (résultats non-présentés).

La protéine BSP5 ainsi que ses domaines ont aussi été produits de façon recombinante à l'aide du vecteur pET32a (résultats non- présentés). BSP5 contient une

extrémité N-terminale beaucoup plus longue que les autres BSP [114]. Lorsque la protéine entière et le domaine N-terminal seul ont été exprimés en fusion avec la trx, le clivage à l'entérokinase était très efficace. Par contre, le clivage était inefficace lorsque l'un ou l'autre des domaines Fn2 était exprimé sans l'extrémité N-terminale. Le domaine N-terminal plutôt court de BSPH1 (27 aa, vs 71 aa pour BSP5 [219]) pourrait empêcher l'accessibilité de l'entérokinase à son site de clivage, qui se trouve immédiatement en amont de la séquence de BSPH1. Dans le cas de BSP5, la plus grande distance entre le site de reconnaissance et le premier domaine Fn2 favoriserait l'accès de l'enzyme.

3.5. Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre BSPH1

Malgré l'insolubilité de la rBSPH1 exprimée avec une étiquette His₆, nous avons utilisé les protéines des corps d'inclusion pour générer des anticorps polyclonaux chez des lapins. Tel que mentionné dans la section 3.4.1, les protéines recombinantes retrouvées dans les corps d'inclusion bactériens représentent normalement la majorité des protéines totales de ces corps insolubles; le degré de pureté est alors élevé. Ces protéines ne possèdent pas leur conformation native, mais peuvent tout de même servir à générer des anticorps. Puisque les anticorps polyclonaux reconnaissent de nombreux épitopes, ils peuvent généralement bien détecter la protéine d'intérêt, que celle-ci soit dénaturée ou correctement repliée. En fait, des anticorps générés de façon similaire ont déjà été utilisés afin d'inhiber les fonctions spermatiques *in vitro* [220, 221].

Les anticorps générés reconnaissent spécifiquement BSPH1, ainsi que son orthologue, Bsph1. Nous avons utilisé ces anticorps dans les expériences d'immunobuvardage, de purification sur colonne d'immunoaffinité et de capacitation. Parallèlement à la production d'anticorps anti-BSPH1, nous avons aussi généré des anticorps dirigés contre la protéine murine, Bsph1, en procédant de la même manière. Ces anticorps n'ont pas encore été utilisés pour des essais fonctionnels, mais reconnaissent spécifiquement leur antigène dans des expériences d'immunobuvardage.

3.6. Liaison de rBSPH1 aux liposomes de phosphatidylcholine et à la membrane des spermatozoïdes humains

Malgré la solubilité de la protéine recombinante obtenue suite à la fusion avec la trx, nous devons tout de même confirmer sa fonctionnalité, puisqu'il arrive parfois que des protéines recombinantes soient solubles mais mal-repliées et donc non-fonctionnelles [200].

Avant de passer aux expériences fonctionnelles, nous avons vérifié si rBSPH1 démontrait les propriétés de liaison connues des protéines BSP. D'abord, les BSP interagissent avec les phospholipides portant un groupement choline [112], et avec la membrane plasmique des spermatozoïdes [113]. Nous avons donc généré des liposomes, petites vésicules fabriquées artificiellement et constituées de lamelles de phospholipides, séparées les unes des autres par des compartiments aqueux. Dans notre cas, nous avons utilisé une solution de PC afin de préparer des liposomes composés uniquement de ce phospholipide. Suite à l'incubation des vésicules avec rBSPH1, nous avons constaté qu'elle interagissait avec les liposomes de PC, tandis que la trx seule et la BSA ne démontraient aucune interaction (article 2.3, figure 4). Puisque l'interaction avec les lipides relève des domaines Fn2 [222], il est justifié de croire que la protéine recombinante avait adopté sa conformation native, et que les ponts disulfure étaient correctement appariés.

Nous avons aussi vérifié l'interaction de trx-BSPH1 avec la membrane des spermatozoïdes humains. Dans cette étude, la rBSPH1 a montré une forte interaction avec les spermatozoïdes humains, tandis que la trx seule ne s'est pas liée à ces cellules (article 2.3, figure 4). Il semblerait donc que l'interaction avec les spermatozoïdes soit bel et bien assurée par l'intermédiaire de BSPH1 et non par l'étiquette trx. La liaison de la protéine aux spermatozoïdes humains constituait le test préalable nécessaire aux expériences biologiques subséquentes.

Nous avons effectué un dernier test de liaison aux LDL du jaune d'œuf. Cette interaction est d'une importance significative pour la cryopréservation de la semence. Le jaune d'œuf est ajouté en tant qu'agent protecteur aux diluants utilisés lors de la congélation la semence de plusieurs espèces, dont le bovin [223] et l'humain [224]. Chez le bovin, le mécanisme de protection des spermatozoïdes par le jaune d'œuf relève de la séquestration d'une grande partie des protéines BSP de l'éjaculat, empêchant ainsi la stimulation d'un efflux de lipides excessif de la membrane des spermatozoïdes [130]. Nous avons démontré que la protéine rBSPH1 interagit aussi avec les LDL du jaune d'œuf (article 2.3, figure 4); il est donc possible que le mécanisme de protection des spermatozoïdes humains par le jaune d'œuf s'effectue de manière similaire. Par contre, étant donné la quantité beaucoup plus faible de protéines BSP dans le plasma séminal humain comparativement au plasma séminal bovin, d'autres mécanismes entrent probablement en cause.

3.7. Expression de *BSPH1* dans les cellules de mammifères HEK293

Une alternative à l'expression de BSPH1 en bactéries serait de l'exprimer dans des cellules de mammifères, qui possèdent la machinerie nécessaire au bon repliement, l'ajout de modifications post-traductionnelles ainsi que la sécrétion de la protéine dans le milieu de culture. Les raisons principales pour lesquelles cette stratégie n'a pas été adoptée *a priori* relevaient du coût plus élevé ainsi que des rendements beaucoup moins élevés en protéine recombinante obtenus avec des cellules de mammifères comparativement à l'expression en bactéries. Malgré cela, devant tous les obstacles rencontrés, nous avons décidé de développer cette approche parallèlement aux essais en bactéries. Pour ce faire, nous avons cloné la séquence codante de BSPH1 dans le vecteur d'expression pIRESpuro2. Suite à une transfection transitoire de cellules HEK293, nous avons vérifié la présence de rBSPH1 par immunobuvardage (résultats non- présentés). Le poids moléculaire de la protéine détectée dans le milieu de culture était de 32 kDa, une valeur supérieure à celle calculée selon la séquence déduite en acides aminés. La différence de poids moléculaire relève peut-être des modifications post-traductionnelles qui n'ont pas lieu lorsque des protéines sont exprimées en bactéries.

3.8. Détection de BSPH1 native dans le plasma séminal humain et associée aux spermatozoïdes humains

3.8.1. Détection dans le plasma séminal

Étant donné la faible quantité d'antigènes BSP-réactifs dans le plasma séminal humain [128], BSPH1 native n'avait encore jamais été détectée. De ce fait, nous avons tenté d'enrichir en BSPH1 en fractionnant les protéines du plasma séminal par chromatographie d'exclusion de taille. En fractionnant sous conditions acides, nous avons détecté une bande réagissant spécifiquement avec les anticorps anti-BSPH1 dans trois des pics (article 2.4, figure 1). La masse moléculaire de la bande était de 32 kDa, soit la même que celle de la BSPH1 exprimée dans les cellules de mammifères. Puisque la chromatographie par exclusion de taille permet une séparation selon le poids moléculaire, la détection de BSPH1 dans plus d'un pic pourrait indiquer que la protéine se retrouve sous différentes formes oligomériques dans le plasma séminal. Autrement, elle pourrait s'être agrégée dû aux conditions expérimentales, ou encore se retrouver sous forme de complexe avec d'autres protéines. La masse moléculaire de 32 kDa, plus élevée que la masse

attendue, suggère que BSPH1 native subit probablement des modifications post-traductionnelles.

Contrairement à ce qui a été obtenu en conditions acides, la chromatographie par exclusion de taille effectuée en conditions alcalines a donné lieu à la détection de BSPH1 seulement dans le premier pic, correspondant aux protéines de haut poids moléculaire (article 2.4, figure 1). Par contre, le poids moléculaire observé en immunobuvardage était encore une fois de 32 kDa, suggérant que BSPH1 aurait plus tendance à s'agréger en conditions basiques. Ceci n'est pas surprenant puisque le point isoélectrique de BSPH1 est d'environ 8,0. Malgré l'agrégation, les résultats obtenus étaient encourageants, car il s'agissait de la première fois que nous arrivions à détecter la protéine BSPH1 native. Ces résultats ont confirmé que BSPH1 se retrouve bel et bien dans le plasma séminal humain.

Les protéines de la famille des BSP interagissent avec l'héparine ainsi qu'avec les glycosaminoglycanes (GAGs) semblables à l'héparine [123, 225]. Chez l'espèce bovine, les GAGs semblables à l'héparine sont présents dans le tractus génital et jouent un rôle important dans la capacitation des spermatozoïdes [123]. De plus, ce type de GAG est présent dans les fluides du tractus génital femelle chez l'humain [226-228]. Quoique controversé, l'héparine serait potentiellement impliquée dans la capacitation et la réaction acrosomale des spermatozoïdes humains [229, 230]. Par contre, peu d'études ont abordé l'implication possible de l'héparine et des GAGs semblables à l'héparine dans les fonctions des spermatozoïdes humains. Comme chez le bovin, les spermatozoïdes humains semblent posséder des sites de liaison pour les GAGs semblables à l'héparine [231]. L'identité de ces sites de liaison n'a pas encore été déterminée, quoique chez le bovin, il s'agirait des protéines BSP liées à la membrane plasmique des spermatozoïdes [123, 125].

Nous avons procédé à la chromatographie d'affinité des protéines du plasma séminal humain sur une colonne héparine-sépharose. Des protéines immunoréactives ont été détectées dans la fraction de protéines interagissant fortement avec la colonne : celles requérant une grande concentration d'urée afin d'être détachées (article 2.4, figure 1). Ceci suggère que BSPH1 possède une affinité pour l'héparine et pourrait interagir avec les GAGs semblables à l'héparine, quoique cette interaction reste encore à être démontrée. Le poids moléculaire apparent de la protéine détectée était de 32 kDa, confirmant la taille plus élevée de BSPH1 native par rapport à la valeur attendue. Des études plus approfondies seront nécessaires afin de vérifier si l'interaction de BSPH1 avec l'héparine revêt d'une

importance biologique. Toutefois, comme cette protéine est nouvellement identifiée, toute nouvelle information biochimique contribue à sa caractérisation.

3.8.2. Détection dans les extraits spermatiques humains

Les protéines BSP chez les ongulés sont exprimées et sécrétées par les vésicules séminales et sont ajoutées aux spermatozoïdes lors de l'éjaculation, ce qui explique leur concentration élevée dans le plasma séminal [121]. Au contraire, les humains et les rongeurs expriment les BSP dans l'épididyme, impliquant un contact avec les spermatozoïdes lors du transit épидидymaire. Puisque les sécrétions de l'épididyme ne contribuent pas de façon significative à la composition du plasma séminal, il n'est pas étonnant que les protéines BSP ne représentent qu'une proportion infime des protéines totales de ce fluide biologique chez les humains et les rongeurs. De ce fait, les protéines BSP détectées dans la semence humaine proviennent probablement de la membrane des spermatozoïdes. Nous avons donc voulu vérifier s'il était possible d'isoler BSPH1 à partir d'extraits de spermatozoïdes humains. À l'aide des anticorps anti-BSPH1, nous avons couplé une colonne d'immunoaffinité sur laquelle nous avons passé les extraits spermatiques. En éluant à bas pH, et en soumettant les protéines éluées à un immunobuvardage avec les anticorps anti-BSPH1, nous avons réussi à détecter des bandes immunoréactives (article 2.4, figure 1). Encore une fois, une bande était apparente à 32 kDa, mais une seconde bande à environ 30 kDa a aussi été détectée. Quoique pas encore vérifié, il est possible qu'il s'agisse de deux glycoformes de BSPH1.

3.8.3. Détection de BSPH1 dans les microdomaines membranaires *rafts* des spermatozoïdes

Récemment, plusieurs études se sont concentrées sur le rôle des microdomaines membranaires *rafts* dans les fonctions spermatiques et la fécondation. De ce fait, de nombreuses molécules importantes pour la fécondation ont été localisées dans ces domaines, telles que P25b [13], SGG [232] et SPAM1 [90]. Puisque BSPH1 semblait interagir fortement avec la membrane des spermatozoïdes, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait faire partie des *rafts*. Des spermatozoïdes ont été lysés dans un tampon contenant du Triton X-100 froid, et un signal spécifique a été détecté dans la fraction Triton-insoluble au poids moléculaire apparent de 32 kDa (article 2.4, figure 2), suggérant la localisation de BSPH1 dans les *rafts*. Afin de confirmer ce résultat, nous avons procédé à

l'ultracentrifugation du matériel Triton-insoluble dans un gradient discontinu de sucrose; technique largement utilisée et acceptée pour isoler les *rafts*. Dans ces conditions, les *rafts* se retrouvent dans les fractions supérieures du tube suite à l'ultracentrifugation, dû à leur faible densité de flottaison dans le gradient de sucrose. Suite à l'immunobuvardage, nous avons détecté une bande immunoréactive à 32 kDa dans le matériel de faible densité, correspondant aux *rafts* (article 2.4, figure 2). Ce résultat supporte l'hypothèse que BSPH1 serait localisée dans les *rafts*, mais la co-localisation avec des marqueurs connus des *rafts*, tels que le ganglioside GM1 [15, 233], serait nécessaire afin de valider les résultats. Une bande immunoréactive a aussi été détectée dans une des fractions de haute densité, quoiqu'à intensité plus faible que celle observée dans les *rafts* (article 2.4, figure 2). Ceci pourrait signifier qu'une partie du pool de BSPH1 n'est pas associée aux *rafts*. De manière alternative, il se peut que BSPH1 change sa localisation suite à un efflux de lipides de la membrane des spermatozoïdes. L'efflux de lipides membranaires enclenche une réorganisation des microdomaines membranaires [14, 15, 91], ce qui mène au mouvement de certaines protéines des *rafts* vers des régions Triton-solubles de la membrane. Puisque les échantillons de sperme étaient recueillis suite à un contact de 30 à 45 minutes avec le plasma séminal, il se peut que des composantes du plasma séminal aient engendré un efflux de lipides de la membrane des spermatozoïdes, provoquant la ré-organisation des *rafts* et le changement de localisation d'une partie du pool de BSPH1. La localisation des protéines BSP dans les microdomaines *rafts* chez d'autres espèces n'a jamais été étudiée. Un phénomène similaire pourrait donc avoir lieu chez les autres espèces exprimant des membres de la famille des BSP.

Les microdomaines *rafts* sont reconnus comme étant des plateformes pour la signalisation cellulaire [6]. Tel qu'indiqué dans la section 1.4.2, les *rafts* subissent une réorganisation lors de la capacitation, probablement due à la perte de cholestérol membranaire, ce qui active les voies de signalisation menant à la phosphorylation sur tyrosines de protéines spermatiques. L'association de BSPH1 avec les microdomaines *rafts* laisse supposer un rôle potentiel dans le déclenchement des voies de signalisation intracellulaires menant à la capacitation ou à la réaction acrosomale. La co-localisation de nombreuses protéines importantes pour les fonctions spermatiques dans les *rafts* supporte l'idée qu'un groupe de protéines agirait de concert à partir de ces domaines afin de favoriser l'interaction avec l'ovocyte. Les *rafts* permettraient de concentrer ces protéines au

même endroit dans la membrane afin d'assurer une collaboration optimale entre les différents joueurs. En fait, la formation capacitation-dépendante d'un complexe à la surface spermatique, à l'intérieur des *rafts*, et comprenant l'ensemble des protéines impliquées dans la reconnaissance de l'ovocyte pourrait constituer la base moléculaire de l'interaction spermatozoïde-ovocyte [12].

3.9. Poids moléculaire de BSPH1 native

Le poids moléculaire apparent de 32 kDa observé pour BSPH1 native détectée dans le plasma séminal humain ainsi que dans les extraits spermatiques et dans les *rafts* est plus élevé que la valeur attendue selon la séquence en acides aminés. De plus, le poids moléculaire de la protéine sécrétée lors de l'expression dans les cellules HEK293 était aussi de 32 kDa. Ceci pourrait être dû à différentes modifications post-traductionnelles. Lorsqu'on soumet la séquence de BSPH1 à une analyse avec le logiciel de prédiction NetNGlyc 1.0, nous voyons qu'il existe un site potentiel de N-glycosylation. Une façon de vérifier si BSPH1 est effectivement glycosylée serait d'incuber la protéine avec l'enzyme PNGase F, qui clive entre l'oligosaccharide et l'asparagine. Il serait aussi possible de recourir à des lectines marquées, ou encore à des colonnes d'affinité multi-lectines [234]. Selon le serveur NetPhos 2.0, la séquence de BSPH1 contient quatre sites potentiels de phosphorylation sur sérines, deux sur thréonines et deux sur tyrosines. Afin de déterminer si BSPH1 est réellement phosphorylée, il suffirait de soumettre la protéine à un immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre ces modifications. De manière alternative, un traitement à la phosphatase alcaline pourrait faire diminuer le poids moléculaire de la protéine suite à la déphosphorylation. Une autre façon de confirmer la présence de résidus phosphorylés serait une analyse par spectrométrie de masse [235]. La phosphorylation à elle seule ne modifie pas le poids moléculaire d'une protéine de façon à expliquer l'écart observé. Il serait possible que l'ensemble de plusieurs modifications post-traductionnelles soit à l'origine de la masse moléculaire observée. Plusieurs protéines retrouvées dans les microdomaines *rafts* ont une ancre GPI par laquelle elles s'attachent à la membrane [236]. Par contre, il serait peu probable que BSPH1 ait subi une telle modification post-traductionnelle, puisqu'elle ne possède pas une séquence répondant à la règle du $w, w + 2$ pour la prédiction des motifs d'attachement des ancres GPI [237]. De plus, l'outil de prédiction informatique « big-PI Predictor » n'indique pas la présence de GPI. Malgré cela, les signaux d'ancrage par le GPI sont assez faiblement définis par les données

expérimentales [238], alors le traitement à la phospholipase C serait nécessaire afin d'éliminer cette hypothèse.

De manière alternative, BSPH1 pourrait connaître une migration anormale, possiblement dû à la formation de dimères ou de multimères. La séquence en acides aminés de BSPH1 déduite à partir de la séquence en ADNc prédit la présence d'une cystéine comme acide aminé N-terminal. Cette cystéine ne participerait pas à la formation des ponts disulfure intramoléculaires qui constituent les domaines Fn2. Ce résidu serait donc un candidat pour la formation de ponts disulfure intermoléculaires. Quoique l'électrophorèse en conditions réductrices permettrait normalement de réduire les ponts disulfure, il existe quelques protéines qui forment des dimères par ponts disulfure intermoléculaires qui sont extrêmement résistants à la réduction par les agents réducteurs [239, 240].

3.10. Étude du rôle de BSPH1 dans les fonctions spermatiques

La participation des protéines BSP bovines et porcines dans la capacitation des spermatozoïdes nous a incités à vérifier si la protéine BSPH1 pouvait jouer un rôle dans la capacitation des spermatozoïdes humains. La disponibilité de la protéine recombinante trx-BSPH1 nous a permis de tester son effet sur cette fonction spermatique. Une manière acceptée de mesurer la capacitation des spermatozoïdes suite à un traitement quelconque est de promouvoir la réaction de l'acrosome à l'aide d'agonistes physiologiques ou non et de mesurer le pourcentage de cellules ayant effectué l'exocytose de leur acrosome [79]. Puisque seuls les spermatozoïdes capités sont en mesure de subir la réaction de l'acrosome, cette méthode permet une mesure indirecte de la capacitation.

Tel qu'indiqué dans la section 1.7.2, la mesure de la réaction acrosomale peut se faire à l'aide de lectines fluorescentes qui se lient à des composantes acrosomales ou à la membrane acrosomale interne. Le pourcentage de cellules ayant subi la réaction acrosomale est généralement évalué au microscope, en comptant entre 100 et 500 cellules par traitement expérimental. Cette méthode, bien qu'acceptable, présente certaines limites, surtout au niveau du faible nombre de cellules pouvant être analysées et au niveau du biais de l'examineur. Certainement, le biais peut être diminué en effectuant les comptes en simple insu, mais le problème du faible nombre de cellules évaluées demeure.

Tel que décrit dans la section 1.7.2, la cytométrie en flux est une technique qui présente de nombreux avantages. Nous avons utilisé cette approche afin d'évaluer

l'intégrité acrosomale des spermatozoïdes humains suite à différents traitements. Puisque la cytométrie en flux n'est pas encore couramment utilisée comme méthode d'analyse des fonctions spermatiques, une période de rigoureuse mise au point s'est avérée nécessaire avant d'être en mesure de distinguer la population de cellules avec un acrosome réagi versus un acrosome-intact. D'abord, nous avons inclus le marqueur de viabilité iodure de propidium, lequel marque seulement les cellules mortes. De cette façon, nous nous sommes assurés d'évaluer l'intégrité acrosomale seulement des spermatozoïdes vivants. Puisque la réaction acrosomale implique la relâche du contenu de l'acrosome des spermatozoïdes et que la lectine fluorescente utilisée, la PSA-FITC, se lie à des sucres de ce contenu acrosomal (α -mannose et α -galactose), les spermatozoïdes ayant subi l'exocytose de leur acrosome formaient une population distincte de fluorescence plus élevée [177] (voir Figure 13). Cette population se retrouve à la droite des spermatozoïdes ayant l'acrosome intact. Avant de réussir à définir ces deux populations cellulaires, nous devions trouver le nombre idéal de spermatozoïdes à utiliser et les meilleures conditions d'incubation, incluant le choix du milieu de culture, les concentrations des agents capacitants, les concentrations des protéines d'intérêt, les témoins à utiliser et le type d'agoniste à utiliser pour induire la réaction acrosomale. L'absence de protocoles établis a entraîné un exercice d'essais et erreur basé sur les informations présentes dans la littérature quant à d'autres types cellulaires ainsi que sur les spermatozoïdes humains et ceux d'autres espèces. Quelques publications plus anciennes avaient recours à la fixation des spermatozoïdes suite au marquage par l'iodure de propidium [178, 241]. Ceci avait pour effet de faire ressortir le marqueur de viabilité hors des cellules, donnant l'illusion d'une population vivante. Nous n'avons pas fixé les cellules car nous voulions nous assurer de mesurer la réaction acrosomale seulement chez les spermatozoïdes vivants.

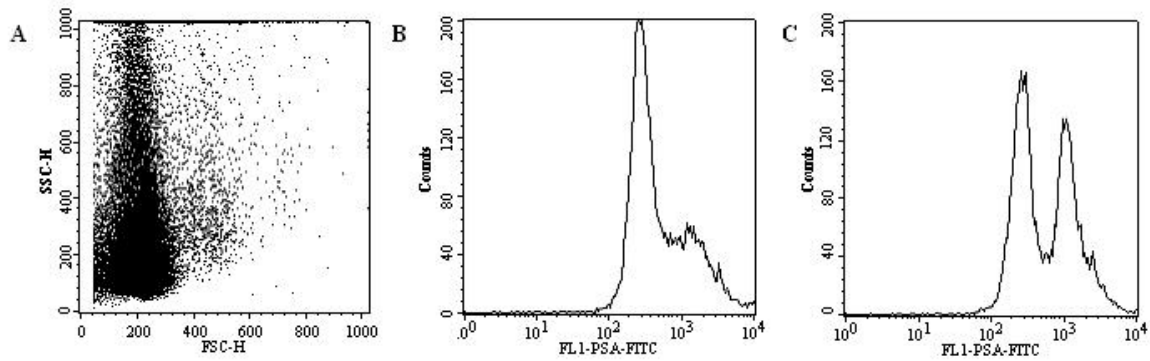


Figure 13. **Profil typique de l'analyse des spermatozoïdes humains par FACS.** (A) Nuage de points FSC/SSC montrant la région en forme de flamme caractéristique des spermatozoïdes. Histogrammes de la fluorescence du PSA-FITC lié à des spermatozoïdes incubés en milieu non-capacitant (B) et en milieu capacitant (C).

Suite à l'optimisation, nous avons effectué les essais de capacitation en présence et en absence de différentes concentrations de trx-BSPH1 et d'anticorps anti-BSPH1, ainsi qu'avec trx seule ou avec les IgG du sérum pré-immun, comme témoins. Une stimulation modeste, quoique significative, de la capacitation a été observée avec la concentration plus faible en BSPH1, mais les concentrations plus élevées n'ont pas montré d'effet. Pour leur part, les anticorps anti-BSPH1 n'ont pas eu d'effet significatif sur la capacitation (article 2.4, figure 3). Les pourcentages de réaction acrosomale mesurés par FACS étaient sensiblement les mêmes dans toutes les conditions expérimentales. Par contre, l'apparition d'une deuxième population de cellules de fluorescence plus élevée suite à l'induction de la réaction de l'acrosome montrait que la méthode de détection par FACS fonctionnait. Nous avons aussi évalué la motilité des spermatozoïdes par microscopie et la viabilité par FACS, et n'avons noté aucun effet des traitements sur ces variables (article 2.4, figure 3).

L'absence de stimulation de la capacitation par la protéine de fusion trx-BSPH1 n'implique pas nécessairement que BSPH1 ne joue aucun rôle dans la capacitation. Nous avons déterminé que le poids moléculaire de BSPH1 native est d'environ 32 kDa, impliquant la présence probable de modifications post-traductionnelles. Puisque la protéine trx-BSPH1 était produite en bactéries, elle ne possède pas ces modifications, qui pourraient être essentielles à sa fonction. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de reprendre l'expression de rBSPH1 dans les cellules de mammifères et utiliser les protéines purifiées du milieu de culture pour les essais de capacitation. De manière alternative, les protéines BSP humaine et murines pourraient jouer un rôle différent de celui qui a été

démontré chez les ongulés. Un rôle dans la reconnaissance de l'ovocyte ou dans l'interaction avec celui-ci serait possible. Cette possibilité reste à être démontrée par des essais d'interaction entre les spermatozoïdes humains ou murins et des ovocytes de la même espèce, en présence/absence de protéines recombinantes ou d'anticorps.

La participation des protéines BSP bovines ou porcines dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte n'a jamais été étudiée, alors il n'est pas impossible que ces protéines jouent plusieurs rôles chez ces espèces. En fait, chez l'espèce bovine, les BSP participent à la formation du réservoir oviductal de spermatozoïdes [106, 107]. De plus, d'autres groupes ont proposé des rôles supplémentaires pour les BSP dans la stimulation de la Ca^{2+} -ATPase des spermatozoïdes bovins [242], dans l'inhibition de la protéine kinase C et de la protéine tyrosine kinase bovines [243] ainsi que dans le contrôle du volume cellulaire des spermatozoïdes bovins pendant la maturation [131]. Par contre, ces résultats n'ont jamais été confirmés par d'autres groupes. Néanmoins, il semblerait que les protéines BSP puissent contribuer à plusieurs étapes de la maturation des spermatozoïdes.

4. CONCLUSIONS

Nos études ont démontré que les séquences conservées des domaines Fn2 des protéines BSP sont distinctes de celles des autres protéines possédant ces domaines, et peuvent être utilisées afin d'identifier des nouveaux membres de cette super-famille. Trois nouveaux gènes bovins, ainsi que des séquences d'ADN apparentées aux BSP dans les génomes de chimpanzé, de souris, de rat, de chien, de cheval et d'humain ont été identifiés de cette manière. De plus, la famille des BSP a été subdivisée en trois sous-familles nommées *BSP*, *BSPH1* et *BSPH2*. L'expression des BSP murines et humaines a été confirmée, et serait restreinte à l'épididyme, contrairement aux ongulés où les BSP sont sécrétées par les vésicules séminales. Il s'agissait de la première démonstration de l'expression d'homologues des BSP chez ces espèces.

Étant donné l'expression épидидymaire qui résulte en une faible quantité de ces protéines dans le plasma séminal, il n'était pas envisageable de les isoler de ce fluide biologique afin d'étudier leurs fonctions dans la maturation des spermatozoïdes et la fécondation. Ayant cloné l'ADN complémentaire des gènes murins et humains des BSP, nous avons procédé à la production des protéines recombinantes. Malgré de nombreux obstacles à l'expression et la purification, notamment l'obtention de protéines solubles, nous avons réussi à produire BSPH1 et BspH1 en fusion avec la thiorédoxine sous forme soluble dans une souche de *E. coli* possédant un cytoplasme oxydatif. De cette façon, nous avons purifié les protéines des lysats bactériens à l'aide d'une stratégie de purification en deux étapes, comprenant une première chromatographie sur colonne de nickel et une seconde sur colonne S-bind, profitant des deux étiquettes supplémentaires ajoutées grâce au vecteur d'expression choisi. Puisque cette stratégie fonctionnait pour les protéines humaine et murine, et a aussi été utilisée pour exprimer la protéine BSP5 bovine, elle pourrait être applicable à toutes les protéines de la famille des BSP, et possiblement aux autres protéines possédant des domaines Fn2.

La production d'anticorps polyclonaux dirigés contre BSPH1 nous a permis de détecter spécifiquement cette protéine dans le plasma séminal humain ainsi que dans les extraits spermatiques, ce qui constituait la première détection de la protéine native. De plus, nous avons obtenu des données solides indiquant que BSPH1 se localiserait dans les microdomaines membranaires *rafts*, résistants aux détergents, impliquant une participation

possible dans la signalisation intracellulaire qui a lieu lors de la capacitation des spermatozoïdes. De manière alternative, BSPH1 pourrait faire partie d'un complexe de protéines localisé dans les microdomaines *rafts* qui serait important pour l'interaction avec l'ovocyte. Nos résultats indiquent que BSPH1 native posséderait un poids moléculaire d'environ 32 kDa, qui est supérieur au poids moléculaire attendu de 14 kDa, suggérant la présence de modifications post-traductionnelles ou de migration anormale.

Un essai de capacitation des spermatozoïdes humains mesurable par cytométrie en flux a été optimisé dans cette étude. La capacitation était mesurée de façon indirecte suite à l'induction de la réaction acrosomale et le marquage du contenu acrosomal par une lectine fluorescente. L'incubation de spermatozoïdes humains éjaculés avec rBSPH1 ou avec les anticorps anti-BSPH1 n'a pas permis de déceler d'effets prononcés sur leur capacitation *in vitro*. Ceci n'exclut pas la possibilité que BSPH1 puisse exercer un rôle *in vivo*, mais que d'autres facteurs seraient nécessaires à son action. En revanche, il est possible que les modifications post-traductionnelles de BSPH1 soient nécessaires à son rôle dans la capacitation, alors l'utilisation de la protéine recombinante exprimée en bactéries ne serait pas appropriée pour ces expériences. La méthode d'analyse de la capacitation par cytométrie en flux, qui permet d'analyser des milliers de spermatozoïdes en très peu de temps, pourra être utilisée dans le futur pour élucider le rôle des protéines BSP ainsi que d'autres protéines dans les fonctions spermatiques.

Une meilleure compréhension des mécanismes de maturation des spermatozoïdes, autant dans l'épididyme que dans le tractus génital femelle, permettra de développer des tests diagnostiques plus performants pour l'infertilité masculine ainsi qu'améliorer les techniques de reproduction assistée. De plus, si nous pouvons identifier les protéines spermatiques cruciales pour la fécondation, ces protéines pourront devenir des cibles pour le développement de contraceptifs masculins. En conclusion, ces études ont une importance autant pour favoriser la fécondation que pour l'inhiber.

5. PERSPECTIVES

Il est évident que de l'étude du rôle des protéines BSP dans la fécondation est loin d'être terminée. Les résultats présentés dans cette thèse ouvrent la porte sur de nombreuses avenues pour les recherches futures. D'abord, il est connu que les gènes exprimés dans l'épididyme sont presque tous sous contrôle androgénique. Il serait donc intéressant de vérifier si *BSPHI* subit une régulation par les androgènes. Des difficultés évidentes limitent l'étendue possible de cette étude chez l'humain, pouvant se restreindre qu'à des études avec des cellules épидидymaires en culture; ces dernières étant difficiles à cultiver et non disponibles commercialement [244]. Par contre, le gène murin *Bsph1* étant orthologue à *BSPHI*, les résultats obtenus pour *Bsph1* chez la souris pourraient se transposer à l'humain. Des études utilisant des cellules de l'épithélium épидидymaire de souris et de rat ont déjà été publiées [245, 246]. Afin de déterminer si l'expression du gène *Crisp4* était régulé par les androgènes, une étude récente a procédé à l'analyse de l'expression de ce gène suite à la gonadectomie de souris, et suivant une thérapie de remplacement de la testostérone [247]. Leurs résultats démontraient l'existence d'une régulation androgénique importante. Ce même type d'expérimentation pourrait être envisagé pour étudier la régulation de l'expression de *Bsph1*. Une bonne indication d'une potentielle régulation de l'expression de *BSPHI* et de *Bsph1* par les androgènes serait la présence d'éléments de réponse aux androgènes dans le promoteur de ces gènes, comme il a déjà été démontré pour les gènes de la famille CRISP [248, 249]. Le clonage et l'étude des promoteurs de *BSPHI* et *Bsph1* apporterait beaucoup d'informations supplémentaires et utiles pour cerner les fonctions biologiques de ces gènes.

Le modèle murin présente d'autres avantages par rapport au modèle humain quant à l'élucidation du rôle des BSP épидидymaires dans la maturation des spermatozoïdes. Par exemple, il est possible d'obtenir des spermatozoïdes épидидymaires murins, qui ne sont jamais entré en contact avec le plasma séminal, et de vérifier l'effet de la protéine *Bsph1* ou des anticorps anti-*Bsph1* sur les fonctions spermatiques. Encore plus important, ce modèle nous permettra de créer des souris « knockout », n'exprimant pas soit *Bsph1*, soit *Bsph2a*, soient les deux. Des études sur la fertilité de ces animaux ainsi que sur les fonctions de leurs spermatozoïdes contribueront de manière inestimable aux connaissances sur le rôle des protéines BSP dans la fertilité.

Tel qu'indiqué dans les sections 3.2 et 3.10, il est possible que BSPH1 joue un rôle différent des protéines BSP chez les ongulés. Il serait intéressant de vérifier si la protéine rBSPH1 ou les anticorps anti-BSPH1 ont un effet sur l'interaction entre les spermatozoïdes et l'ovocyte. Des expériences d'interaction avec les ovocytes humains seront effectuées dès que le matériel humain sera disponible.

Cette étude montrait, pour la première fois, une détection de BSPH1 native dans le plasma séminal et liée aux spermatozoïdes humains. Beaucoup de travail reste à faire au niveau de sa caractérisation. Lorsqu'une quantité suffisante de protéine native sera isolée, il serait important de soumettre cette protéine à une analyse protéomique afin de confirmer sa séquence et la présence ou non de modifications post-traductionnelles. De plus, il serait intéressant de voir s'il existe des différences entre les protéines retrouvées dans les *rafts* et celles du plasma séminal. Puisque la protéine BSPH1 native semble être la cible de modifications post-traductionnelles, une avenue à explorer dans un avenir rapproché serait de reprendre la purification de rBSPH1 exprimée dans les cellules de mammifères et de répéter les expériences de capacitation avec ces protéines. De cette manière, la protéine aurait subi toutes les modifications post-traductionnelles potentiellement nécessaires à sa fonction. Étant donné que la méthode de cytométrie en flux est déjà mise au point, ces expériences pourraient se faire rapidement une fois la protéine recombinante purifiée.

La cytométrie en flux pourrait aussi être utilisée afin de détecter BSPH1 native sur la membrane des spermatozoïdes humains. Il s'agirait soit de procéder à un marquage indirect à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, ou encore de coupler l'anticorps directement à une molécule fluorescente afin de procéder au marquage direct. En plus de fournir une méthode supplémentaire pour détecter BSPH1 native, la cytométrie en flux permettrait de comparer les quantités de BSPH1 liées à la membrane de spermatozoïdes provenant d'hommes infertiles avec les quantités présentes chez les hommes fertiles.

Dans le même ordre d'idées, si nous démontrons un rôle important pour BSPH1 dans la fertilité humaine, il serait possible de procéder au séquençage du gène encodant BSPH1 chez des hommes infertiles et de vérifier s'il existe des mutations pouvant affecter la séquence en acides aminés et possiblement la fonction de la protéine.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Eddy EM. The spermatozoon. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol. 1. New York: Raven Press; 1988: 27-68.
2. Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM, O'Brien DA. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 16501-16506.
3. Simons K, van Meer G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 1988; 27: 6197-6202.
4. Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 2006; 47: 1597-1598.
5. Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14: 111-136.
6. Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2000; 275: 17221-17224.
7. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387: 569-572.
8. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 31-39.
9. Foster LJ, De Hoog CL, Mann M. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5813-5818.
10. Gidwani A, Holowka D, Baird B. Fluorescence anisotropy measurements of lipid order in plasma membranes and lipid rafts from RBL-2H3 mast cells. *Biochemistry* 2001; 40: 12422-12429.
11. Travis AJ, Merdiushev T, Vargas LA, Jones BH, Purdon MA, Nipper RW, Galatioto J, Moss SB, Hunnicutt GR, Kopf GS. Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Dev Biol* 2001; 240: 599-610.
12. Nixon B, Bielanowicz A, McLaughlin EA, Tanphaichitr N, Ensslin MA, Aitken RJ. Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa. *J Cell Physiol* 2009; 218: 122-134.
13. Girouard J, Frenette G, Sullivan R. Seminal plasma proteins regulate the association of lipids and proteins within detergent-resistant membrane domains of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 2008; 78: 921-931.
14. Shadan S, James PS, Howes EA, Jones R. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; 71: 253-265.
15. Cross NL. Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol Reprod* 2004; 71: 1367-1373.

16. Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35: 1-10.
17. Cooper TG. Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation. *Adv Exp Med Biol* 1995; 377: 87-101.
18. Jones R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1998; 53: 73-84.
19. Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1988: 999-1080.
20. Cornwall GA, Lareyre J, Matusik P, Hinton BT, Orgebin-Crist MC. Gene expression and epididymal function. In: Robaire B, Hinton BT (eds.), *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York: Kluwer Academic Press/Plenum Press Publishers; 2002: 169-199.
21. Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS, Turner TT. The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol Reprod* 2005; 73: 404-413.
22. Thimon V, Koukoui O, Calvo E, Sullivan R. Region-specific gene expression profiling along the human epididymis. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 691-704.
23. Jervis KM, Robaire B. Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol Reprod* 2001; 65: 696-703.
24. Amann RP, Howards SS. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *J Urol* 1980; 124: 211-215.
25. Robaire B, Viger RS. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 1995; 52: 226-236.
26. Cameo MS, Blaquier JA. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J Endocrinol* 1976; 69: 47-55.
27. Kohane AC, Cameo MS, Pineiro L, Garberi JC, Blaquier JA. Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol Reprod* 1980; 23: 181-187.
28. Kohane AC, Gonzalez Echeverria FM, Pineiro L, Blaquier JA. Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol Reprod* 1980; 23: 737-742.
29. Rochwerger L, Cuasnicu PS. Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 34-41.
30. Bedford JM. Mechanisms of conception: the maturation and interaction of mammalian gametes. *Mead Johnson Symp Perinat Dev Med* 1979: 7-17.
31. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol. 2. New York: Raven Press; 1994: 189-317.
32. Mizuki N, Kasahara M. Mouse submandibular glands express an androgen-regulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 89: 25-32.

33. Cohen DJ, Ellerman DA, Cuasnicu PS. Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biol Reprod* 2000; 63: 462-468.
34. Cohen DJ, Ellerman DA, Busso D, Morgenfeld MM, Piazza AD, Hayashi M, Young ET, Kasahara M, Cuasnicu PS. Evidence that human epididymal protein ARP plays a role in gamete fusion through complementary sites on the surface of the human egg. *Biol Reprod* 2001; 65: 1000-1005.
35. Haendler B, Kratzschmar J, Theuring F, Schleuning WD. Transcripts for cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. *Endocrinology* 1993; 133: 192-198.
36. Sullivan R, Robitaille G. Heterogeneity of epididymal spermatozoa of the hamster. *Gamete Res* 1989; 24: 229-236.
37. Boue F, Berube B, De Lamirande E, Gagnon C, Sullivan R. Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein. *Biol Reprod* 1994; 51: 577-587.
38. Legare C, Gaudreault C, St-Jacques S, Sullivan R. P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis. *Endocrinology* 1999; 140: 3318-3327.
39. Boue F, Blais J, Sullivan R. Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1996; 54: 1009-1017.
40. Robitaille G, Sullivan R, Bleau G. Identification of epididymal proteins associated with hamster sperm. *J Exp Zool* 1991; 258: 69-74.
41. Parent S, Lefievre L, Brindle Y, Sullivan R. Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. *Molecular Reproduction and Development* 1999; 52: 57-65.
42. Carmona E, Weerachayanukul W, Soboloff T, Fluharty AL, White D, Promdee L, Ekker M, Berger T, Buhr M, Tanphaichitr N. Arylsulfatase a is present on the pig sperm surface and is involved in sperm-zona pellucida binding. *Dev Biol* 2002; 247: 182-196.
43. Tantibhedhyangkul J, Weerachayanukul W, Carmona E, Xu H, Anupriwan A, Michaud D, Tanphaichitr N. Role of sperm surface arylsulfatase A in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biol Reprod* 2002; 67: 212-219.
44. Carmona E, Weerachayanukul W, Xu H, Fluharty A, Anupriwan A, Shoushtarian A, Chakrabandhu K, Tanphaichitr N. Binding of arylsulfatase A to mouse sperm inhibits gamete interaction and induces the acrosome reaction. *Biol Reprod* 2002; 66: 1820-1827.
45. Weerachayanukul W, Rattanachaiyanont M, Carmona E, Furimsky A, Mai A, Shoushtarian A, Sirichotiyakul S, Ballakier H, Leader A, Tanphaichitr N. Sulfogalactosylglycerolipid is involved in human gamete interaction. *Mol Reprod Dev* 2001; 60: 569-578.

46. Myles DG, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* 1997; 56: 320-327.
47. Martin-DeLeon PA. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250: 114-121.
48. Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* 1994; 125: 1157-1163.
49. Vandervoort CA, Cherr GN, Overstreet JW. Hyaluronic acid enhances the zona pellucida-induced acrosome reaction of macaque sperm. *J Androl* 1997; 18: 1-5.
50. Jones MH, Davey PM, Aplin H, Affara NA. Expression analysis, genomic structure, and mapping to 7q31 of the human sperm adhesion molecule gene SPAM1. *Genomics* 1995; 29: 796-800.
51. Martin-DeLeon PA, Zhang H, Morales CR, Zhao Y, Rulon M, Barnoski BL, Chen H, Galileo DS. Spam1-associated transmission ratio distortion in mice: elucidating the mechanism. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 32.
52. Evans EA, Zhang H, Martin-DeLeon PA. SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: utilizing laser microdissection/RT-PCR. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 54.
53. Zhang H, Martin-DeLeon PA. Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J Androl* 2003; 24: 51-58.
54. Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 1998; 53: 119-136.
55. Kirchhoff C, Hale G. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 177-184.
56. Legare C, Berube B, Boue F, Lefievre L, Morales CR, El-Alfy M, Sullivan R. Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 225-233.
57. Aumuller G, Renneberg H, Schiemann PJ, Wilhelm B, Seitz J, Konrad L, Wennemuth G. The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. *Adv Exp Med Biol* 1997; 424: 193-219.
58. Hermo L, Jacks D. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 394-410.
59. Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux JM, Vericel E, Grizard G, Vernet P, Drevet JR. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod* 2006; 74: 1104-1113.
60. Eickhoff R, Wilhelm B, Renneberg H, Wennemuth G, Bacher M, Linder D, Bucala R, Seitz J, Meinhardt A. Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol Med* 2001; 7: 27-35.

61. Frenette G, Sullivan R. Protasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol Reprod Dev* 2001; 59: 115-121.
62. Thimon V, Frenette G, Saez F, Thabet M, Sullivan R. Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum Reprod* 2008; 23: 1698-1707.
63. Griffiths GS, Galileo DS, Reese K, Martin-Deleon PA. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Mol Reprod Dev* 2008; 75: 1627-1636.
64. Frenette G, Lessard C, Madore E, Fortier MA, Sullivan R. Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. *Biol Reprod* 2003; 69: 1586-1592.
65. Frenette G, Lessard C, Sullivan R. Polyol pathway along the bovine epididymis. *Mol Reprod Dev* 2004; 69: 448-456.
66. Frenette G, Thabet M, Sullivan R. Polyol pathway in human epididymis and semen. *J Androl* 2006; 27: 233-239.
67. Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 2007; 9: 483-491.
68. Rejraji H, Vernet P, Drevet JR. GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 96-103.
69. Schwaab V, Lareyre JJ, Vernet P, Pons E, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR. Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1998; 53: 157-162.
70. Girouard J, Frenette G, Sullivan R. Compartmentalization of Proteins in Epididymosomes Coordinates the Association of Epididymal Proteins with the Different Functional Structures of Bovine Spermatozoa. *Biol Reprod* 2009.
71. Bancroft J. Human sexual behaviour. In: Austin CR, Short RV (eds.), *Reproduction in Mammals: Human Sexual Behaviour*, vol. 8. Cambridge: Cambridge University Press; 1980: 34-67.
72. Bedford JM. The status and the state of the human epididymis. *Hum Reprod* 1994; 9: 2187-2199.
73. Harper MJK. Gamete and zygote transport. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol. 1. New York: Raven Press; 1988: 103-134.
74. Tauber PF, Zaneveld LJD. Coagulation and liquefaction of human semen. In: Hafez ESE (ed.) *Human Semen and Fertility Regulation in Men*. St. Louis: C.V. Mosby; 1976: 153-166.
75. Lundquist F. Studies on the biochemistry of human semen; the viscosimetric determination of hyaluronidase. *Acta Physiol Scand* 1949; 17: 44-54.
76. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol* 2006; 7: R40.

77. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168: 697-698.
78. Austin CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 1951; 4: 581-596.
79. de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 175-194.
80. Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998; 59: 1-6.
81. Davis BK. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 7560-7564.
82. Dow MP, Bavister BD. Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation in vitro. *Gamete Res* 1989; 23: 171-180.
83. Abou-haila A, Tulsiani DR. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys* 2009; 485: 72-81.
84. Zarintash RJ, Cross NL. Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biol Reprod* 1996; 55: 19-24.
85. Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 1985; 822: 267-287.
86. Belton RJ, Jr., Adams NL, Foltz KR. Isolation and characterization of sea urchin egg lipid rafts and their possible function during fertilization. *Mol Reprod Dev* 2001; 59: 294-305.
87. Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* 1999; 274: 3235-3242.
88. Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 1999; 214: 429-443.
89. Ward CR, Kopf GS. Molecular events mediating sperm activation. *Dev Biol* 1993; 158: 9-34.
90. Sleight SB, Miranda PV, Plaskett NW, Maier B, Lysiak J, Scrabble H, Herr JC, Visconti PE. Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biol Reprod* 2005; 73: 721-729.
91. Thaler CD, Thomas M, Ramalie JR. Reorganization of mouse sperm lipid rafts by capacitation. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 1541-1549.

92. Rodriguez-Martinez H, Ekstedt E, Einarsson S. Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int J Androl* 1990; 13: 238-243.
93. Vishwakarma P. The pH and bicarbonate-ion content of the oviduct and uterine fluids. *Fertil Steril* 1962; 13: 481-485.
94. Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, Moss SB. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 2005; 9: 249-259.
95. 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.
96. Vadnais ML, Galantino-Homer HL, Althouse GC. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch Androl* 2007; 53: 109-123.
97. Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* 1991; 12: 323-330.
98. Handrow RR, First NL, Parrish JJ. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool* 1989; 252: 174-182.
99. Tardif S, Dube C, Bailey JL. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* 2003; 68: 207-213.
100. Florman HM, Corron ME, Kim TD, Babcock DF. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 1992; 152: 304-314.
101. Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF. CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14864-14868.
102. Suarez SS. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 647-657.
103. Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14869-14874.
104. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 23-37.
105. Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 102-107.
106. 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.

107. Gwathmey TM, Ignatz GG, Suarez SS. 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.
108. Ignatz GG, Cho MY, Suarez SS. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biol Reprod* 2007; 77: 906-913.
109. Pacey AA, Hill CJ, Scudamore IW, Warren MA, Barratt CL, Cooke ID. The interaction in vitro of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (fallopian) tube. *Hum Reprod* 1995; 10: 360-366.
110. Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. *Biol Reprod* 2009; 80: 394-397.
111. Manjunath P, Therien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 109-119.
112. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 1992; 267: 10149-10155.
113. Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50: 27-37.
114. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: Chretien M, McKerns K, W. (eds.), *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems*. New York: Plenum Press; 1988: 259-273.
115. Kemme M, Scheit KH. Cloning and sequence analysis of a cDNA from seminal vesicle tissue encoding the precursor of the major protein of bull semen. *DNA* 1988; 7: 595-599.
116. Salois D, Menard M, Paquette Y, Manjunath P. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. *Biol Reprod* 1999; 61: 288-297.
117. 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.
118. 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.
119. Desnoyers L, Therien I, Manjunath P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 425-435.
120. 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.

121. 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.
122. Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 1989; 264: 16853-16857.
123. Therien 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.
124. 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.
125. Therien I, Bleau G, Manjunath P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 1995; 52: 1372-1379.
126. Therien I, Soubeyrand S, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod* 1997; 57: 1080-1088.
127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. Bergeron A, Crete 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.
131. Sahin E, Petrunkina AM, Ekhlasi-Hundrieser M, Hettel C, Waberski D, Harrison RA, Topfer-Petersen E. Fibronectin type II-module proteins in the bovine genital tract and their putative role in cell volume control during sperm maturation. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21: 479-488.
132. Drevius LO. Water content, specific gravity and concentrations of electrolytes in bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1972; 28: 15-28.
133. Petrunkina AM, Harrison RA, Tsoлова M, Jebe E, Topfer-Petersen E. Signalling pathways involved in the control of sperm cell volume. *Reproduction* 2007; 133: 61-73.
134. Williams M, Barratt CL, Hill CJ, Warren MA, Dunphy B, Cooke ID. Recovery of artificially inseminated spermatozoa from the fallopian tubes of a woman undergoing total abdominal hysterectomy. *Hum Reprod* 1992; 7: 506-509.

135. Williams M, Hill CJ, Scudamore I, Dunphy B, Cooke ID, Barratt CL. Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation. *Hum Reprod* 1993; 8: 2019-2026.
136. Villanueva-Diaz C, Vadillo-Ortega F, Kably-Ambe A, Diaz-Perez MA, Krivitzky SK. Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertil Steril* 1990; 54: 1180-1182.
137. Ralt D, Goldenberg M, Fetterolf P, Thompson D, Dor J, Mashiach S, Garbers DL, Eisenbach M. Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2840-2844.
138. Sun F, Bahat A, Gakamsky A, Girsh E, Katz N, Giojalas LC, Tur-Kaspa I, Eisenbach M. Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum Reprod* 2005; 20: 761-767.
139. Eisenbach M, Giojalas LC. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 276-285.
140. Kaupp UB, Kashikar ND, Weyand I. Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu Rev Physiol* 2008; 70: 93-117.
141. Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CL. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod* 2004; 19: 1580-1586.
142. Bleil JD, Wassarman PM. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 1980; 20: 873-882.
143. Bleil JD, Wassarman PM. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 1983; 95: 317-324.
144. Bleil JD, Wassarman PM. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 1980; 76: 185-202.
145. Bleil JD, Beall CF, Wassarman PM. Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Dev Biol* 1981; 86: 189-197.
146. Greve JM, Wassarman PM. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol* 1985; 181: 253-264.
147. Green DP. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod* 1997; 2: 147-156.
148. Wassarman PM. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 1999; 96: 175-183.
149. Liu C, Litscher ES, Mortillo S, Sakai Y, Kinloch RA, Stewart CL, Wassarman PM. Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5431-5436.

150. Rankin T, Familiari M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J. Mice homozygous for an insertional mutation in the *Zp3* gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 1996; 122: 2903-2910.
151. Cohen DJ, Busso D, Da Ros V, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, Cuasnicu PS. Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. *Int J Dev Biol* 2008; 52: 737-742.
152. Shur BD, Hall NG. A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* 1982; 95: 574-579.
153. Nixon B, Lu Q, Wassler MJ, Foote CI, Ensslin MA, Shur BD. Galactosyltransferase function during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* 2001; 168: 46-57.
154. Lu Q, Hasty P, Shur BD. Targeted mutation in beta1,4-galactosyltransferase leads to pituitary insufficiency and neonatal lethality. *Dev Biol* 1997; 181: 257-267.
155. Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lullmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D'Hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C, Gieselmann V. Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 14821-14826.
156. Nixon B, Aitken RJ, McLaughlin EA. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 1805-1823.
157. Tanphaichitr N, Carmona E, Bou Khalil M, Xu H, Berger T, Gerton GL. New insights into sperm-zona pellucida interaction: involvement of sperm lipid rafts. *Front Biosci* 2007; 12: 1748-1766.
158. Boerke A, Tsai PS, Garcia-Gil N, Brewis IA, Gadella BM. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology* 2008; 70: 1188-1196.
159. Kopf GS, Gerton GL. The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: Wassarman PM (ed.) *Elements of Mammalian Fertilization*. Boca Raton: CRC Press; 1991: 153-203.
160. Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C, O'Toole CM. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* 1998; 59: 12-16.
161. Tomes CN. Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 275-291.
162. Harper CV, Cummerson JA, White MR, Publicover SJ, Johnson PM. Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J Cell Sci* 2008; 121: 2130-2135.
163. Tulsiani DR, Yoshida-Komiya H, Araki Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod* 1997; 57: 487-494.
164. Tulsiani DR, Abou-Haila A. Mammalian sperm molecules that are potentially important in interaction with female genital tract and egg vestments. *Zygote* 2001; 9: 51-69.

165. Roldan ER, Fraser LR. Protein Kinase C and Exocytosis in Mammalian Spermatozoa. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9: 296-297.
166. Grippo AA, Anderson SH, Chapman DA, Henault MA, Killian GJ. Cholesterol, phospholipid and phospholipase activity of ampullary and isthmic fluid from the bovine oviduct. *J Reprod Fertil* 1994; 102: 87-93.
167. de Lamirande E, Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1993; 16: 21-25.
168. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med* 1993; 14: 157-166.
169. Zini A, De Lamirande E, Gagnon C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J Androl* 1995; 16: 424-431.
170. Tulsiani DR, Abou-Haila A, Loeser CR, Pereira BM. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 1998; 240: 151-164.
171. Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 1990; 43: 55-64.
172. Casey PJ, Hillman RB, Robertson KR, Yudin AI, Liu IK, Drobnis EZ. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J Androl* 1993; 14: 289-297.
173. Meyers SA, Overstreet JW, Liu IK, Drobnis EZ. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *J Androl* 1995; 16: 47-54.
174. Wilhelm KM, Graham JK, Squires EL. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology* 1996; 46: 559-578.
175. Flesch FM, Voorhout WF, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol Reprod* 1998; 59: 1530-1539.
176. Farlin ME, Jasko DJ, Graham JK, Squires EL. Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1992; 32: 23-27.
177. Graham JK. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 2001; 68: 239-247.
178. Miyazaki R, Fukuda M, Takeuchi H, Itoh S, Takada M. Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. *Arch Androl* 1990; 25: 243-251.
179. Stein KK, Primakoff P, Myles D. Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J Cell Sci* 2004; 117: 6269-6274.

180. Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 1998; 281: 1857-1859.
181. Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol* 2001; 233: 204-213.
182. Shamsadin R, Adham IM, Nayernia K, Heinlein UA, Oberwinkler H, Engel W. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol Reprod* 1999; 61: 1445-1451.
183. Brachvogel B, Reichenberg D, Beyer S, Jehn B, von der Mark K, Bielke W. Molecular cloning and expression analysis of a novel member of the Disintegrin and Metalloprotease-Domain (ADAM) family. *Gene* 2002; 288: 203-210.
184. Choi I, Woo JM, Hong S, Jung YK, Kim DH, Cho C. Identification and characterization of ADAM32 with testis-predominant gene expression. *Gene* 2003; 304: 151-162.
185. Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila AP, Primakoff P, Myles DG, White JM. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol* 1995; 169: 378-383.
186. Zhu GZ, Myles DG, Primakoff P. Testase 1 (ADAM 24) a plasma membrane-anchored sperm protease implicated in sperm function during epididymal maturation or fertilization. *J Cell Sci* 2001; 114: 1787-1794.
187. Sutovsky P. Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert Rev Mol Med* 2009; 11: e11.
188. WHO. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999.
189. Tanphaichitr N, Haebe J, Leader A, Carmona E, Harris JD, da Silva SM, Antunes TT, Chakrabandhu K, Leveille MC. Towards a more precise assay of sperm function in egg binding. *J Obstet Gynaecol Can* 2003; 25: 461-470.
190. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-18.
191. Trussell J, Wynn LL. Reducing unintended pregnancy in the United States. *Contraception* 2008; 77: 1-5.
192. Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist MC. The epididymis. In: Neil J (ed.) *Knobil and Neil's Physiology of Reproduction*. New York: Elsevier; 2006: 1971-1148.
193. 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.
194. Berube B, Sullivan R. Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein. *Biol Reprod* 1994; 51: 1255-1263.

195. Tian X, Pascal G, Fouchecourt S, Pontarotti P, Monget P. Gene Birth, Death, and Divergence: The Different Scenarios of Reproduction-Related Gene Evolution. *Biol Reprod* 2009; 80: 616-621.
196. Busso D, Goldweic NM, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicu PS. Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 2007; 76: 701-708.
197. Hammarstrom M, Woestenenk EA, Hellgren N, Hard T, Berglund H. Effect of N-terminal solubility enhancing fusion proteins on yield of purified target protein. *J Struct Funct Genomics* 2006; 7: 1-14.
198. Rudolph R, Lilie H. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J* 1996; 10: 49-56.
199. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 2005; 99: 303-310.
200. Huang KX, Huang QL, Wildung MR, Croteau R, Scott AI. Overproduction, in *Escherichia coli*, of soluble taxadiene synthase, a key enzyme in the Taxol biosynthetic pathway. *Protein Expr Purif* 1998; 13: 90-96.
201. Vallejo LF, Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact* 2004; 3: 11.
202. LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N Y)* 1993; 11: 187-193.
203. Tsunoda Y, Sakai N, Kikuchi K, Katoh S, Akagi K, Miura-Ohnuma J, Tashiro Y, Murata K, Shibuya N, Katoh E. Improving expression and solubility of rice proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2005; 42: 268-277.
204. Stewart EJ, Aslund F, Beckwith J. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J* 1998; 17: 5543-5550.
205. Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* 1997; 272: 15661-15667.
206. Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 13703-13708.
207. LaVallie ER, McCoy JM. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1995; 6: 501-506.
208. Bayer ME, Bayer MH, Lunn CA, Pigiet V. Association of thioredoxin with the inner membrane and adhesion sites in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1987; 169: 2659-2666.
209. Wunderlich M, Glockshuber R. In vivo control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *J Biol Chem* 1993; 268: 24547-24550.

210. Ostermeier M, De Sutter K, Georgiou G. Eukaryotic protein disulfide isomerase complements *Escherichia coli* dsbA mutants and increases the yield of a heterologous secreted protein with disulfide bonds. *J Biol Chem* 1996; 271: 10616-10622.
211. Zhao JH, Xu Z, Hua ZC. Expression of human cardiac-specific homeobox protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2000; 18: 316-319.
212. Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 1996; 60: 512-538.
213. Fu XY, Tong WY, Wei DZ. Extracellular production of human parathyroid hormone as a thioredoxin fusion form in *Escherichia coli* by chemical permeabilization combined with heat treatment. *Biotechnol Prog* 2005; 21: 1429-1435.
214. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 60: 523-533.
215. Shahravan SH, Qu X, Chan IS, Shin JA. Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag. *Protein Expr Purif* 2008; 59: 314-319.
216. Cui T, Gao Y, Liew OW, Puah CM, Gutte B. Efficient preparation of an acyclic permutant of kalata B1 from a recombinant fusion protein with thioredoxin. *J Biotechnol* 2007; 130: 378-384.
217. Schleiff E, Khanna R, Orlicky S, Vrielink A. Expression, purification, and in vitro characterization of the human outer mitochondrial membrane receptor human translocase of the outer mitochondrial membrane 20. *Arch Biochem Biophys* 1999; 367: 95-103.
218. Abdullah N, Chase HA. Removal of poly-histidine fusion tags from recombinant proteins purified by expanded bed adsorption. *Biotechnol Bioeng* 2005; 92: 501-513.
219. 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.
220. Trivedi RN, Naz RK. Testis-specific antigen (TSA-1) is expressed in murine sperm and its antibodies inhibit fertilization. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47: 38-45.
221. Naz RK, Zhu X. Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding for human FA-1 antigen. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 256-268.
222. Moreau R, Therien I, Lazure C, Manjunath P. Type II domains of BSP-A1/-A2 proteins: binding properties, lipid efflux, and sperm capacitation potential. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 148-154.
223. 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.

224. Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertil Steril* 2004; 82: 913-918.
225. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 313-318.
226. Hamamah S, Wittemer C, Barthelemy C, Richet C, Zerimech F, Royere D, Degand P. Identification of hyaluronic acid and chondroitin sulfates in human follicular fluid and their effects on human sperm motility and the outcome of in vitro fertilization. *Reprod Nutr Dev* 1996; 36: 43-52.
227. Agostini AI. An unexpected role for the anticoagulant heparan sulfate proteoglycans in reproduction. *Swiss Medical Weekly* 2006; 136: 583-590.
228. Eriksen GV, Carlstedt I, Morgelin M, Uldbjerg N, Malmstrom A. Isolation and characterization of proteoglycans from human follicular fluid. *Biochem J* 1999; 340 (Pt 3): 613-620.
229. Valencia A, Wens MA, Merchant H, Reyes R, Delgado NM. Capacitation of human spermatozoa by heparin. *Arch Androl* 1984; 12 Suppl: 109-113.
230. Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote* 1998; 6: 103-111.
231. Delgado NM, Reyes R, Huacuja L, Merchant H, Rosado A. Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. *Arch Androl* 1982; 8: 87-95.
232. Bou Khalil M, Chakrabandhu K, Xu H, Weerachatyanukul W, Buhr M, Berger T, Carmona E, Vuong N, Kumarathasan P, Wong PT, Carrier D, Tanphaichitr N. Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid. *Dev Biol* 2006; 290: 220-235.
233. Chinnapen DJ, Chinnapen H, Saslowsky D, Lencer WI. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 266: 129-137.
234. Geyer H, Geyer R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764: 1853-1869.
235. Mikesh LM, Ueberheide B, Chi A, Coon JJ, Syka JE, Shabanowitz J, Hunt DF. The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764: 1811-1822.
236. Muniz M, Riezman H. Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J* 2000; 19: 10-15.
237. Kodukula K, Gerber LD, Amthauer R, Brink L, Udenfriend S. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins in intact cells: specific amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and GPI attachment. *J Cell Biol* 1993; 120: 657-664.
238. Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F. Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng* 1998; 11: 1155-1161.

239. Grigorian AL, Bustamante JJ, Hernandez P, Martinez AO and Haro LS. Extraordinarily stable disulfide-linked homodimer of human growth hormone. *Protein Sci* 2007; 14: 902-913.
240. Wang Z, Widgren EE, Richardson RT and O'Rand MG. Characterization of an Eppin Protein Complex from Human Semen and Spermatozoa. *Biol Reprod* 2007; 77: 476-484.
241. Purvis K, Rui H, Scholberg A, Hesla S, Clausen OP. Application of flow cytometry to studies on the human acrosome. *J Androl* 1990; 11: 361-366.
242. Sanchez-Luengo S, Aumuller G, Albrecht M, Sen PC, Rohm K, Wilhelm B. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca²⁺-ATPase. *J Androl* 2004; 25: 234-244.
243. Yu B, Zhao Y, Zhao W, Chen F, Liu Y, Zhang J, Fu W, Zong Z, Yu A, Guan Y. The inhibitory effect of BSP-A1/-A2 on protein kinase C and tyrosine protein kinase. *Cell Biochem Funct* 2003; 21: 183-188.
244. Montiel EE, Huidobro CC, Castellon EA. Glutathione-related enzymes in cell cultures from different regions of human epididymis. *Arch Androl* 2003; 49: 95-105.
245. Britan A, Lareyre JJ, Lefrancois-Martinez AM, Manin M, Schwaab V, Greiffeuille V, Vernet P, Drevet JR. Spontaneously immortalized epithelial cells from mouse caput epididymidis. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 224: 41-53.
246. Dufresne J, St-Pierre N, Viger RS, Hermo L, Cyr DG. Characterization of a novel rat epididymal cell line to study epididymal function. *Endocrinology* 2005; 146: 4710-4720.
247. Jalkanen J, Huhtaniemi I, Poutanen M. Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the Crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. *Biol Reprod* 2005; 72: 1268-1274.
248. Schwidetzky U, Schleuning WD, Haendler B. Isolation and characterization of the androgen-dependent mouse cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1) gene. *Biochem J* 1997; 321 (Pt 2): 325-332.
249. Haendler B, Habenicht UF, Schwidetzky U, Schuttke I, Schleuning WD. Differential androgen regulation of the murine genes for cysteine-rich secretory proteins (CRISP). *Eur J Biochem* 1997; 250: 440-446.