

Université de Montréal

**Induction de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par
pB1 et BSP-A1/-A2, des protéines de la famille des protéines BSP**

**Par
Marie-France Lusignan**

**Département de Biochimie
Faculté de Médecine**

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

Avril 2006

© Marie-France Lusignan, 2006



W

4

058

2006

V140



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé:
Induction de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par pB1
et BSP-A1/-A2, des protéines de la famille des protéines BSP**

**Présenté par:
Marie-France Lusignan**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Stephen Michnick, Ph.D.

Puttaswamy Manjunath, Ph.D.

François Dubé, Ph.D.

Président-Rapporteur

Directeur de Recherche

Membre du jury

Résumé

La capacitation des spermatozoïdes est un processus complexe dont les détails ne sont pas entièrement connus à ce jour. La caractérisation des facteurs présents dans le plasma séminal de porc est importante afin d'élaborer un mécanisme général de capacitation des spermatozoïdes porcins qui permettra d'améliorer les techniques d'insémination artificielle chez cette espèce.

Le but de notre étude était d'évaluer l'effet des protéines BSP dans la capacitation des spermatozoïdes porcins. Nous avons purifié pB1, une protéine homologue aux protéines BSP, du plasma séminal de porc par une nouvelle méthode rapide et efficace (chromatographie d'affinité à la chondroïtine sulfate B et rp-HPLC). Nous avons ensuite étudié l'effet de pB1 et de la protéine bovine BSP-A1/-A2 sur la capacitation des spermatozoïdes porcins. Des spermatozoïdes épидидymaires ont été pré-incubés 20 min en présence de différentes concentrations de protéines, puis ont été lavés et incubés pendant 4 h dans un milieu capacitant. La capacitation des spermatozoïdes a été déterminée en évaluant la capacité des spermatozoïdes à subir la réaction de l'acrosome suite à l'ajout de l'ionophore calcique A23187. L'intégrité de l'acrosome a été observée grâce à la coloration au CTC.

Nos résultats ont démontré qu'il y a une augmentation de capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins lorsqu'ils sont pré-incubés en présence de pB1 ou de BSP-A1/-A2. L'effet maximal est 2,3 fois plus élevé que le contrôle (spermatozoïdes pré-incubés sans protéines) lorsque les spermatozoïdes sont pré-incubés avec 10 µg/ml de pB1 et 2,2 fois plus élevé que le contrôle lorsqu'ils sont pré-incubés avec 20 µg/ml de BSP-A1/-A2. De plus, des résultats préliminaires indiquent que la pré-incubation des spermatozoïdes avec pB1 ou BSP-A1/-A2 n'entraîne pas une augmentation de phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes. Ces résultats suggèrent que les protéines de la famille des protéines BSP et leurs homologues retrouvées chez les autres mammifères ont le même effet sur la capacitation des spermatozoïdes.

Mots clés: capacitation, porc, protéines BSP, pB1, BSP-A1/-A2, spermatozoïdes.

Abstract

Sperm capacitation is a complex process and the mechanism is not fully understood. The characterization of factors present in boar seminal plasma is important for the elaboration of a general mechanism of boar sperm capacitation and to improve boar artificial insemination.

The objective of our study was to investigate the role of BSP proteins in boar sperm capacitation. We isolated pB1, a BSP protein homolog, from boar seminal plasma by a new efficient method (chondroitin sulfate B affinity chromatography and rp-HPLC). We studied the effect of pB1 and bovine protein BSP-A1/-A2 on boar sperm capacitation. Epididymal boar sperm were pre-incubated 20 min with different protein concentrations, washed and incubated for 4 h in capacitating media. The status of capacitation of sperm was evaluated by the capacity of sperm to undergo the acrosome reaction induced by calcium ionophore A23187. Acrosomal integrity was assessed by CTC coloration.

Our results demonstrate that pB1 and BSP-A1/-A2 potentiate epididymal boar sperm capacitation. This effect reached a maximum level of 2.3-fold compared to control (sperm pre-incubated without proteins) at 10 µg/ml pB1 and 2.2-fold higher than that of control at 20 µg/ml BSP-A1/-A2. Preliminary results indicate that pre-incubation of sperm with pB1 or BSP-A1/-A2 do not induce tyrosine phosphorylation of sperm proteins. These results suggest that BSP proteins and their homologs found in other mammals have the same effect on sperm capacitation.

Key words: capacitation, boar, BSP proteins, pB1, BSP-A1/-A2, sperm.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des Tableaux et Figures.....	viii
Liste des abréviations et des sigles.....	ix
Remerciements.....	xii
1. Introduction.....	1
1.1. Les spermatozoïdes.....	1
1.1.1. La spermatogenèse et la spermiogenèse.....	1
1.1.2. Structure des spermatozoïdes.....	2
1.1.3. Maturation épидидymaire des spermatozoïdes.....	3
1.2. Le plasma séminal.....	5
1.3. L'éjaculation.....	6
1.4. Capacitation des spermatozoïdes chez les mammifères.....	6
1.4.1. Capacitation <i>in vitro</i>	7
1.4.2. Efflux d'ions et potentiel de la membrane plasmique des spermatozoïdes.....	7
1.4.3. Modification de la membrane plasmique des spermatozoïdes.....	8
1.4.4. Phosphorylation sur tyrosine des protéines.....	9
1.4.5. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	10
1.4.6. Facteurs capacitants présents dans le tractus génital femelle.....	10
1.4.7. Hyperactivation des spermatozoïdes.....	12
1.4.8. Réaction de l'acrosome.....	12
1.5. Rôle du PS sur la capacitation.....	13
1.5.1. Les protéines majeures du PS bovin.....	14
1.5.1.1. Propriétés biochimiques des protéines BSP.....	14
1.5.1.2. Structure des protéines BSP.....	16
1.5.1.3. Propriétés de liaison des protéines BSP.....	16
1.5.1.4. Rôle biologique des protéines BSP.....	16
1.5.2. Les protéines homologues aux protéines BSP.....	19
1.5.2.1. Les protéines du PS de bouc, de bélier, de bison et du cheval.....	20

1.6.	Le porc	20
1.6.1.	Système reproducteur du porc.....	21
1.6.2.	Les protéines du PS de porc.....	21
1.6.2.1.	Les spermadhésines.....	21
1.6.2.2.	La protéine pB1	22
1.6.2.3.	Formation de complexes protéiques dans le PS porcin.....	23
1.6.3.	Mécanismes impliqués dans la capacitation des spermatozoïdes porcins	25
1.6.3.1.	Rôle du HCO_3^-	25
1.6.3.2.	Rôle de l'efflux de cholestérol	25
1.6.3.3.	Rôle des GAGs.....	26
1.6.4.	Évaluation de la capacitation des spermatozoïdes porcins	26
1.6.5.	La production porcine	28
1.7.	Objectifs du projet.....	29
2.	Matériel et Méthodes.....	31
2.1.	Matériel	31
2.2.	Méthodes	31
2.2.1.	Milieux de culture	31
2.2.2.	Capacitation des spermatozoïdes porcins.....	32
2.2.3.	Évaluation de la capacitation des spermatozoïdes porcins	32
2.2.4.	Viabilité.....	33
2.2.5.	Isolation des protéines des spermatozoïdes porcins.....	33
2.2.6.	Gel de polyacrylamide en condition dénaturante et immunobuvardage...	34
2.2.7.	Évaluation de la quantité de protéines	34
2.2.8.	Statistiques	34
3.	Résultats	35
3.1.	Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2, protein members of the BSP protein family (2006) Lusignan, M.-F., Bergeron, A., Lazure, C. and Manjunath, P., sera soumis à <i>Molecular Reproduction and Development</i>	35
3.2.	Résultats complémentaires.....	66

3.2.1.	Capacitation des spermatozoïdes épидидymaires par les protéines totales du PS porcin.....	66
3.2.2.	Capacitation des spermatozoïdes épидидymaires par le PS porcin (résultats préliminaires).....	66
3.2.3.	Phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes porcins capacités par pB1 (résultats préliminaires).....	69
3.2.4.	Phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes porcins capacités par BSP A1/A2 (résultats préliminaires).....	69
4.	Discussion.....	72
4.1.	Nouvelle méthode de purification de la protéine pB1 du PS de porc.....	72
4.2.	Capacitation des spermatozoïdes porcins.....	74
4.2.1.	Modulée par la protéine pB1.....	74
4.2.2.	Modulée par la protéine BSP-A1/-A2.....	76
4.2.3.	Modulée par les protéines du PS de porc.....	77
4.3.	Phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes.....	78
4.4.	Élaboration d'un modèle de capacitation des spermatozoïdes porcins.....	81
4.5.	Comparaisons entre les mécanismes de la capacitation porcine et bovine ...	84
4.6.	Applications.....	86
4.7.	Perspectives.....	88
4.8.	Conclusions.....	89
5.	Bibliographie.....	91

Liste des Tableaux et Figures

Tableau I : Homologues des protéines BSP chez différents mammifères	19
Figure 1: Structure d'un spermatozoïde.....	2
Figure 2: Structure d'un testicule.....	4
Figure 3: Système reproducteur du porc.....	5
Figure 4: Réaction de l'acrosome	13
Figure 5: Structure des protéines BSP	15
Figure 6: Modèle de capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins par les protéines BSP	18
Figure 7: Comparaison entre la séquence d'acides aminés des protéines de la famille des protéines BSP et celle de pB1	24
Figure 8: Profil de CTC des spermatozoïdes épидидymaires porcins.....	27
Figure 9: Modulation de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par les protéines totales du PS de porc précipitées à l'alcool	67
Figure 10: Modulation de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par les protéines totales du PS de porc.....	68
Figure 11: Effet de la protéine pB1 sur la phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes épидидymaires porcins	70
Figure 12: Effet de la protéine BSP-A1/-A2 sur la phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes épидидymaires porcins	71
Figure 13: Structure tridimensionnelle de pB1 prédite selon son homologie avec la protéine BSP-A1/-A2	77
Figure 14: Modèle hypothétique de la capacitation des spermatozoïdes porcins par pB1	83

Liste des abréviations et des sigles

%	Pourcentage
~	Environ
μ	Micro (10 ⁻⁶)
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire
°C	Degré celsius
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
BiSV	Protéines des vésicules séminales de bison « <u>B</u> ison <u>S</u> eminal <u>V</u> esicle proteins »
BSP	Protéines majeures du plasma séminal bovin « <u>B</u> ovine <u>S</u> eminal <u>P</u> lasma proteins »
Ca ²⁺	Calcium
CM	Milieu capacitant
CTC	Chlortétracycline
Ctl	Contrôle
CUB	Domaine identifié dans les protéines <u>C</u> lr/ <u>C</u> ls, <u>U</u> egf et <u>B</u> MP1
FSH	Hormone folliculo-stimulante « <u>F</u> ollicle <u>S</u> timulating <u>H</u> ormone »
g	Accélération gravitationnelle (9,81 m/sec ²)
g	Gramme
GAG	Glycosaminoglycan
GSP	Protéines du plasma séminal de bouc « <u>G</u> oat <u>S</u> eminal <u>P</u> lasma proteins »
h	Heure
HCl	Acide hydrochlorique
HCO ₃ ⁻	Bicarbonate

HDL	Lipoprotéines de haute densité « <u>H</u> igh <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein »
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HSP	Protéines du plasma séminal de cheval « <u>H</u> orse <u>S</u> eminal <u>P</u> lasma proteins »
IA	Insémination artificielle
IgG	Immunoglobuline G
K ⁺	Potassium
KDa	KiloDalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LDL	Lipoprotéine de faible densité « <u>L</u> ow <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein »
LH	Hormone lutéinisante « <u>L</u> uteinizing <u>H</u> ormone »
M	Molaire (mole/litre)
m	Mètre
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
n	Nombre de répétition
Na ⁺	Sodium
NCM	Milieu non capacitant
nm	Nanomètre
pAIF	Facteur inducteur de l'adhésion « <u>P</u> orcine <u>A</u> dhesion <u>I</u> nducing <u>F</u> actor »
pB1	Protéine de porc 1 « protein boar 1 »
PBS	Tampon phosphate salin « Phosphate Buffered Saline »
PI	Point isoélectrique
PKA	Protéine Kinase A
PS	Plasma séminal
PSA-FITC	Agglutinine <i>Pisum sativum</i> couplé à la fluorescéine « <u>F</u> luorescein-labeled <u>P</u> isum <u>s</u> ativum agglutinin »
PSP	Protéines du plasma séminal porcin « <u>P</u> orcine <u>S</u> eminal <u>P</u> lasma

	protein »
PVFD	Fluorure de polyvinylidène P
RIA	Dosage radioimmunologique « RadioImmunoAssay »
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
rp	Phase inverse « <u>R</u> everse <u>P</u> hase »
RSP	Protéines du plasma séminal de bélier « <u>R</u> am <u>S</u> eminal <u>P</u> lasma proteins »
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec sodium dodécylsulphate « <u>S</u> odium <u>D</u> odécyl <u>s</u> ulfate- <u>P</u> oly <u>A</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis »
sec	Seconde
TFA	Acide trifluoroacétique
v	Volume

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr. P. Manjunath de m'avoir accueillie dans son laboratoire afin d'y faire ma maîtrise. Mon projet était très intéressant et m'a permis d'acquérir beaucoup de nouvelles connaissances et d'habiletés techniques. Merci pour les conseils donnés afin d'améliorer mes présentations orales ainsi que les encouragements fréquents. Par ces présentations, j'ai appris à avoir plus confiance en moi et à mieux gérer mon stress.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire pour les conseils, les supports technique et moral: Dr. Annick Bergeron, Jasmine Lefebvre, Dr. Jinjiang Fan. Un merci tout particulier pour Annick qui m'a appris toutes les techniques que j'ai utilisées dans mon projet ainsi que pour m'avoir montré à être plus rigoureuse, autant dans les présentations orales, les textes écrits que les expériences de laboratoire. Merci à tout ceux et celles au Centre de Recherche qui ont participé de près ou de loin à mon projet et qui ont répondu à mes nombreuses questions.

Je tiens aussi à remercier FMénard Inc (Ange-Gardien) et l'abattoir Hébert (Ste-Hélène-de-Bagot) qui m'ont permis de m'avancer dans mes travaux en fournissant de la semence et des testicules de porc.

Finalement, je tiens à remercier ma famille et mes amis, qui m'ont soutenue durant ces études. Merci de m'avoir encouragée dans les moments plus difficiles et d'avoir partagé ma joie lors des moments de réussite.

1. Introduction

Les mammifères se reproduisent par reproduction sexuée, qui implique la rencontre entre les gamètes mâles, les spermatozoïdes, et un ou des ovocyte(s) (les gamètes femelles). La fusion entre un gamète mâle et femelle est appelée fécondation et permet de former un zygote qui se développera pour former un nouvel être.

Afin de pouvoir fusionner ensemble, les gamètes mâle et femelle doivent devenir mature. Le présent mémoire porte sur la maturation des spermatozoïdes, qui commence dans le tractus génital mâle et qui se termine dans le tractus génital femelle.

1.1. Les spermatozoïdes

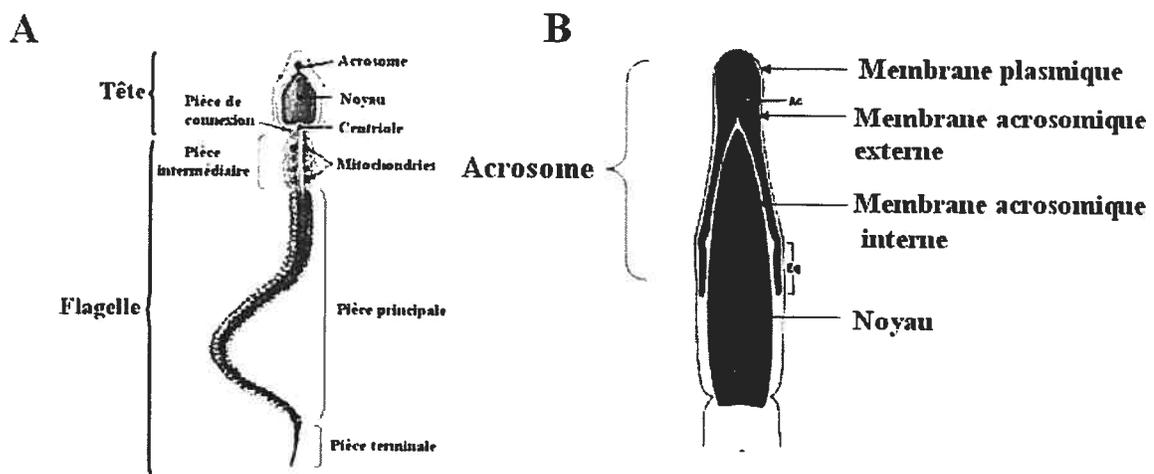
1.1.1. La spermatogenèse et la spermiogenèse

La spermatogenèse est le processus qui permet la formation des spermatozoïdes et qui a lieu dans les tubules séminifères des testicules. Ce processus commence à la puberté lorsque un niveau adéquat d'hormones LH et FSH en circulation est atteint et se déroule de façon continue tout au long de la vie reproductive [1]. Trois éléments importants constituent la spermatogenèse: un renouvellement des cellules souches (spermatogonies) suite à la mitose, une réduction du nombre de chromosomes suivant la méiose et le développement d'une cellule conventionnelle en spermatozoïde suite à un processus de métamorphose (spermiogenèse) [1]. Les spermatogonies proviennent des cellules germinales primordiales qui ont migré dans les gonades lors de l'embryogenèse [1, 2]. Des groupes de spermatogonies peuvent entrer en méiose (composée de deux divisions cellulaires) pendant la spermatogenèse. Les spermatogonies qui entrent en méiose sont nommées spermatocytes primaires et se diviseront pour donner des spermatocytes secondaires. Les spermatocytes secondaires formeront des spermatides suite à la deuxième division cellulaire de la méiose et ces derniers seront transformés en spermatozoïdes lors de la spermiogenèse [1]. La spermiogenèse est un processus de métamorphose qui ne comporte pas de division cellulaire, mais où il y a une réorganisation de l'emplacement du noyau et des

organelles et la formation de l'acrosome et du flagelle [1]. La spermatogenèse et la spermiogenèse se déroulent dans un environnement unique fourni par les cellules de Sertoli et de Leydig et sont influencées par des facteurs endocrines, paracrines et grâce à des interactions cellule-cellule [2, 3].

1.1.2. Structure des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes sont des cellules spécialisées dont le contenu réduit ne sert qu'à leur survie jusqu'à la fécondation. Le spermatozoïde se divise en deux parties : la tête et le flagelle (Figure 1) [1].



Modified from *Mammalian Fertilization*, Yanagimachi, 1994.

Figure 1: Structure d'un spermatozoïde. (A) Schéma d'un spermatozoïde. (B) Schéma de la tête d'un spermatozoïde.

La tête contient un noyau, un acrosome, certaines composantes cytosquelettiques et un peu de cytoplasme [1]. Les spermatozoïdes sont des cellules haploïdes qui ne contiennent qu'un seul élément de chaque paire de chromosomes. Le noyau du spermatozoïde est unique, car l'ADN génomique est associé majoritairement avec de petites protéines nucléaires de 27-65 acides aminés, les protamines [1]. Les protamines sont riches en arginine et en cystéine, ce qui les rend très basiques. Le complexe ADN-protamine est très compact et il est stabilisé par des ponts disulfures entre les protéines. L'acrosome origine de l'appareil de Golgi des spermatides et il est constitué de deux membranes : une membrane extérieure, appelée membrane acrosomique externe, qui est accolée à la membrane

plasmique et une membrane intérieure qui suit la partie antérieure du noyau, nommée membrane acrosomique interne (Figure 1) [1]. L'acrosome contient plusieurs enzymes protéolytiques, telles que l'acrosine et l'hyaluronidase. Ces enzymes sont spécifiques de l'acrosome des spermatozoïdes de mammifères et sont nécessaires pour la fusion entre le spermatozoïde et l'ovocyte lors de la fécondation [1]. Ces enzymes sont relâchées au cours de la réaction d'acrosome. D'autres enzymes, que l'on retrouve fréquemment dans les lysosomes primaires, sont aussi présentes quoiqu'en en plus petite quantité [1].

Le flagelle fournit au spermatozoïde la force nécessaire pour se déplacer dans le tractus génital femelle et atteindre l'ovocyte pour le féconder. Le flagelle des spermatozoïdes de mammifère possède quatre segments distincts : une pièce de connexion, une pièce intermédiaire, une pièce principale et une petite pièce terminale (Figure 1) [4]. La pièce de connexion lie la tête et la pièce intermédiaire du flagelle. La pièce intermédiaire est composée d'une couche de mitochondries qui entoure étroitement les structures cytosquelettiques. La pièce principale est entourée par la couche fibreuse, qui est unique aux spermatozoïdes. Cette couche fibreuse est constituée de deux colonnes longitudinales entourées par des côtes semi-circulaires. La couche fibreuse sert d'échafaudage aux protéines des voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans la maturation, la motilité, l'hyperactivation et/ou la réaction d'acrosome des spermatozoïdes [4]. Le flagelle contient l'axonème, qui est formé de deux microtubules centraux entourés par neuf doublets de microtubules. Le mouvement du flagelle nécessite de l'ATP comme source d'énergie. Cet ATP est hydrolysé par les ATPases qui sont présentes sur les bras de dynéines des doublets de microtubules, et permet le glissement de ces derniers pour créer une courbure du flagelle [4].

1.1.3. Maturation épидидymaire des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes qui sont produits dans les tubules séminifères quittent les testicules. Ces spermatozoïdes ne peuvent pas féconder un ovocyte. Ils acquièrent leur pouvoir fécondant durant la maturation dans les épидидymes. L'épидидyme consiste en un tube qui est situé à la surface postérieure du testicule et

qui est divisé en trois segments : la tête (caput), le corps (corpus) et la queue (cauda) (Figure 2) [5].

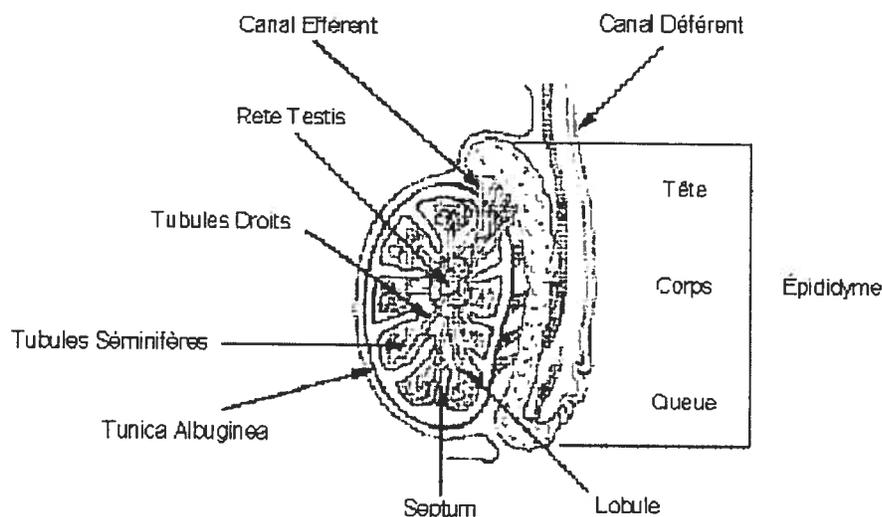


Figure 2: Structure d'un testicule.

La partie de l'épididyme où commence la maturation des spermatozoïdes varie selon les espèces. Chez le porc, les spermatozoïdes débutent leur processus de maturation dans la partie distale du corps de l'épididyme [1]. La membrane plasmique des spermatozoïdes est modifiée pendant leur transit dans les épидидymes. La charge nette de la surface de la membrane est plus élevée chez des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme que ceux de la tête de l'épididyme. Des glycoprotéines de la membrane des spermatozoïdes sont enlevées ou modifiées et d'autres glycoprotéines provenant de l'épididyme peuvent être ajoutées à la membrane des spermatozoïdes [1]. Le contenu en cholestérol de la membrane est modifié lors de la maturation dans les épидидymes et ces changements varient entre les espèces [6]. Également, les spermatozoïdes qui sortent des testicules n'ont pas encore la capacité d'être motiles. L'acquisition de la motilité se fait progressivement durant la traversée de l'épididyme. La maturation des spermatozoïdes de la majorité des espèces est complétée lorsqu'ils ont atteint le segment distal de la queue de l'épididyme [1].

1.2. Le plasma séminal

Le plasma séminal (PS) est composé des sécrétions des différentes glandes accessoires mâles, telles que les épидидymes, le canal déférent, les vésicules séminales, la prostate, les ampoules et les glandes de Cowper nommées également glandes bulbo-uréthales (les trois dernières glandes peuvent être absentes chez certains mammifères) et constitue la partie liquide du sperme (Figure 3) [1]. Le volume des sécrétions des vésicules séminales compte pour environ 60% du PS alors que la prostate fournit environ 30% des sécrétions du PS chez la plupart des mammifères [7].

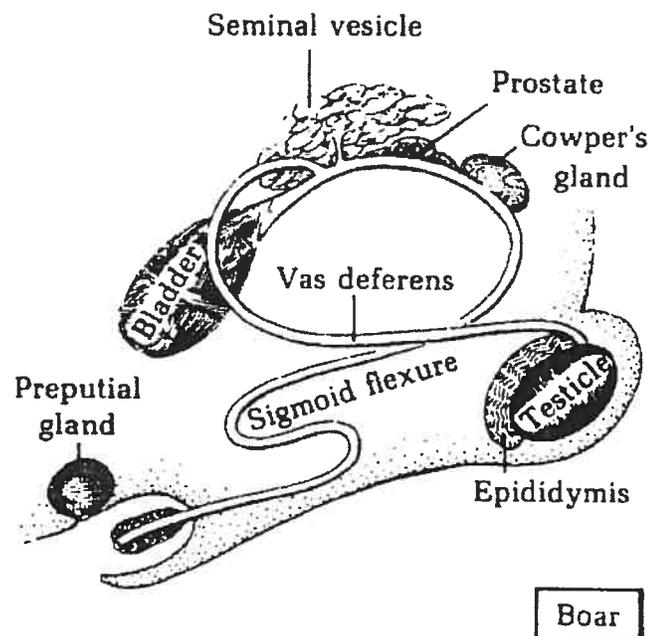


Figure 3: Système reproducteur du porc.

La composition du PS varie selon les espèces, entre les individus d'une même espèce et parfois selon l'intervalle de temps entre la collecte des échantillons de sperme chez un même individu [1]. Le PS contient des ions tels que le Na^+ , le K^+ et le Ca^{2+} , des sucres tels que le fructose, le sorbitol et l'inositol ainsi que des protéines [1]. Le fructose est le principal sucre utilisé par les spermatozoïdes pour la glycolyse.

1.3. L'éjaculation

Au moment de l'éjaculation, les spermatozoïdes entreposés dans les épидидymes passent par les canaux déférents, entrent en contact avec le PS et sont expulsés du tractus génital mâle pour être déposés dans le tractus génital femelle au niveau du vagin ou du col de l'utérus, selon l'espèce [1]. Par exemple, chez le porc les spermatozoïdes sont directement déposés dans l'utérus lors de l'éjaculation et n'ont pas à traverser le vagin [8, 9].

1.4. Capacitation des spermatozoïdes chez les mammifères

Chez les mammifères, les spermatozoïdes qui sont nouvellement éjaculés n'ont pas la capacité de féconder un ovocyte. Afin d'acquérir leur pouvoir fécondant, ils doivent subir un processus dans le tractus génital femelle qui est nommé capacitation. La capacitation a été décrite pour la première fois en 1951 par Austin et Chang [10, 11]. La capacitation est un processus de modifications biochimiques et physiologiques des spermatozoïdes. Pendant la capacitation, il y a une augmentation des ions (Na^+ , HCO_3^- et Ca^{2+}) et du pH intracellulaire, des modifications de la membrane plasmique (efflux de cholestérol et phospholipides, augmentation de la fluidité membranaire) et une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine des protéines. C'est chez l'espèce bovine que le mécanisme de capacitation est le mieux caractérisé.

La durée du processus de capacitation des spermatozoïdes est différente entre chaque espèce. Il peut durer d'une heure à plusieurs heures. Par exemple, les spermatozoïdes porcins éjaculés capacitent en 3 h *in vitro* [12]. Toutefois, ce temps peut varier selon l'état hormonal des femelles, selon la race de l'animal et également selon la composition du milieu auquel sont exposés les spermatozoïdes *in vitro* [1]. Malgré le nombre important d'études qui ont été entreprises pour élucider les mécanismes impliqués dans la capacitation depuis sa description en 1951, plusieurs aspects doivent être éclaircis.

1.4.1. Capacitation *in vitro*

In vivo, la capacitation a lieu dans le tractus génital femelle. La majorité des études ayant pour but d'étudier ce phénomène ont été effectuées *in vitro*, étant donné qu'il est difficile d'étudier ce processus *in vivo*. La capacitation des spermatozoïdes est possible *in vitro* lorsqu'ils sont incubés dans un milieu de culture qu'on appelle « milieu capacitant ». La capacitation des spermatozoïdes *in vitro* est dépendante de la température à laquelle les spermatozoïdes sont incubés [1]. Chez la plupart des espèces, les spermatozoïdes peuvent être capités à des températures variants entre 37°C et 38°C. Chez le porc, les spermatozoïdes nécessitent une température un peu plus élevée, soit 39°C [1]. Le milieu capacitant a une composition qui permet de recréer un environnement semblable à celui retrouvé dans le tractus génital femelle. Il contient généralement une source d'énergie (glucose, pyruvate, lactate), du Ca^{2+} , du HCO_3^- , un facteur capacitant, tel l'héparine, ainsi qu'un accepteur de cholestérol, tel que l'albumine de sérum [1]. La concentration de chacun des composants utilisés dans le milieu capacitant varie selon l'espèce.

1.4.2. Efflux d'ions et potentiel de la membrane plasmique des spermatozoïdes

Lorsque les spermatozoïdes épидидymaires sont entreposés dans la queue des épидидymes, ils baignent dans un milieu aqueux qui est riche en ions K^+ , mais qui possède peu d'ions Na^+ et très peu de HCO_3^- [1]. Pendant l'éjaculation, la concentration de ces ions change de façon radicale lorsque les spermatozoïdes entrent en contact avec le PS, puis ensuite avec les fluides du système reproducteur femelle. Les changements de la concentration des ions du milieu entraînent une modification de la concentration intracellulaire de plusieurs ions chez les spermatozoïdes. Plus précisément, la concentration intracellulaire de K^+ diminue et celle du Na^+ et du HCO_3^- augmente de façon significative [1]. Plusieurs études ont démontré l'importance du Ca^{2+} dans la capacitation et l'induction de la réaction d'acrosome [13-15]. En effet, il y a une augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire dans les spermatozoïdes de plusieurs espèces pendant la capacitation [16-18]. Chez le bovin et la souris, la capacitation est accompagnée par une hyperpolarisation de la membrane plasmique qui est probablement causée par la

variation de la concentration intracellulaire des ions, principalement à la diminution du K^+ et possiblement à l'augmentation du Ca^{2+} [19, 20]. Le HCO_3^- est requis pour la capacitation des spermatozoïdes (revue en [21]). Chez le porc, le HCO_3^- induit des changements rapides dans l'architecture des lipides de la membrane et une stimulation de la motilité [22, 23]. De plus, l'augmentation du pH intracellulaire observée durant la capacitation est attribuée à l'augmentation de HCO_3^- intracellulaire [24].

1.4.3. Modification de la membrane plasmique des spermatozoïdes

Pendant la capacitation, la membrane plasmique des spermatozoïdes est modifiée de façon importante. Un événement important de la capacitation des spermatozoïdes est l'efflux de cholestérol (ou d'autres stérols) de la membrane plasmique des spermatozoïdes (revue dans [6, 25]).

Chez une majorité d'espèces étudiées, le cholestérol est le stérol retrouvé en plus grande abondance dans la membrane plasmique des spermatozoïdes éjaculés [25]. Le ratio molaire cholestérol/phospholipides est très variable selon les espèces, allant de 0,83 chez les spermatozoïdes éjaculés humains, 0,40 chez les spermatozoïdes éjaculés bovins et de 0,20 chez les spermatozoïdes éjaculés porcins [25]. Ce ratio diminue lors de l'efflux du cholestérol membranaire qui a lieu lors de la capacitation [25]. Tel que mentionné à la section 1.4.1, l'albumine de sérum (habituellement l'albumine de sérum bovin; BSA) est un composant important du milieu capacitant utilisé pour les expériences de capacitation *in vitro* des spermatozoïdes de souris, de rat, de hamster, de bovin ainsi que d'humain et sert d'accepteur du cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes [25-30]. La BSA peut être remplacée dans des expériences de capacitation *in vitro* par d'autres accepteurs de cholestérol, tels que les lipoprotéines de haute densité (HDL) [31] et par la β -cyclodextrine [32].

La diminution du ratio cholestérol/phospholipides suite à l'efflux de cholestérol est probablement à l'origine de certains événements qui sont observés durant la capacitation, comme des changements de la fluidité membranaire [33], une redistribution des protéines de la membrane plasmique [34] et l'activation de voies

de transduction du signal de la membrane amenant à la phosphorylation sur tyrosine des protéines [35].

1.4.4. Phosphorylation sur tyrosine des protéines

La phosphorylation des protéines permet la régulation de plusieurs processus intracellulaires, comme la croissance cellulaire, l'assemblage du cytosquelette, le contrôle du cycle cellulaire, la modulation des courants ioniques ou la régulation de récepteurs [36]. L'ajout ou le retrait de groupements phosphate d'une protéine permet sa régulation : elle peut être activée ou inhibée.

Certaines protéines des spermatozoïdes peuvent être phosphorylées sur les résidus tyrosine pendant la capacitation. L'augmentation de phosphorylation sur tyrosine correspond à une apparition de nouvelles protéines qui n'étaient pas phosphorylées et elle est corrélée avec la capacitation des spermatozoïdes chez plusieurs mammifères [37]. Certaines études démontrent aussi une augmentation de phosphorylation sur sérine et thréonine des protéines spermatiques pendant la capacitation [38, 39].

L'augmentation de la phosphorylation sur les résidus tyrosine des protéines spermatiques est régulée par une voie dépendante à l'AMPc qui implique la protéine kinase A (PKA) chez les spermatozoïdes de plusieurs espèces [37]. En effet, Leclerc et al. [40] ont démontré que l'incubation des spermatozoïdes humains avec un inhibiteur de la PKA (H89) entraîne une diminution de la phosphorylation sur tyrosine des protéines et une inhibition de capacitation des spermatozoïdes et que l'incubation avec un analogue de l'AMPc (dibutyryl cAMP) engendre une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine et de la capacitation. Tel que mentionné à la section 1.4.3., il semble que l'augmentation de la fluidité membranaire engendrée par l'efflux de cholestérol durant la capacitation affecte la phosphorylation sur tyrosine des protéines spermatiques. Chez la souris, le traitement des spermatozoïdes par de la β -cyclodextrine, un accepteur de cholestérol, entraîne un efflux de cholestérol de la membrane plasmique, augmentant la capacitation et la phosphorylation sur tyrosine des protéines via la voie AMPc/PKA [35].

La régulation de la phosphorylation sur tyrosine pendant la capacitation est également due à certains facteurs qui sont présents dans l'environnement capacitant, tel que le Ca^{2+} et le HCO_3^- . Cependant, le rôle du Ca^{2+} extracellulaire dans la phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes est controversé. Chez les spermatozoïdes de souris, de porc et d'humain, une augmentation de phosphorylation est observée avec une augmentation croissante de la concentration de Ca^{2+} extracellulaire [41-43]. Toutefois, d'autres études démontrent que le Ca^{2+} régule à la baisse la phosphorylation des protéines des spermatozoïdes humains pendant la capacitation [44, 45]. Également, le HCO_3^- entraîne une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes porcins [23].

1.4.5. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Des études démontrent que la capacitation *in vitro* des spermatozoïdes peut être modulée par la présence extracellulaire d'une faible concentration de ROS tels que l'oxyde nitrique, le peroxyde d'hydrogène ou l'anion superoxide. Ils sont impliqués dans la capacitation des spermatozoïdes de plusieurs espèces (revue en [46]). Les ROS stimulent la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs protéines spermatiques [47]. De plus, lorsqu'ils sont incubés en présence de PS, de fluide folliculaire ou de sérum fœtal qui contiennent des facteurs capacitants, les spermatozoïdes génèrent immédiatement des anions superoxydes au niveau de leur membrane [48].

1.4.6. Facteurs capacitants présents dans le tractus génital femelle

Les fluides oviductal et folliculaire possèdent des éléments qui sont nécessaires pour induire la capacitation. Ils contiennent les ions nécessaires à la capacitation (Ca^{2+} , HCO_3^- , K^+) et plusieurs facteurs capacitants qui diffèrent selon les espèces. Il a été démontré que les spermatozoïdes éjaculés deviennent capables après avoir été en contact avec du fluide oviductal ou folliculaire [49-52]. Deux groupes prédominants de facteurs capacitants sont retrouvés au niveau du tractus génital femelle bovin : les glycosaminoglycans (GAGs) semblables à l'héparine, tels que l'héparane sulfate et la chondroïtine sulfate ainsi que les accepteurs de cholestérol tels les HDL [49-51, 53-56].

Les GAGs sont de longues chaînes de polysaccharides qui sont habituellement attachés à un corps protéique, formant ainsi les protéoglycans [57]. Les GAGs sont composés d'unités de disaccharides qui sont répétées. L'un des deux résidus est toujours un sucre aminé (N-acétylglucosamine), et au moins un des deux sucres est chargé négativement à cause de la présence de groupements carboxyle ou sulfate. Chez la vache, la concentration totale des GAGs du fluide varie selon les différentes parties du tractus génital femelle et selon le cycle oestral. En effet, la concentration est de 34 mg/100 mg de protéines au niveau du col de l'utérus, 20 mg/100 mg de protéines au niveau de l'utérus et de 9 mg/100 mg de protéines au niveau des oviductes [58]. La concentration de chondroïtine sulfate et de GAGs semblables à l'héparine est plus élevée dans le mucus cervical de la vache qui est en oestrus [59]. Chez la truie, la concentration des GAGs semblables à l'héparine présents dans le fluide oviductal varie aussi selon la partie du tractus génital femelle et selon le cycle oestral et atteint une concentration moyenne de 24 mg/ml durant l'oestrus [60].

Chez l'espèce bovine, l'héparine (qui est un GAG utilisé pour la capacitation *in vitro*) et les GAGs (héparane sulfate et chondroïtine sulfate) qui sont présents dans le tractus génital femelle jouent un rôle très important dans la capacitation des spermatozoïdes. En effet, l'héparine induit *in vitro* la capacitation des spermatozoïdes d'humain [61], de bovin [53, 62], de cheval [63] et de bison [64]. Chez le bovin, la capacitation des spermatozoïdes éjaculés bovins peut être induite *in vitro* en 9 h lorsqu'ils sont incubés avec les GAGs isolés du fluide folliculaire bovin ou avec l'héparine, et en 22 h pour des spermatozoïdes épидидymaires [49, 65-67]. Les GAGs qui sont les plus sulfatés possèdent un pouvoir inducteur de la capacitation plus grand que ceux qui sont moins sulfatés [65]. Ainsi, l'héparine (30% de sulfatation) est le meilleur GAG inducteur de la capacitation [65].

Les HDL sont retrouvés dans le tractus génital femelle et sont la seule classe de lipoprotéines présente dans les fluides oviductal et folliculaire bovin, porcin et humain [51, 54, 68-70]. Les HDL ont la capacité de capter le cholestérol de la membrane des spermatozoïdes et sont impliqués dans l'efflux de cholestérol observé pendant la capacitation des spermatozoïdes. L'incubation des spermatozoïdes

bovins avec du fluide oviductal pendant 2 h cause un transfert net de 25% du cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes vers les HDL [54].

1.4.7. Hyperactivation des spermatozoïdes

La capacitation est corrélée avec des changements dans le patron de motilité des spermatozoïdes chez plusieurs espèces [1]. Ces changements sont nommés hyperactivation [1, 71]. La motilité des spermatozoïdes hyperactivés est caractérisée par une lente progression vers l'avant, une grande vitesse et un mouvement du flagelle ressemblant à celui d'un fouet [1]. L'hyperactivation des spermatozoïdes semble nécessaire pour qu'ils soient capables de féconder l'ovocyte. En effet, il existe une corrélation élevée entre la capacité des spermatozoïdes à pénétrer la zone pellucide et l'hyperactivation de la motilité [1].

1.4.8. Réaction de l'acrosome

Le spermatozoïde qui est capacité peut entreprendre la réaction de l'acrosome pour être en mesure de féconder l'ovocyte. La réaction de l'acrosome consiste en la fusion de la membrane plasmique du spermatozoïde avec la membrane externe de l'acrosome, ce qui permet la libération d'enzymes hydrolytiques (Figure 4). Ces enzymes facilitent le passage du spermatozoïde à travers la zone pellucide.

Chez la plupart des espèces de mammifères, seulement les spermatozoïdes possédant un acrosome intact peuvent interagir avec la zone pellucide de l'ovocyte [72]. La réaction de l'acrosome est induite par la liaison entre des récepteurs spécifiques situés à la surface du spermatozoïde et une protéine de la zone pellucide, la protéine ZP3 [73]. Il y a alors activation de canaux calciques du spermatozoïde, entraînant une entrée massive de Ca^{2+} qui est essentiel à la réaction de l'acrosome [73]. La réaction de l'acrosome permet aussi l'exposition de nouveaux récepteurs au niveau de la membrane plasmique interne du spermatozoïde qui permettent sa liaison à la membrane plasmique de l'ovocyte, qui résultera éventuellement à la fusion des gamètes. Récemment, une protéine à la surface des spermatozoïdes de souris (nommée Izumo) a été identifiée et elle est impliquée dans le processus de fusion entre le spermatozoïde et l'ovocyte [74]. Izumo est détectable que lorsque les spermatozoïdes ont subi la réaction de l'acrosome [74].

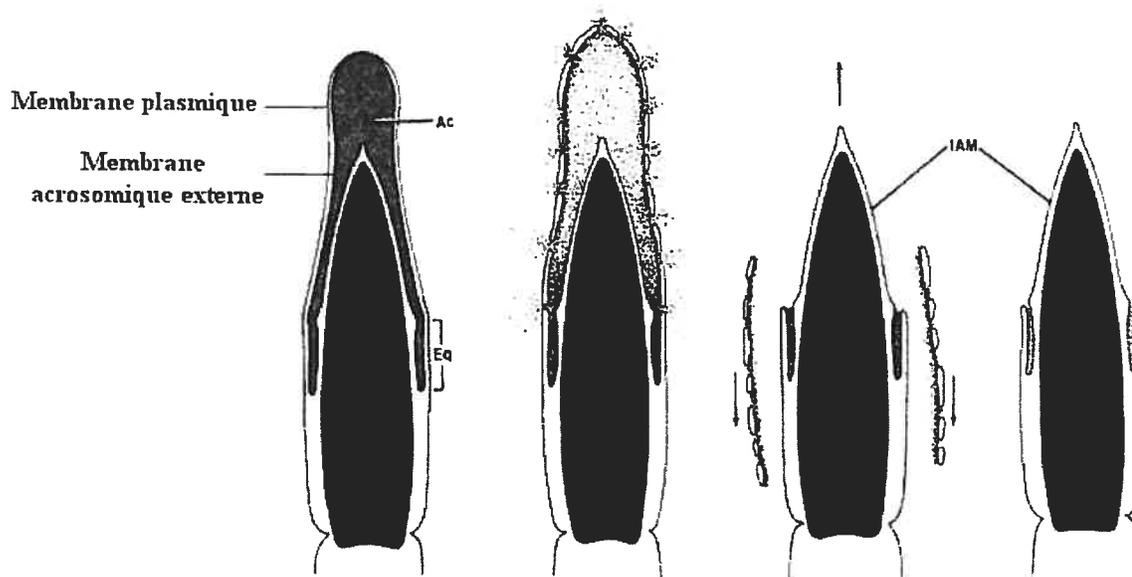


Figure 4: Réaction de l'acrosome. Eq : segment équatorial; Ac : acrosome; IAM : membrane acrosomique interne.

1.5. Rôle du PS sur la capacitation

Le PS contient plusieurs facteurs qui peuvent moduler le pouvoir fécondant des spermatozoïdes [75-77]. Il contient des facteurs décapitants qui préviennent la capacitation des spermatozoïdes *in vitro* et des protéines qui sont associées avec une faible fertilité des taureaux [75, 78-81]. Le PS possède aussi des facteurs qui sont impliqués dans la capacitation. Tel que mentionné plus haut, les spermatozoïdes épидидymaires bovins qui capacitent en 22 h lorsqu'ils sont incubés avec des GAGs (versus 9 h pour des spermatozoïdes éjaculés bovins) peuvent être capités en une durée de 9 h *in vitro* s'ils sont préalablement exposés au PS bovin [82]. Ces résultats suggèrent que les spermatozoïdes épидидymaires sont modifiés par le PS. Les équipes de Miller et al. [83] et de Florman et al. [84] ont également démontré le rôle du PS au niveau de la capacitation des spermatozoïdes induites par l'héparine. En effet, les spermatozoïdes épидидymaires bovins doivent être pré-incubés avec du PS afin d'être capités *in vitro* en présence d'héparine dans le même laps de temps que les spermatozoïdes éjaculés [84]. Cette diminution du temps de capacitation induite par l'héparine des spermatozoïdes épидидymaires serait due à la liaison de

protéines du PS sur les spermatozoïdes qui augmentent le nombre de site de liaison à l'héparine sur le spermatozoïde [82].

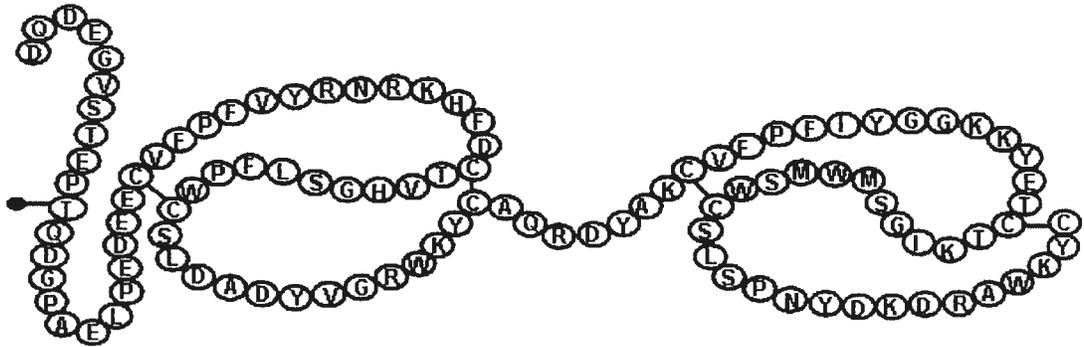
1.5.1. Les protéines majeures du PS bovin

Le PS bovin contient plusieurs protéines qui sont présentes à une concentration totale moyenne de 68 mg/ml [7]. La majeure partie de ces protéines (~65%) est sécrétée par les vésicules séminales et fait partie de la famille des protéines BSP (Bovine Seminal Plasma proteins) [85, 86]. La famille des protéines BSP est constituée de 4 protéines : BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 et BSP-30 kDa (Figure 5) [85-87]. Les protéines BSP-A1 et BSP-A2 sont considérées comme étant la même protéine car elles ont toutes deux une séquence d'acides aminés identique et ne diffèrent que par leur degré de glycosylation (BSP-A1 étant la plus glycosylée). Les protéines BSP-A1 et BSP-A2 portent souvent le nom de BSP-A1/A2 ou de PDC-109 (où P signifie protéine, D et C sont les abréviations des acides aminés qui se trouvent aux extrémités amino-terminale et carboxy-terminale respectivement et 109 le nombre d'acides aminés) [88].

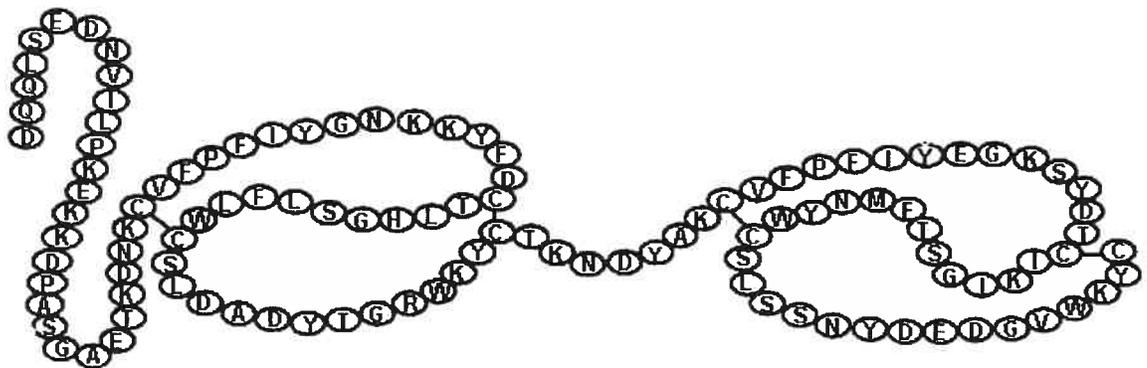
1.5.1.1. Propriétés biochimiques des protéines BSP

Les protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3 possèdent une masse moléculaire qui varie entre 15 et 16,5 kDa, tandis que celle de la protéine BSP-30kDa varie entre 28-30 kDa [85-89]. Les protéines BSP sont toutes glycosylées à l'exception de BSP-A3. BSP-A1 et BSP-30kDa contiennent des sucres neutres, de l'acide sialique et de la galactosamine. La protéine BSP-A2 contient également de l'acide sialique (en plus faible quantité que BSP-A1) et de la galactosamine, mais elle ne possède pas de sucres neutres. BSP-30kDa est la protéine la plus glycosylée de la famille des protéines BSP [85, 89]. Les protéines BSP-30kDa et BSP-A3 ont une composition en acides aminés différente de celle de BSP-A1/A2 [85, 89]. Les protéines BSP possèdent un point isoélectrique (PI) qui se situe entre 3,9 et 5,2 et sont donc des protéines acides [90].

Protéines BSP-A1/-A2



Protéine BSP-A3



Protéine BSP-30kDa

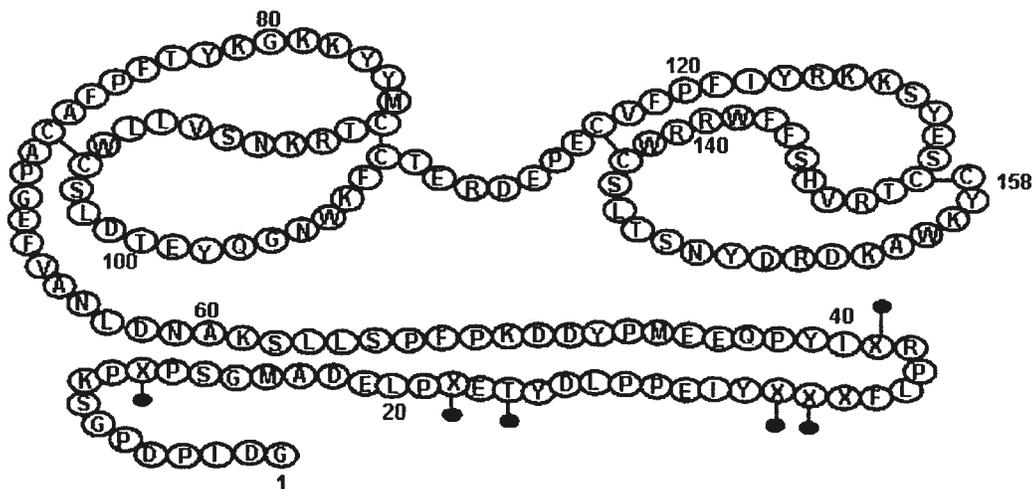


Figure 5: Structure des protéines BSP. Les sites de glycosylation sont indiqués par des cercles pleins noirs.

1.5.1.2. Structure des protéines BSP

Les protéines BSP possèdent une structure secondaire similaire (Figure 5) qui est composée de deux domaines de type II disposés en tandem [88, 91, 92]. Les domaines de type II sont constitués de 38-41 acides aminés, possèdent 4 cystéines formant deux ponts disulfures et ont la propriété de pouvoir lier le collagène [93]. L'extrémité N-terminale des protéines BSP est variable selon la protéine. La protéine BSP-30kDa possède une longue extrémité N-terminale, contrairement aux autres protéines BSP. Également, l'ADNc des trois protéines BSP a été cloné [94, 95].

1.5.1.3. Propriétés de liaison des protéines BSP

Les protéines BSP peuvent s'associer avec plusieurs macromolécules grâce à leur deux domaines de type II. En effet, des études ayant utilisé diverses colonnes d'affinité ont démontré que les protéines BSP ont la capacité de lier la gélatine [86], le fibrinogène, différents types de collagène (types I, II, III et IV), le groupement choline des phospholipides [96], la calmoduline [97], la fraction de faible densité du jaune d'œuf (qui est riche en lipoprotéines de faible densité, LDL) [98] et certains facteurs capacitants tels que les HDL [99], et les GAGs (héparine [100], chondroïtine sulfate B et héparane sulfate [56]). Les protéines BSP peuvent lier d'autres macromolécules, comme le fucose [101] ou encore des phospholipides portant un groupement éthanolamine ou glycérol, toutefois avec moins d'affinité que les phospholipides portant un groupement choline [102, 103]. Les diverses propriétés de liaison des protéines BSP permettent d'utiliser la chromatographie d'affinité pour les isoler à partir du PS.

1.5.1.4. Rôle biologique des protéines BSP

Les études effectuées par notre laboratoire sur les protéines BSP indiquent qu'elles sont impliquées dans les modifications lipidiques des membranes des spermatozoïdes durant la capacitation. Les résultats obtenus ont permis à notre laboratoire de proposer un mécanisme général de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins par les protéines BSP (Figure 6) [104].

Pendant l'éjaculation, les spermatozoïdes épидидymaires entrent en contact avec les protéines BSP, qui sont présentes dans le PS. Les protéines BSP peuvent alors se lier à la membrane plasmique des spermatozoïdes via des interactions avec le groupement choline des phospholipides qui sont présents dans la membrane [96, 105]. Simultanément, les protéines BSP stimulent un efflux de cholestérol et de phospholipides portant un groupement choline. En effet, Thérien et al [55, 106] ont démontré que les protéines BSP sont capables de stimuler un efflux de lipides des spermatozoïdes épидидymaires. De plus, cet efflux lipidique est dépendant de la concentration des protéines BSP dans le milieu d'incubation et du temps d'incubation avec les protéines BSP [55, 106]. La liaison des protéines BSP à la membrane plasmique et l'efflux de cholestérol peuvent entraîner une réorganisation de la membrane du spermatozoïde. Peu de temps après l'éjaculation (environ 10 à 20 minutes), la majorité du PS est laissé derrière les spermatozoïdes, qui nagent dans le mucus cervical en direction de l'utérus. De plus, il est possible que la membrane plasmique des spermatozoïdes soit stabilisée avant leur traversée dans le tractus génital femelle grâce à la présence des protéines BSP à leur surface qui empêcheraient le libre mouvement des phospholipides dans la membrane.

Les spermatozoïdes rencontrent des HDL qui sont présents dans le tractus génital femelle et sont capités par ces derniers, via les protéines BSP. En effet, les protéines BSP à la surface de la membrane peuvent interagir avec les HDL, ce qui pourrait stimuler un deuxième efflux de cholestérol et ainsi diminuer le ratio cholestérol/phospholipides de la membrane plasmique des spermatozoïdes. La diminution du ratio aurait pour conséquence de déstabiliser encore plus la membrane plasmique et d'engendrer une cascade de signaux menant à la capacitation. Tel que discuté précédemment, les protéines BSP peuvent lier l'héparine. Les protéines BSP présentes sur la membrane des spermatozoïdes permettent ainsi d'augmenter le nombre de sites de liaison à l'héparine à la surface des spermatozoïdes. L'héparine peut alors se lier aux protéines BSP et induire la capacitation des spermatozoïdes [53, 107]. Les GAGs semblables à l'héparine qui sont présents dans le tractus génital femelle, comme la chondroïtine sulfatée et l'héparane sulfatée, peuvent

également induire la capacitation des spermatozoïdes via les protéines BSP sur la membrane des spermatozoïdes [56].

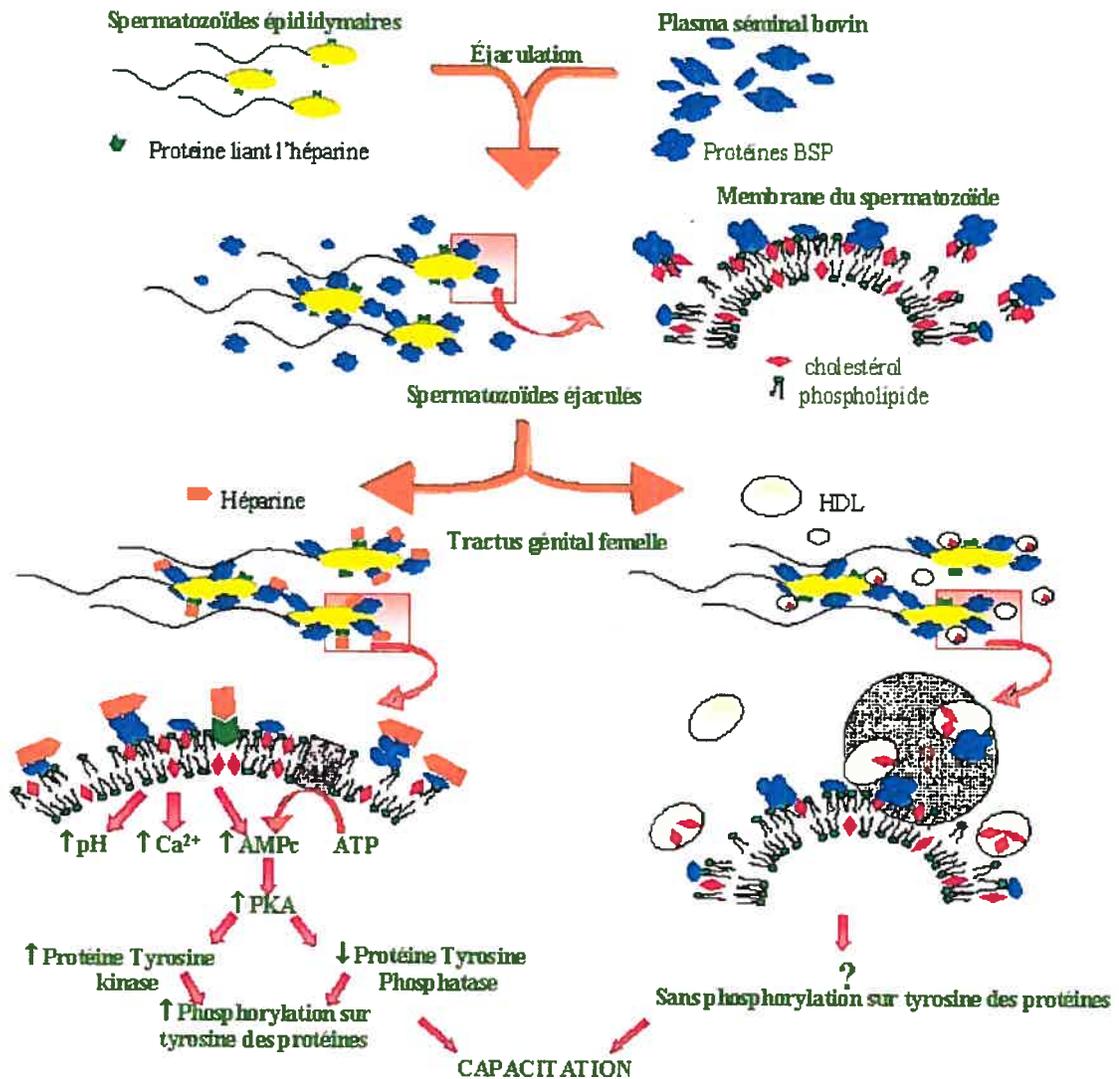


Figure 6: Modèle de capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins par les protéines BSP [56, 104].

De plus, les protéines BSP jouent un rôle dans la formation du réservoir de spermatozoïdes dans l'oviducte [108]. Plus précisément, les protéines BSP-A1/-A2 présentes à la surface des spermatozoïdes permettent à ces derniers de se lier aux cellules épithéliales de l'oviducte via leur interaction avec le fucose présent à la surface des cellules épithéliales [108].

Les protéines BSP sont donc bénéfiques pour le pouvoir fécondant des spermatozoïdes, car elles stimulent la capacitation et la liaison des spermatozoïdes aux cellules épithéliales de l'oviducte pour former le réservoir oviductal. Également, la présence de la protéine BSP-30kDa dans le PS est associée à l'index de la fertilité des bœufs reproducteurs et peut ainsi servir de marqueur de fertilité [109].

1.5.2. Les protéines homologues aux protéines BSP

L'utilisation d'anticorps polyclonaux dirigés contre chacune des protéines BSP a permis à notre laboratoire de détecter des protéines homologues aux protéines BSP dans le PS de plusieurs espèces de mammifères, telles que le rat, la souris, le hamster, le porc et l'humain [110]. Également, des protéines homologues aux protéines BSP ont été isolées et séquencées chez le cheval, le porc, le bélier, le bison et le bouc (Tableau I) [111-117].

Tableau I : Homologues des protéines BSP chez différents mammifères.

Espèce animale	Protéines homologues	Références
Bovin	BSP-A1/-A2; BSP-A3; BSP-30kDa	[85-87]
Bouc	GSP-14kDa; GSP-15kDa; GSP-20kDa; GSP-22kDa	[114]
Bélier	RSP-15kDa; RSP-16kDa; RSP-22kDa; RSP-24kDa	[116]
Bison	BiSV-16kDa; BiSV-17kDa; BiSV-18kDa; BiSV-28kDa	[115]
Cheval	HSP-1; HSP-2; HSP-12kDa	[111, 117]
Porc	pB1	[112]

La présence de protéines homologues aux protéines BSP dans le PS de plusieurs espèces nous laisse croire que les protéines BSP sont ubiquitaires dans le système reproducteur mâle chez les mammifères.

1.5.2.1. Les protéines du PS de bouc, de bélier, de bison et du cheval

Des protéines homologues aux protéines BSP ont été identifiées dans le PS de bouc, de bélier, de bison et de cheval, mais elles sont peu caractérisées. Chez le bouc, quatre protéines ont été isolées et ont été nommées selon leur masse moléculaire : GSP-14kDa, GSP-15kDa, GSP-20kDa et GSP-22kDa (GSP pour Goat Seminal Plasma proteins) [114]. Ces protéines représentent environ 50% des protéines totales du PS de bouc. Quatre protéines homologues aux BSP ont été isolées du PS de bélier: RSP-15kDa, RSP16kDa, RSP-22kDa et RSP-24 kDa (où RSP signifie Ram Seminal Plasma proteins) [116]. Contrairement aux homologues du bouc ou du bovin, les protéines RSP comptent pour seulement 20% des protéines totales du PS, la majorité (environ 45%) étant constituée des spermadhésines, une autre famille importante des protéines du PS. Quatre protéines homologues aux protéines BSP ont été isolées du PS de bison, soit BiSV-16kDa, BiSV-17kDa, BiSV-18kDa et BiSV-28kDa (BiSV: Bison Seminal Vesicle proteins) [115]. Les protéines BiSV, constituent environ 20% des protéines totales du PS de bison. Toutes les protéines homologues aux protéines peuvent lier la gélatine, l'héparine (sauf GSP-14kDa, GSP-15kDa et BiSV-16kDa) et la fraction de faible densité du jaune d'œuf (qui est riche en lipoprotéines de faible densité, LDL).

Les protéines majeures du PS de cheval sont nommées les HSP (pour Horse Seminal Plasma proteins). Les deux premières protéines homologues aux protéines BSP à avoir été isolées du PS de cheval sont nommées HSP-1 et HSP-2 [111]. Leur séquence et leurs propriétés de liaison sont semblables à celle des protéines BSP-A1/-A2 et BSP-A3. Récemment, une troisième protéine homologue aux protéines BSP a été isolée et nommée HSP-12kDa [117]. Ces trois protéines représentent environ 20% des protéines totales du PS de cheval. Les autres protéines HSP qui ont été identifiées dans le PS de cheval font partie de la famille des spermadhésines, soit HSP-3 et HSP-7 [118, 119].

1.6. Le porc

La suite de cette introduction portera sur le porc, plus particulièrement sur les spécificités de son système reproducteur, les protéines présentes dans le PS, ce

qui est connu sur la capacitation des spermatozoïdes porcins, la technique utilisée afin d'évaluer la capacitation pour ce projet et un bref aperçu de la production porcine et l'apport que peut avoir l'étude de la capacitation des spermatozoïdes porcins.

1.6.1. Système reproducteur du porc

Le système reproducteur du porc est composé de deux testicules, deux épидидymes et des glandes accessoires (Figure 3). Il possède des glandes de Cowper qui sont très développées, comparativement à celles de l'homme qui sont de la grosseur d'un pois [1, 9]. Ces glandes contiennent du mucus et sont reliées à l'urètre par un canal. La prostate se situe autour de l'urètre et les ampoules sont absentes [9]. De plus, le mucus sécrété par les glandes de Cowper qui est présent dans le PS du porc, permet de former un bouchon dans l'utérus et ainsi empêcher le reflux du sperme dans la cavité vaginale, ce qui favorise la fécondation [8, 9].

Chez le porc, un échantillon de sperme a un volume qui varie entre 150 et 500 ml avec une concentration en spermatozoïdes qui varie entre $25-300 \times 10^6$ cellules/ml [1]. L'échantillon de sperme porcine est volumineux et peu concentré en spermatozoïdes, comparé aux autres espèces.

1.6.2. Les protéines du PS de porc

La concentration de protéine dans le PS de porc est d'environ 30 mg/ml [1]. La majorité des protéines totales du PS appartiennent à la famille des spermadhésines [120]. Toutefois, une protéine homologue aux protéines BSP a été isolé du PS [112].

1.6.2.1. Les spermadhésines

La famille des spermadhésines comprend plusieurs protéines possédant un poids moléculaire qui varie de 12 à 16 kDa. Ces protéines sont retrouvées dans le PS et elles peuvent s'associer à la surface des spermatozoïdes de porc, de bovin d'humain et de cheval [120]. Les spermadhésines possèdent un domaine CUB et ont des propriétés de liaison pour les oligosaccharides, les GAGs sulfatés, comme l'héparine, les phospholipides et les inhibiteurs de sérine protéase [120]. Les

spermadhésines lient les phosphatidyléanolamines présents à la surface des spermatozoïdes [121] et la zone pellucide, suggérant qu'elles peuvent servir de récepteur pour la reconnaissance entre le spermatozoïde et l'ovocyte [120]. Également, les spermadhésines ont un rôle à jouer dans la liaison entre les spermatozoïdes et l'épithélium de l'oviducte [122].

Sept spermadhésines ont été identifiées jusqu'à présent dans le PS de porc : AQN-1, AQN-2, AQN-3, AWN-1, AWN-2, PSP-I et PSP-II (revue en [120]). Les spermadhésines sont nommées selon les trois premiers acides aminés de leur extrémité N-terminale, sauf pour les protéines PSP-I et PSP-II où PSP signifie « Porcine Seminal Plasma protein » [123]. Les spermadhésines sont des protéines glycosylées (à l'exception d'AQN-1) et basiques [121]. Elles sont sécrétées par les vésicules séminales, sauf pour AWN-I qui est produit par les rete testis et les tubuli recti des testicules [120]. La protéine AWN-1 est impliquée dans la liaison entre le spermatozoïde et l'ovocyte durant la fécondation [120]. Étant donné que les spermadhésines sont relâchées de la surface des spermatozoïdes durant la capacitation et qu'elles peuvent lier l'héparine, il a été suggéré qu'elles auraient un rôle à jouer dans la capacitation [121]. Les protéines PSP-I et PSP-II ont des effets proinflammatoires et jouent un rôle dans la réponse immunitaire dans l'environnement utérin [124].

1.6.2.2. La protéine pB1

En 1997, Calvete et al. [112] ont identifié une protéine du PS porcine qui était homologue aux protéines BSP. Elle a pu être isolée et purifiée par chromatographie d'affinité à l'héparine, puis sur colonne phosphorylcholine-agarose et finalement par rp-HPLC [112]. Cette protéine a été nommée pB1 (protein boar 1). Des analyses de séquence ont démontré que cette protéine avait déjà été identifiée auparavant par Hadjisavas et al. [125]. En effet, ces derniers ont identifié une protéine de 15 kDa, pAIF-1 (porcine Adhesion Inducing Factor-1), qui induit l'adhésion des leucocytes dans les vésicules séminales de porc pendant la réaction inflammatoire [125]. La séquence en N-terminal de la protéine de l'article de Hadjisavas est la même que

celle de pB1 [112, 125, 126]. La protéine pB1 est aussi nommée DQH pour les trois premiers acides aminés retrouvés du côté N-terminal [123].

La protéine pB1 est constituée de 105 acides aminés. Sous forme de précurseur, pB1 possède 130 acides aminés, dont 25 appartiennent au peptide signal [127]. Elle est sécrétée par les vésicules séminales [127], est une protéine *O*-glycosylée [112] et possède plusieurs glycoformes [126]. Elle possède un poids moléculaire de 12,7 kDa lorsqu'elle n'est pas glycosylée et d'environ 13 kDa pour les différentes glycoformes [126]. pB1 possède 8 résidus cystéine qui forment quatre ponts disulfure. Tout comme les protéines BSP, pB1 possède deux domaines de type II qui sont placés en tandem [112]. La protéine pB1 peut donc lier la gélatine [123], les phosphorylcholines, l'héparine, les GAGs semblables à l'héparine (chondroïtine sulfate) [128] et la fraction de faible densité des lipoprotéines du jaune d'œuf [117]. pB1 peut aussi lier la zone pellucide [128]. La séquence d'acides aminés de la protéine pB1 est identique à 26-47% et est similaire à 36-65% avec celles des protéines BSP (Figure 7). Contrairement aux protéines BSP, la protéine pB1 est basique avec un PI de 8,6 [123]. La protéine pB1 représente de 0,6 à 1,5% des protéines totales du PS porcin [127]. Le rôle biologique de pB1 n'a pas encore été étudié.

1.6.2.3. Formation de complexes protéiques dans le PS porcin

Calvete et al. [112] ont démontré que la protéine pB1 et la spermadhésine AQN-1 formaient un complexe stœchiométrique de 35-40 kDa qui pouvait être dissocié grâce à des interactions avec les phosphorylcholines. D'autres études ont démontré l'existence d'agrégats entre les différentes spermadhésines retrouvées dans le PS et la protéine pB1 [128, 129]. Plusieurs combinaisons de protéines ont été observées, mais peu d'études ont vérifié si ces agrégats étaient biologiquement actifs avec un rôle spécifique ou s'ils étaient des artéfacts produits par la purification ou la manipulation des échantillons. Les spermadhésines PSP-I et PSP-2 exercent leur rôle proinflammatoire sous forme de monomères ou d'hétérodimères [130].

A

```

          *      20      *      40      *      60
BSP-A1/-A2 : MALQLGLFLIAGVSVFLQLDFVHGDQDEG----- : 30
BSP-A3      : MALRLGLFLIAGVSMFLQLDFVHGDQLSEDN----- : 33
BSP-30kDa   : MALPLGLFLIAGASVFLQLDFVHGGDIPDPGSKPTPPGMADELPTETDYDLPEIYTTTFLPRTI : 65
pB1         : MAPRLGIFLLIAGVSVFLPLDFVHGDQHLPG----- : 31

          *      80      *      100     *      120     *
BSP-A1/-A2 : -----VSTEPTQDGPALPEDEECVFFPFWTRNRHFDCTVHGSLSPMCSLDADYVGR : 82
BSP-A3      : -----VILPKKKDPASGAEIKGNKCVFFPFWTRNRHFDCTVHGSLSPMCSLDADYVGR : 87
BSP-30kDa   : YPQEEMPYDDKPPFPLLKANDLNAYFEGPACAFPEITKCKRYMCDRKNVLLMCSLDTEIQEN : 130
pB1         : -----RFLTPALITSQDKVFPFTRKGNLHFDCTVHGSLSPMCSVITTYVGR : 77

          140      *      160      *      180
BSP-A1/-A2 : MRYDAQRDYAKCVPEPFLYGGKRYETDDEKCSMMMS-MCSLSPVITKGRAMRYG : 134
BSP-A3      : MRYC TKNDYAKCVPEPFLYGGKRYETDDEKCSMMMS-MCSLSPVITKGRAMRYG : 140
BSP-30kDa   : MRYC TERDEPECVPEPFLYRKPSVETDTRVHSPFRRMCSLTSNVLPRKAMRYG : 183
pB1         : MRYCRSTLYAKCALPFLPRGPEFDCIDKGGVSKYMCPTIPNLOBRAMRYG : 130

```

B

	BSP-A1/-A2	BSP-A3	BSP-30kDa	pB1
BSP-A1/-A2	109	58%	31%	44%
		69%	43%	65%
BSP-A3	67	115	32%	47%
		80	41%	60%
BSP-30kDa	49	52	158	26%
		68	66	36%
pB1	49	55	42	105
		73	70	57

L'identité et la similarité des séquences ont été calculées à partir des protéines matures (le peptide signal a été exclus).

	BSP-A1/-A2	BSP-A3	BSP-30kDa	pB1
BSP-A1/-A2	86	73%	54%	52%
		83%	73%	75%
BSP-A3	64	87	57%	56%
		73	70%	68%
BSP-30kDa	47	50	87	47%
		64	61	63%
pB1	46	49	41	87
		66	60	55

L'identité et la similarité des séquences ont été calculées à partir des deux domaines de type II (le peptide signal et la partie N-terminale ont été exclus).

Figure 7: Comparaison entre la séquence d'acides aminés des protéines de la famille des protéines BSP et celle de pB1. (A) Alignement des séquences. (B) Identité et similarité entre les séquences d'acides aminés. Pour chaque protéine, la ligne du haut représente l'identité et la ligne du bas la similarité entre chaque paires comparées. En dessous de la diagonale, la ligne du haut représente le nombre d'acides aminés identiques et la ligne du bas représente le nombre d'acides aminés similaires entre chaque paires.

1.6.3. Mécanismes impliqués dans la capacitation des spermatozoïdes porcins

1.6.3.1. Rôle du HCO_3^-

Le HCO_3^- est un élément essentiel pour la capacitation des spermatozoïdes porcins *in vitro*. Il entraîne une altération de l'architecture des lipides de la membrane plasmique, stimule la motilité et augmente la phosphorylation sur tyrosine de protéines en absence de Ca^{2+} extracellulaire [22, 131-133]. Le HCO_3^- entraîne une réponse qui est très rapide. En effet, 60 sec après l'ajout de HCO_3^- le niveau d'AMPc intracellulaire est à son maximum et après 90 sec, il y a une augmentation de la phosphorylation sur sérine/thréonine dépendante de la PKA, de protéines ayant des masses moléculaires de 59, 64 et 96 kDa [23]. Quelques minutes plus tard, le niveau d'AMPc et la phosphorylation des protéines diminuent, pour augmenter à nouveau, mais de façon plus lente par la suite. Une augmentation de phosphorylation sur tyrosine dépendante du HCO_3^- des protéines de spermatozoïdes commence après 60 min d'incubation [133]. La phosphorylation sur tyrosine d'une protéine ayant une masse moléculaire de 32 kDa est corrélée avec la capacitation des spermatozoïdes porcins [134]. Cette protéine phosphorylée a ensuite été identifiée comme étant sp32, une protéine impliquée dans la maturation de la (pro)acrosine [135]. De plus, le HCO_3^- induit le mouvement des phospholipides entre les feuillettes de la bicouche membranaire des spermatozoïdes porcins et ceci facilite l'extraction de cholestérol, qui est importante pour la capacitation [131, 133, 136].

1.6.3.2. Rôle de l'efflux de cholestérol

Shadan et al. [137] ont démontré qu'un efflux d'environ 70% du cholestérol de la membrane des spermatozoïdes porcins induit par 5 mM de méthyl- β -cyclodextrine, entraîne une augmentation du nombre de spermatozoïdes capités et induit la phosphorylation sur tyrosine de deux protéines de 15 et 26 kDa. Tel que mentionné à la section 1.4.3, la BSA doit être présente dans le milieu capacitant pour accepter le cholestérol qui est relâché de la membrane des spermatozoïdes pendant la capacitation *in vitro* des spermatozoïdes de souris, de hamster, de bovin ainsi que d'humain [25-30]. Cependant, il semble que chez le porc, la présence de

BSA dans le milieu capacitant ne soit pas absolument nécessaire pour la capacitation des spermatozoïdes porcins *in vitro* [138, 139]. Les spermatozoïdes porcins éjaculés peuvent capiter *in vitro* dans un milieu capacitant ne contenant pas de BSA, possiblement parce que le ratio cholestérol/phospholipides de la membrane plasmique des spermatozoïdes porcins est relativement bas, comparé aux autres espèces (voir section 1.4.3.) [139]. L'albumine n'est probablement pas requise pour capter le cholestérol de la membrane plasmique lors de l'efflux de cholestérol pendant la capacitation des spermatozoïdes porcins [139].

1.6.3.3. Rôle des GAGs

Les spermatozoïdes porcins ne peuvent pas être capités par 20 µg/ml d'héparine après 1,5 et 3 h d'incubation [140]. Toutefois, une concentration de 500 µg/ml de hyaluronan (un GAG non sulfaté) induit la capacitation des spermatozoïdes congelés et décongelés, mais sans induire la réaction d'acrosome lors d'expériences de fécondation *in vitro* [141]. L'effet des autres GAGs semblables à l'héparine sur la capacitation des spermatozoïdes porcins n'est pas connue.

1.6.4. Évaluation de la capacitation des spermatozoïdes porcins

Des techniques basées sur l'observation de l'intégrité de l'acrosome ont été développées pour évaluer la capacitation des spermatozoïdes. La population de spermatozoïdes qui a été incubée dans un milieu capacitant possède toujours un petit nombre de spermatozoïdes qui a subi la réaction de l'acrosome et ils sont considérés comme des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome spontanément [142]. La réaction de l'acrosome peut être induite chez des spermatozoïdes capités par divers agents naturels, tel que la zone pellucide solubilisée [72, 143] ou par des agents pharmacologiques, tel que l'ionophore calcique A23187 [144]. Ainsi, afin d'évaluer le % de spermatozoïdes capités, il faut soustraire le % de spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome spontanément au % de spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome induite par un agent.

L'intégrité de l'acrosome est observée grâce à la coloration au chlortétracycline (CTC). L'antibiotique CTC est un composé fluorescent qui permet

d'obtenir différents patrons qui dépendent du statut acrosomal et de la capacitation des spermatozoïdes [145]. Le CTC a été utilisé la première fois pour les spermatozoïdes de souris [146] et les patrons de fluorescence ont été associés avec les différents stades de la capacitation quelques années plus tard par Ward et Storey [147]. Le CTC entre dans les compartiments intracellulaires qui contiennent beaucoup de Ca^{2+} . Sous forme d'anion, il lie le Ca^{2+} ce qui le rend plus fluorescent [148]. Le complexe CTC- Ca^{2+} lie de façon préférentielle les régions hydrophobiques de la membrane cellulaire, créant les différents patrons observés chez les spermatozoïdes. Wang et al. [138] ont mis au point la technique de CTC pour les spermatozoïdes de porc. D'autres méthodes sont employées pour évaluer l'intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes porcins, comme l'utilisation de lectines fluorescentes telle que PSA-FITC [149], ou encore l'utilisation d'une triple coloration [150].

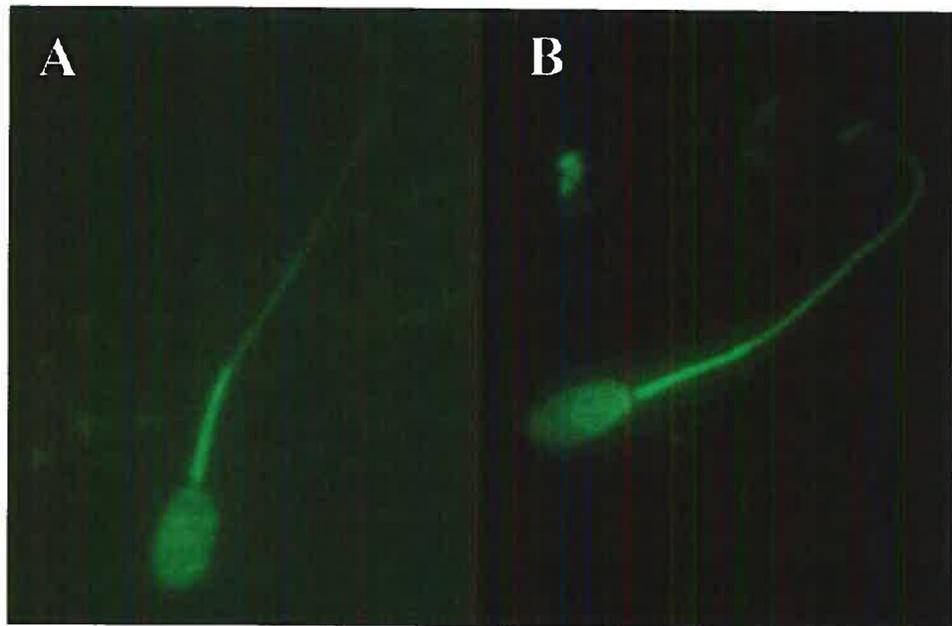


Figure 8: Profil de CTC des spermatozoïdes épидидymaires porcins. (A) Spermatozoïde n'ayant pas subi la réaction de l'acrosome. (B) Spermatozoïde ayant subi la réaction de l'acrosome.

Le spermatozoïde porcine qui n'a pas subi la réaction de l'acrosome est fluorescent sur toute la tête et celui qui a subi la réaction de l'acrosome n'est presque plus fluorescent, sauf pour une mince bande au segment équatorial (Figure 8).

Des patrons de fluorescence intermédiaires existent, (par exemple, des spermatozoïdes capacités) d'où l'importance d'établir des règles strictes lorsque l'on classe les spermatozoïdes et de compter de la même façon à chaque expérience.

1.6.5. La production porcine

La consommation mondiale de viande de porc est très élevée, représentant environ 40% de toutes les viandes rouges consommées [151]. Selon les statistiques de FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; <http://www.fao.org/>), la production porcine a augmentée de 73 à 94 millions de tonnes métriques durant les 10 dernières années. Les dernières statistiques disponibles sur l'industrie du porc au Québec montrent que pour l'année 2003, il y a eu une production de 7,5 millions de porcs, ce qui représente 889 millions de dollars en exportation et 3,1 milliards de dollars en retombées économiques (source : Fédération des producteurs de porc du Québec; <http://www.leporcduquebec.qc.ca/fppq/prod-4.html>). L'industrie porcine connaît une hausse de productivité qui est assez récente et qui est due aux connaissances acquises dans les domaines de la nutrition, de la reproduction, de la génétique, du contrôle des parasites et des maladies [151]. Également, la production de porc a pu être optimisée grâce à l'utilisation de l'insémination artificielle (IA).

L'IA est une technique qui est pratiquée depuis une cinquantaine d'année et elle possède plusieurs applications [152]. Elle peut être utilisée pour la conservation des espèces en voie d'extinction, la recherche, le traitement de l'infertilité et également pour l'optimisation de la productivité des animaux de consommation [152]. L'IA est la seule technique utilisée par les producteurs de porc pour la reproduction de ces animaux. Les techniques de reproduction doivent être efficaces et sans danger pour la santé des animaux afin de pourvoir à la demande de l'industrie alimentaire.

La technique de cryoconservation des spermatozoïdes permet de conserver et entreposer des spermatozoïdes pendant de longues périodes de temps dans de l'azote liquide à -196°C jusqu'à son utilisation pour l'IA (revue en [153]). Chez le porc, la technique de cryoconservation n'est pas optimisée. Les spermatozoïdes porcins sont

très vulnérables au froid [154]. En effet, les échantillons de sperme de verrat qui sont congelés et par la suite décongelés sont peu utilisables, car le taux de fécondation obtenu avec les spermatozoïdes décongelés est très bas. Par conséquent, les doses d'insémination doivent être de 2 à 3 fois plus concentrées en spermatozoïdes pour obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec un échantillon de sperme frais [151]. Le refroidissement et la congélation des spermatozoïdes porcins entraînent des changements membranaires qui s'apparentent à ceux observés durant la capacitation [132]. De plus, un échantillon de sperme qui est conservé plus de 5 jours à 15-20°C entraîne une baisse du taux de fécondation et du nombre de porcelets par portée [154]. La majorité des producteurs de porc doivent donc utiliser un échantillon de sperme frais qui a été dilué et gardé à 15-20 °C pour l'IA [154].

L'optimisation de la cryopréservation des échantillons de sperme de porc est importante pour permettre la conservation des spermatozoïdes porcins sur de longues périodes et ainsi faciliter l'accès aux échantillons de sperme d'individus performants qui pourraient être vendus partout à travers le monde. De plus, ceci permettrait de conserver plus efficacement un échantillon de sperme et de produire un plus grand nombre de doses d'insémination, ce qui permettrait aux agriculteurs de diminuer le nombre de verrats sur leur ferme et par conséquent, de diminuer la quantité de lisier produit par ces animaux qui est néfaste pour l'environnement (revue en [155]). Pour améliorer l'IA chez le porc, il est nécessaire de comprendre les mécanismes qui sont impliqués dans l'obtention du pouvoir fécondant des spermatozoïdes porcins. La capacitation est une étape importante de l'obtention du pouvoir fécondant. De plus, puisque la cryopréservation amène à des changements qui s'apparentent à la capacitation, la compréhension des mécanismes de la capacitation vont aider à comprendre ce qui se produit pendant la cryopréservation.

1.7. Objectifs du projet

Il est connu que le PS des mammifères contient plusieurs facteurs qui peuvent être bénéfiques ou néfastes pour la capacitation des spermatozoïdes. Peu d'études ont été effectuées sur le rôle des diverses protéines qui se retrouvent dans le

PS de porc. Notre laboratoire s'intéresse aux protéines BSP, qui sont les protéines majoritaires du PS bovin. Ces protéines stimulent la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins. Une protéine homologue aux BSP, la protéine pB1 a été précédemment isolée et caractérisée, mais son rôle biologique est inconnu. Nous croyons qu'elle pourrait jouer un rôle similaire à celui joué par les protéines BSP dans la capacitation des spermatozoïdes bovins.

Le but de mon projet consistait à étudier le rôle de la famille des protéines BSP dans la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins afin de pouvoir établir un modèle du processus de capacitation chez le porc. Le premier objectif de ce projet était d'isoler et de purifier la protéine pB1 du PS porcine à partir d'une nouvelle méthode de purification en utilisant les techniques classiques de chromatographie. Le second objectif de ce projet était de vérifier l'effet qu'avait la protéine pB1 et la protéine BSP-A1/-A2 sur la capacitation des spermatozoïdes porcins.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

L'ionophore calcique A23187 a été acheté chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). L'acrylamide et la bisacrylamide ont été achetés de ICN (Mississauga, ON, Canada). Le sodium dodecyl sulfate (SDS), l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à la peroxydase et les autres produits d'électrophorèse provenaient de Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). L'anticorps monoclonal de souris antiphosphotyrosine P-Tyr-100 provenait de CellSignaling (Beverly, MA). Les membranes de fluorure de polyvinylidène P (PVDF, Immobulon-P) ont été achetées chez Millipore (Nepean, ON, Canada). La trousse de calibration Low Molecular Weight a été achetée chez GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada). La trousse de réactifs de chemiluminescence Western Lightning provenait de PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Tous les autres produits chimiques utilisés ont été achetés chez des fournisseurs commerciaux et étaient de grade analytique.

Les testicules et les épидидymes de porc provenaient de l'abattoir Hébert (Ste-Hélène-de-Bagot, QC, Canada). Le PS de porc était obtenu en centrifugeant un échantillon de sperme complet (provenant de FMénard Inc., Ange-Gardien, QC, Canada), à 1 500 X g durant 15 min. Le surnageant était centrifugé de nouveau à 14 000 X g durant 15 min pour obtenir un échantillon exempt de débris. Le PS était préservé à -80 °C jusqu'à son utilisation. Les protéines totales du PS de porc ont été préparées comme précédemment [114].

2.2. Méthodes

2.2.1. Milieux de culture

Le milieu capacitant (CM) était un milieu Tyrode modifié [156] composé de 96 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0.4 mM MgSO₄, 0.3 mM NaH₂PO₄, 10 µg/ml rouge de Phénol, 20 mM Hepes, 5 mM D-glucose (+), 21.6 mM lactate de sodium, 1 mM pyruvate de sodium, 15 mM NaHCO₃. Le lactate de sodium et le pyruvate de sodium ont été ajoutés juste avant l'utilisation. Le milieu a été équilibré

au moins 1 h à 39°C dans un environnement humide contenant 5% de CO₂. Le milieu non capacitant (NCM) a été préparé comme le CM excepté qu'il contenait 120 mM NaCl, et ne contenait pas de CaCl₂ et de NaHCO₃ [157]. Le NCM a été incubé dans le même incubateur que le CM dans une bouteille scellée pour prévenir la formation de HCO₃⁻. La phase gazeuse du NCM a été rafraîchie à l'extérieur de l'incubateur tous les 15 minutes [156]. Le pH des milieux a été ajusté à 7.4 avec du NaOH.

2.2.2. Capacitation des spermatozoïdes porcins

Environ 1 h après que les testicules aient été récupérés à l'abattoir, les spermatozoïdes épидидymaires ont été récoltés dans un tube en plastique en pratiquant de petites incisions dans la queue des épидидymes qui ont été préalablement lavés. Les spermatozoïdes ont ensuite été lavés deux fois (350 X g pendant 10 min) dans 10 volumes de NCM et ont été resuspendus dans le NCM afin d'obtenir une concentration de 80 X 10⁶ spermatozoïdes/ml. 500 µl de cette dilution a été incubé avec 500 µl d'une solution contenant des protéines totales du PS de porc (afin d'obtenir une concentration finale des protéines totales du PS de porc de 0 et de 250 µg/ml) ou avec du PS de porc (afin d'obtenir une concentration finale de protéines du PS de porc de 0, de 250, de 500 et de 1000 µg/ml) dans le NCM pendant 20 min, dans des tubes scellés. Par la suite, les spermatozoïdes ont été lavés deux fois (350 X g pendant 10 min) dans 10 volumes de NCM, ont été resuspendus dans le CM afin d'obtenir une concentration de 40 X 10⁶ spermatozoïdes/ml et ont été incubés à 39°C pendant 4 h dans un environnement humide contenant 5% CO₂.

2.2.3. Évaluation de la capacitation des spermatozoïdes porcins

Après 0 et 4 h incubation, 1 µl de l'ionophore A23187 0.2 mM dans le DMSO ou 1 µl de DMSO (contrôle) a été ajouté à 100 µl de la suspension de spermatozoïde et a été incubé pendant 30 min. La réaction de l'acrosome peut être induite chez les spermatozoïdes capités par l'ionophore A23187 [138, 147]. Après l'incubation avec l'ionophore, 1 µl de protamine 2 mg/ml a été ajouté aux échantillons et ils ont été incubés pendant une minute supplémentaire pour prévenir

l'agglutination des spermatozoïdes par la tête, qui est causée par la capacitation *in vitro*.

L'intégrité acrosomale des spermatozoïdes a été évaluée par la technique de coloration au CTC, comme décrit par Wang et al. pour le porc [138]. La cystéine (5 mM) et le CTC (750 μ M) ont été dissouts dans un tampon Tris-NaCl (20 mM Tris base et 130 mM NaCl), le pH a été ajusté à 7.8 et la solution gardée à 4°C dans le noir, jusqu'à son utilisation. 15 μ l de la suspension de spermatozoïdes, 22.5 μ l de la solution de CTC et 0.75 μ l de glutaraldéhyde (12.5%) ont été mélangés dans un puits préchauffé à 39°C. Deux gouttes de 15 μ l de ce mélange ont été déposées sur une lame et ont été recouvertes par une lamelle. Les lames ont été gardées dans le noir à 4°C dans un environnement humide. Les lames ont été observées avec un microscope à fluorescence Leitz Diaplan en utilisant une lumière bleue-violette (excitation à 330-380 nm, émission à 420 nm; objectif à immersion à l'huile 100X/1.25) et 100 spermatozoïdes ont été comptés par goutte pour un total de 200 spermatozoïdes par lame. Les lames ont été préparées en duplicata. Les spermatozoïdes ont été classés en deux catégories: 1) spermatozoïdes n'ayant pas subi la réaction de l'acrosome, avec de la fluorescence sur toute la tête, 2) spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome, avec une petite ligne fluorescente au segment équatorial [138].

2.2.4. Viabilité

La viabilité des spermatozoïdes a été évaluée avec la coloration éosine/nigrosine décrite par Dott and Foster [158]. Deux échantillons par traitement ont été préparés et 200 spermatozoïdes par lame ont été comptés.

2.2.5. Isolation des protéines des spermatozoïdes porcins

Des aliquots de 130 μ l de la suspension de spermatozoïdes ont été prélevés aux temps 0 et 4 h et ont été centrifugés à 12 000 X g pour 5 min à température pièce. Les culots de spermatozoïdes ont été lavés dans 1 ml PBS contenant 0.2 mM d'orthovanadate [159], resuspendus dans le tampon d'échantillon [160], bouillis pendant 10 min [160] et centrifugés (12 000 X g, 6 min). Le surnageant a été enlevé

et 5% de β -mercaptoethanol a ensuite été ajouté au surnageant, puis les échantillons ont été rangés immédiatement et conservés à -80°C jusqu'au jour de l'électrophorèse.

2.2.6. Gel de polyacrylamide en condition dénaturante et immunobuvardage

Les protéines, dont la quantité équivalait aux protéines isolées d'environ 2×10^6 de spermatozoïdes épидидymaires, ont été séparées dans un gel de polyacrylamide 12% selon [160], en utilisant un appareil Mini protean III de Bio-Rad. Les protéines du gel ont ensuite été transférées sur des membranes de PVFD, comme décrit précédemment [161], en utilisant un appareil Trans-Blot de Bio-Rad. Les protéines ont été détectées en utilisant un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre les phosphotyrosines (1:10 000).

2.2.7. Évaluation de la quantité de protéines

La quantité de protéines présente dans un échantillon de PS ou de protéines a été mesurée en utilisant la méthode de Lowry modifiée [162] ou en pesant des protéines avec une microbalance Cahn (modèle C-31, Fisher Scientific, St.-Laurent, QC, Canada).

2.2.8. Statistiques

Les données ont été testées pour une différence significative par le test t de Student pour les données pairées. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

3. Résultats

3.1. Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/A2, protein members of the BSP protein family (2006) Lusignan, M.-F., Bergeron, A., Lazure, C. and Manjunath, P., *sera soumis à Molecular Reproduction and Development.*

Préambule:

Le rôle des protéines homologues aux protéines BSP dans la capacitation des spermatozoïdes n'a jamais été étudié. Dans le PS de porc, une seule protéine homologues aux protéines BSP a été identifiée (pB1) et son rôle biologique n'est pas connu. Étant donné l'homologie qui existe entre les protéines appartenant à la famille des protéines BSP, il est possible qu'elles aient le même effet sur la capacitation des spermatozoïdes porcins. Dans la présente étude, nous avons isolé et purifié pB1 à partir du PS de porc par une nouvelle méthode efficace : chromatographie d'affinité à la chondroïtine sulfate B et rp-HPLC. Cette méthode nous a permis d'obtenir une protéine pure. Nous avons ensuite étudié l'effet de pB1 sur la capacitation des spermatozoïdes porcins. La protéine pB1 a induit la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins. Son effet a été maximal lorsque les spermatozoïdes ont été pré-incubés avec une concentration de 10 µg/ml de pB1 (13,8% de spermatozoïdes ont subi la réaction de l'acrosome après l'induction avec l'ionophore A23187 versus 6,0% pour le contrôle, les spermatozoïdes pré-incubés sans protéines). Toutefois, à une concentration plus élevée de pB1 (20 µg/ml), il n'y avait pas une augmentation de capacitation à comparer au contrôle. La pré-incubation des spermatozoïdes porcins avec 20 µg/ml de protéine bovine BSP-A1/A2 a induit la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins (16,1% des spermatozoïdes ont subi la réaction de l'acrosome après induction avec l'ionophore A23187 versus 7,4% pour le contrôle). Ces résultats indiquent que les protéines BSP et leurs homologues chez d'autres espèces induisent la capacitation des spermatozoïdes.

Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family*

Marie-France Lusignan¹, Annick Bergeron¹, Claude Lazure² and Puttaswamy Manjunath^{1,3}

¹*Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Department of Medecine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada*

²*Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Quebec, Canada*

Running Title: Seminal plasma proteins induce sperm capacitation

*This work is supported by the Canadian Institutes of Health Research.

³To whom correspondence should be addressed: Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boulevard de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada H1T 2M4 Tel.: 514-252-3562 or 514-252-3400 (ext. 3329). Fax: 514-252-3430.

SUMMARY

A family of proteins designated BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 and BSP-30kDa, collectively called BSP proteins, constitute the major protein of the bull seminal plasma. BSP proteins can stimulate sperm capacitation. Boar seminal plasma contains one homologous protein to the BSP family, pB1, but its physiological role is still unknown. In the current study, we report a novel method to purify pB1 from boar seminal plasma by chondroitin sulfate B-affinity chromatography and rp-HPLC. We also studied the effect of pB1 and BSP-A1/-A2 on sperm capacitation. Boar epididymal sperm were washed and incubated in non-capacitating medium containing pB1 (0, 2.5, 5, 10 or 20 $\mu\text{g/ml}$) or BSP-A1/-A2 (0 or 20 $\mu\text{g/ml}$) proteins and then washed and incubated in capacitating medium. Acrosomal integrity was assessed by CTC staining. The status of capacitation of sperm was evaluated by the capacity of sperm to undergo the acrosome reaction initiated by the addition of calcium ionophore A23187. The results demonstrated that pB1 and BSP-A1/-A2 increased epididymal sperm capacitation as compared to control (sperm pre-incubated without proteins). This effect reached a maximum level at 10 $\mu\text{g/ml}$ pB1 and at 20 $\mu\text{g/ml}$ BSP-A1/-A2 (2.3 and 2.2 fold higher than control, respectively). These results indicate that the BSP proteins and their homologs in other species induce sperm capacitation in a similar way.

INTRODUCTION

Bovine seminal vesicles secrete a family of lipid-binding proteins designated BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 and BSP-30-kDa (collectively called BSP proteins) [1, 2]. BSP proteins contain two similar type-II domains arranged in tandem [3-5] that give them binding properties to choline phospholipids [6], high density lipoprotein (HDL; [2, 7]), glycosaminoglycans (GAGs; such as heparin, heparan sulfate and chondroitin sulfate B [8, 9]) and gelatin [2, 10]. These binding properties can be used to isolate BSP proteins from bovine seminal plasma [8-10].

BSP proteins play a role in bovine sperm capacitation (reviewed in [11]) which is a multistep process that the sperm must undergo to be able to fertilize eggs. This process consists of many biochemical and physiological changes that occur in sperm during their transit through the female reproductive tract [12-14]. The general mechanism of capacitation proposed by our laboratory includes modification of the sperm membrane by BSP proteins [11]. At ejaculation, BSP proteins are mixed with sperm, bind to choline phospholipids of the sperm membrane and stimulate a first phospholipid and cholesterol efflux from the sperm membrane [15]. As sperm reach the oviduct, they encounter follicular and oviductal fluids. Heparin-like GAGs and HDL are components of the oviductal and follicular fluid, found in the female reproductive tract that induce sperm capacitation [16-24]. Interestingly, our studies showed that BSP proteins potentiate capacitation induced by heparin [25] and by HDL [24]. HDL could then interact with sperm-bound BSP proteins, which would result in further removal of phospholipids and cholesterol leading to the capacitation state. Alternatively, heparin-like GAGs could interact with sperm-bound BSP proteins and promote capacitation [9], which involves protein tyrosine phosphorylation [26]. In addition, BSP-A1/-A2 proteins also play a role in the formation of the oviductal sperm reservoir because it enables sperm to bind the oviductal epithelium [27].

Proteins homologous to the BSP proteins have been found in the seminal plasma of other mammalian species such as stallion [28, 29], goat [30], bison [31], ram [32] and boar [33]. BSP-like antigens have also been found in mouse, human,

hamster and rat [2, 34]. The role of BSP homologs in other mammalian species is not documented.

Only one BSP protein homolog has been isolated from boar seminal plasma to date (pB1) [29, 33]. pB1 represents ~ 1.1% of total boar seminal plasma proteins [35], contains 105 amino acids, possess different glycoforms and its molecular weight is 12.6 kDa and 13.0-13.4 kDa for the glycosylated forms [33, 36]. pB1 and BSP proteins share 36-65% sequence similarity. Similar to BSP proteins, pB1 contains a tandem of type II domains and binds to heparin, chondroitin sulfate, phosphorylcholine [33, 37] and epididymal boar sperm [38]. However, the physiological role of pB1 is unknown.

Boar sperm capacitation is not fully elucidated. As in many mammals, boar sperm capacitation requires Ca^{2+} [39] and bicarbonate (HCO_3^-) [40], which induce changes in plasma membrane architecture [41], increase sperm motility [42] and sperm protein tyrosine phosphorylation [43-45]. Reorganization of the membrane lipid architecture induces cholesterol and phospholipid efflux [46], required for boar sperm capacitation. The presence of oviductal fluid in the capacitating medium increase the proportion of capacitated and acrosome reacted boar sperm, but heparin alone cannot induce sperm capacitation *in vitro* [47]. The non-sulfated GAG, hyaluronan, can induce boar sperm capacitation but without inducing acrosome reaction [48]. However, the effects of other sulfated GAGs and HDL on boar sperm capacitation have not yet been studied. Further studies are required in order to understand the molecular mechanisms involved in boar sperm capacitation.

In the present study, we hypothesized that proteins of the family of BSP proteins stimulate boar sperm capacitation. First, we isolated and purified pB1 from porcine seminal plasma by a new efficient method (chondroitin sulfate B affinity chromatography followed by rp-HPLC) and we tested if pB1 potentiates capacitation of epididymal porcine sperm. Second, we wanted to test the hypothesis that BSP-A1/-A2 isolated from bovine seminal plasma could also potentiate capacitation of epididymal boar sperm.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Chondroitin sulfate B, BSA, calcium ionophore A23187 and Freund's adjuvant (complete and incomplete) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Acrylamide and bisacrylamide were purchased from ICN (Mississauga, ON, Canada). Affi-Gel 15, sodium dodecyl sulfate (SDS), goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated and other electrophoresis products were from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). Immobilon-P polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes were purchased from Millipore (Nepean, ON, Canada). Low Molecular Weight Calibration kit was from GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada). Western Lightning Chemiluminescence Reagent Kit was from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). HPLC grade trifluoroacetic acid (TFA) was from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). All other chemicals used were of ultra pure grade and obtained from local suppliers.

Boar testis and epididymides were obtained from Abattoir Hébert (Ste-Hélène-de-Bagot, QC, Canada). Boar seminal plasma was obtained by centrifuging a pool of 3-4 complete ejaculates, obtained from FMénard Inc. (Ange-Gardien, QC, Canada), at 1 500 X g for 15 min. The supernatant was further centrifuged at 14 000 X g for 15 min to obtain clear seminal plasma. The seminal plasma was preserved at -80 °C in aliquotes of 3 ml until used. Boar seminal plasma total proteins were prepared as previously [30].

Chondroitin Sulfate B-Agarose affinity chromatography

Chondroitin sulfate B was previously coupled to Affi-gel 15 as described earlier [9] with the exception that about 28.5 mg of commercial chondroitin sulfate B in 5.5 ml of 0.1 M MES pH 6.7 was used for coupling with 7.5 ml of Affi-Gel 15. All purification steps were performed at 4°C. Frozen seminal plasma (3 ml) was thawed, centrifuged at 10 000 X g for 10 min and the supernatant was loaded onto a chondroitin sulfate B column (1.0 cm X 8.6 cm), previously equilibrated with 10 volumes of 50 mM phosphate buffer saline (PBS). Once the sample entered the

column, the flow was stopped for 20 min to allow proteins to bind. Following this step, the column was washed with PBS to eliminate unadsorbed and retarded proteins. The bound proteins were then successively eluted with PBS containing 1 M NaCl and with PBS containing 1 M NaCl and 7 M urea. Fractions of 2 ml were collected at a flow rate of 30 ml/h and their absorbance at 280 nm were measured. Fractions corresponding to each protein peak were pooled, dialyzed against PBS and frozen at -20°C , or dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate (fraction 3) and lyophilized.

Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography (rp-HPLC)

The proteins were analysed by rp-HPLC as described previously [32]. Lyophilized proteins from fraction 3 (100 μg) from the chondroitin sulfate B-Agarose chromatography step were dissolved in 0.1% TFA containing 6 M guanidine-HCl. Protein solution was centrifuged at 10 000 X g for 10 min and the supernatant was loaded onto the column. The proteins were eluted using a gradient of 0.1% TFA in acetonitrile. Fractions of 1.0 ml were collected at a flow rate of 1 ml/min. The eluted proteins were monitored at 235 nm and dried under vacuum for biochemical analysis and capacitation study.

Culture Medium

The capacitating medium (CM) was a modified Tyrode's medium [49] and was composed of 96 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 0.4 mM MgSO_4 , 0.3 mM NaH_2PO_4 , 10 $\mu\text{g/ml}$ Phenol Red, 20 mM HEPES, 5 mM D-glucose (+), 21.6 mM sodium lactate, 1 mM sodium pyruvate, 15 mM NaHCO_3 . Sodium lactate and sodium pyruvate were added before use. The medium was equilibrated at least 1 h before experiment at 39°C in a humidified atmosphere that contained 5% CO_2 . The noncapacitating medium (NCM) had the same composition as the capacitating medium except that it contained 120 mM NaCl and no CaCl_2 and NaHCO_3 [50]. NCM was incubated in the same incubator in air-tight sealed flasks to prevent formation of bicarbonate. The gas phase in the air-tight sealed flasks was refreshed outside the incubator every 15 minutes [49]. pH of the media was adjusted at 7.4 with NaOH.

Sperm capacitation

Approximately an hour after the testis were collected, epididymal sperm were recovered in a plastic tube by making small incisions in the cauda of the epididymidis, sperm were then washed twice ($350 \times g$ for 10 min) in 10 volumes of NCM and resuspended in NCM in order to adjust sperm concentration to 80×10^6 spermatozoa/ml. 500 μ l of this dilution was incubated with 500 μ l of a solution containing different concentrations of pB1 protein or BSP-A1/-A2 protein (final concentration of pB1 : 0, 2.5, 5, 10 and 20 μ g/ml; BSP-A1/-A2: 0 and 20 μ g/ml) in NCM for 20 minutes in air-tight sealed flasks. Spermatozoa were then washed twice ($350 \times g$ for 10 min) in 10 volumes of NCM and resuspended in CM at a sperm concentration of 40×10^6 spermatozoa/ml and incubated at 39°C for 4 h in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Evaluation of sperm capacitation

After 0 and 4 h incubation, 1 μ l of 0.2 mM ionophore A23187 in DMSO or DMSO alone (as control) was added to 100 μ l of sperm suspension and incubated for 30 min. Acrosome reaction in capacitated sperm can be induced by ionophore A23187 [51, 52]. After incubation with ionophore, 1 μ l of 2 mg/ml protamine was added to sample and incubated for an additional minute to prevent sperm head-to-head agglutination caused by *in vitro* capacitation.

Acrosome integrity was evaluated with the chlorotetracycline (CTC) assay as described for boar by Wang et al. [52]. Briefly, cysteine (5 mM) and CTC (750 μ M) were dissolved in Tris-NaCl buffer (20 mM Tris base and 130 mM NaCl), pH 7.8 and the solution was kept at 4°C in dark until used. 15 μ l of sperm suspension, 22.5 μ l of CTC solution and 0.75 μ l of glutaraldehyde (12.5%) were mixed in a well preheated at 39°C. Two 15 μ l droplets of this mixture were placed on a slide and covered with a cover slip. The slides were kept in the dark at 4°C in a humid environment. The slides were then observed with a Leitz Diaplan fluorescent microscope under blue-violet illumination (excitation at 330-380 nm, emission at 420 nm; 100X/1.25 oil immersion objective) and 100 spermatozoa were counted on each droplet for a total of 200 spermatozoa by slide. Two samples by treatments

were assayed. Sperm were divided into two categories: acrosome reacted with only a small fluorescent line at the equatorial segment and non acrosome reacted with fluorescence everywhere on the head [52].

Viability

Viability was established with eosin/nigrosin coloration as described by Dott and Foster [53]. Two samples by treatment and 200 sperm by sample were assayed.

Antiserum generation against pB1

A peptide of 15 amino acids corresponding to C-terminal amino acids of pB1 (TVTPNYDRDRAWKYC) was synthesised and conjugated to Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) at Centre de Biotechnologie Sheldon (Montreal, QC, Canada). New Zealand rabbits were injected hypodermically with a mixture composed of 200 µg of conjugated peptide dissolved in 100 µl PBS 50 mM, 400 µl sterile 0.9% NaCl and 500 µl of Freund's complete adjuvant. The boost were performed at 10-day intervals over a period of 88 days, with 200 µg of the same antigen in the same mixture with the exception that Freund's complete adjuvant was replaced by incomplete Freund's adjuvant. Bleedings were done 15 days after each injection. Antiserum from the third boost was used for the present study. Animals were treated in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care.

SDS-PAGE and Immunoblotting

Proteins were reduced, denatured and separated in 15% polyacrylamide gels according to Laemmli [54], using the Mini protean III apparatus from Bio-Rad. Proteins from the gel were then either stained with Coomassie Blue or transferred electrophoretically to PVDF membranes as described previously [55], using a Trans-Blot apparatus from Bio-Rad for immunodetection. Proteins were detected by using antiserum directed against pB1 (1:1000). Molecular mass was estimated by comparison with the Low Molecular Weight Calibration Kit containing phosphorylase b (M_r 97 000), albumin (M_r 66 000), ovalbumin (M_r 45 000), carbonic anhydrase (M_r 30 000), trypsin inhibitor (M_r 20 100) and α -lactalbumine (M_r 14 400).

Protein Sequencing

Following the transfer of those proteins that were separated by SDS-PAGE to an Immobilon-P membrane, the Coomassie Blue stained proteins band was cut and placed in the sequenator reactor. Sequencing was carried out according to the manufacturer's protocol using an Applied Biosystems Procise sequencer (model 494).

Protein Assay

The protein content of the samples was measured by a modified Lowry method [56] or by weighing on a Cahn microbalance (Model C-31, Fisher Scientific, St.-Laurent, QC, Canada).

Data analysis

The data were tested for significant difference by Student's *t*-test on paired observations. Value of $p < 0.05$ was consider as statistically significant.

RESULTS

Chondroitin Sulfate B-agarose chromatography of boar seminal plasma

Figure 1A shows the chondroitin sulfate B-Agarose chromatography pattern of boar seminal plasma proteins. The proteins were eluted in three peaks: unadsorbed (fraction 1), retarded (fraction 2) and adsorbed (fraction 3) proteins. The proportion of proteins found in fraction 1, 2, and 3 was approximately 98:1:0.5, respectively. The recovery of the total proteins was about 85% of the starting material following chondroitin sulfate B-Agarose chromatography. SDS-PAGE analysis of fraction 1 showed that the majority of proteins did not bind to the column (Fig. 1B). A group of proteins with molecular masses from 14 to 18 kDa were found in fraction 1, 2 and 3. A protein with an apparent molecular mass of 14 kDa was more predominant in fraction 3. Immunoblot shows that pB1 protein is found in all fractions eluted from the chondroitin sulfate B-Agarose chromatography (Fig. 1C). In fraction 1, there were two protein bands that were detected by anti-pB1 antiserum. The major quantity of pB1 was found in fraction 3. Since our goal was to accumulate a large quantity of pB1 and fraction 1 still contained pB1 as shown by immunoblot, we reran fraction 1 onto chondroitin sulfate B-Agarose column (result not shown). The recovery of pB1 was about 20-35% of total proteins for the first run and 20-35% for the second run.

Purification of pB1 by rp-HPLC

pB1 protein present in fraction 3 was further purified by rp-HPLC (Fig. 2). The elution pattern of fraction 3 showed the presence of a major protein peak that eluted around 25 min. The first large peak that eluted around 5 min contains only salts (results not shown). Protein fractions were pooled as described on the Figure 2 and the identity of the major peak was determined by immunoblot with antiserum directed against pB1 (Fig. 2, inset). SDS-PAGE pattern of rp-HPLC fraction II shows that it corresponds to one protein band of 14 kDa (Fig. 3). The protein impurities of 16 and 18 kDa visible in Figure 1B, lane 5 are not present in the SDS-PAGE of rp-HPLC fraction II. Furthermore, the first 15 amino acids at the N-

terminal end were identified and they correspond to the N-terminal sequence of pB1 (Fig. 4).

Capacitation of epididymal sperm by pB1 protein

Epididymal boar sperm were pre-incubated 20 min with the highly purified pB1 protein, washed, and reincubated in capacitating media for 4 h, and the acrosome reaction was induced in capacitated sperm by addition of ionophore A23187 for 30 min. As shown in Figure 5A, pB1 protein allowed the epididymal boar sperm to undergo the acrosome reaction induced by ionophore A23187. This effect was dose-dependent with a maximum level at 10 $\mu\text{g/ml}$ pB1 protein that was approximately 2.3 times (13.8%) the stimulation rate of control without pB1 protein (6.0%). However, at higher pB1 protein concentration (20 $\mu\text{g/ml}$), the acrosome reaction induced by ionophore A23187 is equivalent to the level of the control. Spontaneous acrosome reaction (without ionophore A23187) after 4 h incubation with pB1 was equivalent to control (Fig. 5B). None of the treatments affected the viability of the epididymal sperm (Fig. 5C).

Capacitation of epididymal sperm by bovine BSP-A1/-A2

We wanted to know if proteins homologous to pB1 could induce capacitation in boar epididymal sperm because they contain two type II domains. We chose to do capacitation experiments with BSP proteins because it is known that the incubation of bovine epididymal sperm with BSP proteins promote capacitation [25]. We used BSP-A1/-A2 for our study because pB1 possess the highest similarity (65%) with this protein and also BSP-A1/-A2 is found in highest amount as compared to the other BSP proteins [57]. Figure 6A shows that the pre-incubation of sperm for 20 min with 20 $\mu\text{g/ml}$ highly purified BSP-A1/-A2 protein (minimum concentration that allow maximum bovine epididymal sperm capacitation [25]) increased the % of acrosome reacted sperm (16.1%) induced by ionophore A23187 that was 2.2-fold higher than control (7.4%). As shown in Figure 6B, a 20 min pre-incubation of epididymal sperm with BSP-A1/-A2 do not stimulate spontaneous acrosome reaction. Viability of epididymal sperm was not affected by the treatments (Fig. 6C).

DISCUSSION

In this study, we isolated and purified the protein pB1 from boar seminal plasma with a new and efficient method. The principal advantage of this new method for the purification of pB1 is that we used only two chromatographic steps as compared to the method of Calvete et al. [33] which contains three steps. The protein concentration in boar seminal plasma is approximately 30 mg/ml [58] and pB1 represent approximately 1% of total boar seminal plasma protein (~300 μ g pB1 by ml of seminal plasma) [35]. With two purification steps, the protein recovery was about 50-70% (150-210 μ g/ml of seminal plasma) of total pB1 in boar seminal plasma.

We chose to isolate pB1 proteins from boar seminal plasma with a chondroitin sulfate B-agarose column because BSP proteins and their homologs have strong affinity for GAGs [9, 37]. pB1 protein, as the BSP proteins, bound strongly to chondroitin sulfate B and a high concentration of urea was required for the protein to be eluted from the column (Fig. 1A). pB1 eluted mostly in the chondroitin sulfate B adsorbed fraction 3, as shown by immunoblot (Fig. 1C, lane 4). The protein was also found in fraction 1 and in chondroitin sulfate B retarded fraction 2, indicating that the binding sites in the column for pB1 were probably saturated with the protein and other components of seminal plasma. Two protein bands were observed in chondroitin sulfate B unadsorbed fraction 1 (lane 2, Figure 1C). Since pB1 possess different glycosylated forms [36], it is possible that the higher band corresponds to another glycosylated form of pB1. These different glycosylated forms were not found in chondroitin sulfate-B fraction 3, probably because they had less binding affinity for the column due to the glycosylation. Purification of pB1 was tricky because the protein is not soluble in buffers commonly used for protein isolation. The volume of chondroitin sulfate B fraction 3 was 10-15 ml. At first, we dialysed it against PBS and concentrated it with a ultrafiltration cell before injecting into HPLC column, but the proteins aggregated even with addition of 6 M guanidine-HCl or 7 M urea. The factors that cause protein aggregation in concentrated denaturing buffer are not known. Thus, as an

alternative, we dialysed the chondroitin sulfate B fraction 3 against 50 mM ammonium bicarbonate and lyophilized it. Lyophilized proteins were dissolved in 0.1% TFA containing 6 M guanidine-HCl. There was no more visible protein aggregates. Also the second strategy was more efficient than the first because it permitted us to recover a higher quantity of pB1 (65-70%) compared to the first strategy (<50%). pB1 eluted around 25 min and the peak was broad, suggesting it could contain other glycoforms of pB1 (Fig. 2, fraction II). However, this fraction contained only one polypeptide, which was confirmed to be pB1 by N-terminal amino acid sequencing (Fig. 4).

It is known that the BSP proteins potentiate bovine epididymal sperm capacitation induced by heparin and HDL (reviewed in [11]). Our results showed that purified pB1 induces capacitation (as determined by induction of acrosome reaction by ionophore A23187; Fig. 5A). Interestingly, pre-incubation of sperm with 20 $\mu\text{g/ml}$ or higher quantity (results not shown) of pB1 had no effect on epididymal sperm capacitation while 10 $\mu\text{g/ml}$ of pB1 induced maximum capacitation. It is possible that when pB1 concentration is $>10 \mu\text{g/ml}$, it could aggregate and therefore cannot interact with sperm membrane to induce capacitation as would do more soluble pB1. Interestingly, the same concentration of BSP-A1/-A2 (20 $\mu\text{g/ml}$) causes a different effect on epididymal boar sperm capacitation. In fact, pre-incubation of sperm with 20 $\mu\text{g/ml}$ of pB1 stimulate capacitation. It is possible that BSP-A1/-A2 was more soluble than pB1 in NCM and it could interact more efficiently with sperm membrane and induce sperm capacitation. Another possibility to explain this difference could reside in the structural difference between the two proteins that could affect binding affinity for the choline groups of membrane phospholipids. The amino acids sequence of BSP-A1/-A2 and pB1 share 65% similarity, and identical amino acids are found mostly in their two type II domains (data not shown). It is possible that BSP-A1/-A2 have more affinity for choline groups than pB1 and this causes more sperm capacitation. The interactions of the proteins with membrane lipids could also be different due to the difference in their degree of glycosylation.

We propose that the mechanism of boar sperm capacitation by pB1 is similar to that of the bovine species with BSP proteins. At ejaculation, epididymal boar sperm is mixed with seminal plasma that contains pB1. pB1 can coat the sperm membrane. We think that pB1 coats sperm membrane because it was demonstrated that pB1 can bind choline groups [37]. The sperm then encounter a sudden rise in HCO_3^- concentration on deposition in the female tract and this induces changes in lipid architecture of boar sperm membrane leading to cholesterol efflux [41, 46]. As found for the BSP proteins, pB1 could mediate this cholesterol efflux because HCO_3^- alone cannot induce epididymal sperm capacitation in the absence of pB1 (Fig. 5). pB1 could still be bound to choline groups of the sperm membrane and induce sperm capacitation via an unknown mechanism.

Since BSP proteins potentiate sperm capacitation by GAGs and HDL, it would be interesting to determine whether heparin-like GAGs and HDL from the oviductal fluid could act in synergy with pB1 to induce boar sperm capacitation. Since there is no heparin or GAGs in our capacitating media, it is possible that pB1 and BSP-A1/-A2 induce sperm capacitation via stimulation of a cholesterol efflux. However, it is also possible that pB1 only induces cholesterol efflux leading to sperm capacitation. These hypotheses need to be verified. In addition, pB1 could be implicated in the formation of the boar sperm reservoir in the female genital tract, as BSP-A1/-A2 that promotes bull sperm binding to oviductal epithelium [27]. Thus, more studies are warranted to understand how pB1 protein capacitates boar sperm as well as allow sperm binding to the oviduct.

In summary, pB1 protein can be isolated and purified efficiently from boar seminal plasma by the new method we described. We demonstrated for the first time that pB1 protein can potentiate capacitation of boar epididymal spermatozoa. Also, boar epididymal spermatozoa can be capacitated by the homologous bovine protein BSP-A1/-A2. The current study shows for the first time that protein that are homologous to the BSP proteins can share a similar role in capacitation of epididymal sperm in another species. These results suggest that proteins of the BSP family and their homologs could play a similar biological role but with some differences between species. Further investigations on the mechanism by which

pB1 induces boar epididymal sperm capacitation are necessary. The understanding of boar sperm capacitation is needed to improve artificial insemination in this species and will help to elaborate a general mechanism of mammalian sperm capacitation.

REFERENCES

1. 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.
2. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, M. C, Chapdelaine A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: Chrétien M, K.W. M (eds.), *Molecular biology of brain and endocrine peptidergic systems*. New York: Plenum Press; 1988: 259-273.
3. Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Ying SY, Guillemin R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113: 861-867.
4. Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, Chretien M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem J* 1987; 243: 195-203.
5. 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.
6. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 1992; 267: 10149-10155.
7. 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.
8. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 313-318.
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. Austin CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 1951; 4: 581-596.
13. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168: 697-698.
14. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The physiology of reproduction*, 2 ed. New York: Raven Press; 1994: 189-317.
15. Therien I, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1998; 59: 768-776.
16. Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107: 1326-1332.
17. Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106: 1092-1098.
18. Lenz RW, Ball GD, Lohse JK, First NL, Ax RL. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1983; 28: 683-690.
19. Meizel S, Turner KO. Glycosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of previously capacitated hamster sperm. *J Exp Zool* 1986; 237: 137-139.
20. First NL, Parrish JJ. In-vitro fertilization of ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* 1987; 34: 151-165.

21. Brantmeier SA, Grummer RR, Ax RL. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J Dairy Sci* 1987; 70: 2145-2149.
22. Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 195-204.
23. Jaspard B, Collet X, Barbaras R, Manent J, Vieu C, Parinaud J, Chap H, Perret B. Biochemical characterization of pre-beta 1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. *Biochemistry* 1996; 35: 1352-1357.
24. 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.
25. 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.
26. Lane M, Therien I, Moreau R, Manjunath P. Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol Reprod* 1999; 60: 169-175.
27. 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.
28. Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Topfer-Petersen E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 1995; 310 (Pt 2): 615-622.
29. Menard M, Nauc V, Lazure C, Vaillancourt D, Manjunath P. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. *Mol Reprod Dev* 2003; 66: 349-357.

30. Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 39.
31. Boisvert M, Bergeron A, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol Reprod* 2004; 70: 656-661.
32. Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 461-470.
33. Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 1997; 407: 201-206.
34. 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.
35. Plucienniczak G, Jagiello A, Plucienniczak A, Holody D, Strzezek J. Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54-kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 303-309.
36. Bezouska K, Sklenar J, Novak P, Halada P, Havlicek V, Kraus M, Ticha M, Jonakova V. Determination of the complete covalent structure of the major glycoform of DQH sperm surface protein, a novel trypsin-resistant boar seminal plasma O-glycoprotein related to pB1 protein. *Protein Sci* 1999; 8: 1551-1556.
37. Jonakova VV, Manaskova P, Kraus M, Liberda J, Ticha M. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol Reprod Dev* 2000; 56: 275-277.
38. 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.
39. Okamura N, Tanba M, Fukuda A, Sugita Y, Nagai T. Forskolin stimulates porcine sperm capacitation by increasing calcium uptake. *FEBS Lett* 1993; 316: 283-286.
 40. Suzuki K, Mori T, Shimizu H. In vitro fertilization of porcine oocytes in chemically defined medium. *Theriogenology* 1994; 42: 1357-1368.
 41. Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 378-391.
 42. Holt WV, Harrison RA. Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *J Androl* 2002; 23: 557-565.
 43. Green CE, Watson PF. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 2001; 122: 889-898.
 44. Kalab P, Peknicova J, Geussova G, Moos J. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 304-314.
 45. Tardif S, Dube C, Chevalier S, Bailey JL. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* 2001; 65: 784-792.
 46. Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* 2001; 114: 3543-3555.
 47. Kim NH, Day BN, Lim JG, Lee HT, Chung KS. Effects of oviductal fluid and heparin on fertility and characteristics of porcine spermatozoa. *Zygote* 1997; 5: 61-65.
 48. Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of

- seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int J Androl* 2002; 25: 84-93.
49. Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 787-792.
 50. Gadella BM, Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 2000; 127: 2407-2420.
 51. Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* 1984; 104: 287-296.
 52. Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 1995; 104: 305-313.
 53. Dott HM, Foster GC. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'life-dead' stain. *J Reprod Fertil* 1972; 29: 443-445.
 54. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
 55. Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 1987; 262: 10035-10038.
 56. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87: 206-210.
 57. Nauc V, Manjunath P. 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* 2000; 63: 1058-1066.

58. Setchell BP, Brooks DE. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The physiology of reproduction*, 1 ed. New York; 1988: 753-836.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Isolation and characterization of pB1 protein from boar seminal plasma. (A) Elution profile of boar seminal plasma proteins on chondroitin sulfate B-Agarose. (B) SDS-PAGE pattern of chondroitin sulfate B-Agarose eluted fractions. Protein samples (15 μ g) were reduced, denatured and separated on 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue R-250. Lane 1, Low molecular weight standard; lane 2, boar seminal plasma total proteins; lanes 3-5, proteins from fraction 1, 2 and 3, respectively. (C) Immunoblot analysis of chondroitin sulfate B-Agarose eluted fractions with anti-pB1 antiserum. Protein samples were separated by SDS-PAGE, transferred to immobilon-P and probed with antiserum directed against pB1 protein. Lane 1, boar seminal plasma total proteins (3 μ g); lanes 2-4, proteins from fraction 1 (3 μ g), 2 (1 μ g), 3 (0.5 μ g) respectively.

Fig. 2. rp-HPLC pattern of chondroitin sulfate B-Agarose chromatography fraction 3. Protein was prepared as described in *Materials and Methods* and was eluted using 0.1% (v/v) TFA in water (solvent A) and 0.1% (v/v) TFA in acetonitrile (solvent B) buffer system. Elution was isocratic at 25% solvent B for 5 min, followed by a first gradient of 25-35% solvent B in 10 min, a second gradient of 35-40% solvent B in 20 min and a gradient of 40-65% solvent B in 25 min. Inset represents the immunoblot pattern of a 1/10 dilution of the fractions I and III-V or a 1/25 dilution of the fraction II using antiserum directed against pB1. ctl, boar seminal plasma total proteins (3 μ g); lanes 1-5, fraction I-V respectively.

Fig. 3. Characterization by SDS-PAGE of rp-HPLC fraction II. Protein samples were reduced, denatured and separated on 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue R-250. Lane 1, Low molecular weight standard; lane 2, boar seminal plasma total proteins (15 μ g); lane 3, rp-HPLC fraction II (0.5 μ g).

Fig. 4. N-terminal sequence comparison of rp-HPLC fraction II and pB1.

Fig. 5. Effect of pB1 protein on epididymal sperm capacitation, acrosome reaction and viability. Cauda epididymal sperm were pre-incubated 20 min with or without pB1 protein, as described in *Materials and Methods*, and incubated in CM for 4 h. (A) % of acrosome reacted sperm induced by ionophore A23187. (B) % of

acrosome reacted sperm without ionophore A23187. (C) % of viability. Results represent mean \pm SD of four experiments that included two samples/experiment and 200 sperm assayed/sample. Significant differences vs. control (without protein): * p < 0.05; ** p < 0.01.

Fig. 6. Effect of BSP-A1/-A2 protein on capacitation, acrosome reaction and viability of epididymal sperm. Cauda epididymal sperm were pre-incubated 20 min with or without highly purified BSP-A1/-A2 proteins [10], as described in *Materials and Methods*, and incubated in CM for 4 h. (A) % of acrosome reacted sperm induced by ionophore A23187. (B) % of acrosome reacted sperm without ionophore A23187. (C) % of viability. Results represent mean \pm SD of five experiments that included two sample/experiment and 200 sperm assayed/sample. Significant differences vs. control (without protein): * p < 0.01.

Fig. 1

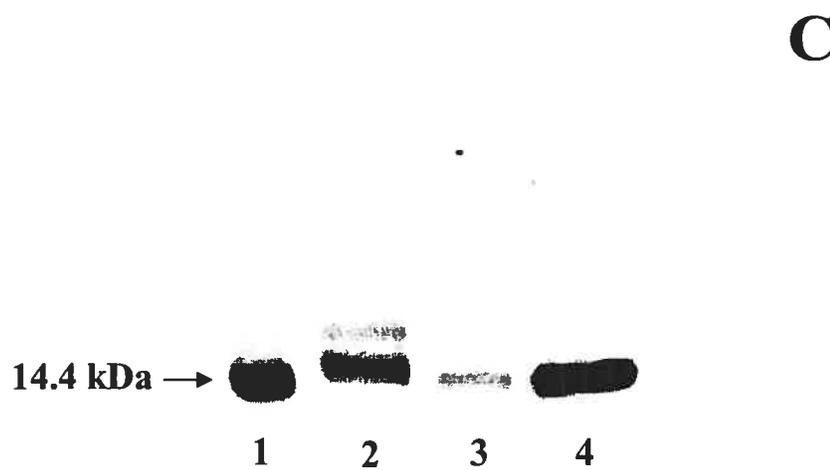
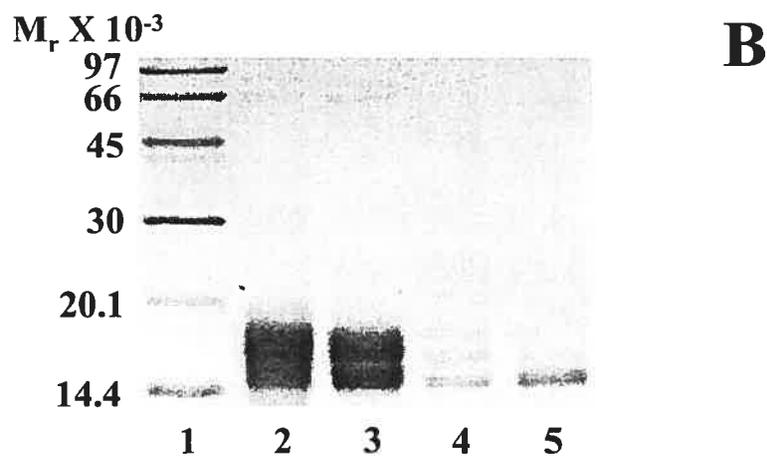
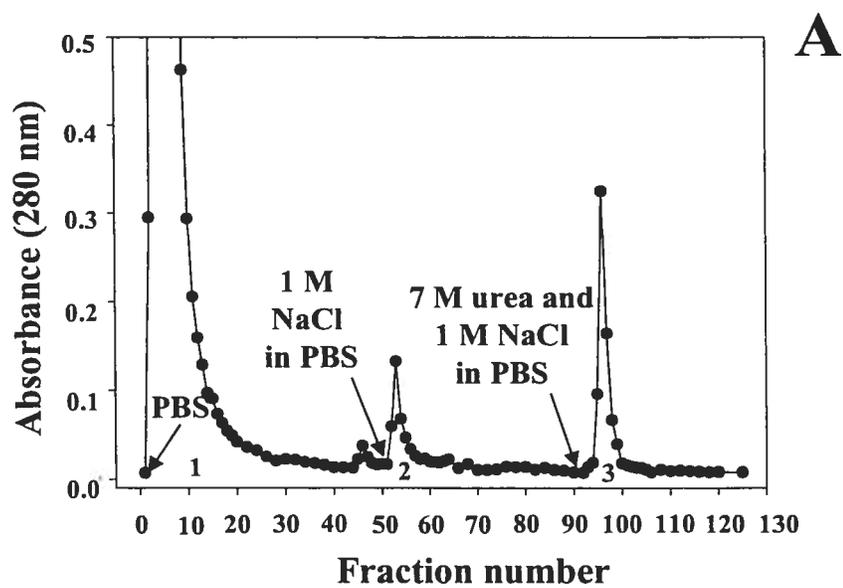


Fig. 2

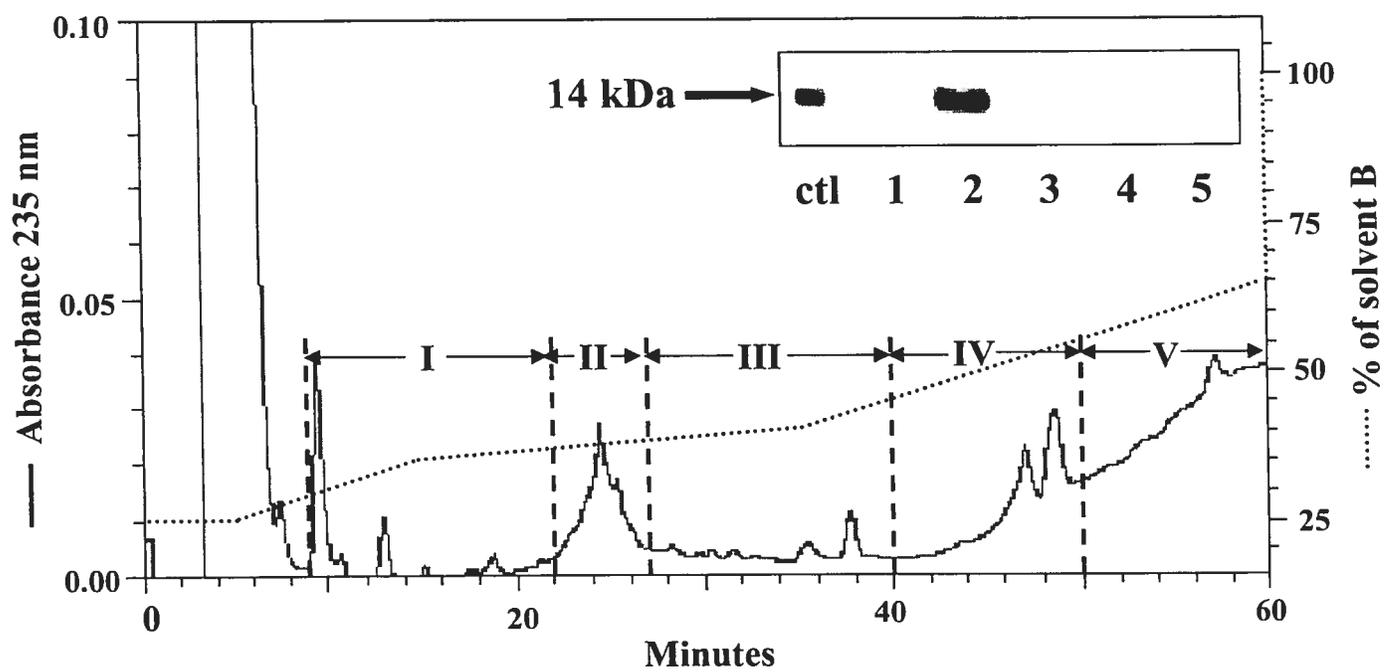


Fig. 3

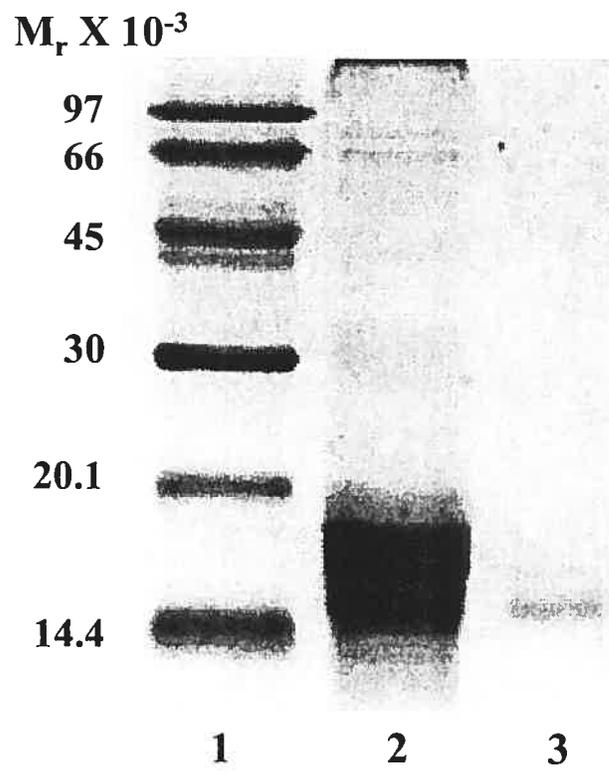


Fig. 5

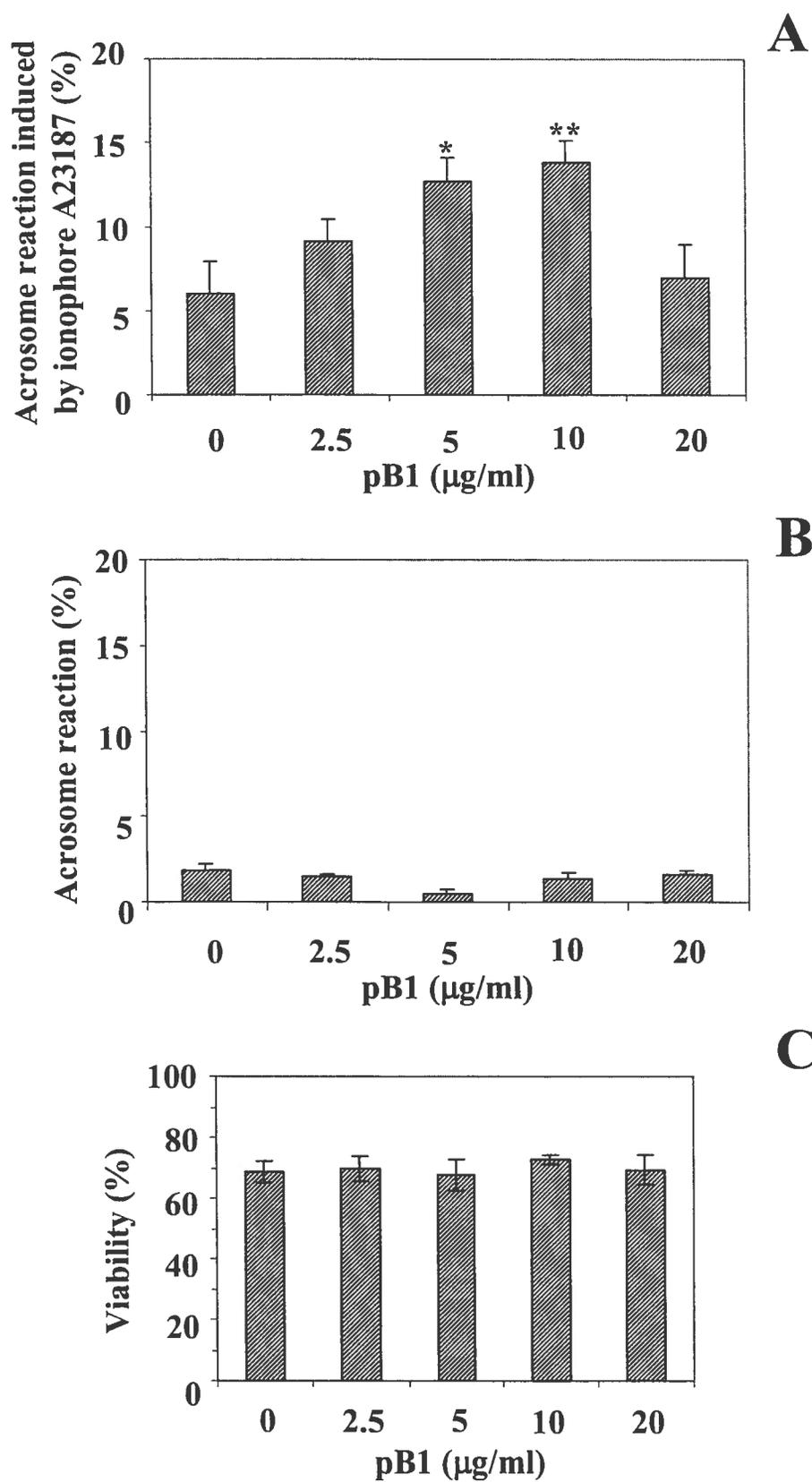
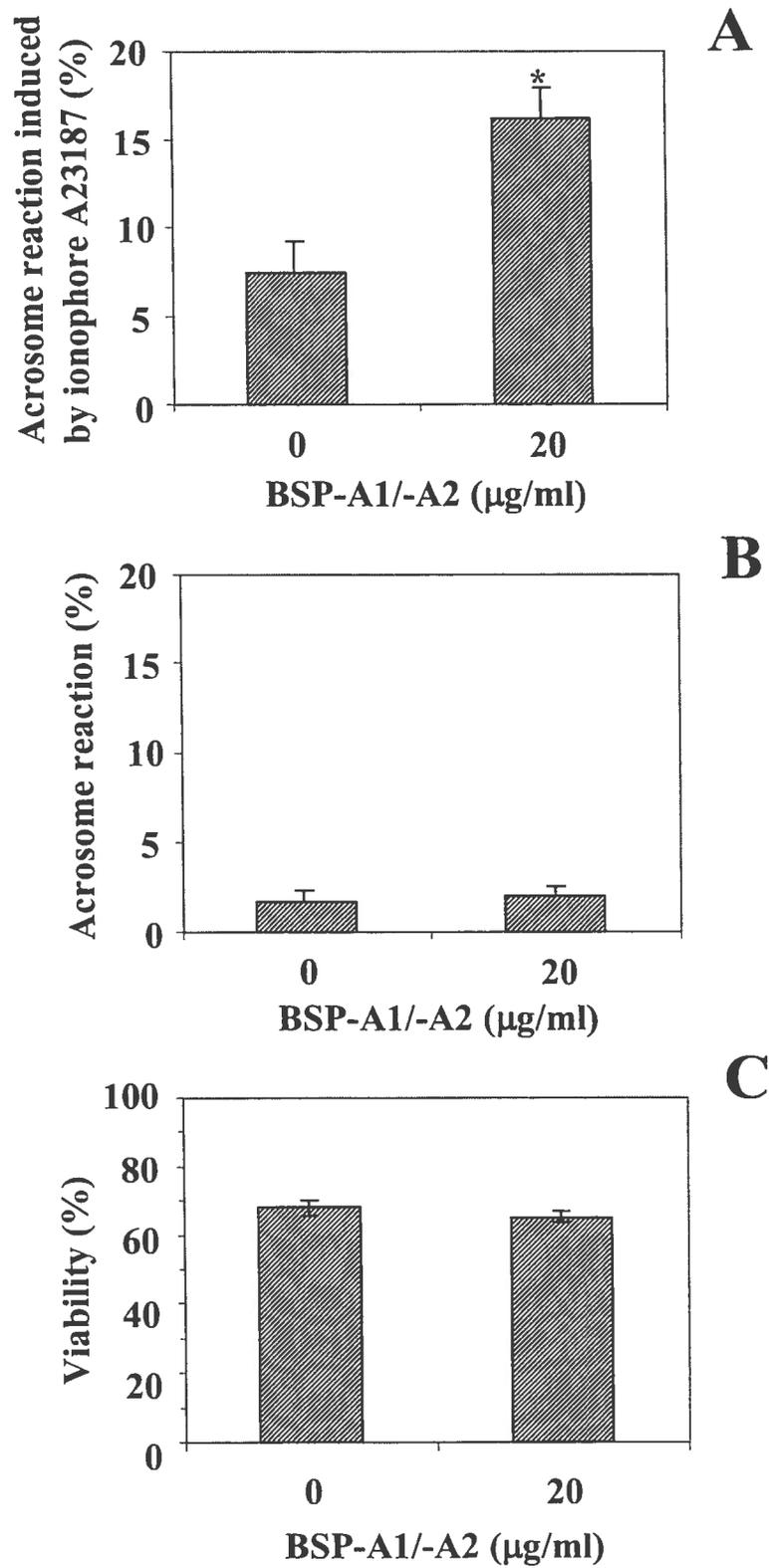


Fig. 6



3.2. Résultats complémentaires

3.2.1. Capacitation des spermatozoïdes épидидymaires par les protéines totales du PS porcin

La pré-incubation des spermatozoïdes épидидymaires porcins avec 250 µg/ml de protéines totales du PS de porc précipitées à l'alcool (correspond à environ 2,8 µg/ml de pB1) n'a pas entraîné une augmentation du pourcentage (%) de spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome induite par l'ionophore A23187, après 4 h d'incubation dans le milieu capacitant, comparé au contrôle (Figure 9A). La Figure 9B montre le % des spermatozoïdes dont la réaction de l'acrosome n'a pas été induite par l'ionophore A23187. Les différents traitements n'entraînent pas de différences du % de spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome spontanée, comparé au contrôle. La viabilité et la motilité des spermatozoïdes étaient constantes pendant toute la durée de l'expérience (~ 60%).

3.2.2. Capacitation des spermatozoïdes épидидymaires par le PS porcin (résultats préliminaires)

Les spermatozoïdes porcins ont été pré-incubés avec un volume de PS équivalent à 0, 250, 500 et 1000 µg/ml de protéines, ce qui correspondait respectivement à ~ 0, 2,8, 5,5 et 11 µg/ml de protéine pB1. Les différents traitements n'ont pas entraîné une augmentation du % de spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome induite avec l'ionophore A23187 comparé au contrôle (spermatozoïdes pré-incubés sans protéines), après 4 h d'incubation dans le milieu capacitant (Figure 10A). Pour chaque traitement, environ 5-6% des spermatozoïdes ont capacité. La Figure 10B montre le % des spermatozoïdes dont la réaction de l'acrosome n'a pas été induite par l'ionophore A23187. Les traitements n'affectent pas le % des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome spontanée comparé au contrôle. La viabilité et la motilité des spermatozoïdes n'étaient pas affectées par les traitements pendant la durée de l'expérience (environ 60%).

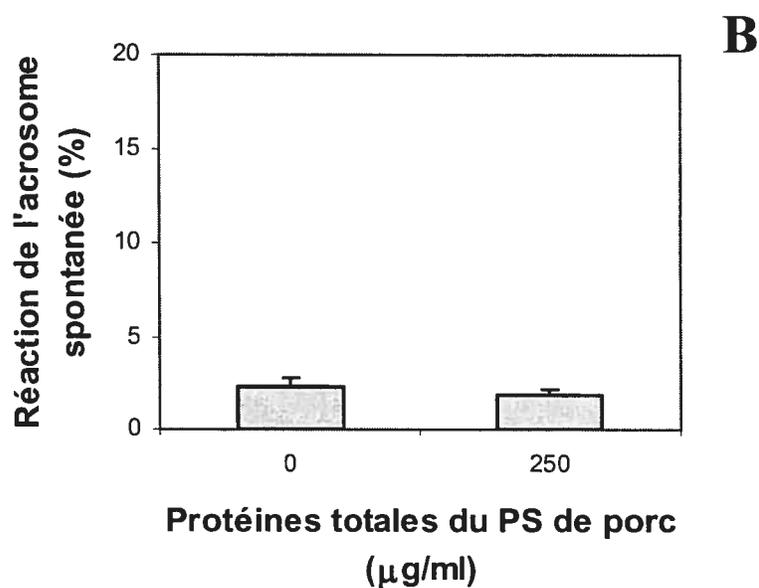
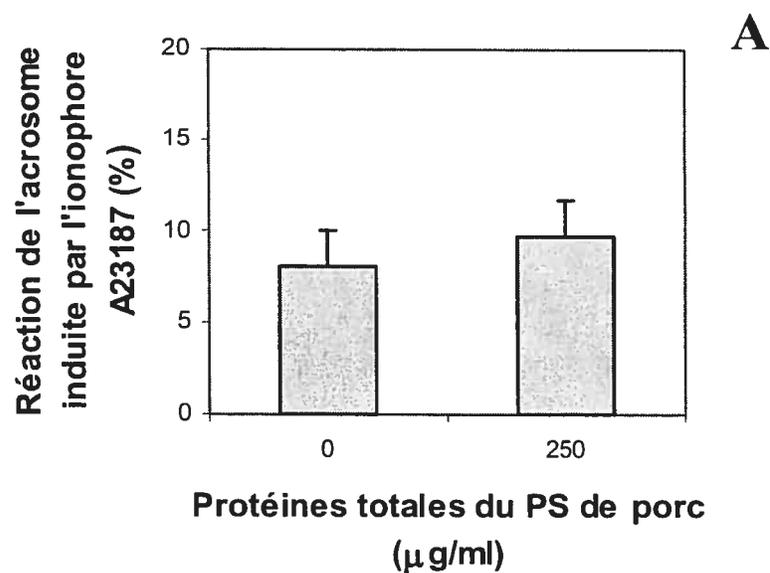


Figure 9: Modulation de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par les protéines totales du PS de porc précipitées à l'alcool. Les spermatozoïdes épидидymaires étaient pré-incubés 20 min avec 0 ou 250 $\mu\text{g/ml}$ de protéines totales du PS avant d'être lavés et incubés pendant 4 h dans un milieu capacitant. (A) % des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome induite par l'ionophore A23187. (B) % des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome spontanée.

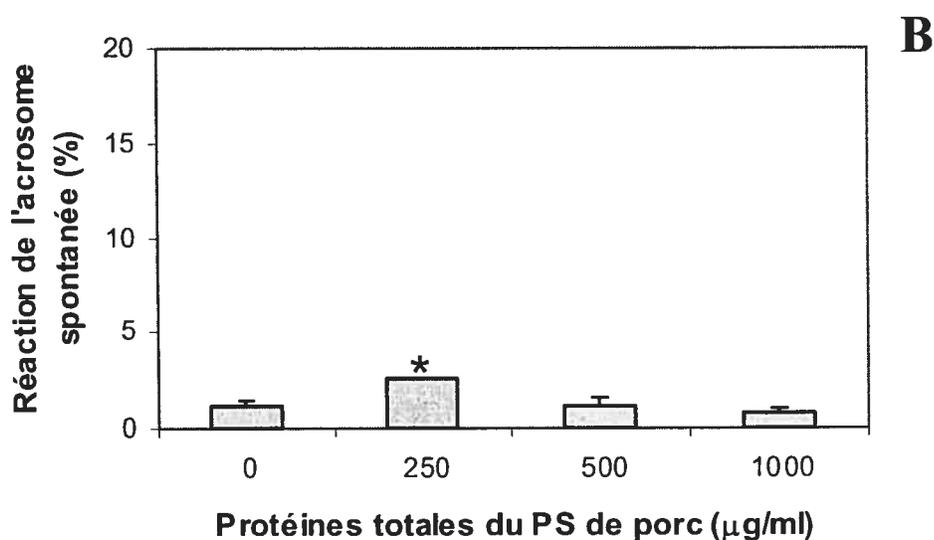
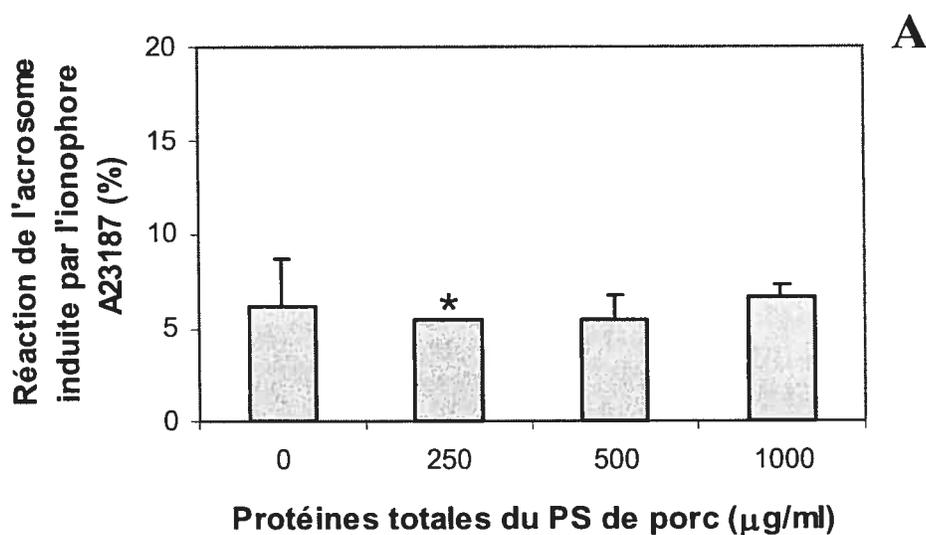


Figure 10: Modulation de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par les protéines totales du PS de porc. Même protocole que la Figure 9, mais les spermatozoïdes épидидymaires étaient pré-incubés 20 min avec 0, 250, 500 ou 1000 $\mu\text{g/ml}$ de protéines totales du PS avant d'être lavés et incubés pendant 4 h dans un milieu capacitant. (A) % des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome induite par l'ionophore A23187. (B) % des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome spontanée. $n = 3$, sauf où *, $n = 2$.

3.2.3. Phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes porcins capacités par pB1 (résultats préliminaires)

Plusieurs protéines isolées des spermatozoïdes épидидymaires sont phosphorylés sur tyrosine aux temps 0 et 4 h (Figure 11). Ces protéines ont des masses moléculaires d'environ 20 kDa, 32 kDa, 42 kDa, 46 kDa, 60 kDa et 66 kDa. Deux protéines d'environ 94 kDa et 99 kDa (p94 et p99, respectivement) sont phosphorylées après 4 h d'incubation pour tous les traitements. Ces résultats préliminaires nous indiquent que la pré-incubation des spermatozoïdes avec les différentes concentration de pB1 n'entraîne pas de changement significatif dans la phosphorylation sur tyrosine des protéines par rapport aux spermatozoïdes pré-incubés sans pB1.

Toutefois, on peut remarquer qu'une bande à environ 20 kDa (p20) est absente dans les puits (0 et 4 h) correspondant aux protéines des spermatozoïdes pré-incubés avec un volume de PS de porc correspondant à 1 mg/ml de protéines totales (Figure 11). Ces résultats proviennent d'une seule expérience et ils sont donc préliminaires.

3.2.4. Phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes porcins capacités par BSP A1/A2 (résultats préliminaires)

A la Figure 12, on peut observer que des protéines de 20 kDa, 32 kDa, 42 kDa, 46 kDa, 60 kDa et 66 kDa sont phosphorylées sur tyrosine aux temps 0 et 4 h. La pré-incubation des spermatozoïdes avec BSP-A1/-A2 n'entraîne pas de changement significatif dans la phosphorylation sur tyrosine des protéines par rapport au contrôle après 0 ou 4 h d'incubation dans le milieu capacitant.

La pré-incubation des spermatozoïdes avec un volume de PS de porc, correspondant cette fois-ci à 250 µg/ml de protéines totales, entraîne la disparition de la protéine phosphorylée d'environ 20 kDa aux temps 0 et 4 h. Cette expérience a été répétée deux autres fois (dont une en présence du PS de porc et l'autre sans PS de porc). La répétition de cette expérience est nécessaire pour confirmer nos résultats.

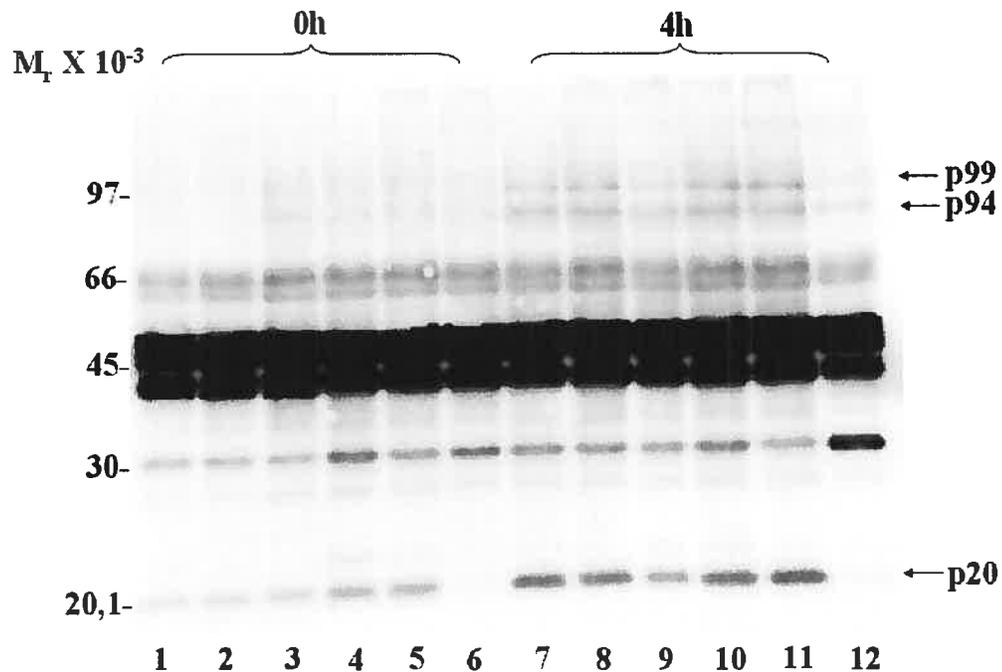


Figure 11: Effet de la protéine pB1 sur la phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes épидидymaires porcins. Les spermatozoïdes épидидymaires porcins ont été pré-incubés avec une concentration croissante de protéine pB1. Des aliquots ont été prélevés aux temps 0 et 4 h et les protéines ont été isolées, puis déposées sur gel SDS-PAGE et transférées sur membrane PVFD. Les protéines phosphorylées sur tyrosine ont été détectées en utilisant un anticorps monoclonal spécifique antiphosphotyrosine. Les échantillons représentent les protéines des spermatozoïdes pré-incubés avec 0, 2,5, 5, 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$ de pB1 et par un volume de PS de porc correspondant à 1 mg/ml de protéines totales, respectivement à 0 h (puits 1-6) et 4 h (puits 7-12).

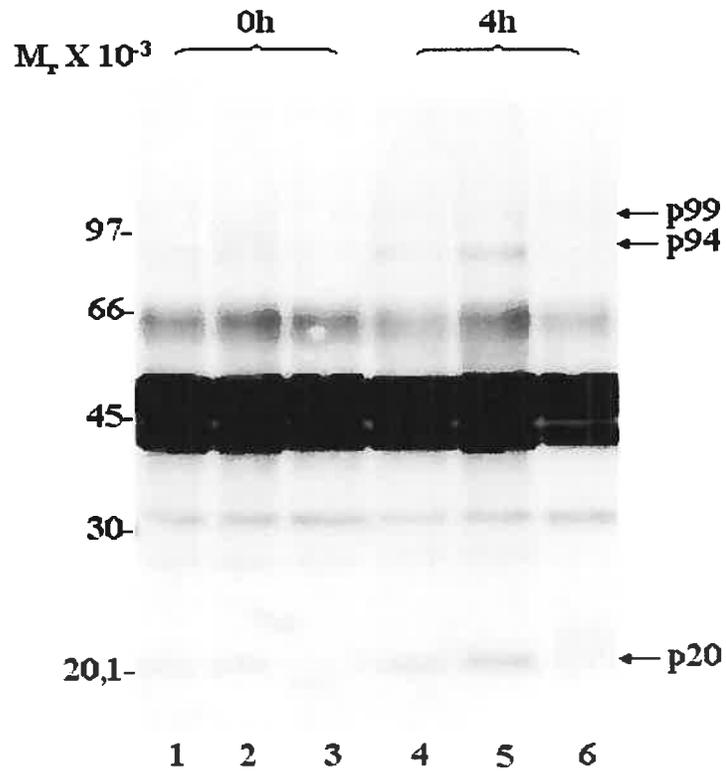


Figure 12: Effet de la protéine BSP-A1/-A2 sur la phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes épидидymaires porcins. Même protocole qu'à la Figure 11, mais les spermatozoïdes épидидymaires porcins ont été pré-incubés ou non avec la protéine bovine BSP-A1/-A2 (0 et 20 $\mu\text{g/ml}$) ou avec 250 $\mu\text{g/ml}$ de protéines totales du PS de porc. Les échantillons représentent les protéines des spermatozoïdes traités avec 0, 20 $\mu\text{g/ml}$ de BSP-A1/-A2 et 250 $\mu\text{g/ml}$ de protéines totales du PS de porc, respectivement, à 0 h (puits 1-3) et 4 h (puits 4-6).

4. Discussion

Le phénomène de la capacitation des spermatozoïdes est connu depuis plusieurs dizaines d'années. Malgré le nombre important d'études effectuées sur le sujet, les détails du mécanisme par lequel les spermatozoïdes sont capités sont encore inconnus. Il est important de connaître le mécanisme de capacitation chez le porc car il pourra servir à améliorer les techniques d'IA. De plus, la comparaison entre le mécanisme impliqué dans la capacitation des spermatozoïdes bovins et porcins permettra d'établir un mécanisme plus général de la capacitation des spermatozoïdes de mammifères. La majorité des études portant sur la capacitation des spermatozoïdes sont effectuées sur les animaux car il est plus difficile d'étudier ce phénomène chez l'humain parce que le matériel biologique est moins accessible.

4.1. Nouvelle méthode de purification de la protéine pB1 du PS de porc

L'isolation et la purification de la protéine pB1 à partir du PS de porc a été assez difficile et longue pour plusieurs raisons. Premièrement, pB1 ne compte qu'environ pour 1,1% des protéines totales du PS de porc [127]. Ceci est un faible % à comparer aux protéines BSP qui représentent 65% des protéines totales du PS bovin (voir section 1.5.1). Par conséquent, il faut plus de PS pour purifier une quantité donnée de pB1, ce qui prend plus de temps. De plus, la majorité des protéines retrouvées dans le PS de porc possèdent des masses moléculaires semblables à celle de pB1 (~ 12-16 kDa) [112, 119]. Il fallait donc trouver une méthode autre que le tamis moléculaire qui allait permettre l'isolation de pB1 des autres protéines de mêmes masses moléculaires. Nous avons employé une méthode différente de celle utilisée par Calvete et al. [112] qui avaient isolé et purifié pB1 à partir du PS de porc en effectuant une chromatographie d'affinité à l'héparine, suivi d'une chromatographie d'affinité à la phosphorylcholine et finalement d'une dernière étape par rp-HPLC. Nous avons mis au point une méthode qui ne requiert que deux étapes : chromatographie d'affinité à la chondroïtine sulfate B et rp-HPLC.

Tout comme les protéines BSP, pB1 peut lier l'héparine et la chondroïtine sulfate B [56, 100, 128]. Nous avons isolé la protéine pB1 en passant directement du PS de porc sur une colonne de chondroïtine sulfate B-agarose. Les fractions

obtenues ont été analysées par immunobuvardage de type western en utilisant un antisérum dirigé contre la protéine pB1. L'antisérum a été préparé précédemment par une étudiante de notre laboratoire à partir d'un peptide de 15 acides aminés (TVTPNYDRDRAWKYC) correspondant à la séquence la moins hydrophobe de la partie C-terminale de la protéine pB1.

Par la suite, la purification de pB1 à partir de la fraction 3 qui provenait de la chromatographie d'affinité à la chondroïtine sulfate B devenait plus compliquée à cause de l'insolubilité de pB1 dans plusieurs solutions salines. Le volume de la fraction 3 (section 3.1, Figure 1A) variait entre 10-15 mL et nous devions trouver un moyen pour concentrer les protéines afin de les injecter dans l'appareil HPLC. La première méthode que nous avons utilisée était de dialyser la fraction C contre du PBS et ensuite de la concentrer en utilisant un appareil d'ultrafiltration. Cette technique avait plusieurs désavantages. L'échantillon était manipulé plusieurs fois, ce qui entraînait une perte importante de protéines. De plus, les protéines avaient tendance à s'agréger lorsqu'elles étaient concentrées et l'ajout de 6 M guanidine-HCl ou de 7 M d'urée aux protéines concentrées n'arrivait pas à défaire complètement ces agrégats de protéines. Nous avons donc essayé une autre méthode. Nous avons dialysé la fraction 3 contre du bicarbonate d'ammonium, puis nous avons lyophilisé les protéines. Cela s'est avéré plus efficace. Les protéines étaient pesées et ensuite dissoutes dans 0,1% TFA à lequel était ajouté 6 M de guanidine-HCl. De cette façon, les échantillons ne contenaient pas d'agrégats de protéines. La rp-HPLC nous a permis d'obtenir la protéine pB1 pure.

Le rendement global de notre méthode est de 50-70%. Nous avons répété plusieurs fois les étapes d'isolation et de purification pour obtenir une quantité suffisante de pB1 dans le but d'étudier son rôle biologique. L'avantage de notre méthode est qu'elle nous permet de récupérer facilement une quantité importante de protéine pB1.

4.2. Capacitation des spermatozoïdes porcins

4.2.1. Modulée par la protéine pB1

La majorité des expériences de capacitation des spermatozoïdes porcins ont été effectuées sur des spermatozoïdes éjaculés. Le rôle de chaque protéine du PS porcine pendant la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires n'a jamais été étudié. Nous sommes les premiers à étudier l'effet de pB1, une protéine du PS porcine, sur la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins.

Nous avons opté pour la technique de coloration au CTC afin d'évaluer l'intégrité acrosomale des spermatozoïdes épидидymaires porcins. Cette technique est utilisée depuis plusieurs années chez le porc [138] et elle nous a permis d'obtenir des résultats reproductibles. Le CTC permet de compter les spermatozoïdes intacts, capités et ayant subi la réaction de l'acrosome. Nous avons compté seulement les spermatozoïdes ayant un acrosome intact et ceux ayant subi la réaction de l'acrosome, afin de ne pas compliquer le comptage. Comme mentionné à la section 1.6.4., le CTC permet de visualiser plusieurs patrons de fluorescence, mais le patron des spermatozoïdes capités est plus difficile à distinguer à comparer aux patrons des spermatozoïdes qui n'ont pas subi la réaction de l'acrosome et ceux qui l'ont subie. Il est toutefois possible de calculer le % des spermatozoïdes capités en soustrayant au % des spermatozoïdes induits par l'ionophore A23187, le % des spermatozoïdes qui ont subi la réaction de l'acrosome spontanément (qui n'ont pas été traités avec l'ionophore A23187).

Malgré la tendance à former des agrégats dans plusieurs milieux, la protéine pB1 se dissolvait bien dans le milieu NCM et aucun agrégat était visible à l'œil nu. Nous avons choisi d'incuber les spermatozoïdes épидидymaires porcins pendant une durée de 4 h pour les expériences de capacitation. Selon la littérature, les spermatozoïdes porcins éjaculés capitent en 3 h [12]. Les spermatozoïdes épидидymaires sont toutefois moins matures que les spermatozoïdes éjaculés. Des résultats préliminaires nous ont suggéré que le temps optimal de capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins est de 4 h.

La protéine pB1 induit la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins après 4 h d'incubation dans le milieu capacitant (section 3.1, Figure 5). Le maximum de spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome induite par l'ionophore A23187 était de 13,8% ($p < 0,01$) pour les spermatozoïdes pré-incubés avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de pB1, à comparer à 6,0% pour le contrôle pré-incubé sans protéines, donc pB1 capacite les spermatozoïdes porcins. Cependant, à une concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ de pB1, le % des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome induite par l'ionophore A23187 est égal à celui observé en absence de protéines. Également, des concentrations plus élevées que 20 $\mu\text{g/ml}$ de pB1 ne capacitent pas les spermatozoïdes (résultats non-montrés). Ces résultats étaient inattendus. Un effet similaire est observé dans la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins [107]. Les protéines BSP ont induit la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins avec un effet maximal avec 20-40 $\mu\text{g/ml}$ de BSP à comparer au contrôle sans protéines. La pré-incubation des spermatozoïdes bovins avec une concentration plus élevée de protéines BSP ($> 40 \mu\text{g/ml}$) entraînait un certain degré d'inhibition de la capacitation. À forte concentration de pB1 (20 $\mu\text{g/ml}$), la protéine n'induit plus la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins. Il est possible qu'à concentration élevée de pB1 ($>10 \mu\text{g/ml}$), les protéines pB1 aient tendance à s'agréger entre elles (non visible à l'œil nu). L'interaction de ces complexes avec la membrane des spermatozoïdes pourrait être différente comparée à une protéine non agrégée. Par exemple, le complexe de protéines pB1 pourrait lier moins fortement ou ne pas se lier du tout la membrane des spermatozoïdes et cette faible interaction ne pourrait pas induire la capacitation des spermatozoïdes porcins.

Les concentrations de protéine pB1 que nous avons utilisées pour les expériences de capacitation *in vitro* sont moins élevées que la concentration de pB1 dans le PS *in vivo* (environ 80 $\mu\text{g/ml}$ de pB1 pour 40×10^6 spermatozoïdes dans le PS). Il est possible que pB1 soit associée avec d'autres macromolécules dans le PS, donc une concentration de pB1 similaire à celles que nous avons utilisées pour capaciter les spermatozoïdes lie la membrane des spermatozoïdes. Alternativement,

il y a peut-être des inhibiteurs de la capacitation qui sont présents dans le PS qui empêcheraient les protéines pB1 d'interagir avec la membrane des spermatozoïdes.

4.2.2. Modulée par la protéine BSP-A1/-A2

La protéine bovine BSP-A1/-A2 induit la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins (section 3.1, Figure 6). Le % des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome induite avec l'ionophore A23187 était de 16,1% lorsque les spermatozoïdes ont été pré-incubés avec 20 µg/ml de BSP-A1/-A2. Nous pouvons observer que pour une même concentration (20 µg/ml), pB1 et BSP-A1/-A2 n'ont pas le même effet sur la capacitation (7,0% versus 16,1%, respectivement).

Il est possible que la solubilité ou les propriétés d'agrégation de BSP-A1/-A2 soient différentes de pB1. Il est également possible que BSP-A1/-A2 et pB1 n'aient pas la même affinité pour les différentes classes de phospholipides de la membrane des spermatozoïdes porcins. La protéine BSP-A1/-A2 lie les groupements choline des phospholipides [96]. pB1 peut aussi lier les groupements choline des phospholipides [123]. Toutefois, il n'est pas connu si pB1 peut lier d'autres types de phospholipides, comme les phosphatidyléthanolamines, les phosphatidylsérines, les phosphatidylinositols. Également, l'affinité de BSP-A1/-A2 ou de pB1 pour les lipides de la membrane pourrait être différente à cause de leur différent degré de glycosylation. Des études supplémentaires devront être effectuées pour comprendre pourquoi une même concentration de pB1 ou de BSP-A1/-A2 n'a pas le même effet sur la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins.

Les protéines pB1 et BSP-A1/-A2 sont similaires à 65% et leur deux domaines de types deux sont similaires à 75% (Figure 7). La similitude qui existe entre les séquences d'acides aminés nous a permis de suggérer un modèle en trois dimension de la protéine pB1 qui est basé sur la structure connue de BSP-A1/-A2 [163]. Cette structure semblable entre les deux protéines suggère qu'elles utilisent un mécanisme semblable pour capaciter les spermatozoïdes épидидymaires porcins (Figure 13).

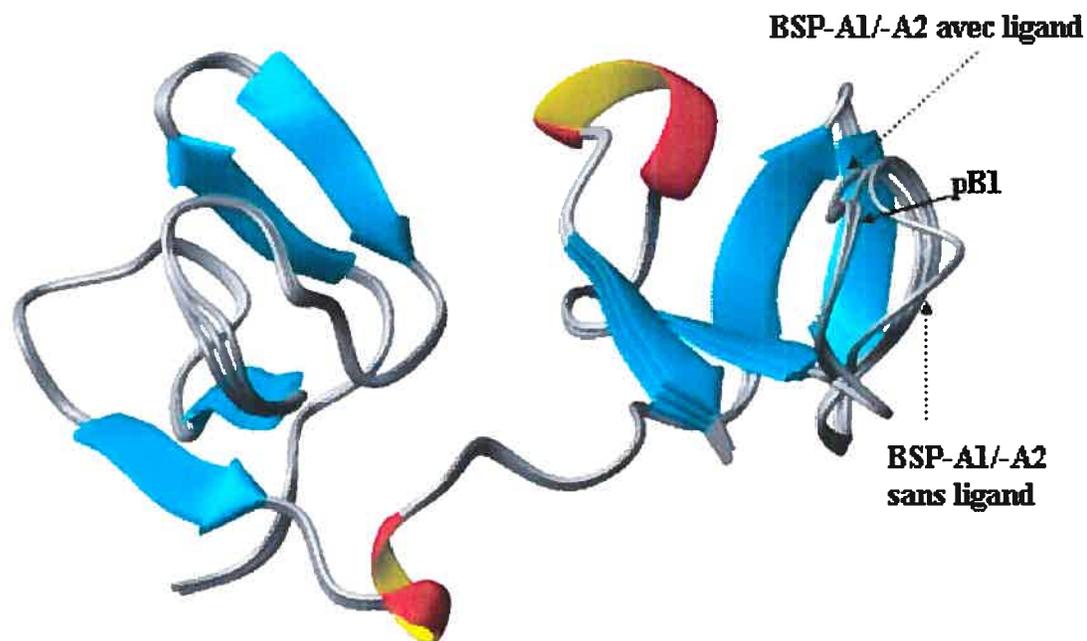


Figure 13: Structure tridimensionnelle de pB1 prédite selon son homologie avec la protéine BSP-A1/-A2.

D'autres expériences de capacitation devront être effectuées pour voir l'effet de différentes concentrations de BSP-A1/-A2 sur l'induction de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins. Le fait qu'une protéine bovine puisse capaciter des spermatozoïdes porcins suggère que les parties les plus importantes de la protéine pour la capacitation des spermatozoïdes sont les deux domaines de type II. Il serait intéressant de vérifier si pB1 peut également capaciter des spermatozoïdes épидидymaires bovins.

4.2.3. Modulée par les protéines du PS de porc

Les protéines totales du PS de porc précipitées à l'éthanol et lyophilisées étaient peu solubles dans le milieu NCM car nous pouvions observer à l'œil nu la présence de filaments de protéines non dissoutes. Toutefois, notre poudre de protéines contenait 100% de protéines, tel que déterminé par Lowry. Nous avons refait les expériences en utilisant directement le PS de porc, dont la quantité de protéines avait été préalablement dosé par Lowry, pour nous assurer que le problème de dissolution des protéines n'affecte pas les résultats de capacitation. Le PS se dissolvait bien dans le milieu NCM.

L'ajout de PS porcin aux spermatozoïdes éjaculés empêche leur capacitation [141, 164, 165]. Nos résultats sont en accord avec ces différentes études (Figure 9 et 10). Nous pouvons remarquer que la pré-incubation des spermatozoïdes porcins avec des protéines totales de PS de porc ou des volumes de PS de porc (les concentrations choisies contenaient des concentrations de pB1 équivalentes à celles utilisées pour les expériences de capacitation des spermatozoïdes par pB1) n'entraîne pas la capacitation des spermatozoïdes, à comparer au contrôle (spermatozoïdes pré-incubés sans protéines). Le PS contient plusieurs facteurs, comme des sucres et des ions (voir section 1.2). Nos résultats préliminaires suggèrent que ce sont les protéines contenues dans le PS qui sont principalement responsables d'inhiber l'effet positif de pB1 sur la capacitation des spermatozoïdes porcins et non les autres facteurs du PS, car les protéines totales du PS peuvent inhiber la capacitation (Figure 9). Toutefois, les volumes de PS porcin utilisés pour les expériences de capacitation étaient moins élevés (~ 37 fois moins) qu'*in vivo* dans un échantillon de sperme pour la même proportion de spermatozoïdes. Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que les autres facteurs du PS aient un rôle à jouer dans l'inhibition de la capacitation des spermatozoïdes.

In vivo, les spermatozoïdes ne restent pas longtemps en contact avec le PS avant d'entrer en contact avec les fluides du tractus génital femelle [1]. Ces fluides contiennent probablement des facteurs qui enlèvent les protéines inhibitrices de la capacitation de la membrane des spermatozoïdes pour permettre à pB1 d'induire la capacitation. Notre milieu capacitant n'était probablement pas capable d'enlever ces protéines inhibitrices, ce qui empêchait les spermatozoïdes d'être capités par pB1.

4.3. Phosphorylation sur tyrosine des protéines des spermatozoïdes

Deux protéines d'environ 94 et 99 kDa sont phosphorylées sur tyrosine après 4 h d'incubation dans le milieu capacitant chez les spermatozoïdes épидидymaires pré-incubés avec les différentes concentrations de pB1 (Figure 11). Toutefois, l'apparition de ces bandes semble seulement due au temps passé dans le milieu capacitant, car elles sont également présentes chez le contrôle (spermatozoïdes pré-

incubés sans protéines). A la Figure 12, l'apparition des protéines phosphorylées sur tyrosine d'environ 94 et 99 kDa après 4 h d'incubation dans le milieu capacitant n'est presque pas visible, possiblement à cause des quantités non équivalentes de protéines ont été mises sur gel ou que les protéines n'ont pas été complètement transférées sur la membrane PVFD. Les résultats préliminaires (Figures 11 et 12) montrent que la protéine pB1 et la protéine BSP-A1/-A2 n'entraînent pas une augmentation de phosphorylation sur tyrosine d'une protéine spécifique après 4 h d'incubation dans le milieu capacitant.

La phosphorylation sur tyrosine d'une protéine de 32 kDa (p32) est associée avec la capacitation chez le porc [134]. Cependant, les études sur la phosphorylation de cette protéine ont été effectuées avec des spermatozoïdes éjaculés, qui ont donc déjà été en contact pendant une certaine période de temps avec le PS et qui sont plus matures que des spermatozoïdes épидидymaires. Nous observons qu'une protéine de 32 kDa était déjà phosphorylée sur tyrosine, même dans les tubes contrôles (spermatozoïdes pré-incubés sans protéines) aux temps 0 et 4 h. Il est probable que la protéine phosphorylée de 32 kDa ne soit pas celle identifiée par Tardif et al [134]. Si toutefois c'était la même protéine, il est possible que p32 soit déjà phosphorylée chez les spermatozoïdes épидидymaires et que le contact avec le PS entraîne sa déphosphorylation. Il est également possible que la présence de Ca^{2+} dans notre milieu capacitant ait entraîné une certaine phosphorylation de p32, car le Ca^{2+} est important pour la phosphorylation sur tyrosine de cette protéine [43]. Les résultats de Dubé et al. [43] démontrent que p32 est légèrement phosphorylée dans le milieu capacitant (qui contient aussi du Ca^{2+}) à 0 h et qu'elle l'est encore plus après 3 h d'incubation dans le même milieu. Nous n'avons pas observé une augmentation de phosphorylation de la protéine de 32 kDa après 4 h d'incubation dans le milieu capacitant. Des facteurs sont probablement présent dans le PS qui rendent possible l'activation de voies amenant à l'augmentation de la phosphorylation de cette protéine de 32 kDa. La phosphorylation est de plus forte intensité à la Figure 11 et de plus faible intensité à la Figure 12. La variation de l'intensité de phosphorylation est probablement due au

fait que les protéines isolées proviennent de spermatozoïdes épидидymaires de différents porcs.

Shadan et al. [137] ont étudié la phosphorylation sur tyrosine des spermatozoïdes provenant des testicules et de différentes parties de l'épididyme (tête et queue). Ils ont observé que le patron de phosphorylation ne change pas après 3 h d'incubation dans un milieu capacitant chez les spermatozoïdes testiculaires et ceux de la tête de l'épididyme, et ce, même avec l'ajout de méthyl- β -cyclodextrine qui induit un efflux de cholestérol. Cependant, un certain changement du patron de phosphorylation est observé avec les spermatozoïdes provenant de la queue de l'épididyme lors de l'ajout de méthyl- β -cyclodextrine, car l'efflux de plus de 70% du cholestérol de la membrane entraîne une phosphorylation significative de protéines de 15 et 26 kDa [137]. Nous n'avons pas observé d'augmentation de phosphorylation de ces protéines, probablement parce que la présence des protéines de la famille BSP et notre milieu n'entraînaient pas un efflux de cholestérol aussi important.

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent que les protéines pB1 et BSP-A1/-A2, n'étaient pas suffisantes pour entraîner la phosphorylation de protéines des spermatozoïdes épидидymaires, telles que décrites précédemment [134, 137], même après une incubation de 4 h dans le milieu capacitant. L'incubation pendant 24 h des spermatozoïdes éjaculés bovins en présence des protéines BSP entraîne un efflux continu de cholestérol et de phospholipides de la membrane spermatique [166]. Si nous avons incubé nos spermatozoïdes épидидymaires porcins pendant une durée de 4 h en présence de pB1 ou BSP-A1/-A2, nous aurions possiblement observé une augmentation de phosphorylation des protéines de 15 et 26 kDa, en supposant que pB1 ou BSP-A1/-A2 entraînent l'efflux de cholestérol et de phospholipides de la membrane des spermatozoïdes porcins.

Les résultats que nous avons obtenus avec les spermatozoïdes épидидymaires porcins pré-incubés avec le PS suggèrent qu'il y a des facteurs qui sont présents dans le PS qui ont déphosphorylé ou empêché la phosphorylation d'une protéine

d'environ 20 kDa (Figure 11 et 12). La concentration de protéines totales du PS, auquel les spermatozoïdes ont été exposée pour ces études, est beaucoup moins élevée que celle *in vivo* pour la même proportion de spermatozoïdes dans un échantillon de sperme (250 ou 1000 µg/ml de protéines totales du PS pour nos études versus ~7,5 mg de protéines totales du PS pour la même concentration de spermatozoïdes *in vivo*), ce qui explique probablement pourquoi p32 n'est pas visible après 4 h d'incubation dans le milieu capacitant.

Toutefois, il est difficile d'émettre des conclusions, car ce ne sont que des résultats préliminaires que nous avons obtenus. D'autres études devront être effectuées pour les confirmer.

4.4. Élaboration d'un modèle de capacitation des spermatozoïdes porcins

Grâce aux résultats que nous avons obtenus suite aux expériences de capacitation, nous pouvons proposer un mécanisme de capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par la protéine pB1 (Figure 14). Ce mécanisme s'inspire de celui proposé pour la capacitation des spermatozoïdes bovins par les protéine BSP [104] étant donné la similarité entre pB1 et BSP-A1/-A2. Toutefois, plusieurs étapes resteront à être étudiées pour valider ce modèle.

Durant l'éjaculation, les spermatozoïdes épидидymaires porcins entrent en contact avec le PS qui contient plusieurs protéines, dont pB1, et qui est un milieu très riche en HCO_3^- comparé au fluide épидидymaire. pB1 peut alors lier la membrane des spermatozoïdes, possiblement via le groupement choline des phospholipides. L'effet de la liaison de pB1 à la membrane des spermatozoïdes n'est pas connu. Il est possible que cette liaison entraîne un efflux de cholestérol de la membrane (comme les protéines BSP avec les spermatozoïdes épидидymaires bovins [55]) ou une certaine déstabilisation de la membrane, mais ceci reste à être démontré. pB1 agit possiblement en synergie avec le HCO_3^- du milieu pour qu'il y ait une réorganisation des lipides de la membrane des spermatozoïdes, ce qui permet d'activer des voies intracellulaires amenant à la capacitation des spermatozoïdes porcins dans le tractus génital femelle. pB1 ne serait pas impliquée dans l'activation de voies amenant à la phosphorylation sur tyrosine des protéines des

spermatozoïdes. Toutefois, d'autres facteurs du PS sont possiblement impliqués dans l'activation de voies amenant à la phosphorylation sur tyrosine de certaines protéines des spermatozoïdes.

Nous croyons que pB1 agit en synergie avec le HCO_3^- afin d'induire la capacitation des spermatozoïdes porcins. Des spermatozoïdes porcins éjaculés (qui ont été préalablement en contact avec pB1 dans le PS porcin) sont peu capables lorsqu'ils ont été incubés 3 h dans un milieu capacitant ne contenant pas de HCO_3^- , mais ils sont capables lorsqu'ils ont été incubés dans un milieu capacitant contenant du HCO_3^- [139]. Nos résultats démontrent que les spermatozoïdes épидидymaires qui n'ont pas été pré-incubés avec pB1 sont peu capables après 4 h d'incubation dans un milieu capacitant contenant du HCO_3^- , à comparer à ceux qui ont été pré-incubés avec pB1 (section 3.1., Figure 5). Il serait intéressant de refaire des expériences de capacitation avec des spermatozoïdes épидидymaires porcins pré-incubés avec pB1, puis ensuite incubés dans un milieu capacitant sans HCO_3^- . Si les spermatozoïdes pré-incubés avec pB1 ne capacitent pas dans un milieu sans HCO_3^- , ceci pourrait suggérer que pB1 a besoin du HCO_3^- pour induire la capacitation. Il a été démontré que le HCO_3^- est important dans la réorganisation des lipides de la membranes des spermatozoïdes porcins [131, 136]. Ces études ont été effectuées avec des spermatozoïdes éjaculés, donc qui avaient déjà été en contact avec pB1. Étant donné que les protéines BSP induisent un efflux de cholestérol, que le HCO_3^- est impliqué dans la réorganisation des lipides de la membrane et que pB1 agit possiblement en synergie avec ce dernier, il est fort possible que pB1 soit impliquée dans le remodelage de la membrane des spermatozoïdes porcins.

Il serait intéressant de vérifier si pB1 n'a pas d'autres rôles dans la capacitation *in vivo* des spermatozoïdes porcins parce que la protéine possède plusieurs propriétés de liaisons. pB1 peut lier la zone pellucide [128]. Il serait intéressant de vérifier si pB1 ne serait pas impliquée dans la liaison des spermatozoïdes porcins avec la zone pellucide. De plus, pB1 pourrait peut-être participer à la formation du réservoir de spermatozoïdes car BSP-A1/-A2 lie les cellules épithéliales de l'oviducte [108].

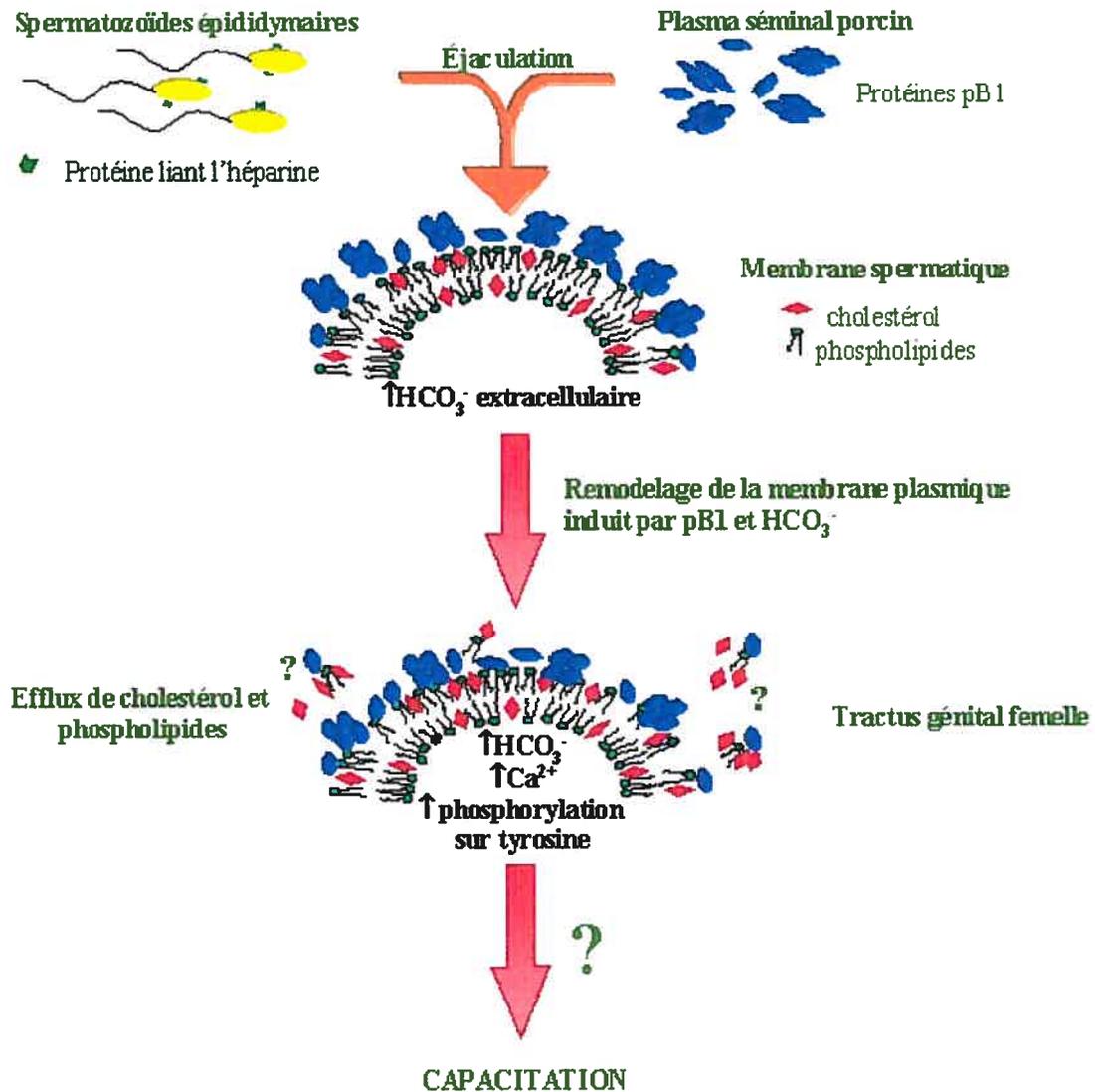


Figure 14: Modèle hypothétique de la capacitation des spermatozoïdes porcins par pB1.

Également, parce que pB1 peut lier les GAGs, il serait tentant de penser que les spermatozoïdes porcins pourraient interagir avec les GAGs du fluide oviductal via pB1 liée à leur membrane. Ceci reste une hypothèse, car l'héparine ne semble pas capaciter *in vitro* les spermatozoïdes porcins [140]. Par contre, l'exposition des spermatozoïdes pendant 3 h au fluide oviductal permet leur capacitation *in vitro* [140]. Toutefois, aucune étude n'a vérifié l'effet des GAGs sulfatés du fluide oviductal sur la capacitation *in vitro* des spermatozoïdes porcins. De plus, il n'est

pas connu si pB1 peut lier les HDL et si ces derniers ont un rôle à jouer dans la capacitation des spermatozoïdes porcins.

4.5. Comparaisons entre les mécanismes de la capacitation porcine et bovine

Une différence majeure que l'on peut remarquer dans la capacitation *in vitro* des spermatozoïdes épидидymaires porcins et bovins est la composition du milieu capacitant. Le milieu capacitant des spermatozoïdes bovins doit contenir des facteurs, tels les HDL, la BSA ou l'héparine. Les spermatozoïdes porcins peuvent être capités *in vitro* dans un milieu qui ne contient pas ces constituants. Une concentration de 5 ou 20 µg/ml d'héparine dans le milieu capacitant ne permet pas de capiter des spermatozoïdes éjaculés porcins, mais plutôt d'induire la réaction de l'acrosome [140]. De plus, si la BSA est omise du milieu capacitant chez le porc, le pourcentage des spermatozoïdes capités ne change pas comparé à des spermatozoïdes incubés dans un milieu capacitant contenant de la BSA [139]. Les protéines pB1 ou BSP-A1/-A2 peuvent induire la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins dans un milieu capacitant ne contenant pas d'héparine ou de BSA, tandis que chez le bovin, les protéines BSP peuvent induire la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins seulement en présence d'héparine [107]. Le ratio cholestérol/phospholipides de la membrane des spermatozoïdes porcins est plus petit que celui des spermatozoïdes bovins (0,20 et 0,40, respectivement [25]). Parce que le ratio cholestérol/phospholipides de la membrane des spermatozoïdes porcins est relativement bas, la BSA n'est probablement pas requise lors de l'efflux de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes porcins. De plus, l'héparine ne semble pas requise pour la capacitation *in vitro* des spermatozoïdes porcins.

Il existe également une différence importante au niveau du taux de capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins et porcins lorsqu'ils sont pré-incubés avec des protéines de la famille des BSP. La pré-incubation des spermatozoïdes épидидymaires porcins avec pB1 ou BSP-A1/-A2 entraîne une augmentation du % des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome induite par l'ionophore A23187 comparé au contrôle, les spermatozoïdes pré-incubés sans protéines (6,0 à 13,8% pour 10 µg/ml pB1 et 7,4 à 16,1% pour 20 µg/ml BSP-A1/-

A2). Lorsque les spermatozoïdes épидидymaires bovins sont pré-incubés avec 20 µg/ml BSP-A1/-A2, il y a une augmentation du % des spermatozoïdes qui ont subi la réaction de l'acrosome induite par la lysophosphatidylcholine comparé au contrôle (7 à 22%) [107]. L'effet de BSP-A1/-A2 sur la capacitation des spermatozoïdes est plus importante chez l'espèce bovine que porcine. De plus, chaque protéine BSP (BSP-A3 et BSP-30kDa) induit une augmentation du % des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome induite par la lysophosphatidylcholine comparé au contrôle et qui varie de 7 à 29% et de 8 à 43%, respectivement [107]. La stimulation du taux de capacitation par les protéines BSP est relativement faible chez les spermatozoïdes porcins comparée aux spermatozoïdes bovins. Ceci suggère que les protéines BSP pourraient ne pas être les seuls facteurs requis afin de capaciter les spermatozoïdes porcins. Comme discuté précédemment, l'héparine semble plutôt induire la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes porcins et non leur capacitation [140]. Ces faits suggèrent que le mécanisme de base de la capacitation des spermatozoïdes porcins peut être relativement différent de celui des spermatozoïdes bovins.

Pour ce qui a trait à la capacitation *in vivo*, la différence majeure entre les protéines BSP et pB1 est leur proportion dans le PS. Les protéines BSP représentent environ 65% des protéines totales du PS bovin, soit environ 31 µg/10⁶ spermatozoïdes, tandis que pB1 représente environ 1,1% des protéines totales du PS porcine, soit environ 2 µg/10⁶ spermatozoïdes [85, 86, 127]. Il y a donc 19 fois plus de protéines BSP par million de spermatozoïdes chez le bovin que chez le porc. De plus, ce sont les spermadhésines qui sont les protéines majoritaires du PS porcine [120]. Cette proportion différente des protéines du PS bovin et porcine est un autre fait qui suggère que le mécanisme de capacitation des spermatozoïdes, bien que semblable, n'est probablement pas identique entre les deux espèces.

Chez les spermatozoïdes bovins, les protéines BSP induisent un efflux de cholestérol [55] et de phospholipides [106] ayant pour effet de déstabiliser la membrane [104], tandis qu'une autre partie reste liée à la membrane pour la

stabiliser. Il n'est pas encore connu si pB1 induit un efflux de lipides pendant la capacitation des spermatozoïdes porcins.

Les protéines BSP induisent la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins en interagissant avec les facteurs capacitants du tractus génital femelle (GAGs et HDL) [104]. De plus, l'héparine peut induire la capacitation *in vitro* des spermatozoïdes éjaculés bovins. Toutefois, il ne semble pas que l'héparine capcite les spermatozoïdes porcins éjaculés *in vitro* [140]. Toutefois, l'effet des GAGs semblables à l'héparine (héparane sulfate et chondroïtine sulfate) sur la capacitation des spermatozoïdes porcins n'est pas connu. D'autres études doivent être effectuées afin de déterminer si les GAGs jouent un rôle dans la capacitation des spermatozoïdes porcins. Également, il n'est pas connu quel serait l'effet sur la capacitation des spermatozoïdes porcins d'ajouter de l'héparine avec pB1 ou BSP-A1/-A2. Le rôle des HDL dans la capacitation des spermatozoïdes porcins n'a pas été étudié.

Les mécanismes intracellulaires semblent être les mêmes entre les spermatozoïdes bovins et porcins, soit une augmentation de Ca^{2+} , de HCO_3^- , du pH ainsi qu'une augmentation de phosphorylation sur tyrosine de certaines protéines. Selon nos résultats préliminaires, la phosphorylation de protéine des spermatozoïdes épидидymaires sur les résidus tyrosine ne semble pas être provoquée par pB1 ou BSP-A1/-A2.

4.6. Applications

La connaissance plus poussée des mécanismes impliqués dans la capacitation des spermatozoïdes porcins est nécessaire pour pouvoir améliorer les différentes techniques du milieu de l'industrie porcine. Les résultats obtenus suite à nos travaux peuvent être utiles pour élaborer des tests de fertilité, pour la fécondation *in vitro* et pour l'IA.

Dans un premier lieu, le fait de savoir que la protéine pB1 à elle seule puisse induire la capacitation des spermatozoïdes porcins suggère que cette protéine pourrait servir comme marqueur de fertilité pour les porcs. Chez l'espèce bovine, plusieurs protéines du PS bovin sont associées avec la fertilité des taureaux, dont

BSP-30kDa [109]. Par une approche protéomique (gel 2D), il a été observé que les taureaux peu fertiles possédaient une concentration plus élevée de BSP-30kDa dans les sécrétions des glandes accessoires que chez les taureaux plus fertiles [109]. Le niveau de pB1 dans les sécrétions des glandes accessoires pourrait être évalué chez les porcs fertiles versus les moins fertiles par la technique de gel 2D ou par RIA.

De plus, la protéine pB1 pourrait être utilisée pour la fécondation *in vitro* chez le porc. Cette technique est intéressante afin de produire une importante quantité d'embryons pour des applications commerciales et de recherche [167]. Les protocoles modernes de fécondation *in vitro* utilisent des milieux capacitants contenant majoritairement de la BSA ou de l'albumine de sérum humain pour capaciter les spermatozoïdes [152]. Ces milieux de capacitation sont efficaces, mais ne sont pas spécifiques à l'espèce. De plus, il y a un risque potentiel de transmission de maladies en utilisant des milieux contenant de la BSA ou de l'albumine de sérum humain [152]. La protéine pB1 pourrait remplacer l'albumine dans le milieu capacitant pour la fécondation *in vitro* chez le porc. Ceci permettrait de diminuer les risques potentiels de contamination causé par la présence d'albumine.

Avant d'être congelé, l'échantillon de sperme de porc doit être refroidi à 5°C afin de préserver l'intégrité de la membrane, la motilité et la viabilité des spermatozoïdes porcins [154]. Le sperme de porc est dilué dans un diluant pour l'étape de refroidissement. Ces diluants sont en général composés de jaune d'œuf, de sucres, de lipoprotéines, de protéines, de tampons et d'agents cryoprotecteurs [154]. Le jaune d'œuf présent dans le diluant sert à protéger les spermatozoïdes contre les chocs dûs au froid en améliorant les fonctions spermatiques et préservant le pouvoir fécondant des spermatozoïdes [168, 169]. Chez le bovin, il a toutefois été démontré que le jaune d'œuf agit en empêchant les protéines BSP de lier la membrane et d'induire un efflux de lipides et ainsi de préserver la qualité des spermatozoïdes [166]. Lorsqu'un échantillon de sperme de porc congelé/décongelé est utilisé pour l'IA, les doses d'insémination doivent être de 2 à 3 fois plus concentrées en spermatozoïdes pour obtenir un taux de fécondation similaire à celui obtenu avec du sperme frais [151]. Il est possible que le jaune d'œuf présent dans le diluant des spermatozoïdes de porc empêche pB1 de lier la membrane des

spermatozoïdes, ce qui permet de préserver la qualité du sperme lors de la congélation, mais ce qui diminue son pouvoir fécondant dû à l'absence de pB1 sur la membrane des spermatozoïdes lorsqu'ils sont décongelés. Il serait intéressant de vérifier si l'ajout de pB1 à un échantillon de sperme décongelé (suite à sa conservation à l'état congelé) permettrait d'améliorer le pouvoir fécondant des spermatozoïdes porcins, étant donné que pB1 est impliquée dans la capacitation.

4.7. Perspectives

Les expériences de capacitation avec pB1 et BSP-A1/-A2 devront être répétées pour confirmer nos résultats préliminaires de phosphorylation sur tyrosine des protéines. Également, il serait intéressant d'inclure deux contrôles à nos expériences. Plus précisément, il serait intéressant de répéter nos expériences dans un milieu NCM, puisqu'il ne contient pas de Ca^{2+} , ni de HCO_3^- et un milieu CM sans HCO_3^- . Ces contrôles permettraient de vérifier si pB1 peut induire la capacitation des spermatozoïdes porcins dans un milieu NCM ou dans un milieu sans HCO_3^- . Également, il faut terminer les expériences préliminaires de capacitation des spermatozoïdes par le PS porcine.

Plusieurs expériences sont nécessaires afin de valider le modèle proposé pour la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par la protéine pB1. Il faudra vérifier si pB1 induit un efflux de cholestérol et de phospholipides de la membrane des spermatozoïdes porcins lors de la capacitation et également si l'ajout de facteurs capacitants (HDL ou GAGs) dans le milieu capacitant permet d'augmenter la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins qui ont été pré-incubés avec pB1.

Comme discuté à la section 4.5., l'effet des protéines BSP sur la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins est plus faible que pour celle des spermatozoïdes épидидymaires bovins. Il serait intéressant de vérifier l'effet potentiel de pB1 en parallèle avec BSP-A1/-A2 sur la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires bovins. Il est possible que pB1 puisse permettre d'induire la capacitation des spermatozoïdes bovins due à son homologie aux protéines BSP. Étant donné que la même concentration de BSP-A1/-A2 a un effet

moins important sur la capacitation des spermatozoïdes porcins que bovins [107], pB1 pourrait peut-être induire un taux plus important de capacitation chez des spermatozoïdes bovins que chez des spermatozoïdes porcins. Ceci reste à être étudié.

Il serait intéressant d'étudier plus en détail l'interaction que les deux domaines de type II de pB1 ont avec les phospholipides de la membrane. D'autres expériences pourraient être effectuées, comme de vérifier si pB1 est impliquée dans la formation du réservoir oviductal de spermatozoïdes chez la truie, étant donné que BSP-A1/-A2 joue ce rôle chez le bovin [108].

4.8. Conclusions

En conclusion, ces travaux ont permis de démontrer que la protéine pB1 induit la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins. De plus, les protéines appartenant à la famille des protéines BSP peuvent également induire la capacitation des spermatozoïdes d'une autre espèce. Puisque ces protéines possèdent deux domaines de type II similaires, ceci suggère que les deux domaines de type II sont les parties les plus importantes de ces protéines pour la capacitation des spermatozoïdes. Des résultats préliminaires nous ont également permis de suggérer que l'induction de la capacitation des spermatozoïdes épидидymaires porcins par pB1 ou BSP-A1/-A2 ne semble pas impliquer l'induction de la phosphorylation sur tyrosine de protéines spermatiques et que l'ensemble des facteurs contenus dans le PS porcine ne permettent pas d'induire la capacitation.

Les résultats obtenus ont permis de proposer un modèle de capacitation des spermatozoïdes porcins par pB1, qui s'inspire de celui des protéines BSP chez le bovin. La protéine pB1 serait importante, possiblement au niveau des événements membranaires amenant à l'efflux de cholestérol et peut-être au niveau du recrutement de facteurs capacitant du tractus génital femelle qui amènerait l'activation de voies intracellulaires inconnues qui sont nécessaires à la capacitation.

Les résultats que nous avons obtenus sont importants car ils apportent un nouvel aspect dans la compréhension du mécanisme de capacitation des spermatozoïdes porcins. Une meilleure compréhension des événements durant la

capacitation est cruciale pour pouvoir perfectionner la technique d'IA afin d'améliorer la productivité porcine. Également, la protéine pB1 pourrait servir de marqueur de fertilité chez les porcs reproducteurs. De plus, la compréhension des mécanismes de capacitation des spermatozoïdes bovins et porcins va faciliter les études chez les autres mammifères en donnant des indications sur le rôle des diverses familles de protéines présentes dans le PS.

5. Bibliographie

1. Knobil E, Neill JD. The physiology of reproduction. New York: Raven Press; 1988.
2. Kierszenbaum AL. Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr Rev* 1994; 15: 116-134.
3. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9: 411-416.
4. Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 103-115.
5. Brandes D. Male accessory sex organs: structure and function in mammals. New York: Academic Press; 1974.
6. Travis AJ, Kopf GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 2002; 110: 731-736.
7. Miller DJ, Ax RL. Seminal plasma: what is it and why is it important. In: 12th technical conference on artificial insemination and reproduction; 1988. 97-107.
8. Cole DJA, Foxcroft GR. Control of pig reproduction. London: Butterworth Scientific; 1982.
9. Bonnes G, Desclaude J, Drogoud C, Gadoud R, Jussiau R, Le Loc'h A, Montméas L, Robin G. Reproduction des mammifères d'élevage. Paris: Les éditions Foucher, INRAP; 1988.
10. Austin CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 1951; 4: 581-596.
11. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168: 697-698.
12. Toyoda Y, Naito K. IVF in domestic animals. In: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS (eds.), Fertilization in mammals. Norwell: Serono Symposia, USA; 1990: 335-347.

13. Fraser LR. Minimum and maximum extracellular Ca²⁺ requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 77-89.
14. 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.
15. DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. Ca(2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 135-143.
16. Coronel CE, Lardy HA. Characterization of Ca²⁺ uptake by guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1987; 37: 1097-1107.
17. White DR, Aitken RJ. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res* 1989; 22: 163-177.
18. Zhou R, Shi B, Chou KC, Oswald MD, Haug A. Changes in intracellular calcium of porcine sperm during in vitro incubation with seminal plasma and a capacitating medium. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 47-53.
19. Zeng Y, Clark EN, Florman HM. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 1995; 171: 554-563.
20. Espinosa F, Darszon A. Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca²⁺. *FEBS Lett* 1995; 372: 119-125.
21. Gadella BM, Van Gestel RA. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 307-319.
22. Holt WV, Harrison RA. Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *J Androl* 2002; 23: 557-565.
23. Harrison RA. Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol Reprod Dev* 2004; 67: 337-352.

24. Vredenburg-Wilberg WL, Parrish JJ. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 490-502.
25. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998; 59: 7-11.
26. Davis BK, Byrne R, Hungund B. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1979; 558: 257-266.
27. Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 1985; 32: 145-153.
28. Langlais J, Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 1985; 12: 183-224.
29. Suzuki F, Yanagimachi R. Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res* 1989; 23: 335-347.
30. Cross NL. Effect of cholesterol and other sterols on human sperm acrosomal responsiveness. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 212-217.
31. 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.
32. Choi YH, Toyoda Y. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. *Biol Reprod* 1998; 59: 1328-1333.
33. Wolf DE, Hagopian SS, Ishijima S. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *J Cell Biol* 1986; 102: 1372-1377.
34. Shalgi R, Matityahu A, Gaunt SJ, Jones R. Antigens on rat spermatozoa with a potential role in fertilization. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 286-296.
35. 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.
36. Hunter T. Signaling--2000 and beyond. *Cell* 2000; 100: 113-127.
 37. Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 75.
 38. Naz RK. Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation. *Biol Reprod* 1999; 60: 1402-1409.
 39. Jha KN, Shivaji S. Protein serine and threonine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in in vitro capacitated hamster spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 119-130.
 40. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 1996; 55: 684-692.
 41. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995; 121: 1129-1137.
 42. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Interaction between Ca²⁺, cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *J Androl* 1998; 19: 434-443.
 43. Dube C, Tardif S, LeClerc P, Bailey JL. The importance of calcium in the appearance of p32, a boar sperm tyrosine phosphoprotein, during in vitro capacitation. *J Androl* 2003; 24: 727-733.
 44. Luconi M, Krausz C, Forti G, Baldi E. Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1996; 55: 207-216.
 45. Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, Aitken RJ. Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine

- phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *J Cell Sci* 2004; 117: 211-222.
46. Ford WC. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 387-399.
 47. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 643-656.
 48. de Lamirande E, Harakat A, Gagnon C. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J Androl* 1998; 19: 215-225.
 49. Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106: 1092-1098.
 50. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 1989; 40: 1020-1025.
 51. Langlais J, Kan FW, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res* 1988; 20: 185-201.
 52. McNutt TL, Killian GJ. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J Androl* 1991; 12: 244-252.
 53. Lane M, Therien I, Moreau R, Manjunath P. Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol Reprod* 1999; 60: 169-175.
 54. Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 195-204.

55. Therien I, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1998; 59: 768-776.
56. 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.
57. Ax RL, Lenz RW. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. *J Dairy Sci* 1987; 70: 1477-1486.
58. Lee CN, Ax RL. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci* 1984; 67: 2006-2009.
59. Zachariae F, Thorsoe H. Hormonal control of acid mucopolysaccharides in the female genital tract. In: Hansen GA (ed.) *Hormones and connective tissue*. Denmark: Munksgaard; 1966.
60. Tienthai P, Kjellen L, Pertoft H, Suzuki K, Rodriguez-Martinez H. Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12: 173-182.
61. Valencia A, Wens MA, Merchant H, Reyes R, Delgado NM. Capacitation of human spermatozoa by heparin. *Arch Androl* 1984; 12 Suppl: 109-113.
62. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38: 1171-1180.
63. Varner DD, Bowen JA, Johnson L. Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm. *Arch Androl* 1993; 31: 199-207.
64. Chauhan MS, Singla SK, Manik RS, Madan ML. Increased capacitation of buffalo sperm by heparin as confirmed by electron microscopy and in vitro fertilization. *Indian J Exp Biol* 1997; 35: 1038-1043.
65. Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107: 1326-1332.

66. Lenz RW, Ball GD, Lohse JK, First NL, Ax RL. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1983; 28: 683-690.
67. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Effect of heparin and chondroitine sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 1985; 24: 537-549.
68. Chang SC, Jones JD, Ellefson RD, Ryan RJ. The porcine ovarian follicle: I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biol Reprod* 1976; 15: 321-328.
69. Simpson ER, Rochelle DB, Carr BR, MacDonald PC. Plasma lipoproteins in follicular fluid of human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 1469-1471.
70. Brantmeier SA, Grummer RR, Ax RL. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J Dairy Sci* 1987; 70: 2145-2149.
71. Suarez SS. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* 1996; 17: 331-335.
72. Florman HM, Storey BT. Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev Biol* 1982; 91: 121-130.
73. Arnoult C, Zeng Y, Florman HM. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J Cell Biol* 1996; 134: 637-645.
74. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; 434: 234-238.
75. Killian G. Fertility factors in seminal plasma. In: 14th technical conference on artificial insemination and reproduction; 1992. 33-37.
76. Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 1993; 49: 1202-1207.

77. Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Smith RG, Forrest DW, Sprott LR, Ax RL. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci* 1998; 76: 2032-2039.
78. Chang MC. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 1957; 179: 258-259.
79. Robertson RT, Bhalla VK, Williams WL. Purification and the peptide nature of decapacitation factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 45: 1331-1336.
80. Eng LA, Oliphant G. Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol Reprod* 1978; 19: 1083-1094.
81. Dostalova Z, Calvete JJ, Sanz L, Hettel C, Riedel D, Schoneck C, Einspanier R, Topfer-Petersen E. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994; 375: 457-461.
82. Lee CN, Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res.* 1985; 12: 345-355.
83. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* 1990; 42: 899-915.
84. Florman HM, First NL. Regulation of acrosomal exocytosis. II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Dev Biol* 1988; 128: 464-473.
85. 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.
86. 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.

87. Manjunath P. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma. In: Sairam MR, Atkinson LE (eds.), *Gonadal Proteins and Peptides and their Biological Significance*. Singapore: World Scientific Publishing; 1984: 49-61.
88. Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Ying SY, Guillemin R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113: 861-867.
89. Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, M. C, Chapdelaine A. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: Chrétien M, K.W. M (eds.), *Molecular biology of brain and endocrine peptidergic systems*. New York: Plenum Press; 1988: 259-273.
90. Desnoyers L, Manjunath P. Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305: 341-349.
91. Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, Chretien M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem J* 1987; 243: 195-203.
92. 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.
93. Banyai L, Trexler M, Koncz S, Gyenes M, Sipos G, Patthy L. The collagen-binding site of type-II units of bovine seminal fluid protein PDC-109 and fibronectin. *Eur J Biochem* 1990; 193: 801-806.
94. 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.
95. 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.

96. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 1992; 267: 10149-10155.
97. Manjunath P, Chandonnet L, Baillargeon L, Roberts KD. Calmodulin-binding proteins in bovine semen. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 75-81.
98. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Menard M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* 2002; 67: 1250-1258.
99. 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.
100. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 313-318.
101. Ignatz GG, Lo MC, Perez CL, Gwathmey TM, Suarez SS. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 2001; 64: 1806-1811.
102. Ramakrishnan M, Anbazhagan V, Pratap TV, Marsh D, Swamy MJ. Membrane insertion and lipid-protein interactions of bovine seminal plasma protein PDC-109 investigated by spin-label electron spin resonance spectroscopy. *Biophys J* 2001; 81: 2215-2225.
103. Thomas CJ, Anbazhagan V, Ramakrishnan M, Sultan N, Surolia I, Swamy MJ. Mechanism of membrane binding by the bovine seminal plasma protein, PDC-109: a surface plasmon resonance study. *Biophys J* 2003; 84: 3037-3044.
104. 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.
105. Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50: 27-37.

106. Therien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1999; 61: 590-598.
107. 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.
108. Gwathmey TM, Igotz 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.
109. Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl* 2006; 27: 201-211.
110. 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.
111. Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Topfer-Petersen E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 1995; 310 (Pt 2): 615-622.
112. Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 1997; 407: 201-206.
113. Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Gabius HJ, Topfer-Petersen E. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 37-43.
114. Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 39.

115. Boisvert M, Bergeron A, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol Reprod* 2004; 70: 656-661.
116. Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 461-470.
117. Menard M, Nauc V, Lazure C, Vaillancourt D, Manjunath P. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. *Mol Reprod Dev* 2003; 66: 349-357.
118. Magdaleno L, Gasset M, Varea J, Schambony AM, Urbanke C, Raida M, Topfer-Petersen E, Calvete JJ. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *FEBS Lett* 1997; 420: 179-185.
119. Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Topfer-Petersen E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur J Biochem* 1996; 242: 636-640.
120. Topfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 1998; 30: 217-224.
121. Calvete JJ, Sanz L, Reinert M, Dostalova Z, Töpfer-Petersen E. Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. In: Jamieson BGM, Ausio, J., and Justine, J.-L. (ed.) *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. Paris: Mém. Mus. natn, Hist. nat.; 1995: 515-524.
122. Topfer-Petersen E. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum Reprod Update* 1999; 5: 314-329.
123. 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.

124. Assreuy AM, Calvete JJ, Alencar NM, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Melo SC, Cunha FQ, Ribeiro RA. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. *Biol Reprod* 2002; 67: 1796-1803.
125. Hadjisavas M, Armstrong DT, Seamark RF. Purification of a cell-cell adhesion regulator from porcine seminal vesicle fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1206-1216.
126. Bezouska K, Sklenar J, Novak P, Halada P, Havlicek V, Kraus M, Ticha M, Jonakova V. Determination of the complete covalent structure of the major glycoform of DQH sperm surface protein, a novel trypsin-resistant boar seminal plasma O-glycoprotein related to pB1 protein. *Protein Sci* 1999; 8: 1551-1556.
127. Plucienniczak G, Jagiello A, Plucienniczak A, Holody D, Strzezek J. Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54-kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 303-309.
128. Jonakova VV, Manaskova P, Kraus M, Liberda J, Ticha M. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol Reprod Dev* 2000; 56: 275-277.
129. Manaskova P, Liberda J, Ticha M, Jonakova V. Aggregated and monomeric forms of proteins in boar seminal plasma: characterization and binding properties. *Folia Biol (Praha)* 2000; 46: 143-151.
130. Rodriguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vazquez JM, Martinez E, Roca J, Sanz L, Calvete JJ. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* 2005; 63: 514-535.
131. Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 378-391.
132. Green CE, Watson PF. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 2001; 122: 889-898.
133. Harrison RA, Gadella BM. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 2005; 63: 342-351.

134. Tardif S, Dube C, Chevalier S, Bailey JL. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* 2001; 65: 784-792.
135. Dube C, Leclerc P, Baba T, Reyes-Moreno C, Bailey JL. The Proacrosin Binding Protein, sp32, Is Tyrosine Phosphorylated During Capacitation of Pig Sperm. *J Androl* 2005; 26: 519-528.
136. Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* 2001; 114: 3543-3555.
137. 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.
138. Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 1995; 104: 305-313.
139. 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.
140. Kim NH, Day BN, Lim JG, Lee HT, Chung KS. Effects of oviductal fluid and heparin on fertility and characteristics of porcine spermatozoa. *Zygote* 1997; 5: 61-65.
141. Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int J Androl* 2002; 25: 84-93.
142. Stock CE, Fraser LR. The acrosome reaction in human sperm from men of proven fertility. *Hum Reprod* 1987; 2: 109-119.

143. Berger T, Turner KO, Meizel S, Hedrick JL. Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol Reprod* 1989; 40: 525-530.
144. Aitken RJ, Ross A, Hargreave T, Richardson D, Best F. Analysis of human sperm function following exposure to the ionophore A23187. Comparison of normospermic and oligozoospermic men. *J Androl* 1984; 5: 321-329.
145. Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, Kopf GS. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 1998; 19: 242-248.
146. Saling PM, Storey BT. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol* 1979; 83: 544-555.
147. Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* 1984; 104: 287-296.
148. Tsien RY. Fluorescent indicators of ion concentrations. *Methods Cell Biol* 1989; 30: 127-156.
149. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* 1986; 15: 213-226.
150. Talbot P, Summers RG, Hylander BL, Keough EM, Franklin LE. The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A23187. *J Exp Zool* 1976; 198: 383-392.
151. Gerrits RJ, Lunney JK, Johnson LA, Pursel VG, Kraeling RR, Rohrer GA, Dobrinsky JR. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology* 2005; 63: 283-299.
152. Bavister BD. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction* 2002; 124: 181-196.
153. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 77-81.
154. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 143-172.

155. Jongbloed AW, Lenis NP. Environmental concerns about animal manure. *J. Anim. Sci.* 1998; 76: 2641-2648.
156. Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 787-792.
157. Gadella BM, Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 2000; 127: 2407-2420.
158. Dott HM, Foster GC. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'life-dead' stain. *J Reprod Fertil* 1972; 29: 443-445.
159. Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 1997; 56: 707-719.
160. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
161. Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 1987; 262: 10035-10038.
162. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87: 206-210.
163. 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.
164. Harayama H, Magargee SF, Kunze E, Shidara O, Iwamoto E, Arikawa S, Miyake M, Kato S, Hammerstedt RH. Changes in epididymal protein anti-agglutinin on ejaculated boar spermatozoa during capacitation in vitro. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11: 193-199.
165. Vadnais ML, Kirkwood RN, Tempelman RJ, Sprecher DJ, Chou K. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as

- determined using chlortetracycline assay. *Anim Reprod Sci* 2005; 87: 121-132.
166. 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.
 167. Abeydeera LR. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002; 57: 256-273.
 168. Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci* 1972; 35: 580-584.
 169. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B, Verkleij AJ. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 1993; 30: 32-44.

