

GUILLAUME MORIN

**CARACTÉRISATION DE LA PROTÉINE
SPERMATIQUE BOVINE P80 ET ÉTUDE DE SON
RÔLE AU COURS DE L'INTERACTION ENTRE
LES GAMÈTES**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT D'OBSTÉTRIQUE-GYNÉCOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

Résumé

Il est reconnu que le passage de la matrice extracellulaire du cumulus ainsi que de la zone pellucide par le spermatozoïde sont assurés, chez plusieurs espèces de mammifères, par la protéine spermatique PH-20. Cette protéine possède une activité hyaluronidase qui lui permet de cliver les liens d'acide hyaluronique contenus dans le cumulus et est responsable de la liaison du spermatozoïde ayant subi la réaction de l'acrosome à la zone pellucide. Une protéine spermatique bovine de 80 kDa (p80) possédant une homologie avec PH-20 fut identifiée au sein de notre laboratoire. Puisque PH-20 n'est pas identifiée chez le bovin, les travaux présentés dans cette thèse étaient destinés à déterminer si la protéine p80 est la PH-20 bovine et si elle est impliquée dans l'interaction entre les gamètes au cours de la fécondation.

Dans un premier temps, la caractérisation de la protéine fut effectuée à l'aide d'une approche PCR et immunologique. L'homologie entre la protéine spermatique bovine p80 et PH-20 fut établie à l'aide de ces résultats. L'analyse de la séquence déduite en acides aminés de p80 a permis de mettre en lumière la présence de caractéristiques uniques chez la protéine dont l'absence d'une ancre-GPI, la présence d'un domaine transmembranaire, de sites de phosphorylation et de N- et O-glycosylation. Deuxièmement, à l'aide du développement d'un anticorps dirigé contre l'extrémité C-terminale de p80 et d'un anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale, l'orientation de p80 dans les membranes spermatiques fut établie. Les résultats montrent que deux populations de p80 existent chez le spermatozoïde bovin. La première est internalisée dans la région antérieure de la tête des spermatozoïdes alors que la deuxième est localisée dans la région post-acrosomale de la tête et expose son domaine hyaluronidase à l'environnement extracellulaire. De plus, les analyses protéomiques et immunologiques démontrent que la population post-acrosomale est un isoforme plus court de p80 et est d'origine épидидymaire alors que la forme pleine longueur présente dans la région antérieure de la tête du spermatozoïde est d'origine testiculaire. La présence de sites d'O-glycosylation fut aussi confirmée expérimentalement.

Afin de déterminer le rôle fonctionnel de p80, l'état de phosphorylation sur les résidus tyrosines de la protéine au cours de la capacitation et de la réaction de l'acrosome fut étudié. De même, l'implication de p80 dans la modulation de la concentration des

niveaux de calcium intracellulaire spermatique en présence d'acide hyaluronique ainsi que son implication au cours de l'interaction entre le spermatozoïde et la zone pellucide furent déterminées. Les résultats démontrent que p80 n'est pas phosphorylée sur ses résidus tyrosines au cours de la capacitation et de la réaction acrosomique et n'est pas impliquée dans la modulation des concentrations de calcium intracellulaire. Toutefois, p80 est impliquée, via son extrémité C-terminale, dans la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide puisque la présence de la protéine purifiée ainsi que l'anticorps C-terminal de p80 dans le milieu inhibe cette liaison. De plus, la glycosylation de la protéine n'est pas responsable de son interaction avec la zone pellucide puisque la présence de la forme déglycosylée de p80 dans le milieu d'incubation produit le même taux d'inhibition que sa forme native. Les résultats présentés dans cette thèse démontrent clairement que la protéine p80 est la PH-20 bovine, que deux populations sont présentes sur le spermatozoïde et qu'elle est responsable de l'activité hyaluronidase requise par le spermatozoïde pour franchir le cumulus ainsi que pour l'interaction entre ceux-ci et la zone pellucide entourant l'ovule au cours de la fécondation.

Abstract

It is generally accepted that the penetration of the cumulus complex and the zona pellucida by spermatozoa is mediated, in many species, by the sperm protein PH-20. This protein has hyaluronidase activity that cleaves the hyaluronic acid bonds present in the cumulus and is responsible for the binding of the acrosome reacted spermatozoa to the zona pellucida. In the bovine, a 80 kDa sperm protein (p80) that possesses an homology with PH-20 was identified in our laboratory. Since PH-20 has not been identified in the bovine, the aims of the research presented in this thesis were to determine if p80 is the bovine PH-20 and if it plays a role in gamete interaction during fertilization.

The characterization of the protein using PCR and immunologic approaches shows the homology between p80 and PH-20. Amino acid sequence analysis of the protein revealed specific characteristics of the bovine PH-20 (p80) such as the absence of a GPI-anchor, the presence of a transmembrane domain and of phosphorylation, N- and O-glycosylation sites. Also, by using an antibody developed against the p80 C-terminal extremity and an antibody that recognize the N-terminal domain of the protein, orientation of p80 in the sperm membrane was evaluated. Results show that two populations of p80 are present on the sperm head. The first one is internalised in the anterior region of the head while the second is localised on the post-acrosomal region of the head with its hyaluronidase domain exposed to the extracellular environment. Moreover, proteomic and immunologic analysis revealed that p80 post-acrosomal population is a shorter isoform that originates from the epididymis while the full length p80 located on the anterior region of the sperm head originates from the testis. N- and O-glycosylation sites were also detected on both isoforms.

In order to determine functional roles of p80, the tyrosine phosphorylation state of the protein during sperm capacitation and acrosome reaction was evaluated. Also, p80 implication in sperm intracellular calcium concentration modulation via the presence of hyaluronic acid and its implication during sperm/zona pellucida interaction was determined. Results show that p80 is not tyrosine phosphorylated during capacitation and acrosome reaction and is not implicated in sperm intracellular calcium modulation. However, the protein is required, via its C-terminal extremity, for the sperm binding to the zona pellucida

as the presence of the purified sperm protein as well as the p80 C-terminal antibody in the IVF incubation medium inhibit sperm/zona binding. Furthermore, glycosylation of the protein is not required during this interaction since the presence of deglycosylated p80 in the incubation medium has the same inhibitory effect than the native form of p80. Concretely, the results presented in this thesis demonstrate that p80 is the bovine PH-20, that two populations are present on the bull sperm with one responsible for the hyaluronidase activity required by the spermatozoon to penetrate the cumulus and the other one playing a role in the binding of spermatozoa to the zona pellucida surrounding the egg during fertilization.

Avant-Propos

Il est important de définir la contribution des différents auteurs dans les travaux présentés tout au long des chapitres de cette thèse. Tout d'abord, les Dr. Pierre Leclerc et Robert Sullivan ont contribué de près ou de loin à l'élaboration conceptuelle de pratiquement toutes les études présentées dans cette thèse. La Dre. Claudia Lalancette a contribué à l'élaboration conceptuelle des travaux présentés dans le chapitre 2. Isabelle Laflamme a contribué à l'élaboration conceptuelle et à l'exécution technique des travaux portant sur la préparation et la maturation des ovocytes ainsi qu'à l'élaboration conceptuelle des travaux portant sur les essais de liaison sperme/ zone pellucide au chapitre 4. Le Dr. Claude Robert à quant à lui contribué à l'élaboration conceptuelle de ces travaux.

L'achèvement de cette thèse de doctorat n'aurait pu se faire sans la participation, de près ou de loin, d'une foule de personnes, non seulement tout au long de ces quatre années de doctorat mais aussi de ces sept années totales de travail en recherche. Tout d'abord, il est évident que rien de tout cela n'aurait pu survenir sans l'aide et la supervision de mon directeur de recherche, le très imminent Dr. Pierre Leclerc! Pierre, ta contribution dans ma vie, tant au niveau professionnel que personnel a eu une grande influence sur ce que je suis devenu en ces sept années passées au sein de ton équipe de recherche. Suite aux nombreuses discussions que nous avons eu, tant au laboratoire qu'au cours de 5 à 7 ou l'épicerie devenait optionnel, j'ai maintenant une très bonne idée sur la façon dont j'aimerais diriger mon laboratoire et ma vie. Merci monsieur le directeur! Merci aussi au Dr. Robert Sullivan pour avoir accepté de codiriger cette thèse. Tes conseils et tes histoires m'ont guidé tout au long de ces années et ont contribué grandement à la réussite des travaux présentés dans ce document. Merci aussi au CRBR pour avoir favorisé une ambiance où les échanges entre étudiants et chercheurs étaient si simples. L'absence de barrières hiérarchiques au sein de ce groupe de recherche favorise grandement le développement des étudiants. Merci de nous considérer comme des confrères et non des exécutants.

Un merci tout spécial à tous ceux que j'ai connu au cours de ces années de recherches et qui ont encore une place importante dans ma vie : Serge McGraw, Christian

Vigneault, Maud Vallée, Catherine Lachance, Louis-Jean Bordeleau, Marlène Fortier, Catherine Gravel, Marc Simard, Karine Tremblay, François Paradis, Susan Novak, Alexandra Fournet, Isabelle Gilbert, Mathieu Boilard, Claudia Lalancette, Véronique Dorval et Serge Goupil. En plus des collègues de travail, il y a les amis proches qui, sans eux, sans leur support, leur divertissement, ces sept années aurait été moins agréables. Merci donc à Steve Jean (mon pot!!!), Frédéric Thisdel (cousin!), Christine Lawson, Olivier Boucher, François Lévesque, Sylvie Desormiers, Ève Lamontagne, Jean-Philippe Gaulin, Tiger, Nathalie Proulx, Jeff Rochette, Annie Prout Karine Dallaire, Gros Phil, Marie-No Harvey, Nathalie Dussault, Julie Hoffman, Vincent Thériault-Prout (Carpe Diem mon Teurd, Carpe Diem), Jérôme Pelletier, la gang du chalet (qu'on en a perdu des neurones au cours des années là-bas!!!) et la gang de 50 qu'on est encore à Rimouski, solide! Grâce à vous, la vie est belle! Merci!

Enfin, je veux terminer cet avant propos en remerciant ma famille. Merci à mon père Florent pour m'avoir offert tout le support dont j'ai eu besoin. C'est grâce à ton support et tes bons conseils si je suis où en j'en suis maintenant. On s'est serré les coudes de nombreuses années pour surmonter les épreuves. Merci p'pa pour tes encouragements, merci d'être un bon père! Merci à mon frère Christophe pour tous les beaux moments que l'on a passé et que je compte bien encore passer avec toi. Ces moments m'ont permis de me changer les idées lorsque rien ne semblait fonctionner et à chaque fois, j'en revenais toujours ressourcé! Finalement, merci à celle qui fait partie de ma vie depuis maintenant sept ans! Merci Karine pour ton amour, ton soutien, ta compréhension et ta patience tout au long de ces années. Sans toi ces années auraient été bien différentes, sans l'ombre d'un doute plus difficiles. Je t'aime! Prends soins de notre enfant en développement!!!

*À Lyne, Alonzo et Vincent, vous serez
toujours avec moi...*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Avant-Propos	v
Table des matières	viii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations.....	14
Chapitre 1 : Revue de la littérature	16
1.1 Structure du testicule	16
1.2 La spermatogenèse.....	17
1.2.1 Phase mitotique.....	18
1.2.2 Phase méiotique	19
1.2.3 Phase post-méiotique ou spermiogenèse	19
1.2.4 Régulation de la spermatogenèse.....	20
1.3 Structure du spermatozoïde	20
1.3.1 La tête	21
1.3.2 Le flagelle	23
1.4 Maturation épидидymaire.....	23
1.5 La capacitation	25
1.5.1 Survol des événements survenant au cours de la capacitation.....	26
1.5.2 Site, durée et conséquences de la capacitation	31
1.6 Réaction de l'acrosome.....	31
1.6.1 Liaison du récepteur spermatique à son ligand.....	32
1.6.2 Maintien de l'influx de calcium.....	33
1.6.3 Événements fusogéniques.....	34
1.7 Événement dans le tractus femelle.....	35
1.7.1 Rôle du plasma séminal	35
1.7.2 Passage du col de l'utérus	36
1.7.3 Transit dans l'utérus et passage de la jonction utéro-tubaire.....	36
1.7.4 Transit dans l'oviducte.....	37
1.8 Interactions entre les gamètes	39
1.8.1 Rencontre entre le spermatozoïde et le complexe ovocyte-cumulus (COC).....	39
1.8.2 Interaction entre les spermatozoïdes et la zone pellucide.....	42
1.9 PH-20	47
1.9.1 Identification et caractérisation de la protéine PH-20; études chez le cobaye; études immunologiques	47
1.9.2 PH-20; protéine conservée chez les espèces.....	48
1.9.3 PH-20 est une protéine GPI-ancrée	49
1.9.4 PH-20 est impliquée dans le passage de la matrice du cumulus grâce à son activité hyaluronidase	49
1.9.5 PH-20 est impliquée dans l'attachement secondaire des spermatozoïdes à la zone pellucide via un domaine différent du domaine hyaluronidase.	51
1.9.6 Localisation et maturation de PH-20 : diversité selon les espèces	52
1.9.7 PH-20 n'est pas restreinte aux tissus reproducteurs mâles	55

1.9.8 PH-20, domaine fonctionnel, signalisation, capacitation et réaction de l'acrosome... une implication?	56
1.10 Problématique et Hypothèse	60
1.10.1 Problématique	60
1.10.2 Hypothèse et plan de recherche	61
1.11 Bibliographie	63
Chapitre 2 / Chapter 2	79
Caractérisation de la protéine spermatique bovine PH-20 (p80) et analyses de ses modifications au cours du transit épидидymaire des spermatozoïdes	79
Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit	79
Résumé	80
2.1 Abstract	81
2.2 Introduction	82
2.3 Materials and Methods	85
2.3.1 Materials	85
2.3.2 Isolation of haploid bull testis germ cells	85
2.3.3 RNA isolation, first strand cDNA synthesis and PCR amplification	86
2.3.4 Expression of p80 in bovine tissues by Northern blot	88
2.3.5 Expression of the p80 protein during spermatogenesis	89
2.3.6 Detection of p80 in epididymal spermatozoa and fluid	89
2.3.7 Immunolocalization of p80 on epididymal spermatozoa	90
2.3.8 In Gel Hyaluronidase Activity	90
2.3.9 N-Deglycosylation of the sperm p80 protein	91
2.4 Results	92
2.4.1 Protein sequencing	92
2.4.2 Expression of p80	95
2.4.3 Effect of epididymal maturation on sperm p80 protein	97
2.4.4 N-deglycosylation of the p80 protein	99
2.5 Discussion	101
2.6 Acknowledgement	106
2.7 References	107
Chapitre 3 / Chapter 3	110
La protéine Spam1 bovine (p80) existe sous deux isoformes chez le spermatozoïde éjaculé. Leurs localisation et orientation différentielles dans les membranes suggèrent différents rôles	110
Bovine Spam1 exists as two isoforms in ejaculated sperm. Different protein orientations within the membranes suggest different roles	110
3.1 Résumé	111
3.2 Abstract	112
3.3 Introduction	113
3.4 Materials and Methods	115
3.4.1 Antibodies	115
3.4.2 Construction and expression of recombinant bovine Spam1 partial domains and characterization of the antibodies	116
3.4.3 Immunolocalization of bovine Spam1 on ejaculated spermatozoa	117
3.4.4 Isolation of bovine Spam1	118

3.4.5 Deglycosylation of soluble sperm protein	119
3.4.6 Identification of bovine Spam1	120
3.4.7 RNA isolation, first strand cDNA synthesis, and PCR amplification	120
3.5 Results	122
3.5.1 Characterization of the bull Spam1 antibodies	122
3.5.2 Orientation of bovine Spam1 within the sperm membrane	123
3.5.3 Protein purification and identification	124
3.6 Discussion	131
3.7 Acknowledgements	136
3.8 References	137
Chapitre 4 / Chapter 4	139
Étude des fonctions de la PH-20 bovine, une protéine requise pour la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide entourant l'ovule	139
Functional role of the bovine PH-20; a protein required for sperm binding to the egg's zona pellucida	139
4.1 Résumé	140
4.2 Abstract	141
4.3 Introduction	142
4.4 Materials and Methods	145
4.4.1 Antibodies	145
4.4.2 Sperm preparation	145
4.4.3 Solubilization and immuniprecipitation	146
4.4.4 Western immunoblotting	147
4.4.5 Evaluation of bull sperm intracellular free Ca ²⁺ concentration	147
4.4.6 Native bovine PH-20 protein isolation	148
4.4.7 PH-20 native total, N- and O-deglycosylation	149
4.4.8 Oocytes Recovery and Selection	149
4.4.9 <i>In Vitro</i> Maturation	149
4.4.10 Sperm/Zona binding assay	150
4.5 Results	152
4.5.1 Tyrosine phosphorylation of bull sperm PH-20	152
4.5.2 Calcium modulation	155
4.5.3 Sperm/zona binding assay	157
4.6 Discussion	161
4.6.1 Bull PH-20 is not phosphrylated during in vitro capacitation and induced acrosome reaction.	161
4.6.2 Bovine Spam1 does not affect intracellular calcium concentration during capacitation	162
4.6.3 Bull PH-20 is involved in sperm binding to the egg zona pellucida	163
4.7 Acknowledgements	165
4.8 References	166
Chapitre 5 : Discussion et Conclusion	169
5.1 Références	175

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Changements observés chez le spermatozoïde au cours de la capacitation. Tiré de Florman et al.(Florman Harvey 2006).....	26
Tableau 1.2: Présence des différents gènes codant pour les protéines ZP chez les vertébrés supérieurs selon les séquences présentement disponibles dans les banques de données.	43
Tableau 2.1: Oligonucleotide sequences of the primers use for the PCR and 3'/5'RACE amplification	87
Tableau 2.2: Comparative homology of the p80 protein with the PH-20 of other species .	95
Tableau 3.1: Peptide identified from the 80 and 70 kDa protein by LC/MS/MS analysis that were positively mapped either on the p80 or the commercial soluble bull testis hyaluronidase sequence	129

Liste des figures

Figure 1.1: A) Anatomie du testicule. B) Coupe transversale du testicule.....	16
Figure 1.2: Illustration de la spermatogénèse	17
Figure 1.3 : Types cellulaires retrouvés au cours des différents stades de la spermatogénèse chez le taureau	18
Figure 1.4 : Structure complète (gauche) et de la tête (droite) du spermatozoïde bovin.....	21
Figure 1.5: Structure de l'épididyme.	24
Figure 1.6: Schéma de la réaction de l'acrosome.	32
Figure 1.7: Événements survenant lors de l'interaction entre les gamètes au cours de la fécondation.....	39
Figure 1.8: Structure de la protéine PH-20 humaine.	58
Figure 1.9: Localisation des différents domaines de PH-20.....	60
Figure 2.1 : p80 nucleotide sequence.	92
Figure 2.2: Amino acid sequence of bull sperm p80.	94
Figure 2.3: Northern blot analysis of p80 mRNA expression in different bovine tissues..	96
Figure 2.4: Testicular expression of bull sperm p80 protein.....	96
Figure 2.5: Western blot detection of the p80 in protein extracts from caput, corpus and cauda epididymal sperm and fluids	97
Figure 2.6: Immunolocalization of p80 on bull spermatozoa collected from the caput corpus and cauda epididymidis..	98
Figure 2.7: Dectection of the hyaluronidase activity of epididymal spermatozoa from the caput, corpus and cauda epididymis..	99
Figure 2.8: Western blot detection of N-deglycosylated p80 bull sperm protein.....	100
Figure 3.1: Detection of the p80 recognition domain by the monoclonal 203-7D10 and polyclonal anti-p80 antibodies.....	116
Figure 3.2: Identification of the recognition domain by the 203-7D10 monoclonal antibody and anti-p80 polyclonal antibody	123
Figure 3.3: Immunolocalization of Spam on bull spermatozoa.....	124
Figure 3.4: Affinity-purification of Spam1 from the soluble fraction of ejaculated bull spermatozoa	125
Figure 3.5: Immunodetection of the two Spam1 isoforms from bull sperm cytosoluble proteins.....	125
Figure 3.6: Immunodetection of the two Spam1 isoforms from testicular germ cells proteins.....	126
Figure 3.7 : Western blot detection of the two isoform of Spam1 in protein extracts from the fluid and sperm obtained from the caput, corpus, and cauda epididymis.....	126
Figure 3.8: PCR amplification of the cDNA encoding for the full length and a portion of the hyaluronidase domain of the Spam1 protein.	127
Figure 3.9: Identification of the proteins selected for LC/MS/MS analysis.....	128
Figure 3.10: Immunodetection of the cytosoluble fraction of ejaculated spermatozoa before or after total, N- and O-deglycosylation	130
Figure 4.1: Detection of the tyrosine phosphorylated content and bull PH-20 protein from the total, soluble and insoluble of sperm	153

Figure 4.2 : Evaluation of the phosphorylated state of bull PH-20 from spermatozoa incubated in presence of either IBMX or sodium orthovanadate.	154
Figure 4.3: Evaluation of the phosphorylated state of Bull PH-20 from acrosome reacted spermatozoa.	155
Figure 4.4: Short term effect of hyaluronic acid and thapsigargin on the free intracellular Ca^{2+} level of individual capacitated (heparin ⁺) and non-capacitated sperm.....	156
Figure 4.5 : Effect of hyaluronic acid on the regulation of free intracellular Ca^{2+} level of capacitated (heparin ⁺) and non-capacitated sperm	157
Figure 4.6: Sperm/zona pellucida binding assay using denuded oocytes pre-incubated with purified bull Spam1 protein..	158
Figure 4.7: Importance of the glycosylation status of sperm PH-20 in the sperm binding to the zona pellucida.	159
Figure 4.8: Involvement of the N- or C-terminal domain of bovine PH-20 in sperm binding to the zona pellucida.	160
Figure 5.1: Schéma de représentation de la protéine Spam1 bovine (p80) dans la membrane du spermatozoïde.	174

Liste des abréviations

AMPC: Adénosine monophosphate cyclique
ARNm: ARN messenger
BCA: Bicinchoninic acid
BSA: Bovine serum albumin
BSP: Bovine seminal plasma
Ca²⁺: Ion calcium
cDNA: Complementary DNA
COC: Cumulus-oocytes complex
DAB: 3,3'Diaminobenzidine
DABCO: 1,4diazabicyclo[2,2,2]octane
DAG: Diacylglycérol
DMSO: Dimethylsulfoxide
dNTP: Déoxynucleotide triphosphate
D-PBS: Dulbecco s Phosphate Buffered Saline
DTT: Dithiothreitol
ECL: Enhanced chemiluminescence
EDTA: acide éthylène-diamine-tétraacétique
FAF-BSA: Fatty acid free – bovine serum albumin
FCS: Fetal calf serum
FITC: Fluorescein reactive isothiocyanate form
FSH: Hormone folliculo-stimulante
GDNF: Glial cell linederived neurotrophic factor
Glu: Glutamate
GPI: Glycosyl-phosphatidylinositol
GRP-78: 78 kDa Glucose-regulated protein
HBS: Hepes buffered saline
HDL: High density lipoproteine
His-tag: Histidine-tagged
HRP: Horseradish peroxidase
HSP-60: 60 kDa Heat shock protein
IBMX: isobutylmethylxanthine
IgG: Immunoglobulin G
IL-1: Interleukine 1
IP₃: Inositol tri-phosphate
IP₃R: Inositol tri-phosphate receptor
IPTG: Isopropyl-thio-β-D-galactoside
IVF: *In vitro* fertilization
LC/MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MII: Métaphase II
mRNA: Messenger RNA
MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight
NCBI: National Center for Biotechnology Information
PBS: Phosphate buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction

pI: Point isoélectrique
PI: Propidium iodide
PI: Phosphatidylinositol
PI-PLC: Phosphatidyl-inositol phospholipase-C
PKA: Protein kinase A cAMP-dépendant
PKC: Protéines kinases C
PLC: Phospholipase C
PMSF: Phenylmethylsulphonyl fluoride
PTx: Pertussis toxin
3'-RACE: Rapid amplification of 3' complementary DNA ends
5'-RACE: Rapid amplification of 5' complementary DNA ends
RT: Reverse transcriptase
RT-PCR: Reverse transcriptase – polymerase chain reaction
sAC: Adénylate cyclase soluble
SCF: Stem cell factor
SDS: Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser: Serine
SNARE: soluble NSF attachment receptor
SOF: Synthetic oviductal fluid
Spam1: Sperm Adhesion molecule 1
TBS: Tris buffered saline
TBST: Tris buffered saline tween 20
TCA: Trichloroacetic acid
Thr: Thréonine
trpc 2: transient receptor potential canonical type 2
TLH: Tyrode lactate medium
Tyr: Tyrosine
ZP: zone pellucide / Zona Pellucida

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.1 Structure du testicule

Les testicules possèdent deux fonctions majeures. La première est la production de gamètes reproductives mâles, les spermatozoïdes, via un mécanisme appelé spermatogénèse et la deuxième est la production des hormones stéroïdiennes mâles, les androgènes (Thibault & Levasseur 2001). Grossièrement, le testicule est constitué principalement d'un long réseau de canaux nommés les tubules séminifères dans lesquels se produit la spermatogénèse (figure 1.1). Les spermatozoïdes produits sont relâchés dans la lumière du tubule puis sont dirigés via le rete testis et les canaux efférents vers l'épididyme où ils transitent afin d'acquérir leur maturité. On retrouve aussi à l'intérieur du testicule, entre les tubules et dans l'espace interstitiel, une multitude de cellules telles que des fibroblastes, des macrophages, des lymphocytes, des mastocytes ainsi que les cellules de Leydig qui sont responsables de la production de la testostérone. Des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques ainsi que des nerfs y sont aussi présents. Une couche fibreuse appelée tunique albugineuse recouvre l'ensemble de ces structures et ces cellules.

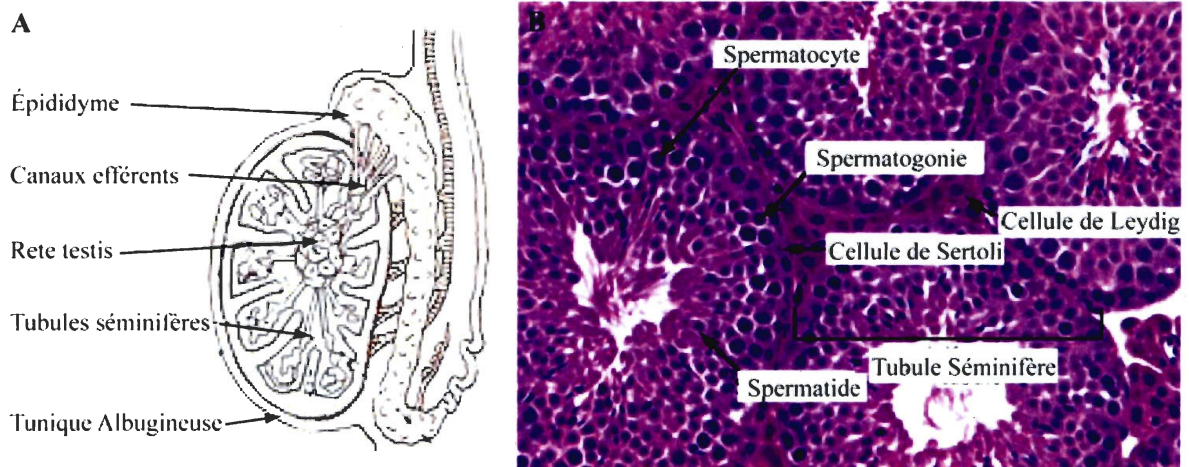


Figure 1.1: A) Anatomie du testicule. B) Coupe transversale du testicule. Adapté de Histology-World (www.histology-world.com).

1.2 La spermatogénèse

La spermatogénèse est le processus qui mène à la formation des spermatozoïdes, cellules haploïdes hautement différenciées, via la division et la différenciation des cellules souches, les spermatogonies, contenues dans les tubules séminifères (Thibault & Levasseur 2001). Cet événement, illustré à la figure 1.2, dont la durée varie selon les espèces, comprend trois phases majeures : la phase mitotique, la phase méiotique et la phase post-méiotique (Eddy 1998).

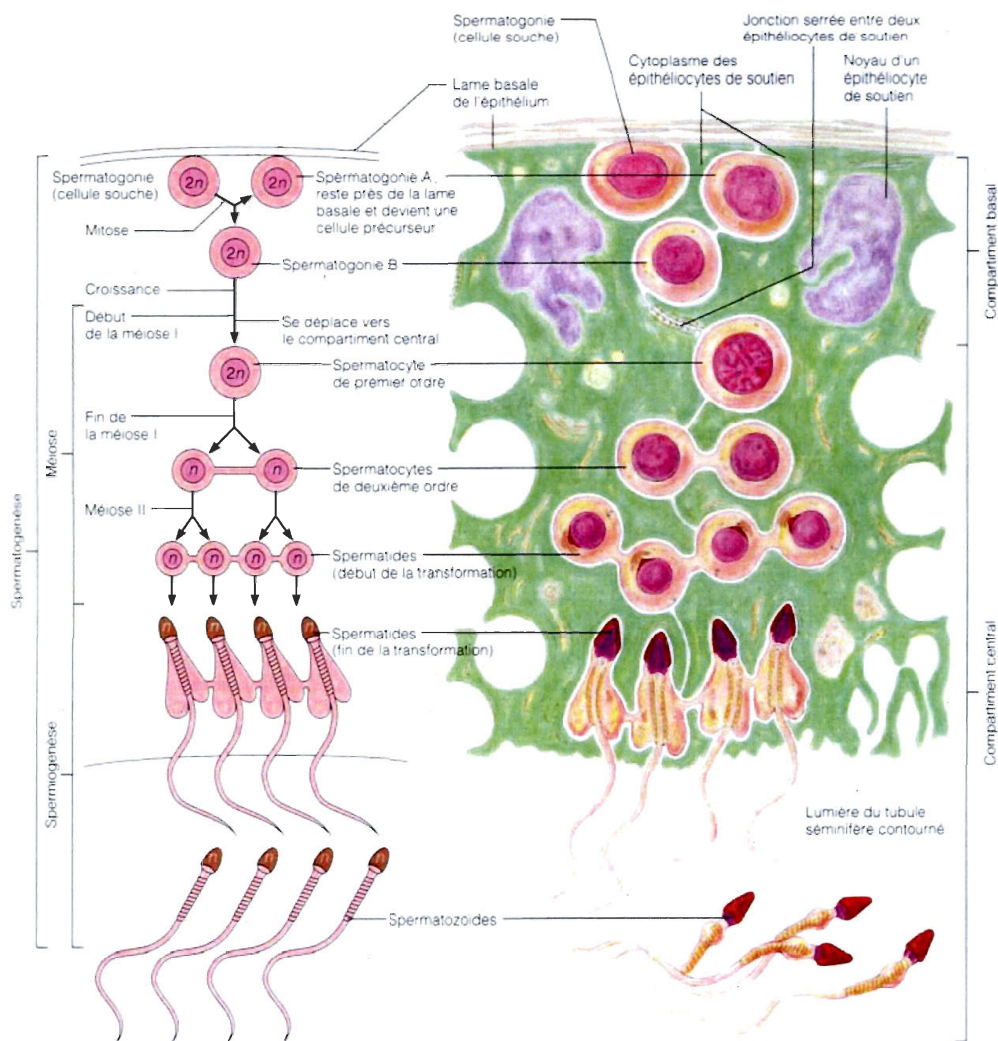


Figure 1.2: Illustration de la spermatogénèse tirée de Campbell et al. (1995) Au cours de la spermatogénèse, les cellules souches (spermatogonies) vont se diviser par mitoses et méioses successives et se différencier à l'intérieur des tubules séminifères pour former les spermatozoïdes qui seront relâchés dans la lumière du tubule pour rejoindre l'épididyme

1.2.1 Phase mitotique

Lors de la première phase, les spermatogonies se multiplient par mitoses successives. Chez le bovin, ces divisions donnent lieu à la formation de spermatogonies de type A suivies des spermatogonies intermédiaires pour finir par la formation de spermatogonies de type B (Berndston and Desjardins 1974) (figure 1.3). Encore une fois le nom et le type de spermatogonies varient selon les espèces (de Kretser et al. 1998; Grootegoed et al. 2000).

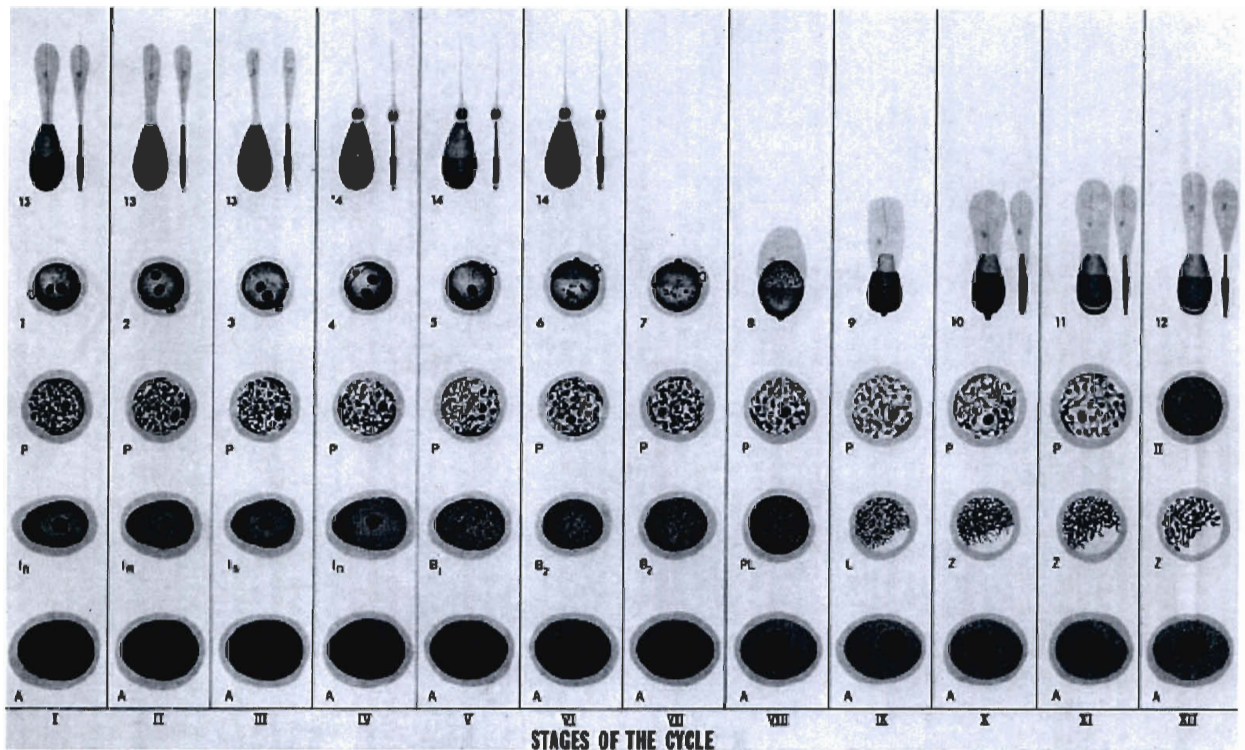


Figure 1.3 : Types cellulaires retrouvés au cours des différents stades de la spermatogénèse chez le taureau. Tiré de Berndston et al. (Berndston and Desjardins 1974)

Afin de maintenir un bassin de cellules souches constant tout au long de la vie adulte, les spermatogonies doivent se répliquer. Lors de ce renouvellement, la division mitotique des spermatogonies n'entraînera pas le développement de spermatogonie de type A mais seulement la réplique de deux nouvelles cellules souches qui, à leur tour, auront la possibilité de se répliquer ou de se différencier (de Rooij 2001). Bien qu'un modèle de division asymétrique fut proposé où une cellule souche se diviserait en une cellule souche et en une cellule ayant le potentiel de former des spermatogonies de type A (Huckins 1971), le manque de données sur cette possibilité empêche de déterminer avec certitude l'existence de ce mode de division et par conséquent, la voie symétrique est généralement favorisée dans

la littérature (de Rooij 2001). Quant au mode de régulation, il est démontré que les cellules Sertoli ont un rôle très important à jouer via la production de GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor) et de SCF (stem cell factor), des facteurs qui induiront soit le renouvellement des spermatogonies souches, soit leur division en spermatogonies de type A (Dadoune 2007).

1.2.2 Phase méiotique

La transformation des spermatogonies de type B en spermatocytes au stade de préleptotènes est généralement acceptée comme étant le début de la deuxième étape majeure de la spermatogenèse (de Kretser et al. 1998). Cette étape est marquée par deux divisions méiotiques successives des cellules, sans réplication de leur contenu en ADN (Eddy 1998), résultant ainsi en la formation de cellules haploïdes. Au cours de cette étape, quelques changements physiologiques sont observables au niveau des cellules tels que l'appariement des chromosomes homologues ainsi que la formation du complexe synaptique et du corps sexuel (Eddy 1998; Grootegoed et al. 2000). Selon ces changements, les spermatocytes au stade pré-leptotène, aussi appelées spermatocytes primaires, passeront au stade de leptotène, puis de zygotène et de pachytène (Berndston and Desjardins 1974). Il est à noter que les cellules passent la majeure partie de cette étape au stade de pachytène. Cette phase est très importante puisque c'est à ce stade que les échanges chromosomiques entre les chromosomes paternels et maternels homologues se produiront (Kerr J.B. 2006).

1.2.3 Phase post-méiotique ou spermiogenèse

La deuxième division méiotique transforme les spermatocytes secondaires en spermatides ronds. C'est à ce moment que débute la troisième étape de la spermatogenèse, la phase post-méiotique aussi appelée spermiogenèse (Eddy 1998; Thibault & Levasseur 2001). Au cours de cette étape, les cellules rondes et haploïdes sont remodelées en spermatozoïdes. En effet, la spermiogenèse est marquée par une multitude de changements morphologiques (Berndston and Desjardins 1974; de Kretser et al. 1998; Eddy 1998). Tout d'abord, il y a condensation du matériel nucléaire. Les histones sont alors graduellement remplacées par les protéines de transition et finalement par les protamines, responsables de la supra compaction de l'ADN à l'intérieur des spermatozoïdes. C'est aussi au cours de

cette étape que se forme l'acrosome (voir la section 1.3) et que se développe le flagelle. Finalement, la spermiogenèse est caractérisée par une importante réabsorption du cytoplasme de la cellule.

1.2.4 Régulation de la spermatogenèse

Bien qu'étant un événement très dynamique, la spermatogenèse est un processus très ordonné. Si bien qu'il est possible d'établir des stades d'avancement du processus selon des associations très définies des types cellulaires retrouvés à l'intérieur des tubules séminifères tel qu'illustré à la figure 1.3. En plus d'être très ordonnée, la spermatogenèse est un phénomène hautement régulé entre autres par les cellules de Sertoli (de Kretser et al. 1998; Eddy 1998; Grootegoed et al. 2000; Thibault & Levasseur 2001). C'est à l'intérieur de ces cellules que se déroulent les étapes mitotique, méiotique et post-méiotique de la spermatogenèse. Elles contrôlent la maturation et la migration des cellules germinales de même que l'élimination par phagocytose des cellules en dégénérescence ainsi que la réabsorption du cytoplasme des spermatides en élongation. Elles assurent aussi la communication entre l'intérieur du tubule et le milieu interstitiel. En effet, les cellules de Sertoli forment une barrière hémato-testiculaire créant ainsi un microenvironnement à l'intérieur du tubule. De plus, afin de permettre la communication entre les cellules spermatogéniques qui forment un syncytium entre elles tout au long de leur développement, des ponts intra-cytoplasmiques sont créés à l'intérieur des cellules de Sertoli. Finalement, il est à noter que la testostérone et la FSH, les deux principales hormones reconnues pour réguler la spermatogenèse, agissent via les récepteurs situés sur les cellules de Sertoli.

1.3 Structure du spermatozoïde

À noter que les informations de cette section sont tirées principalement de E.M. Eddy et Deborah A. O'Brien (O'Brien 1994). Le spermatozoïde est une cellule ultra spécialisée dont le but bien défini est de féconder l'ovule afin de transmettre le bagage génétique nécessaire à la formation d'un nouvel être et d'assurer la survie de l'espèce. Sa structure se divise en 2 composantes principales: la tête et le flagelle (figure 1.4).

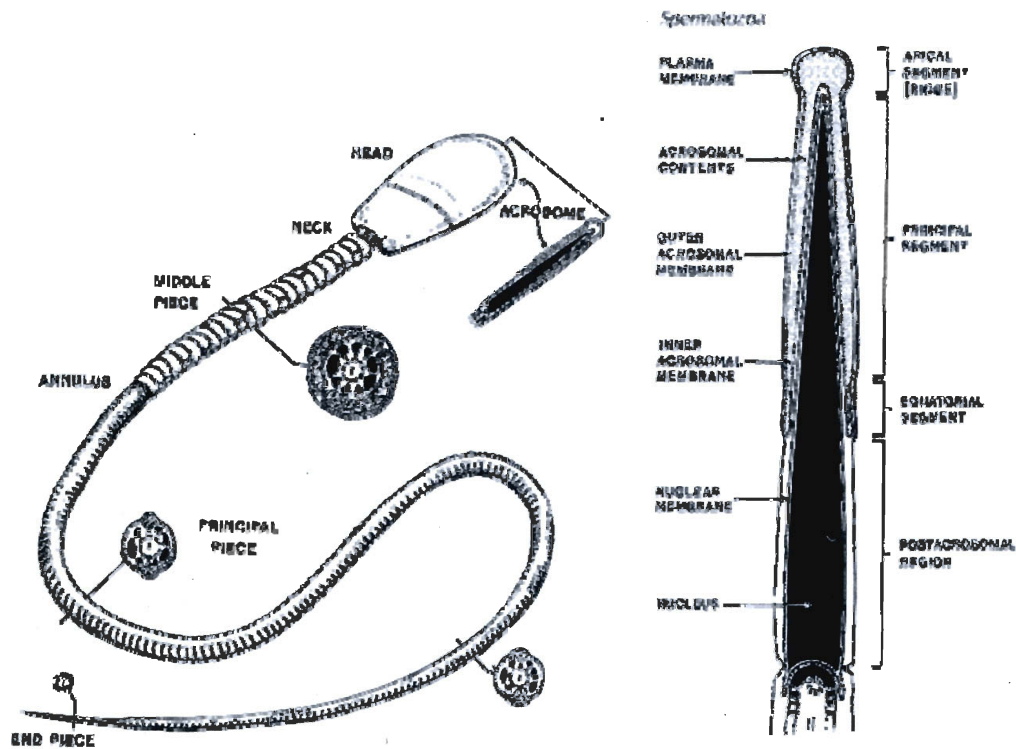


Figure 1.4 : Structure complète (gauche) et de la tête (droite) du spermatozoïde bovin. Tiré de Hafez E.S.E, 1980)

1.3.1 La tête

La tête du spermatozoïde se compose principalement du noyau, de l'acrosome, du cytosquelette et d'une petite quantité de cytoplasme comparativement à ce que contient une cellule eucaryote somatique (figure 1.4). Le noyau du spermatozoïde possède une chromatine très condensée ($0,2-0,3\mu\text{M}$ chez le bovin (Saacke and Almquist 1964)) dont l'arrangement et la composition en protéines nucléaires lui est spécifique. La membrane nucléaire spermatique est, elle aussi, particulière puisque qu'elle ne possède que peu ou pas de pores nucléaires. De plus, la distance entre le feuillet nucléaire interne et externe est de 4 à 6 fois plus petite que celle retrouvée chez la plupart des cellules. Chez le bovin, la tête du spermatozoïde possède une forme arrondie et mesure environ $9\mu\text{M}$ sur la longueur alors que la largeur varie de $1,7$ à $4,5\mu\text{M}$ (Saacke and Almquist 1964). Une particularité à retenir chez le spermatozoïde est qu'il est dépourvu de machinerie transcriptionnelle et donc qu'aucun nouvel ARN messager n'est produit une fois que le spermatozoïde est relâché par les cellules de Sertoli.

L'acrosome peut être représenté comme un sac enzymatique qui origine de l'appareil de Golgi et qui est formé au cours de la spermiogenèse. Il recouvre la portion antérieure de la tête, entre le noyau et la membrane plasmique, et contient les enzymes nécessaires aux spermatozoïdes pour franchir la zone pellucide entourant l'ovule. Tout comme la tête, la taille et la forme de l'acrosome varient d'une espèce à l'autre (O'Brien 1994). Cet organelle comporte une membrane continue dont les feuillettes internes et externes sont communément appelés membrane interne et membrane externe de l'acrosome et qui est constituée de deux segments, soit la portion acrosomale et le segment équatorial. Au cours de la réaction acrosomiale, la membrane externe de l'acrosome est relâchée et seule la membrane interne ainsi que la portion du segment équatorial demeurent.

Il est suggéré que la forme de la tête des spermatozoïdes, plus particulièrement du noyau, serait définie par le cytosquelette retrouvé au niveau sub-acrosomal (entre l'acrosome et le noyau) et post-acrosomal (entre le noyau et la membrane plasmique, en position postérieure de la tête). La structure de cytosquelette formée par ces deux régions peut être isolée et a été nommée thèque péri-nucléaire. Il existe aussi une troisième région du cytosquelette (para-acrosomale), située entre l'extrémité antérieure de l'acrosome et la membrane plasmique chez les spermatozoïdes falciformes. Le cytosquelette présent dans la tête pourrait aussi aider à la pénétration de l'ovule. De plus, il a été proposé que la thèque péri-nucléaire est requise afin de fournir un support et une rigidité à la portion postérieure de la tête lors du mouvement flagellaire. Finalement, une dernière hypothèse suggère que la thèque péri-nucléaire permet le maintien de l'association des différents constituants de la tête (acrosome, noyau et membrane plasmique).

La membrane plasmique qui recouvre la tête des spermatozoïdes peut elle aussi être séparée en différents domaines. Les deux domaines majeurs retrouvés sont les domaines acrosomal et post-acrosomal. Ces domaines, probablement établis lors de la spermiogenèse et la maturation épидидymaire, furent définis selon leur composition et leur fonction. La membrane plasmique spermatique possède un contenu en glycolipides et cholestérol normal mais contient toutefois une grande quantité de phospholipides. On note aussi la présence d'acide gras, de diacylglycérol et de quelques glycolipides spécifiques aux spermatozoïdes.

1.3.2 Le flagelle

Chez les mammifères, on peut diviser le flagelle en quatre segments distincts: la pièce connective (cou), la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (figure 1.4). C'est grâce aux battements flagellaires que le spermatozoïde peut se déplacer lors du processus de fécondation. La longueur du flagelle varie beaucoup selon les espèces. Parmi ses principales composantes structurales, on retrouve l'axonème, un complexe de microtubules de composition 9+2, tel que retrouvé chez les ciliés et la plupart des plantes et animaux, et qui s'étend sur la pleine longueur du flagelle. Adjacent à l'axonème, on retrouve les fibres denses externes. Tout autour des fibres denses, au niveau de la pièce intermédiaire, on retrouve les mitochondries suivies de la couche fibreuse qui prend place sur la pièce principale. Toutes ces structures apportent le support nécessaire pour générer et donner le patron du battement flagellaire.

1.4 Maturation épидидymaire

Lors de leur relâchement dans la lumière des tubules séminifères, les spermatozoïdes possèdent un très faible pouvoir fécondant et sont dépourvus de motilité. C'est pourquoi ils seront transportés vers l'épididyme via le rete testis et les canaux efférents. C'est pendant leur transit dans l'épididyme qu'ils acquièrent leur motilité et leur capacité à féconder. Cette section résumera les principaux événements retrouvés au cours de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes.

L'épididyme est divisé en trois sections principales (figure 1.5): la tête (caput), le corps (corpus) et la queue (cauda). Ces sections sont divisées à leur tour en segments (proximal et distal) (revue par Thibault & Levasseur 2001; Yanagimachi 1994). Contrairement au testicule, un seul canal parcourt l'épididyme d'un bout à l'autre dont la longueur varie entre les espèces: allant de 2 m chez le cobaye à 40 m chez le taureau et 80 m chez l'étalon. La taille, la forme de l'épididyme ainsi que la durée de transit du spermatozoïde (environ 10 jours chez le bovin) dans celui-ci varient beaucoup selon les espèces (revue par Thibault & Levasseur 2001). L'épithélium du canal épидидymaire est composé de cinq types cellulaires: les cellules principales, apicales, claires, basales et ciliées. Les cellules principales auraient un rôle d'absorption et de sécrétion alors que les cellules apicales auraient un rôle d'acidification du milieu et d'élimination des particules.

L'épididyme joue un important rôle au niveau du transport et de la concentration des spermatozoïdes, de leur maturation, de leur hétérogénéité ainsi que de leur conservation jusqu'à l'éjaculation (revue par Thibault & Levasseur 2001). En effet, bien qu'une importante absorption de liquide survienne dans le canal efférent, l'épithélium du canal épидидymaire contribue aussi à la réabsorption du liquide et permet la concentration des spermatozoïdes. Par exemple, chez le taureau, 95% du liquide testiculaire est absorbé dès les premiers segments de l'épididyme (revue par Thibault & Levasseur 2001).

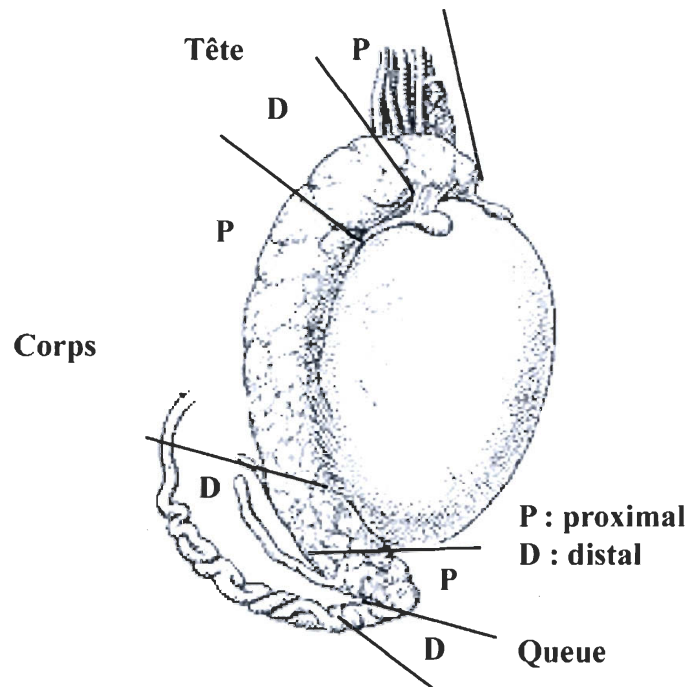


Figure 1.5: Structure de l'épididyme. Adapté de SEER'S Training Web Site (http://training.seer.cancer.gov/ss_module11_testis/00_testis_home.html).

À l'exception de certaines espèces, il est généralement accepté qu'à la fin du transit épидидymaire (cauda proximal), les spermatozoïdes auront acquis leur motilité ainsi que leur pouvoir fécondant (Thibault & Levasseur 2001; Yanagimachi 1994). Cette acquisition surviendrait suite à l'interaction entre les spermatozoïdes et les cellules épithéliales peuplant le canal, ainsi que leurs sécrétions. En effet, ces interactions vont modifier le

contenu de la membrane plasmique spermatique. Parmi les changements apportés, on note une perte, un ajout et un changement dans le patron de distribution de certaines protéines, ainsi qu'un ajout de cholestérol à la membrane. On note aussi une augmentation de la charge nette négative à la surface ainsi qu'une modification dans la liaison des lectines indiquant un processus de glycosylation très actif (Yanagimachi 1994). Ces changements surviennent tant au niveau de la membrane plasmique de la tête que celle du flagelle. Par exemple, il est suggéré que l'ajout de glycoprotéines aurait un rôle de prévention dans l'hyperactivation au niveau du flagelle alors qu'au niveau de la tête, un rôle de stabilisation membranaire prévenant une réaction acrosomiale précoce est proposé (Yanagimachi 1994). La membrane plasmique n'est pas la seule touchée par la maturation épидидymaire puisque des changements ont aussi été observés sur d'autres structures telles que l'acrosome (Phillips et al. 1991). Finalement, une fois la queue de l'épididyme atteint, les spermatozoïdes matures demeurent stockés dans ce réservoir jusqu'au moment de l'éjaculation.

1.5 La capacitation

Bien que la maturation épидидymaire confère une motilité aux spermatozoïdes, ils sont toujours inaptes à féconder une fois dans le tractus reproducteur femelle. Une fois éjaculés, les spermatozoïdes seront séquestrés dans l'isthme de l'oviducte où ils devront y séjourner un certain temps, afin de subir une série de modifications physiques et biochimiques qui leur permettront d'acquérir leur pouvoir à féconder l'ovule. Le terme capacitation englobe l'ensemble de ces modifications. La capacitation nécessite la synchronisation et l'interaction de plusieurs événements individuels qui se regrouperont afin d'arriver à un but commun: donner au spermatozoïde son pouvoir fécondant.

Découvert en 1951 par Austin (Austin 1951) et Chang (Chang 1951), plus de 50 ans plus tard, les événements composants la capacitation ne sont toujours pas tous élucidés. Plusieurs mécanismes ont toutefois été mis en lumière. L'altération de la composition des membranes périphériques, la localisation de certains antigènes, le changement de la charge de surface et du potentiel des membranes, la composition et la diffusion latérale des lipides, l'asymétrie des phospholipides dans la membrane, l'acquisition et la perte de protéines, l'augmentation du pH intracellulaire, la modulation de l'activité cytosolique du calcium et

de plusieurs autres ions ainsi que la phosphorylation sur les résidus tyrosines sont des exemples d'événements qui sont présentement à l'étude (Florman Harvey 2006). Bien que ces mécanismes ne soient pas tout à fait élucidés, nous avons maintenant une meilleure idée de ce qui se passe au niveau du spermatozoïde. À noter toutefois que, la capacitation des spermatozoïdes *in vitro* fut possible grâce à l'élaboration de milieux chimiquement définis (Yanagimachi 1994) bien avant la compréhension des mécanismes. Il est important de noter que la capacitation n'est pas un événement unique mais bien une multitude d'événements réunis. Le tableau 1.1, tiré de Florman (Florman Harvey 2006) résume bien quelques-uns des changements associés aux spermatozoïdes au cours de la capacitation.

TABLE 1. Sperm changes associated with capacitation or occurring during incubation under capacitating conditions

Change	Effect	Ref.	Change	Effect	Ref.
Surface effects			Enzyme activities (non-ATPase)		
Proteins			Adenylyl cyclase	Increase	(10)
β -Galactosyltransferase	Unmasked	(49)	Protein kinase A	Increase	(554)
Fertilin (ADAM1, 2)	Becomes mobile	(655)	Protein kinase C	Increase	(16)
Various epitopes	Distribution or accessibility changes	(10)	ERK kinase	Increase	(656)
Lipids			Protein tyrosine phosphorylation		
Cholesterol, other sterols	Decrease	(45)	AKAP3, 4	Increased phosphorylation	(657, 658)
Phospholipids	Asymmetry decrease	(93-95)	CABYR	Increased phosphorylation	(659)
	Increased diffusion	(10)	VDAC2	Increased phosphorylation	(112)
Glycolipids	Redistribution	(660)	VCP/p97	Increased phosphorylation	(112)
Surface charge	Less negative	(10)	ODF1	Increased phosphorylation	(112)
Membrane potential	Hyperpolarize	(65)	Other proteins	Increased phosphorylation	(112)
Ion concentration or content			Other effects		
Ca ²⁺	Increase	(62, 661)	ATP levels	Decrease	(10)
Zn ²⁺	Decrease	(662)	Reactive oxygen species	Increase	(663)
K ⁺	Decrease, no change	(10, 665)	Functional effects		
Na ⁺	Increase	(10)	Motility	Hyperactivation	(10)
pH	Increase	(61)		Chemotaxis	(112)
Ion channels and transporters			Zona binding	Acquired	(10)
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Increased activity	(19)	Acrosome reaction	Acquired	(10)
Ca ²⁺ ATPase	Decreased activity	(664)			
Ca ²⁺ ATPase - PMCA4	Hyperactivation defect in null sperm	(660)			
Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger	Increased activity	(10, 665)			
CatSper2	Hyperactivation defect in null sperm	(131)			

Tableau 1.1: Changements observés chez le spermatozoïde au cours de la capacitation. Tiré de Florman et al. (Florman Harvey 2006)

1.5.1 Survol des événements survenant au cours de la capacitation

1.5.1.1 Au niveau intracellulaire

Plusieurs changements ioniques sont apportés au cours de la capacitation. Par exemple, chez le spermatozoïde non capacité, la concentration en potassium est maintenue élevée à l'intérieur de la cellule alors que celle du sodium est maintenue basse (Yanagimachi 1994). Ce ratio est conservé grâce à une pompe ATPase à échange

sodium/potassium. Au cours de la capacitation, les gradients sont inversés entraînant une sortie importante de potassium (Yanagimachi 1994) qui aura pour conséquence de donner une charge négative à la membrane (chez la souris et le bovin) et contribuera à l'hyperpolarisation de celle-ci (Zeng et al. 1995) (voir plus bas).

Plusieurs études ont montré l'implication du bicarbonate dans le mécanisme de capacitation (Vadnais et al. 2007). Dans l'épididyme porcin, le niveau de bicarbonate est maintenu bas (Rodriguez-Martinez et al. 1990a) comparativement au niveau retrouvé dans l'utérus et l'oviducte, là où la capacitation a lieu (Vishwakarma 1962). De plus, chez les femelles murines ayant une déficience dans leur mécanisme sécrétoire du bicarbonate, Wang et al. (Wang et al. 2003) ont démontré un dysfonctionnement au niveau de la capacitation des spermatozoïdes et par le fait même, une diminution de la fertilité des femelles. L'entrée du bicarbonate dans les cellules spermatogéniques activera une adénylate cyclase soluble (sAC) (Vadnais et al. 2007) qui produira à son tour de l'AMPc, un composant essentiel à la capacitation chez les mammifères (Visconti et al. 2002). L'AMPc produit par sAC stimulera la protéine kinase A (PKA) qui, une fois activée, contribuera à l'augmentation de la phosphorylation en tyrosine de diverses protéines via la phosphorylation de ses substrats (Gadella and Harrison 2002; Visconti and Kopf 1998). À noter que malgré le fait que le mécanisme de transport du bicarbonate est toujours inconnu, il est néanmoins suggéré qu'un cotransporteur bicarbonate/sodium pourrait être impliqué (Demarco et al. 2003).

La capacitation nécessite aussi un apport en calcium. Son importance au cours de cet événement est reconnue chez plusieurs espèces (Vadnais et al. 2007). En effet, au cours de la capacitation, on note une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire chez les spermatozoïdes. L'implication des canaux calciques voltage dépendant de type T contribuerait à cette augmentation (Arnoult et al. 1999). Il est présentement suggéré que le rôle principal du calcium, tout comme celui du bicarbonate et de l'augmentation intracellulaire du pH est de contribuer à l'activation de PKA via sAC et l'AMPc (Breitbart 2003; Harrison and Gadella 2005; Hess et al. 2005; Sutton et al. 2003; Travis and Kopf 2002; Vadnais et al. 2007). Chez le taureau, Parrish et al. (Parrish et al. 1988; Parrish et al. 1999) ont suggéré que la capacitation *in vitro* des spermatozoïdes bovins en présence

d'héparine, nécessitait un apport de calcium extracellulaire. Selon leur hypothèse, ce calcium serait entreposé dans l'acrosome pour être relargué par les canaux calciques acrosomiques lors de la réaction de l'acrosome (voir section 1.8.3).

La capacitation des spermatozoïdes s'accompagne non seulement d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, mais aussi d'une augmentation de protéines phosphorylées sur leurs résidus tyrosine. Initialement découverte, chez la souris (Visconti et al. 1995a; Visconti et al. 1995b), il est maintenant reconnu chez plusieurs espèces que cette augmentation est dépendante de PKA (Visconti et al. 2002). Bien que cet événement survienne dans plusieurs compartiments de la cellule spermatogénique (Sakkas et al. 2003), c'est principalement dans le flagelle que se produit la majorité de ces événements (Mahony and Gwathmey 1999; Nassar et al. 1999; Si and Okuno 1999). Plusieurs protéines ciblées comme substrats potentiels à une phosphorylation en tyrosine ont été reliées à la voie sAC/AMPC/PKA (Florman Harvey 2006; Vadnais et al. 2007). Bien que les substrats directs de PKA n'ont toutefois pas encore été identifiés, quelques facteurs sont proposés dont les tyrosine kinases de la famille SRC (Baker et al. 2006; Dorval et al. 2002; Lawson et al. 2008; Leclerc et al. 1997; Luconi et al. 1995). PKA est une serine/thréonine kinase dépendante de l'AMPC qui, une fois activée par celui-ci, provoquera la phosphorylation de serine/thréonine kinases (toujours inconnues) (Visconti et al. 1995) qui à leur tour agiront sur différents facteurs menant à la capacitation dont les tyrosines kinases proposées ici. Finalement, il a aussi été démontré que les dérivés actifs de l'oxygène pouvaient contribuer à l'augmentation du contenu en phosphotyrosines au cours de la capacitation (Baumber et al. 2003; Rivlin et al. 2004). Ils auraient aussi un effet positif sur la capacitation de plusieurs espèces dont le hamster (Bize et al. 1991), la souris (Ecroyd et al. 2003), le rat (Lewis and Aitken 2001), le cheval (Baumber et al. 2003), le bovin et le mouton (Brener et al. 2003).

1.5.1.2 Au niveau de la membrane

Il était surprenant de voir qu'*in vitro*, les spermatozoïdes éjaculés ont plus de difficulté que les spermatozoïdes épидидymaires à féconder l'ovule (Nagai et al. 1984). Toutefois, lorsque les spermatozoïdes épидидymaires sont mis en présence de plasma séminal, le taux de fécondation s'apparente à celui des spermatozoïdes éjaculés (Nagai et

al. 1984). Il est maintenant connu que lors du contact entre les spermatozoïdes et le plasma séminal, des protéines sont transférées à la membrane des spermatozoïdes (Yanagimachi 1994). Au cours de la capacitation, ces protéines originaires du plasma séminal et de l'épididyme qui stabiliseraient la membrane, sont éliminées ou altérées. Plusieurs antigènes spermatiques changent aussi de localisation au cours de la capacitation. On peut penser entre autres aux molécules de « fibronectinlike » chez l'humain, aux antigènes T et S chez le cobaye et à une protéine de 37 kDa chez le rat (Yanagimachi 1994) ainsi qu'à la protéine 2B1 retrouvée au niveau du flagelle chez les spermatozoïdes non capacités est détectée au niveau acrosomal suivant la capacitation (Shalgi et al. 1990).

En plus du changement de localisation d'antigènes, plusieurs échanges protéiques surviennent via l'interaction entre les spermatozoïdes et le fluide utérin ainsi que celui de l'oviducte (Yanagimachi 1994). À noter que ces échanges sont à double sens. En effet, les spermatozoïdes vont accepter plusieurs protéines provenant du fluide mais vont aussi en libérer. Il a aussi été observé, suite à l'étude du changement d'affinité des lectines aux membranes, que des modifications au niveau des glycoprotéines intégrales et périphériques sur leurs chaînes carbohydrates pouvaient survenir (Yanagimachi 1994).

Dans un même ordre d'idées, la capacitation va jouer sur la distribution, de même que la composition des différents lipides dans les feuillettes interne et externe de la membrane plasmique (Elliott and Higgins 1983). Chez le porc, il fut démontré que le bicarbonate a un rôle à jouer sur la désorganisation et le remodelage lipidique des membranes (Gadella and Harrison 2002; Harrison 1996). Chez la souris, un transporteur lipidique similaire aux flippases (Bever et al. 1999; Wang et al. 2004) serait impliqué dans ce remodelage au cours de capacitation. Ce remodelage permettrait la relocalisation du cholestérol à la portion apicale de la tête des spermatozoïdes. Il fut d'ailleurs suggéré que cette relocalisation du cholestérol soit requise pour son efflux via l'interaction entre les spermatozoïdes et l'albumine (Flesch et al. 2001).

À propos du cholestérol, plusieurs évidences montrent que la capacitation est associée à une perte de celui-ci et ce en relation avec l'augmentation de la fluidité de la membrane. L'importance de cet efflux de cholestérol fut démontrée suite à l'observation où l'addition de cholestérol dans le milieu augmente le temps requis aux spermatozoïdes

humains pour capaciter, et produirait même une inhibition de la capacitation *in vitro* (Cross 1996a; Cross 1996b; Florman Harvey 2006; Zarintash and Cross 1996). Dans le même ordre d'idées, l'ajout d'accepteurs de stérols au milieu (albumine, HDL, β -cyclodextrine), rétabli ou même accélère le temps normalement requis pour l'obtention de spermatozoïdes capités (Florman Harvey 2006; Vadnais et al. 2007). La diminution du ratio cholestérol : phospholipide dans la membrane contribuerait à augmenter la fluidité de la membrane et ainsi, augmenterait la perméabilité de celle-ci afin de faciliter le transport/diffusion des ions. Finalement, il est montré que l'héparine faciliterait la capacitation *in vitro* chez le bovin (Parrish et al. 1988). Il remplacerait *in vitro* un glycosaminoglycan retrouvé dans l'oviducte qui s'associerait avec les protéines BSP transférées du plasma séminal aux spermatozoïdes afin de contribuer à la modification de la composition de la membrane (Therien et al. 1995).

L'augmentation de la fluidité des membranes observée au cours de la capacitation faciliterait la sortie des ions potassium de la cellule, et contribuerait ainsi au mécanisme d'hyperpolarisation des membranes. Cette hyperpolarisation semble être une étape nécessaire chez la souris et le bovin pour le succès de la fécondation puisque l'incubation des spermatozoïdes en conditions dépolarisantes inhibe le taux de réaction de l'acrosome induit par l'interaction entre les spermatozoïdes et la zone pellucide (Zeng et al. 1995).

1.5.1.3 Au niveau physiologique

Un des phénomènes physiques observés lors de la capacitation est l'intensification marquante de la motilité des spermatozoïdes. Ce phénomène, nommé hyperactivation, consiste en une augmentation du déplacement latéral de la tête ainsi qu'à une augmentation du battement flagellaire asymétrique des spermatozoïdes (Florman Harvey 2006). L'hyperactivation serait requise pour le passage des milieux viscoélastiques tels que le mucus de l'oviducte ainsi que la matrice extracellulaire du cumulus (Suarez 1996) et favoriserait le détachement des spermatozoïdes qui sont liés aux parois de l'oviducte au moment opportun afin de rejoindre le site de fécondation (voir section 1.7.4)(Demott and Suarez 1992; Florman Harvey 2006; Stauss et al. 1995; Suarez 1996; Suarez 2006; Suarez et al. 1992; Yanagimachi 1994).

L'initiation de l'hyperactivation serait contrôlée par des facteurs provenant du tractus reproducteur de la femelle au moment de la fécondation tels que le liquide folliculaire ainsi que des facteurs provenant des cellules du cumulus entourant l'ovule (voir section 1.7). Toutefois, aucun consensus quant à l'identité et la nature de ces facteurs n'a été obtenu jusqu'à maintenant (Florman Harvey 2006). L'implication d'un influx de calcium ainsi que de la cascade sAC/AMPC/PKA pour l'hyperactivation fut toutefois observée (Carlson et al. 2003; Florman Harvey 2006; Vannier et al. 1999).

1.5.2 Site, durée et conséquences de la capacitation

Bien qu'il a été démontré que la capacitation peut se produire dans divers sites ectopiques dans le tractus reproducteur femelle et que le site d'initiation n'a pas été déterminé (dépôt des spermatozoïdes dans le tractus variant d'une espèce à l'autre chez les mammifères), il est tout de même suggéré que le spermatozoïde complète sa capacitation dans l'oviducte (Bedford 2004; Florman Harvey 2006; Yanagimachi 1994).

Il n'y a pas de durée unique de capacitation. Il s'agit d'un processus dont la durée varie grandement d'une espèce à l'autre (Florman Harvey 2006; Yanagimachi 1994). Cette variation serait dépendante de la disponibilité de l'ovule dans le tractus reproducteur femelle de ces espèces (Giojalas et al. 2004). Non seulement le temps de réaction de la capacitation varie selon les espèces, mais il varie aussi entre les spermatozoïdes d'une même espèce (Florman Harvey 2006). Ce qui résulte en une faible fraction des spermatozoïdes qui capacitent en même temps *in vitro*. Il est suggéré que ce soit aussi le cas *in vivo*. Ceci aurait pour effet de générer graduellement et continuellement une population de spermatozoïdes capacités prêts à poursuivre le processus de fécondation.

1.6 Réaction de l'acrosome

L'attachement primaire du spermatozoïde à la zone pellucide par son/ses récepteurs initie une réaction en chaîne via l'activation de plusieurs voies de signalisation qui se traduit physiquement par la fusion de la membrane plasmique de la portion antérieure de la tête du spermatozoïde et de la membrane externe de l'acrosome (figure 1.6). Cette réaction libère le contenu enzymatique de l'acrosome dans le milieu et expose dans un même temps la surface interne de l'acrosome au milieu extracellulaire et ainsi, à la zone pellucide. Bien

qu'il n'y ait toujours pas de voie signalétique complète connue, plusieurs événements ont tout de même été résolus ou suggérés. Cette section résumera les principaux événements qui sont connus jusqu'à maintenant en mettant l'emphase sur ceux ayant été démontrés via l'interaction entre le spermatozoïde et la zone pellucide. Afin de décrire le phénomène, Florman a séparé la réaction de l'acrosome en trois grandes parties : les événements liés à l'interaction entre le récepteur spermatique et son ligand, l'influx de calcium intra cellulaire et les événements d'exocytose (Florman Harvey 2006).

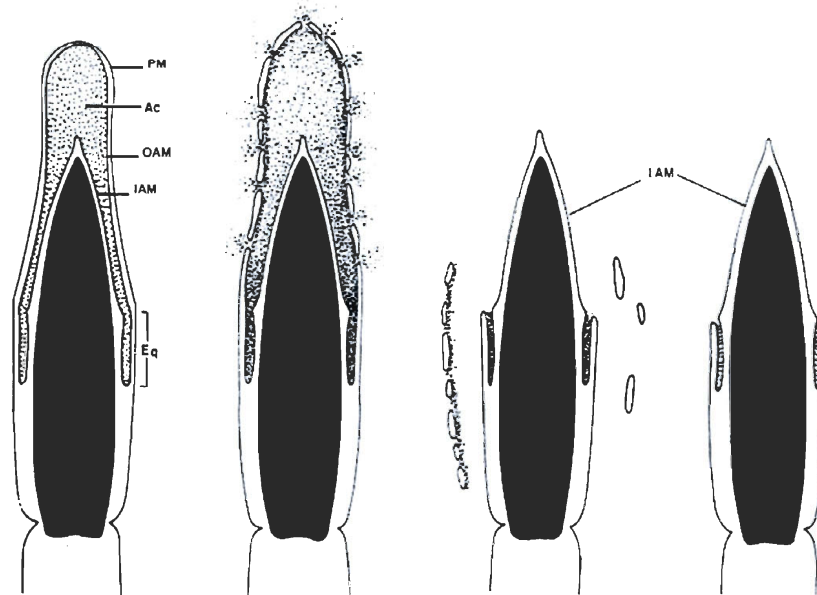


Figure 1.6: Schéma de la réaction de l'acrosome. PM: membrane plasmique, AC: acrosome, OAM: membrane externe de l'acrosome, IAM: membrane interne de l'acrosome. Tiré de Yanagimachi 1994

1.6.1 Liaison du récepteur spermatique à son ligand

Un des mécanismes généralement acceptés lors de l'attachement primaire est l'activation des protéines G hétérotrimériques G_{i1} et G_{i2} (Ward et al. 1994). Ceci fut démontré suite à l'utilisation de l'exotoxine de *Bordetella pertussis* (PTx), un inhibiteur de cette classe de protéine G, qui prévient l'initiation de la réaction de l'acrosome (Ward et al. 1994). Il est suggéré que l'activation de ces protéines va induire une augmentation du pH intracellulaire (Florman et al. 1989; Meldolesi 1998). Bien que le rôle précis de cette alcalinisation n'est pas encore élucidé il est proposé que l'augmentation de pH intracellulaire contribuerait à l'augmentation du calcium intracellulaire présent lors de la réaction acrosomique (Arnoult et al. 1996; Babcock and Pfeiffer 1987).

L'activation des protéines G par le complexe récepteur/ligand est aussi impliquée dans l'activation de la phospholipase C (PLC) qui produira du diacylglycérol (DAG) ainsi que de l'inositol tri-phosphate (IP₃) (Murase and Roldan 1996). Le DAG produit par PLC, reconnu pour être impliqué dans la régulation de nombreuses protéines participant aux diverses fonctions cellulaires (Brose et al. 2004), régulera la famille des protéines kinases C (PKC). Présent dans la tête des spermatozoïdes, cette protéine serait impliquée dans les événements de phosphorylation reliés à la réaction de l'acrosome (Breitbart et al. 1992; Lax et al. 1997; Lee et al. 1987; Liu and Baker 1997). Il est à noter que PKC serait aussi influencée par l'influx de calcium produit lors de la réaction acrosomique (Arnoult et al. 1999; Flesch and Gadella 2000; Lax et al. 1997; O'Toole et al. 1996a; O'Toole et al. 1996b). L'IP₃ produit, quant à lui, activerait les canaux calciques via leur récepteur IP₃R provoquant le relâchement dans le cytosol du calcium intracellulaire emmagasiné dans les réservoirs de la cellule (Berridge 1993; Patterson et al. 2004). Consistant au fait que l'acrosome est un réservoir de calcium (Herrick et al. 2005), le récepteur pour l'IP₃ est retrouvé en grande quantité dans la membrane acrosomiale (Walensky and Snyder 1995).

Toutes ces évidences convergent donc vers un même grand facteur: le calcium. Une augmentation du calcium intracellulaire fut observée chez les spermatozoïdes murins en contact avec la protéine ZP3 de la zone pellucide. Les études utilisant des agents pharmacologiques bloquant l'élévation de calcium et par le fait même, la réaction de l'acrosome, permirent de suggérer l'implication des canaux calciques voltage dépendant de type T dans le processus de réaction acrosomique chez l'humain (Jagannathan et al. 2002). Suite aux résultats obtenus chez le bovin et la souris, il est rapporté que l'interaction avec ZP3 cause une dépolarisation du potentiel membranaire spermatique via, entre autres, l'activation d'un canal ionique peu sélectif (Arnoult et al. 1996). De plus, cette dépolarisation serait suffisante pour activer les canaux calciques voltage dépendant (Florman Harvey 2006), permettant ainsi l'influx de calcium dans le cytosol.

1.6.2 Maintien de l'influx de calcium

Bien que les canaux calciques voltage dépendant de type-T soient impliqués dans les événements déclencheurs de la réaction acrosomique, leur temps de réponse n'est que d'environ 250 millisecondes. Il fut toutefois reconnu chez le bovin en premier lieu, puis

chez la souris et le hamster par la suite, que l'influx de calcium peut durer plusieurs minutes en présence d'agonistes lors de l'incubation de spermatozoïdes en présence de zones pellucides ou de ZP3 purifiée (revue par Florman Harvey 2006). Le maintien de cet afflux de calcium est nécessaire pour la fusion des membranes (Florman Harvey 2006). De plus, l'ajout d'agents bloquant l'entrée de calcium dans la cellule a un effet négatif sur la réaction de l'acrosome, mettant ainsi en lumière l'importance de l'apport externe de calcium pour compléter la réaction acrosomique (Florman et al. 1992; O'Toole et al. 2000; Yanagimachi 1994). L'implication du « store operated calcium channel », notamment le trpc 2 (transient receptor potential canonical type 2), fut suggérée comme candidat jouant un rôle dans cet influx de calcium (Jungnickel et al. 2001; Montell 2005; Parekh and Putney 2005). En ce qui a trait à sa régulation, il est reconnu que trpc2 peut être activé suite à un épuisement du calcium dans les réservoirs en ouvrant les canaux de la membrane plasmique afin de permettre l'entrée de calcium pour combler cette baisse (Montell 2005; Parekh and Putney 2005; Vannier et al. 1999). Puisqu'il est suggéré qu'IP₃ active les canaux calciques à récepteur IP₃R retrouvé sur la membrane de l'acrosome, la libération du calcium de ce réservoir pourrait être l'élément déclencheur pour l'activation de trpc2, provoquant ainsi l'influx de calcium dans la cellule (Florman Harvey 2006). Finalement, d'autres événements ont été rapportés dans la littérature qui semblent indiquer que la phosphorylation des protéines semble impliquée au cours de la réaction de l'acrosome (Luconi et al. 1995; Tesarik et al. 1993). Il est aussi proposé par Dorval et al. qu'une protéine tyrosine kinase de la famille de src pourrait être impliquée dans cet événement (Dorval et al. 2003).

1.6.3 Événements fusogéniques

Malgré le fait qu'aucune voie unique et directe n'a pu être déterminée jusqu'à maintenant, tous les événements de signalisation énumérés plus haut convergent tout de même vers un but commun, soit la fusion des membranes plasmiques de l'ovule et de la membrane externe de l'acrosome. Pour ce faire, le spermatozoïde doit avoir recours à une machinerie exocytotique. C'est à ce moment qu'intervient le complexe SNARE. Il s'agit d'un système impliqué dans la fusion des membranes qui fut tout d'abord identifié chez la levure et lors des études sur les vésicules de transport intra-Golgi (Pryer et al. 1992; Rothman 1994). Ce système comprend plusieurs éléments qui furent progressivement

identifiés chez les spermatozoïdes. Son implication dans le domaine reproducteur fut tout d'abord identifié chez l'oursin de mer, puis chez les mammifères (Ramalho-Santos et al. 2000; Schulz et al. 1998; Schulz et al. 1997). Il est suggéré que l'activation de la voie fusogénique des SNARE serait dépendante de l'afflux de calcium induit au cours des événements précoces de la réaction de l'acrosome (Mayorga et al. 2007). Suite à son activation, le complexe provoquera le rapprochement et la fusion de la membrane plasmique et de la membrane externe de l'acrosome pour ainsi terminer le processus de la réaction acrosomique.

1.7 Événement dans le tractus femelle

1.7.1 Rôle du plasma séminal

Bien qu'ayant acquis leur motilité, chez certaines espèces dont le taureau, les spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme ne seront pas motiles (Thibault & Levasseur 2001). Plusieurs facteurs épидидymaires tels un pH acide, une viscosité très élevée, l'osmolarité et l'absence de source énergétique font que les spermatozoïdes demeureront immobiles. C'est au cours de l'éjaculation que les spermatozoïdes deviendront motiles. En effet, lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes seront mélangés au plasma séminal dont les principaux contributeurs sont les glandes de Cowper, les vésicules séminales et la prostate (Thibault & Levasseur 2001). L'effet de dilution du plasma, le changement d'osmolarité, la neutralisation du pH ainsi que l'apport de sources énergétiques contribueront à activer la motilité progressive des spermatozoïdes. De plus, plusieurs protéines sont transférées aux spermatozoïdes lors de leur interaction avec le plasma séminal. Les protéines BSP (bovine seminal plasma) en sont un exemple (Desnoyers and Manjunath 1992; Manjunath et al. 1994a). Le plasma séminal offre aussi un effet protecteur aux spermatozoïdes. Dans le tractus femelle, les spermatozoïdes se retrouvent dans un milieu inhospitalier où ils sont soumis à divers stress physiques. Ils doivent, entre autres, se défendre contre les mécanismes oxydatifs et doivent aussi échapper aux mécanismes de défense immunitaire de leur hôte et ce, jusqu'au temps de l'ovulation puisqu'ils sont reconnus comme du non-soi dans le système reproducteur femelle. Parmi ces obstacles, le premier défi que doivent surmonter les spermatozoïdes chez les espèces dont la semence est déposée dans le vagin tel l'humain et le bovin, est de résister au pH très

acide du fluide vaginal. En effet, le pH vaginal de la femme tourne autour de 5 et peut être plus acide. Ceci permet d'éliminer la plupart des pathogènes (Suarez 2006). Ce premier défi est surmonté grâce au plasma séminal. En effet, avec un pH variant de 6.7 à 7.4 chez les espèces domestiques communes, le plasma séminal a la capacité de neutraliser le pH vaginal (Suarez 2006). Des études chez l'humain (Fox et al. 1973) ont montré une élévation de pH de l'environnement vaginal de 3.8 à 7.2 en seulement 8 secondes suivant l'éjaculation. Grâce à ce mécanisme, les spermatozoïdes peuvent donc survivre au milieu inhospitalier du vagin.

1.7.2 Passage du col de l'utérus

Toujours pour les espèces dont la semence est déposée dans le vagin, les spermatozoïdes doivent franchir le col de l'utérus. Selon les espèces, ils le traversent soit grâce à leur motilité (primate et bovin) ou seront transportés directement dans l'utérus via les contractions utérines (souris, rat et hamster) (Suarez 2006). Chez l'humain et le bovin où les spermatozoïdes doivent franchir le col grâce à leur motilité, ils doivent passer à travers une grande quantité de mucus cervical (Suarez 2006). Ce mucus permet de faire une première sélection des spermatozoïdes puisque les spermatozoïdes ayant une morphologie anormale ainsi qu'une motilité anormale ou faible restent prisonniers de ce mucus alors que ceux ayant une bonne motilité se retrouvent dans l'utérus. De plus, le passage du col crée un effet de lavage pour les spermatozoïdes puisque le plasma séminal ne traverse pas le col de l'utérus. Il est d'ailleurs à noter que des études ont montré qu'un plus grand nombre spermatozoïdes étaient retrouvés à l'intérieur du col lorsque ceux-ci étaient dilués dans le plasma séminal comparativement à ceux dilués dans le milieu Tyrode (Overstreet et al. 1980), démontrant ainsi l'importance de certaines composantes du plasma séminal dans la pénétration du mucus du col de l'utérus malgré sont accès restreint à celui-ci.

1.7.3 Transit dans l'utérus et passage de la jonction utéro-tubaire

Une fois dans l'utérus, les spermatozoïdes doivent passer les cornes utérines, dont la longueur varie selon les espèces, pour atteindre la jonction utéro-tubaire. Chez la vache, un mouvement de péristaltisme présent durant l'œstrus les aide dans leur transit (Hawk 1987). Une fois à la jonction utéro-tubaire, les spermatozoïdes auront toutefois besoin de leur

motilité afin de franchir cette barrière (Suarez 2006). Ils auront aussi besoin de certaines protéines de surface. En effet, des études ont montré que bien qu'ayant une motilité et une morphologie normale, les spermatozoïdes provenant de souris mutantes pour la calmegine, une chaperone impliquée dans le repliement de protéines membranaires (Ikawa et al. 1997; Nakanishi et al. 2004; Yamagata et al. 2002), ne pouvaient entrer dans l'oviducte. Similairement, les spermatozoïdes auront besoin de la protéine de surface Fertilin β afin de pouvoir franchir l'oviducte puisque les souris déficiente pour cette protéine perdent leur capacité à traverser celle-ci (Cho et al. 1998). La nécessité de recruter un facteur protéique afin de permettre la poursuite des spermatozoïdes vers le site de fécondation permet une sélection plus stringente des spermatozoïdes de qualité pour la fécondation.

1.7.4 Transit dans l'oviducte

Une fois dans l'oviducte, les spermatozoïdes se retrouvent dans un environnement plus accueillant puisque, contrairement au vagin et à l'utérus, celui-ci ne recrute pas une armée de leucocytes suite à l'insémination (Rodriguez-Martinez et al. 1990b). Ils seront conservés dans l'isthme de l'oviducte avant d'être relâchés graduellement dans l'ampoule où ils rejoignent l'ovule pour terminer le processus de fécondation (Suarez 2006). En effet, lors de leur entrée dans l'isthme, les spermatozoïdes se lient aux cellules de l'oviducte. Cette interaction est reconnue pour prolonger le pouvoir fécondant des spermatozoïdes en attendant l'ovulation (Suarez 2006). L'interaction entre les spermatozoïdes et les cellules épithéliales serait médiée via les carbohydrates des glycoprotéines (DeMott et al. 1995). Au cours de cette interaction, les spermatozoïdes échangent avec les cellules de l'oviducte. Par exemple, il fut récemment démontré que les spermatozoïdes bovins acquéraient les protéines HSP-60 et GRP-78 (Boilard et al. 2004) situées sur les membranes apicales des cellules épithéliales.

Par quel mécanisme le spermatozoïde peut-il lier les parois de l'oviducte? Chez le spermatozoïde bovin, Suarez et al. ainsi que Ignatz et al. démontrèrent que la liaison s'effectue via la protéine PDC-109; une protéine provenant du plasma séminal qui serait transférée aux spermatozoïdes lors de l'éjaculation (Ignatz et al. 2001; Suarez et al. 1998). Il est proposé que PDC-109 contribuerait au maintien du pouvoir fécondant des spermatozoïdes en stabilisant la fluidité des membranes par l'immobilisation du cholestérol

contenu dans celles-ci (Greube et al. 2001; Muller et al. 2002) et en inhibant l'activité de la phospholipase A₂ (Manjunath et al. 1994b; Soubeyrand and Manjunath 1997). Il est suggéré que ces deux fonctions ont pour but de prolonger le pouvoir fécondant des spermatozoïdes durant leur stockage dans l'oviducte (Suarez 2006). Un autre moyen utilisé par l'oviducte pour conserver le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est de maintenir une concentration de calcium cytoplasmique faible chez celui-ci. Il est montré que les spermatozoïdes humains et équins subissent la capacitation (voir section 1.6) moins rapidement lorsqu'ils sont incubés en présence de vésicules provenant des cellules de l'oviducte (Dobrinski et al. 1997; Dobrinski et al. 1996). Bien que le mécanisme utilisé demeure inconnu, il est proposé que la catalase présente dans l'oviducte pourrait protéger les spermatozoïdes des dommages oxydatifs causés à leur membrane et aiderait ainsi à maintenir les niveaux de calcium cytoplasmique bas (Lapointe et al. 1998).

À l'approche de l'ovulation, les spermatozoïdes bovins sont relâchés graduellement des cellules épithéliales et rejoignent l'ovocyte afin de le féconder. Il est reconnu que le détachement des spermatozoïdes est associé à une perte de cholestérol membranaire et de la protéine PDC-109 ainsi qu'à l'hyperactivation des spermatozoïdes (Suarez 2006). Ces événements sont associés au phénomène de capacitation, un processus essentiel aux spermatozoïdes pour la fécondation de l'ovule (section 1.6). Des études ont démontré que les spermatozoïdes de hamsters capités et hyper-motiles ne lient plus l'épithélium de l'oviducte (Smith and Yanagimachi 1991). De même, les spermatozoïdes bovins capités en présence d'héparine perdent significativement leur affinité pour les cellules de l'oviducte (Lefebvre and Suarez 1996).

Comment les spermatozoïdes liés aux cellules épithéliales dans des conditions visant à minimiser la capacitation peuvent-ils finalement être relâchés de ces mêmes cellules dans un état capacité? Chez le bovin, il est reconnu qu'*in vivo*, peu avant l'ovulation, un glycoaminoglycan similaire à l'héparine est retrouvé en plus grande concentration dans le fluide de l'oviducte et pourrait contribuer à la capacitation des spermatozoïdes bovins (Parrish et al. 1989). De cette façon, les spermatozoïdes se détacheraient au moment opportun augmentant ainsi leur chance de féconder l'ovule retrouvé dans l'ampoule de l'oviducte.

1.8 Interactions entre les gamètes

1.8.1 Rencontre entre le spermatozoïde et le complexe ovocyte-cumulus (COC)

Lors du développement de l'ovule, chez plusieurs espèces de mammifère, il se développera de la prophase de la première division méiotique à la métaphase de la deuxième division méiotique juste avant l'ovulation (Suarez 2006). Chez la plupart de ces espèces, l'ovocyte restera dans cet état jusqu'à la fécondation (Suarez 2006). C'est donc sous le stade MII que les seront relâchés par l'ovaire et transportés dans l'oviducte pour y être fécondés. Lors de l'ovulation, l'ovule est entouré d'une grosse matrice extracellulaire: le cumulus (Figure 1.7). Formant une barrière physique entre le spermatozoïde et l'ovule, le cumulus est la première barrière rencontrée par les spermatozoïdes capités rejoignant le site de fécondation. Produit au cours de la reprise de la méiose (Yanagimachi 1994), il est démontré que le cumulus est aussi nécessaire pour le recrutement de l'ovule par les cils et pour son transport au site de fécondation (Suarez 2006).

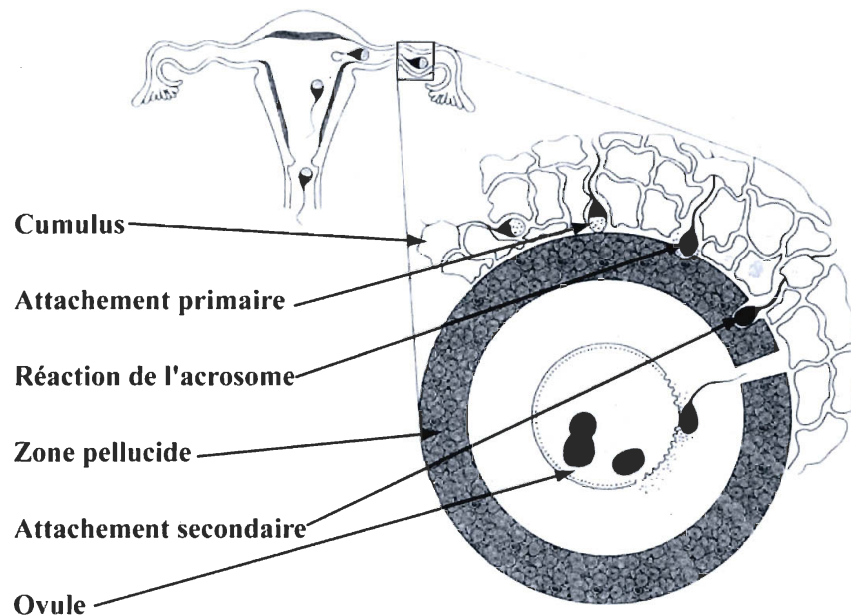


Figure 1.7: Événements survenant lors de l'interaction entre les gamètes au cours de la fécondation

1.8.1.1 Composition du cumulus

Le cumulus est composé de milliers de cellules de granulosa comprises dans une matrice extracellulaire dont la principale composante est l'acide hyaluronique (Florman Harvey 2006; Yanagimachi 1994). On y retrouve aussi du collagène, de la laminine, de la fibronectine, de la tenaséine-C (Familiari et al. 1996) ainsi que des composantes encore non identifiées (Florman Harvey 2006). Attachés à ces protéines, on y retrouve des protéoglycans tels que la chondroïtine sulphate, l'héparane sulphate et la dermatine sulphate (Rodgers et al. 2003; Yanagimachi 1994). Des membres de la famille des inhibiteurs trypsines inter- α stabilisant le complexe de la matrice sont aussi présents (L et al. 2002). Toute cette matrice se retrouve liée aux cellules de granulosa via la protéine associée à l'acide hyaluronique, CD44, (Campbell et al. 1995; Yokoo et al. 2002) ainsi que potentiellement via les fibronectines qui interagiraient avec les intégrines retrouvées à la surface des cellules (Sutovsky et al. 1995).

1.8.1.2 Rôle du cumulus au cours de la fécondation

Il fut rapporté que certaines espèces ne possèdent peu ou pas de cumulus lors de la fécondation, et que celui-ci ne serait qu'un déchet résiduel suivant l'ovulation et le transport de l'ovule dans l'oviducte (Yanagimachi 1994). Chez le bovin par exemple, la dispersion du cumulus est très rapide puisque l'ovule recueilli dans l'oviducte deux à trois heures suivant l'ovulation sont dépourvus de cumulus (Lorton and First 1979). Toutefois, il est à noter que lors de la reproduction chez les animaux, les spermatozoïdes atteindront le site de fécondation avant l'arrivée de l'ovule. La présence du cumulus autour de l'ovule est donc indéniable. De plus, la présence bénéfique du cumulus au cours de la fécondation *in vitro* chez certaines espèces dont le bovin (Tajik et al. 1993; Younis and Brackett 1991; Zhang et al. 1995) et la souris (Pomeroy et al. 1988; Yanagimachi 1994), particulièrement lors d'une faible concentration en spermatozoïdes (Siddiquey and Cohen 1982) ou en albumine (Fraser 1985), fut démontrée.

Plusieurs études ont démontré le rôle sélectif du cumulus au cours de la fécondation. En effet, celui-ci empêche le passage des spermatozoïdes non-capacités ainsi que ceux ayant déjà subis la réaction acrosomique. Ces spermatozoïdes demeurent prisonniers soit à l'extérieur ou à l'intérieur de la matrice (Cherr et al. 1986; Cummins and Yanagimachi

1986). Le mécanisme de sélection demeure toutefois inconnu. Néanmoins, il fut mis en lumière qu'une augmentation de calcium intracellulaire ainsi qu'une phosphorylation de certaines protéines étaient observables chez les spermatozoïdes en contact avec l'acide hyaluronique contenu dans le cumulus (Cherr et al. 1999; Ranganathan et al. 1995). Ces auteurs proposent que l'acide hyaluronique contenu dans le cumulus aurait un rôle préparatoire pour la réaction de l'acrosome au cours de l'interaction entre le spermatozoïde et la zone pellucide (Sabeur et al. 1998; Vandervoort et al. 1997).

Dans un autre ordre d'idées, il est suggéré que le cumulus ou des facteurs sécrétés par celui-ci stimuleraient la motilité du spermatozoïde (Bradley and Garbers 1983; Florman Harvey 2006). Certains auteurs voient tout simplement le cumulus comme une « grosse cible » pouvant aider le spermatozoïde à se diriger vers l'ovule (Bedford and Kim 1993; Yanagimachi 1994) alors que d'autres proposent qu'il prolongerait la viabilité de l'ovule et aiderait le spermatozoïde à pénétrer la zone pellucide en empêchant celle-ci de tourner (Yanagimachi 1994). Finalement, un rôle dans l'attraction des spermatozoïdes vers l'ovocyte fut proposé (Tanghe et al. 2002). Des études plus approfondies sont toutefois nécessaires afin de déterminer si le cumulus possède un pouvoir chimiotaxique.

1.8.1.3 Passage des spermatozoïdes au travers du complexe du cumulus

Bien qu'une grande quantité de spermatozoïdes se retrouvent autour du complexe lors de la fécondation *in vitro*, il en est tout autrement *in vivo* (Yanagimachi 1994). En effet, le ratio spermatozoïdes : ovule varie de 1:1 à 10:1 au cours de la fécondation *in vivo* (Florman Harvey 2006). Dans cette situation, le complexe du cumulus demeure intact et on ne peut compter sur la force mécanique des spermatozoïdes pour expliquer leur passage. Il fut démontré que la dispersion du cumulus n'est pas mécanique mais plutôt enzymatique et causée par une hyaluronidase présente chez les spermatozoïdes qui, via son activité, digère les liens d'acide hyaluronique présents dans la matrice afin de faciliter leur passage (Florman Harvey 2006; Kreil 1995). Il fut par la suite reconnu que cette protéine était en fait la glycoprotéine nommée PH-20 (Myles and Primakoff 1984; Phelps et al. 1988), dont l'activité hyluronidase et l'implication dans le passage du cumulus sont maintenant bien établies (Gmachl and Kreil 1993; Gmachl et al. 1993; Lin et al. 1994; Myles and Primakoff

1997). C'est donc grâce à l'activité hyaluronidase de PH-20 que les spermatozoïdes pourront atteindre le dernier obstacle les séparant de l'ovule : la zone pellucide.

1.8.2 Interaction entre les spermatozoïdes et la zone pellucide

1.8.2.1 Structure et origine de la zone pellucide

Tel que mentionné plus haut, le spermatozoïde capacité ayant franchit le complexe du cumulus doit lier et franchir la zone pellucide entourant l'ovule (figure 1.7). C'est la dernière barrière le séparant de la membrane plasmique de l'œuf. Il s'agit d'une ceinture protéique protégeant l'ovule contre les dommages physiques pouvant lui être portés et contre la polyspermie. Elle empêche aussi les cellules de l'embryon de se dissocier et d'adhérer aux cellules des autres embryons ou aux parois du tractus reproducteur femelle (Yanagimachi 1994). La zone pellucide est composée principalement de trois ou quatre glycoprotéines selon les espèces (tableau 1.2) communément appelées ZP1, ZP2, ZP3 et ZP4 (Florman Harvey 2006; Yanagimachi 1994). Tout d'abord identifiées en 1980 chez la souris (Bleil and Wassarman 1980b), les protéines ZP1, 2 et 3 furent par la suite caractérisées chez plusieurs espèces (Florman Harvey 2006). Ce n'est que 19 ans plus tard que la protéine ZP4 fut identifiée, tout d'abord dans les bases de données génomiques en 1999 (Hughes and Barratt 1999), puis sous forme protéique. Suite aux observations de la zone pellucide murine faites par microscopie électronique, il est proposé que ZP2 et ZP3 soient associées de façon non covalente pour former des filaments protéiques inter-reliés entre eux via ZP1 (Harvey Florman, 2006). Toutefois, cet arrangement varie selon les espèces (Chiu et al. 2008; Kanai et al. 2008). Comme on peut le voir dans ce tableau, la zone pellucide bovine se compose des protéines ZP2 ZP3 et ZP4, tout comme la plupart des espèces présentées ici.

L'analyse de la séquence de ZP3 a montré une forte homologie entre les différentes espèces. Par exemple, la ZP3 de la souris et de l'humain ont une homologie de séquence protéique à 67% (Yanagimachi 1994) alors que la souris et le hamster ont une homologie protéique de 81% (Kinloch et al. 1990). De plus, l'analyse de la structure de l'ARN messager montre qu'elle est conservée chez les mammifères (Ringuette et al. 1988) suggérant un rôle important pour cette glycoprotéine au cours de la fécondation.

Species	ZP1	ZP2	ZP3	ZP4
Human	x	x	x	x
Chimpanzee	x	x	x	x
Macaque	x	x	x	
Crab-eating macaque				x
Mormoset		x	x	x
Baboon				x
Pig		x	x	x
Cow		x	x	x
Cat		x	x	x
Dog		x	x	
Rabbit		x	x	x
Mouse	x	x	x	§
Rat	x	x	x	x
Hamster			x	
Possum		x	x	x
Lemming		x	x	
Chicken	x	x	x	x
Quail	x	x	x	
<i>Xenopus</i>		x	x	x

Tableau 1.2: Présence des différents gènes codant pour les protéines ZP chez les vertébrés supérieurs selon les séquences présentement disponibles dans les banques de données. Tiré de Conner et al.(Conner et al. 2005) À noter que ZP4 est considérée comme pseudogène chez la souris§.

Parmi les autres composantes formant la zone pellucide, il fut rapporté que l'acide hyaluronique contenu dans le cumulus s'étend jusqu'aux régions poreuses de la zone pellucide (Tesarik and Kopecný 1986; Yanagimachi 1994) et ferait donc partie intégrante de celle-ci. Il fut aussi rapporté chez plusieurs espèces dont le hamster, la brebis, la vache, la truie, le babouin et l'humain (Yanagimachi 1994) que certaines glycoprotéines provenant de l'oviducte s'associeraient aux constituants de la zone pellucide. Le rôle potentiel de ces ajouts sera discuté dans la prochaine section.

1.8.2.2 Attachement primaire

Lors de la rencontre entre le spermatozoïde et la zone pellucide, une première liaison se produit, mieux connue sous le nom de l'attachement primaire (figure 1.7). Cette interaction entraîne une modification de la structure du spermatozoïde nommée la réaction de l'acrosome. Suite à cette réaction, le spermatozoïde lie à nouveau la zone pellucide et cette deuxième liaison se nomme l'attachement secondaire (figure 1.7). Grâce à cette liaison, le spermatozoïde pénètre la zone pellucide et adhère finalement à la membrane plasmique de l'ovule pour fusionner avec celle-ci. La réaction de l'acrosome et

l'attachement secondaire seront discutés dans les prochaines sections alors que cette section sera concentrée sur l'attachement primaire du spermatozoïde.

Les spermatozoïdes lient fortement la zone pellucide avant de la pénétrer. En effet, la pré-incubation *in vitro* de spermatozoïdes capités en présence de zones pellucides solubilisées inhibe la liaison de ceux-ci aux zones pellucides intactes (Gwatkin and Williams 1977). Suite à cette observation, il fut proposé qu'un récepteur situé sur la membrane des spermatozoïdes ayant une forte affinité pour la zone pellucide est requis pour l'attachement primaire (Gwatkin and Williams 1977; O'Rand et al. 1985; Yanagimachi 1994). Les études effectuées chez la souris et le hamster, ont montré que la protéine ZP3 est responsable de l'attachement primaire du spermatozoïde à la zone pellucide (Bleil and Wassarman 1980a; Bleil and Wassarman 1986; Moller et al. 1990; Mortillo and Wassarman 1991).

Chez les spermatozoïdes, des études utilisant la protéine ZP3 couplée à l'iode¹²⁵, ont permis de déterminer que les protéines spermatiques de liaison à la ZP3 étaient situées sur la partie antérieure de la tête mais et qu'il pouvait y avoir près de 30 000 sites liant ZP3 sur la tête des spermatozoïdes (Bleil and Wassarman 1986; Thaler and Cardullo 1996). Plusieurs candidats furent suggérés comme récepteurs, tels la zonadhésine (Hardy and Garbers 1995), sp56 (Bleil and Wassarman 1990; Bookbinder et al. 1995), p95 (Burks et al. 1995; Leyton and Saling 1989), P26h (Montfort et al. 2002, Sullivan et al. 1985), β -1,4-galactosyltransférase (GalT) (Miller et al. 1992) ainsi que SED1 (Ensslin et al. 1998). Certains de ces candidats furent rejetés, d'autres sont toujours à l'étude. Néanmoins, jusqu'à présent, aucun candidat fiable n'a pu être désigné comme agent de liaison spermatique à ZP3 dû aux résultats ambivalents des tests de fertilité de souris déficientes pour les gènes codants pour certains candidats ou tout simplement dû à la localisation de ces protéines chez le spermatozoïde.

L'interaction entre ZP3 et les spermatozoïdes s'effectue via les chaînes de carbohydrates de ZP3 et non via une séquence peptidique spécifique (Florman et al. 1984; Florman and Wassarman 1985; Shur et al. 2006). Bien que les résidus d'O-glycan sont impliqués dans l'interaction entre les spermatozoïdes et la zone pellucide, une N-

deglycosylation effectuée sur des zones pellucides entières produit aussi un effet inhibiteur dans l'attachement primaire des spermatozoïdes (Shur et al. 2006). L'implication des chaînes de N-glycosylation est aussi démontrée dans la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide dans le modèle porcin et bovin, (Yonezawa et al. 2005; Yonezawa et al. 1995). Qu'il s'agisse des chaînes O- ou N-glycanes, ce facteur peut être spécifique à l'espèce. Toutefois, il est important de retenir que dans un cas comme dans l'autre, il s'agit des chaînes carbohydrates retrouvées sur la protéine ZP3 et non d'une séquence en acides aminés qui est responsable de la première interaction entre les spermatozoïdes et la zone pellucide.

1.8.2.3 Attachement secondaire et passage de la zone pellucide

Suivant la réaction de l'acrosome, le spermatozoïde adhère à la zone pellucide via la membrane interne de l'acrosome. Cet attachement secondaire permet au spermatozoïde de franchir la zone pellucide et finalement de se lier à l'ovule. Il fut suggéré que cette interaction est médiée via la protéine ZP2 de la zone pellucide (Bleil et al. 1988; Mortillo and Wassarman 1991; Tsubamoto et al. 1996; Tsubamoto et al. 1999). Parmi les mécanismes de pénétration proposés, la combinaison de la force mécanique produit par le battement flagellaire combinée à l'utilisation des protéases présentes dans l'acrosome et sur la membrane interne de l'acrosome sont favorisées contre une pénétration purement mécanique ou causée par une altération ou un changement de la conformation des protéines de la zone pellucide (Florman Harvey 2006). De plus, les études effectuées chez la souris et le hamster, démontrent que le temps requis aux spermatozoïdes pour traverser la zone pellucide est relativement court, soit de 15 à 30 minutes suivant l'insémination (Stewart-Savage 1993; Yanagimachi 1994).

Au niveau spermatique, plusieurs protéines furent rapportées pour avoir une affinité pour ZP2. La zonadhésine (Bi et al. 2003; Olson et al. 2004), sp56 (Foster et al. 1997), la proacrosine (Jones 1990; Yanagimachi 1994), l'IAM38 (Yu et al. 2006) et PH-20 (Hunnicut et al. 1996b) en sont des exemples. Plusieurs études se sont intéressées à l'acrosine. Cette enzyme, tout d'abord retrouvée dans sa forme inactive, la proacrosine, est activée par le clivage de son extrémité N-terminale en α -acrosine, puis par le clivage de son extrémité C-terminale en β -acrosine (Howes and Jones 2002; Yanagimachi 1994). Il est

reconnu que la proacrosine possède une affinité de liaison pour la zone pellucide. De plus, la conversion de la proacrosine en α -acrosine est accélérée en présence d'une faible concentration de protéines de la zone pellucide. À l'inverse, elle est ralentie en présence d'une concentration élevée de ces mêmes protéines (Topfer-Petersen and Cechova 1990). Quant à la conversion de l' α -acrosine en β -acrosine, elle est accélérée en présence des protéines de la zone pellucide (Eberspaecher et al. 1991). Il fut proposé, à partir de ces observations, que le ralentissement de la conversion proacrosine/ α -acrosine est requis afin d'éviter l'épuisement du réservoir de proacrosine avant la fin du passage complet de la zone pellucide par le spermatozoïde. Grâce au mécanisme d'hydrolyse de la zone pellucide par l' α - et la β -acrosine (Yanagimachi 1994) ainsi qu'à la force générée par le battement flagellaire, le passage de la zone pellucide serait assuré.

Les résultats obtenus par Yudin et al. (Yudin et al. 1999), de même que ceux de Honda et al. (Honda et al. 2002) semblent toutefois poser un bémol sur ces hypothèses. En effet, la génération d'anticorps contre l'acrosine n'a aucun effet sur la fécondation des spermatozoïdes lors de tests de compétition. De plus les souris déficientes pour l'acrosine se sont révélées aptes à féconder (Baba et al. 1994). Les auteurs ont toutefois observé que le temps de fécondation requis était plus long qu'à l'habitude. Des résultats similaires furent observés chez les souris déficientes pour la protéine PH-20 (Baba et al. 2002), aussi proposée comme candidate impliquée dans l'attachement secondaire du spermatozoïde à la zone pellucide ainsi que dans la pénétration de celle-ci (voir section 1.9). Deux conclusions peuvent être tirées de ces résultats. La première est qu'une autre protéine non identifiée jusqu'à présent est requise pour l'attachement secondaire du spermatozoïde et le passage de la zone pellucide. La deuxième est que plusieurs candidats sont impliqués dans le processus et que malgré le temps de fécondation plus long, la délétion d'un des candidats n'inhibe pas la pénétration de la zone pellucide puisque les autres candidats joueraient un rôle « compensatoire ». Quoiqu'il en soit, quelques années de recherche sont encore requises afin d'élucider tous les mécanismes entourant l'attachement secondaire et la pénétration de la zone pellucide.

1.9 PH-20

À la lumière des phénomènes décrits précédemment, il ne fait aucun doute que la fécondation est un phénomène hautement régulé par une multitude de facteurs stéroïdogéniques, enzymatiques et protéiques. Une défaillance d'un de ces contributeurs peut affecter la fertilité de l'individu. D'un autre côté, si l'on pouvait contrôler, inhiber ou contrecarrer volontairement l'action d'un de ces facteurs de façon temporaire, il serait alors possible de développer un moyen de contraception masculine efficace. Bien que plusieurs facteurs puissent être ciblés chez le spermatozoïde (développement, maturation, motilité), les prochaines pages seront consacrées plus spécialement sur une protéine, brièvement mentionnée jusqu'à maintenant dans cette introduction, qui est impliquée dans les mécanismes se déroulant au cours de l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovule et qui fut d'un grand intérêt pour son potentiel contraceptif : PH-20.

Des études sur le potentiel contraceptif de PH-20 furent effectuées et malgré le potentiel prometteur de la protéine suite aux premiers résultats obtenus chez le cobaye (Primakoff et al. 1985; Primakoff et al. 1988b; Tung et al. 1997), le projet fut abandonné. En effet, les tentatives d'immunocontraception effectuées chez d'autres espèces donnèrent des résultats peu convaincants (Deng et al. 2002; Hardy et al. 2004; Holland et al. 1997; Pomeroy et al. 2002). À noter que les résultats obtenus par ces études démontrèrent la faiblesse du caractère immunocontraceptif de PH-20 sans toutefois enlever au rôle essentiel de celle-ci au cours de la fécondation. Il semble tout simplement que PH-20 ne peut être utilisée comme antigène dans le développement d'un mode de contraception par voie immunologique et depuis, les recherches en ce sens ont beaucoup diminué.

1.9.1 Identification et caractérisation de la protéine PH-20; études chez le cobaye; études immunologiques

C'est au cours d'études sur les différents domaines retrouvés à la surface des spermatozoïdes à l'aide d'anticorps provenant de différentes cultures d'hybridomes que cette protéine de 64kDa fut identifiée chez le cobaye (Myles et al. 1981; Primakoff and Myles 1983). La définition de la protéine PH-20 réfère à sa localisation initiale par l'anticorps dans la portion postérieure de la tête (Posterior Head) et à son origine de production (une lignée d'hybridome qui fut clonée) (Primakoff and Myles 1983). Suite à

l'observation du changement de localisation de la protéine au cours de la réaction acrosomique induite à l'aide de l'ionophore calcique A23187 et de calcium exogène, les auteurs se sont attardés plus attentivement à cette protéine, voyant ainsi un rôle potentiel de PH-20 au cours de la fécondation (Myles and Primakoff 1984). En effet, PH-20 est transférée de la région post-acrosomale à la membrane interne de l'acrosome en 7 à 10 minutes seulement suivant l'induction de la réaction de l'acrosome par l'ionophore A23187. Des études subséquentes ont montré qu'une population de PH-20 était déjà présente au niveau acrosomal et que l'induction de la réaction de l'acrosome permettait à la population post-acrosomale de migrer pour rejoindre cette population (Cowan et al. 1986). Au cours de la maturation épидидymaire, la population située sur la membrane plasmique est clivée en deux fragments qui migrent aux alentours de 41-48 kDa et 27kDa (Primakoff et al. 1988a). Ces fragments sont normalement reliés entre eux via des ponts disulfures. Quant à la population acrosomale de PH-20, Primakoff et al. spéculent qu'elle est clivée au cours de la réaction de l'acrosome (Primakoff et al. 1988a). Les auteurs suggèrent que ce clivage, de nature endoprotéolitique, interviendrait dans l'activation des fonctions de la protéine (Phelps et al. 1990; Primakoff et al. 1988a).

1.9.2 PH-20; protéine conservée chez les espèces

La séquence complète de la protéine fut déterminée par criblage d'une banque d'ADN complémentaire testiculaire chez le cobaye (Lathrop et al. 1990). Les résultats montrent que PH-20 est une protéine de 468 acides aminés et confirment la présence d'une ancre GPI à l'extrémité C-terminale de la protéine tel que rapportée précédemment par Phelps et al. (Phelps et al. 1988). De plus, la protéine possède plusieurs sites de N-glycosylation ainsi que des sites potentiels de formation de ponts disulfures. Les analyses effectuées par Southern blot révélèrent que le gène PH-20 est conservé chez la souris, le rat, le hamster, le lapin, l'humain, le bovin et le singe (Lathrop et al. 1990). La protéine fut par la suite identifiée chez de nombreuses espèces telles que la souris (Thaler and Cardullo 1995), le rat (Shalgi et al. 1990), le macaque (Overstreet et al. 1995), le renard roux (ten Have et al. 1998), l'humain (Gmachl et al. 1993), le cheval (Meyers 2001), le porc (Day et al. 2002), le mouton (Fleming et al. 2004) et le bovin (Lalancette et al. 2001; Morin et al. 2005) confirmant ainsi la conservation de PH-20 parmi les espèces. Mis à part le bovin où la masse moléculaire de la protéine s'élève à 80 kDa (Lalancette et al. 2001; Morin et al.

2005), PH-20 est une protéine d'environ 64-68 kDa chez plusieurs des espèces énumérées ci-haut (Martin-DeLeon 2006).

1.9.3 PH-20 est une protéine GPI-ancrée

Deux questions demeuraient toutefois sans réponse: i) comment se fait-il que les deux populations ne se déplacent pas d'un site à l'autre précédant la réaction de l'acrosome et ii) de quelle façon la protéine est-elle ancrée dans la membrane pour pouvoir se déplacer ainsi? Grâce aux études de mobilité latérale de PH-20, Cowan et al proposèrent que la population post-acrosomale est maintenue en place grâce à la présence d'une barrière de diffusion et que cette barrière est perdue pendant la réaction de l'acrosome, permettant ainsi le déplacement latéral de PH-20 post-acrosomale à la membrane interne de l'acrosome (Cowan et al. 1987). Pour ce qui est de l'attachement à la membrane, grâce au relâchement de la protéine par traitement à la phosphatidyl-inositol phospholipase-C (PI-PLC), Phelps et al. (Phelps et al. 1988) ont pu démontrer que PH-20 est ancrée via un lien phosphatidyl-inositol (PI), confirmant ainsi le potentiel de mobilité latérale de la protéine. Jusqu'à maintenant, seuls les homologues chez le renard roux et le taureau ne semblent pas posséder d'ancre-GPI (Lalancette et al. 2001; Morin et al. 2005; ten Have et al. 1998). L'analyse de la séquence en acide aminés de PH-20 bovin suggère toutefois la présence d'un domaine transmembranaire en position C-terminale de la protéine (Morin et al. 2005).

1.9.4 PH-20 est impliquée dans le passage de la matrice du cumulus grâce à son activité hyaluronidase

Connaissant la séquence de PH-20 en main, la recherche de domaines fonctionnels de la protéine était désormais possible. C'est ainsi que Gmachl et Kreil. (Gmachl and Kreil 1993) purent établir que PH-20 possède une partie de séquence partageant environ 36% d'homologie avec la séquence codant pour la hyaluronidase retrouvée dans le venin des abeilles. Il était connu depuis plusieurs années qu'une hyaluronidase était présente dans le testicule et chez les spermatozoïdes (voir revue de la littérature par Kreil.G (Kreil 1995)) mais son identification demeurait toujours inconnue. La découverte de l'homologie entre la hyaluronidase du venin d'abeille et PH-20 chez le cobaye permis de mettre en évidence une activité hyaluronidase chez la plupart des espèces où PH-20 fut identifiée (Cherr et al. 1996; Gmachl et al. 1993; Hou et al. 1996; Lalancette et al. 2001; Meyer et al. 1997;

Meyers and Rosenberger 1999; Thaler and Cardullo 1995). Meyer et al. proposèrent même que la hyaluronidase testiculaire bovine soluble était en fait un fragment de PH-20 (Meyer et al. 1997). Six gènes codant pour des hyaluronidases ont été initialement identifiés chez l'humain et la souris. Chez l'humain, HYAL 1, 2 et 3 situés sur le chromosome 3q21.3 et HYAL4, PH-20 et le pseudogène HYALP1 situés sur le chromosome 7q13.3 (Csoka et al. 2001). Parmi ces gènes, HYAL3 et PH-20 sont retrouvés en abondance dans le testicule. Puisque HYAL3 est impliqué principalement dans la régulation des cellules souches (Csoka et al. 2001), tout laisse croire que PH-20 est la seule hyaluronidase impliquée dans le processus reproducteur. Toutefois, chez la souris, un septième gène codant pour une nouvelle hyaluronidase, HYAL5, fut identifié suite à des études mutationnelles effectuées chez la souris (Baba et al. 2002; Kim et al. 2005). La protéine fut retrouvée chez le spermatozoïde et elle possède une activité hyaluronidase. Néanmoins, ce gène ne fut retrouvé que chez la souris et le rat et les auteurs ne nient pas la possibilité qu'il s'agisse d'une spécificité des rongeurs (Kim et al. 2005). Chez le macaque, la souris et le cobaye, deux formes de PH-20 furent retrouvées; une forme membranaire et une forme soluble qui origine de la forme membranaire (Cherr et al. 1996; Hunnicutt et al. 1996a; Li et al. 1997; Thaler and Cardullo 1995). Au cours de la réaction de l'acrosome, une fraction de la population située sur la membrane interne de l'acrosome est clivée et relâchée dans le milieu avec le contenu de l'acrosome. Bien que les deux formes, membranaire et soluble, démontrent une activité hyaluronidase (Cherr et al. 1996; Hunnicutt et al. 1996a; Li et al. 1997), la forme soluble retrouvée chez le macaque possède une activité hyaluronidase plus efficace à pH acide comparativement à la forme membranaire dont l'activité optimale se situe à pH neutre (Cherr et al. 1996).

Suite à la découverte du domaine hyaluronidase de PH-20, des études furent effectuées afin de déterminer si cette protéine pouvait avoir un rôle quelconque à jouer lors du passage des spermatozoïdes au travers de la matrice extracellulaire du cumulus qui, rappelons-le, contient de l'acide hyaluronique en grande quantité (voir section 1.7.1). L'incubation de PH-20 recombinante en présence d'ovocytes murins permis a de démontrer le pouvoir de dispersion du cumulus de PH-20. De plus, l'incubation de spermatozoïdes murins intacts avec un anticorps dirigé contre PH-20 inhibe la pénétration de ceux-ci à l'intérieur du cumulus (Lin et al. 1994). Ces résultats démontrent l'implication essentielle

de PH-20 au cours de l'interaction entre les spermatozoïdes et le cumulus. Des résultats similaires furent par la suite observés chez la souris et le macaque (Meyers et al. 1997).

1.9.5 PH-20 est impliquée dans l'attachement secondaire des spermatozoïdes à la zone pellucide via un domaine différent du domaine hyaluronidase.

Les premières évidences qui mirent en lumière l'implication potentielle de PH-20 dans l'interaction entre les spermatozoïdes et la zone pellucide proviennent des études de Primakoff et al. réalisées chez le cobaye (Primakoff et al. 1985). Brièvement, il fut montré que lorsque les spermatozoïdes sont incubés dans des conditions favorisant la réaction de l'acrosome et qu'ils sont transférés par la suite dans un milieu contenant l'anticorps monoclonal PH-20, ils perdent leur capacité à lier l'ovule. Des résultats similaires furent observés chez le rat lorsque des spermatozoïdes capotés étaient incubés sur une longue période en présence d'ovules dénudés et de l'anticorps 2B1 (Shalgi et al. 1990). En effet, les auteurs ont observé une inhibition de la liaison des spermatozoïdes à près de 70%. Des résultats similaires furent obtenus lors de l'incubation de spermatozoïdes de macaque en présence de l'anticorps dirigé contre mPH-20 précédant l'ajout des ovules (Yudin et al. 1999). Le fait que l'anticorps dirigé contre PH-20 inhibe la liaison des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome à la zone pellucide suggère que PH-20 est requise au cours de l'attachement secondaire des spermatozoïdes à la zone pellucide chez le cobaye (Primakoff et al. 1985).

Hunnicut et al. démontrèrent par la suite la bifonctionnalité de PH-20. En effet, l'incubation des spermatozoïdes en présence de l'anticorps dirigé contre PH-20 inhibe l'interaction spermatozoïde/ovule mais n'inhibe pas l'activité hyaluronidase de celle-ci (Hunnicut et al. 1996b). De plus, l'incubation des spermatozoïdes en présence d'apigénine, un inhibiteur de l'activité hyaluronidase de PH-20 (Lin et al. 1994), n'a aucun effet sur le pouvoir de liaison de PH-20 à la zone pellucide (Hunnicut et al. 1996b). De ces résultats, les auteurs conclurent que PH-20 possède deux fonctions indépendantes : i) une activité hyaluronidase nécessaire au passage du cumulus et ii) un pouvoir de liaison à la zone pellucide requis au cours de l'attachement secondaire du spermatozoïde suivant la réaction de l'acrosome (Hunnicut et al. 1996b). Il fut aussi proposé par les auteurs que le

domaine hyaluronidase serait situé en position N-terminale alors que le site de liaison de PH-20 à la zone pellucide serait situé en position C-terminale de la protéine et que le clivage de la protéine, au cours de la réaction de l'acrosome, pourrait servir à activer cette fonction (Hunnicutt et al. 1996b).

Ces résultats démontrent bien l'importance de PH-20 dans les interactions entre les gamètes et suggèrent même un rôle essentiel à PH-20 pour le succès de la fécondation. Afin de confirmer ce rôle essentiel, une lignée de souris déficientes pour PH-20 fut générée et des essais de fécondation *in vitro* et *in vivo* furent effectués (Baba et al. 2002). Les résultats obtenus furent surprenants. En effet, les mâles PH-20^{-/-} se sont révélés totalement fertiles puisque suivant l'accouplement, des portées de taille normale furent obtenues. Toutefois, les observations *in vitro* révélèrent que la dispersion du cumulus par les spermatozoïdes mutants est grandement affectée. Seul 20% du cumulus étaient dispersés après trois heures d'incubation alors que normalement, les ovocytes sont totalement dépourvus de leur cumulus après ce temps (Baba et al. 2002). De plus, le temps de fécondation des ovules est trois fois plus long chez les souris PH-20^{-/-} comparativement aux lignés sauvages (Baba et al. 2002). Quoiqu'ayant une activité hyaluronidase affectée et un temps de fécondation plus lent, les souris PH-20^{-/-} sont bien fertiles, ce qui remet en doute le caractère essentiel de PH-20. Dans cette même étude, les auteurs ont démontré la présence d'une autre protéine possédant une activité hyaluronidase qui jouerait un rôle compensatoire à celui de PH-20 assurant ainsi le succès de la fécondation. Les études ultérieures ont révélé que cette protéine est, en fait, le septième membre de la famille des hyaluronidases, HYAL5, mentionné dans la section précédente (Kim et al. 2005). Ce gène ne fut identifié que chez la souris et le rat et non chez l'humain, le porc, le bovin, et le chimpanzé, suggérant une spécificité d'espèces (Kim et al. 2005). Par conséquent, il n'est pas exclu qu'un rôle essentiel pour la pénétration du cumulus et l'attachement secondaire du spermatozoïde à la zone pellucide soit attribué à PH-20 chez les autres espèces puisqu'elle demeure la seule hyaluronidase identifiée chez ces espèces.

1.9.6 Localisation et maturation de PH-20 : diversité selon les espèces

Les premières études de localisation de la protéine chez le cobaye au cours de la spermatogenèse démontrèrent que PH-20 est présente au niveau de l'appareil de Golgi lors

du début de la différenciation des spermatides (spermiogenèse) et par la suite dans les membranes de l'acrosome en formation. Peu après, une deuxième population est localisée à la surface de la membrane plasmique (Phelps and Myles 1987). À la sortie du testicule, les deux populations sont distribuées de façon uniforme sur les membranes acrosomale et plasmique au niveau de la tête des spermatozoïdes. C'est au cours de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme que PH-20 se concentre sur la membrane interne de l'acrosome et sur la région postérieure de la tête de la membrane plasmique. Des études similaires effectuées chez la souris ont montré que le messager codant pour la protéine et exprimé à l'étape 3 du développement des spermatides, augmente jusqu'à l'étape 8 puis diminue de l'étape 9 à 11 (Morales et al. 2004). À noter que les messagers étaient localisés près du réticulum endoplasmique seulement. Au niveau protéique, Spam1 (nom donné pour PH-20 chez la souris), est tout d'abord détectée dans le cytoplasme des spermatides à l'étape 5 et demeure présente jusqu'à la spermiation (Morales et al. 2004). À sa sortie du testicule, Spam1 est localisée au niveau flagellaire (pièce principale et intermédiaire). Toutefois, dès son arrivée dans la tête de l'épididyme, la localisation de la protéine a déjà changée et elle se retrouve au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle mais est aussi distribuée de façon uniforme au niveau de la tête. Spam1 sera finalement localisée au niveau de la tête, dans la queue de l'épididyme, préférentiellement au niveau de la portion antérieure de la tête (Morales et al. 2004). Des changements de localisation de PH-20 au cours de la maturation épидидymaire furent similairement observés chez l'étalon (Rutllant and Meyers 2001).

Chez la souris, en plus de la population d'origine testiculaire de Spam1 présente sur les spermatozoïdes, l'épididyme produit un ARN messager codant pour Spam1 qui est traduit en protéine fonctionnelle retrouvée dans les vésicules présentes dans les cellules principales et qui sont reconnues pour avoir des fonctions sécrétrices (Deng et al. 2000). En effet, Spam1 est sécrétée tout au long de l'épididyme et comporte une ancre lipidique qui lui permet de se lier aux spermatozoïdes (Chen et al. 2006; Zhang and Martin-DeLeon 2001; Zhang and Martin-DeLeon 2003). De plus, Spam1 fut retrouvée partiellement dans les épидидyosomes, une vésicule de transport reconnue pour interagir avec les spermatozoïdes (Sullivan et al. 2007), confirmant son potentiel de transfert sur les spermatozoïdes murins (Griffiths et al. 2008a; Zhang and Martin-DeLeon 2003). Bien que

Spam1 testiculaire et épидидymaire possèdent la même masse moléculaire lors de leurs séparations sur gel en condition dénaturante, Zhang et al. rapportèrent que l'initiation de leur transcription était régulée de façon indépendante et qu'elles possédaient différents sites d'initiations de transcription (Zhang and Martin-DeLeon 2001). Alors que le messager de PH-20 fut retrouvé dans l'épididyme de l'humain et du macaque par RT/PCR (Evans et al. 2003), la plupart des études furent effectuées chez les rongeurs, probablement en raison de la facilité d'accès au matériel biologique. Des études protéiques chez les grands mammifères permettraient de confirmer les résultats obtenus par technique PCR qui est très sensible et ne requiert que peu de matériels de départ.

Suite à ces observations il semble que l'épididyme joue un rôle important dans la maturation de PH-20 précédant l'éjaculation. Les études effectuées chez le rat semblent pointer dans cette direction. Au cours du transit épидидymaire, plus précisément au niveau de la tête proximale, il fut observé qu'un clivage endoprotéolytique a lieu sur la protéine 2B1 (PH-20 chez le rat)(Jones et al. 1996). Les auteurs proposèrent que ce clivage, tout comme la capacitation, est nécessaire à l'activation de cette protéine pour les événements subséquents de la fécondation. Il fut démontré par la suite que bien que non essentiel, le clivage de 2B1 dans l'épididyme avait un effet positif sur l'activité hyaluronidase de la protéine (Seaton et al. 2000). Tel que cité plus haut, un clivage survient aussi chez la population post-acrosomale de PH-20 du cobaye au cours de la maturation épидидymaire (Phelps et al. 1990; Primakoff et al. 1988a) tout comme une relocalisation de la protéine (Phelps and Myles 1987). De retour chez la souris, il fut démontré que la maturation épидидymaire était nécessaire pour l'activation de l'activité hyaluronidase tout comme chez le rat mais via un mécanisme différent. Deng et al. établirent qu'une N-déglycosylation de Spam1 survenait lors du transit épидидymaire et que cette déglycosylation augmentait grandement la capacité de la protéine à cliver l'acide hyaluronique (Deng et al. 1999). À la lumière de ces données, il est clair que l'épididyme contribue grandement à la maturation de PH-20 non seulement par des modifications biochimiques mais aussi en apportant une population non testiculaire de protéines aux spermatozoïdes. Toutefois, mise à part l'augmentation de la concentration en protéines à la membrane, les rôles de cet apport demeurent toutefois à éclaircir.

1.9.7 PH-20 n'est pas restreinte aux tissus reproducteurs mâles

La présence d'une forme épидидymaire de PH-20 a poussé les chercheurs à se questionner à savoir si PH-20 était restreinte au système testicule/épididyme seulement, ou si d'autres tissus ou organes composant le système reproducteur mâle pouvaient exprimer la protéine. Les études effectuées par Zang et al. ont pu démontrer la présence du messenger et de la protéine Spam1 non seulement dans les canaux efférents et déférents, mais aussi dans les organes accessoires tels la prostate et les vésicules séminales ainsi que dans leurs sécrétions (Zhang et al. 2004). Les résultats démontrent toutefois que les populations retrouvées dans le canal efférent, la prostate et les vésicules séminales ne possèdent pas d'activité hyaluronidase à pH neutre contrairement aux populations testiculaire, épидидymaire et du vas déférent. Puisque le canal efférent a pour principale fonction de réabsorber le liquide provenant du testicule, les auteurs suggèrent que PH-20 participe à cette fonction. Toutefois, cette hypothèse reste à vérifier (Zhang et al. 2004). Il en est de même pour les populations provenant de la prostate et des vésicules séminales, un rôle d'agent antimicrobien fut proposé pour PH-20 sachant que certaines protéines retrouvées dans le plasma séminal exerçaient cette fonction. Encore une fois, cette hypothèse doit être confirmée (Zhang et al. 2004).

Non seulement Spam1 fut retrouvée tout au long du système reproducteur mâle, mais Zhang et Martin-DeLeon retrouvèrent aussi le messenger et la protéine au niveau du système reproducteur femelle murin (vagin, utérus et oviducte) (Zhang and Martin-DeLeon 2003). Toutefois, le niveau d'expression du messenger et de la protéine est beaucoup plus faible, de trois à dix fois pour le messenger et d'une fois et demi à 3 fois pour la protéine comparativement à la population testiculaire. De plus, l'expression de la protéine fluctue dans l'utérus selon le cycle œstral, allant de la plus forte expression au cours de l'œstrus et du proœstrus à une expression nulle au cours du metœstrus. L'expression augmente graduellement au cours du diœstrus (Zhang and Martin-DeLeon 2003). Ces populations possèdent une activité hyaluronidase active à pH neutre seulement. Tout comme la population épидидymaire, les populations du vagin, de l'utérus et de l'oviducte sont localisées au niveau cellulaire mais aussi au niveau de l'épithélium luminal, suggérant encore ici une voie sécrétoire de Spam1 (Zhang and Martin-DeLeon 2003). Cette hypothèse fut confirmée par Griffiths et al. qui montrèrent le transfert de Spam1 provenant

du fluide utérin sur les spermatozoïdes déficients en Spaml (Griffiths et al. 2008b). De plus les auteurs démontrèrent que le transfert est réalisé via un mécanisme similaire à celui retrouvé dans l'épididyme faisant intervenir des utérosomes, les épидидymosomes femelles (Griffiths et al. 2008a).

PH-20 fut aussi identifiée dans les tissus non reproducteurs. En effet, l'expression du messenger de PH-20 fut détecté dans le sein dont les tissus étaient normaux et néoplastiques avec une plus forte expression pour les tissus dont le cancer est sous forme métastatique ou invasive (Beech et al. 2002). Un rôle dans l'invasion de la tumeur est proposé par les auteurs dans l'optique où PH-20, via son activité hyaluronidase, contribuerait à la perturbation de l'intégrité des membranes et ainsi, à la dissémination des tumeurs. Dans un même ordre d'idées, PH-20 fut détectée dans les chondrocytes, les synoviocytes et les fibroblastes dermiques humains. De plus, il fut démontré aussi que les niveaux protéiques dans ces tissus peuvent être régulés positivement par l'IL-1 (El Hajjaji et al. 2005). Les auteurs suggèrent, tout comme Beech et al. (Beech et al. 2002), que la surexpression de PH-20 dans ces tissus pourrait jouer un rôle dans la progression de maladies invasives.

Tout d'abord retrouvée exclusivement dans le testicule, PH-20 semble, avec le temps, perdre sa spécificité spermatique et plusieurs rôles lui sont maintenant attribués. Toutefois, il est important de garder en tête que le site majeur d'expression de la protéine demeure le testicule puisque c'est seulement dans cet organe qu'il fut possible d'identifier le messenger codant pour PH-20 par analyse Northern Blot. Dans tous les autres tissus, le messenger fut identifié par des techniques beaucoup plus sensibles telles que l'hybridation *in situ* ainsi que le RT-PCR. Il n'en demeure pas moins que, tel que proposé par Hong Zhang, il serait maintenant préférable de surnommer PH-20, la hyaluronidase des tissus reproducteurs plutôt que la hyaluronidase spermatique puisque plusieurs rôles ont pu lui être attribués chez la femelle (Zhang et al. 2004).

1.9.8 PH-20, domaine fonctionnel, signalisation, capacitation et réaction de l'acrosome... une implication?

Bien que le domaine de liaison à la zone pellucide demeure encore peu étudié, le domaine hyaluronidase de PH-20 fut bien caractérisé au cours des dernières années. En

effet, les premières études d'Arming et al. permirent de mettre en évidence quelques acides aminés importants pour l'activité enzymatique du domaine hyaluronidase de PH-20 (Arming et al. 1997). Par la suite, Yudin et al. générèrent des anticorps contre deux domaines potentiellement importants pour l'activité hyaluronidase de PH-20 chez le macaque (Yudin et al. 2001). Leurs résultats montrent que l'anticorps généré contre les acides aminés 142-172 inhibe l'activité hyaluronidase de la protéine à pH neutre alors que l'anticorps généré contre les acides aminés 277-297 de la protéine inhibe l'activité de PH-20 à pH acide (Yudin et al. 2001), reflétant la forme soluble de PH-20 identifiée chez le macaque (Cherr et al. 1996). Le mécanisme d'hydrolyse de PH-20 fut par la suite mis en lumière chez l'humain par Jedrzejewski et al. qui identifièrent la structure conformationnelle de PH-20 en se basant sur la structure de l'hyaluronidase retrouvée dans le venin d'abeilles (Jedrzejewski and Stern 2005). La structure de la PH-20 humaine peut être retrouvée à la figure 1.8. Brièvement, le domaine catalytique de l'hyaluronidase est composé de feuillets- β et d'hélices- α dont l'arrangement ressemble fortement à celui des barils TIM (TIM barrel). L'extrémité plus large du baril est principalement formée de boucles créant une clé qui est responsable de la liaison et du clivage des molécules d'acide hyaluronique. La région de liaison est la même que la région catalytique et est assez grande pour contenir des segments octasaccharides d'acide hyaluronique qui, après plusieurs séquences de clivage, sont libérés sous forme de tétrasaccharides. Au niveau du site catalytique, les auteurs rapportent qu'un seul résidu, très conservé parmi les hyaluronidases, est requis pour l'activité catalytique (Glu 131) alors que plusieurs résidus sont requis pour le positionnement de la molécule d'acide hyaluronique aussi très conservée dans les séquences des hyaluronidases (toujours chez l'humain).

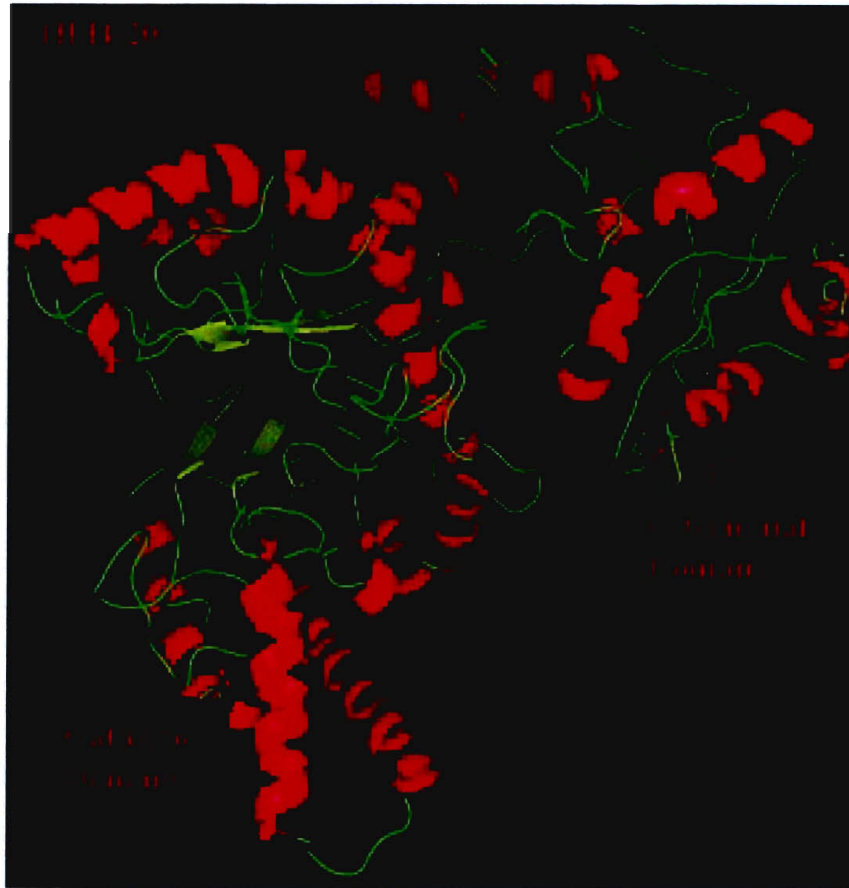


Figure 1.8: Structure de la protéine PH-20 humaine. Tiré de Jedrzejas et al.(Jedrzejas and Stern 2005)

Non seulement PH-20 possède une action catalytique, mais certaines évidences suggèrent aussi la présence d'une activité signalétique, du moins chez l'humain et le macaque. Il fut rapporté préalablement que l'induction de la réaction de l'acrosome était positivement influencée lors de l'incubation des spermatozoïdes en présence d'acide hyaluronique chez le macaque (Vandervoort et al. 1997). À partir de cette observation, Sabeur et al. ont démontré que cette augmentation du taux de réaction de l'acrosome est médiée via PH-20 chez l'humain (Sabeur et al. 1998). En effet, lorsque les spermatozoïdes humains sont incubés en présence d'acide hyaluronique, les auteurs observent un taux de réaction de l'acrosome induit par la progestérone ou par la présence de zones pellucides solubilisées plus élevé que lors de leur incubation sans acide hyaluronique. Ils observèrent aussi que l'incubation des spermatozoïdes en présence d'un anticorps dirigé contre PH-20 inhibe cette amélioration du taux de réaction acrosomique induite montrant ainsi

l'implication de PH-20 dans cet événement. Il est important de noter ici que PH-20 n'induit pas la réaction de l'acrosome mais semble toutefois la favoriser, du moins chez l'humain et possiblement chez le macaque (Sabeur et al. 1998; Vandervoort et al. 1997).

Associée à cette amélioration du taux de réaction acrosomique, une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire fut observée au niveau des spermatozoïdes (Sabeur et al. 1998). Des études approfondies effectuées par Cherr et al. permirent de montrer que cette augmentation de calcium était induite via PH-20 chez le macaque. L'incubation des spermatozoïdes en présence de l'anticorps dirigé contre PH-20 a pour conséquence d'inhiber l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire observés lors de l'incubation des spermatozoïdes en présence d'acide hyaluronique (Cherr et al. 1999). L'étude de la séquence de PH-20 chez le macaque révèle qu'une portion de la séquence du domaine hyaluronidase comporte un domaine homologue (BxxBxxB) aux protéines reconnues pour lier sans cliver l'acide hyaluronique où B reflète des acides aminés basiques et x des acides aminés neutres (Vines et al. 2001). Suite à cette observation, deux anticorps furent générés. Le premier fut dirigé contre cette portion de séquence du domaine hyaluronidase alors que le deuxième fut dirigé contre une portion de séquence de PH-20 située en aval du domaine potentiel de liaison de l'acide hyaluronique. Les résultats observés montrent que seul l'anticorps généré contre le domaine (BxxBxxB) de PH-20 inhibait l'augmentation de calcium intracellulaire induite via l'acide hyaluronique (Vines et al. 2001). De plus, ce domaine est indépendant du domaine catalytique de PH-20. La compilation de tous ces résultats permis de suggérer la localisation des différents domaines retrouvés chez PH-20. La figure 1.9, tirée de l'article de revue de Patricia Martin-DeLeon, résume bien la localisation de ces domaines (Martin-DeLeon 2006). On retrouverait donc en position N-terminale de PH-20, le domaine hyaluronidase actif à pH neutre, suivi du site de liaison de l'acide hyaluronique impliqué dans les voies de signalisations, suivi du domaine hyaluronidase actif à pH acide et enfin, en extrémité C-terminale, le domaine de liaison de la protéine à la zone pellucide.



Figure 1.9: Localisation des différents domaines de PH-20. Tiré de Martin-DeLeon et al. (Martin-DeLeon 2006) NH: activité hyaluronidase pH neutre, HA: domaine de liaison de l'acide hyaluronique, AH: activité hyaluronidase pH acide, ZP: domaine de liaison à la zone pellucide.

1.10 Problématique et Hypothèse

1.10.1 Problématique

Nul besoin de mentionner l'importance de PH-20 au cours de la fécondation si ce n'est que de rappeler l'identification de cette protéine chez de multiples espèces, quoique les études sont parfois sommaires chez certaines d'entre elles. Chez le taureau par exemple, les seules études qui furent réalisées n'ont montré que l'association entre l'hyaluronidase bovine testiculaire commerciale et PH-20 (Meyer et al. 1997) et n'ont permis de caractériser que le domaine hyaluronidase et ce, à des fins commerciales (Chowpongpang et al. 2004). La forme protéique de PH-20 ne fut ni identifiée, ni caractérisée. Ce n'est que récemment qu'une protéine de 80 kDa fut identifiée (nommée p80) et partiellement caractérisée par une étudiante travaillant au sein du laboratoire du docteur Pierre Leclerc (Lalancette et al. 2001). p80 fut caractérisée et les résultats démontrent que la protéine possède une activité hyaluronidase fonctionnelle optimale à pH 7.0. Par immunolocalisation, p80 est retrouvée dans les régions post-acrosomale et antérieure de la tête des spermatozoïdes et finalement, l'analyse des peptides obtenus par digestion tryptique et séquençage démontre que p80 possède une homologie avec PH-20. Néanmoins, p80 possède aussi quelques caractéristiques qui lui sont propres. La première est l'absence d'une ancre GPI reliant la protéine à la membrane. En effet, les digestions à la phospholipase C et à la trypsine ne peuvent libérer la protéine des spermatozoïdes. La deuxième différence est sa masse moléculaire plus élevée que ses homologues. En effet, PH-20 est une protéine de 66 kDa chez le cobaye (Phelps and Myles 1987) et varie toutefois selon les espèces de 64 à 68 kDa (Martin-DeLeon 2006). Un poids moléculaire plus élevé laisse supposer une séquence en acides aminés potentiellement plus longue et/ou

la présence de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, etc.) différentes de celles retrouvées chez les autres espèces. Finalement, cette protéine fut identifiée dans la fraction cytosolique d'échantillons protéiques spermatiques au cours d'essais d'activité tyrosine kinase (Lalancette et al. 2006), ce qui laisse supposer que p80 pourrait être phosphorylée sur ses résidus tyrosines. Aucune étude de phosphorylation de PH-20 n'a encore été rapportée dans la littérature. Devant les similarités et les différences présentées, une caractérisation plus approfondie de p80 nous permettrait de confirmer son homologie avec la PH-20. Nul besoin de rappeler l'importance de PH-20 dans les interactions entre les gamètes au cours de la fécondation. Sachant que cette protéine n'est pas identifiée chez le bovin, il est important de confirmer l'homologie de p80 à PH-20 afin de pouvoir par la suite évaluer l'implication de la protéine dans un des événements les plus cruciaux à la survie des espèces: la reproduction.

1.10.2 Hypothèse et plan de recherche

Les premiers résultats obtenus par Lalancette et al. (Lalancette et al. 2001) suggèrent une homologie entre la protéine p80 et PH-20, lui suggérant ainsi un rôle au cours de la fécondation. Ainsi, l'hypothèse de travail de cette thèse propose que: **La protéine spermatique p80 est la protéine bovine homologue à la protéine PH-20 et est par conséquent impliquée dans l'interaction entre les gamètes au cours de la fécondation.** Afin de confirmer cette hypothèse, trois études sont présentées dans cette thèse. La première, présentée au chapitre 2, avait pour but d'effectuer une caractérisation plus approfondie de la protéine p80 afin de confirmer son homologie à PH-20 et ce, en acquérant de l'information sur sa séquence nucléotidique et peptidique. L'étude du site d'expression de son ARN messager et de la protéine, l'influence de la maturation épидидymaire sur p80 ainsi que le mode d'attachement de la protéine à la membrane furent aussi investigués.

La deuxième étude présentée porte sur l'orientation de p80 dans les membranes. Suite aux résultats obtenus de la première étude qui démontrèrent que p80 possédait un domaine transmembranaire séparant le domaine hyaluronidase de l'extrémité C-terminale, il était nécessaire de déterminer de quelle façon p80 est orientée dans les membranes du spermatozoïde bovin afin de pouvoir effectuer ses fonctions. Cette étude fut réalisée principalement par approches immunologique et protéomique. Les résultats obtenus offrent

une belle élucidation sur l'intégration de p80 à la membrane versus son attachement via une ancre GPI chez les autres espèces.

Finalement, la troisième étude porte sur la fonctionnalité de la protéine. Je me suis penché sur l'implication de p80 dans la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide au cours de l'attachement secondaire lors de la fécondation. Cette étude visait aussi à déterminer si, tout comme chez le macaque et l'humain, l'incubation de spermatozoïdes capités en présence d'acide hyaluronique pouvait contribuer à provoquer un influx de calcium intracellulaire et si cet influx pouvait survenir via l'action de p80. Finalement, puisque cette protéine fut identifiée par purification des protéines ayant un potentiel de phosphorylation sur leurs résidus tyrosines (Lalancette et al. 2001), j'ai déterminé si p80 pouvait être phosphorylée sur ses résidus tyrosines au cours de la capacitation et de la réaction de l'acrosome. Les résultats de ces études fourniront de l'information fondamentale qui aidera à la compréhension des partenaires impliqués lors de l'interaction entre les gamètes.

1.11 Bibliographie

- Arming S, Strobl B, Wechselberger C, Kreil G. 1997. In vitro mutagenesis of PH-20 hyaluronidase from human sperm. *Eur J Biochem* 247(3):810-814.
- Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12):6757-6762.
- Arnoult C, Zeng Y, Florman HM. 1996. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J Cell Biol* 134(3):637-645.
- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 4(4):581-596.
- Baba D, Kashiwabara S, Honda A, Yamagata K, Wu Q, Ikawa M, Okabe M, Baba T. 2002. Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J Biol Chem* 277(33):30310-30314.
- Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y. 1994. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem* 269(50):31845-31849.
- Babcock DF, Pfeiffer DR. 1987. Independent elevation of cytosolic $[Ca^{2+}]$ and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. *J Biol Chem* 262(31):15041-15047.
- Baker MA, Hetherington L, Aitken RJ. 2006. Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *J Cell Sci* 119(Pt 15):3182-3192.
- Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball BA. 2003. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology* 60(7):1239-1247.
- Bedford JM. 2004. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79(2):429-460.
- Bedford JM, Kim HH. 1993. Cumulus oophorus as a sperm sequestering device, in vivo. *J Exp Zool* 265(3):321-328.
- Beech DJ, Madan AK, Deng N. 2002. Expression of PH-20 in normal and neoplastic breast tissue. *J Surg Res* 103(2):203-207.
- Berndson WE, Desjardins C. 1974. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am J Anat* 140(2):167-179.
- Berridge MJ. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361(6410):315-325.
- Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF. 1999. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439(3):317-330.
- Bi M, Hickox JR, Winfrey VP, Olson GE, Hardy DM. 2003. Processing, localization and binding activity of zonadhesin suggest a function in sperm adhesion to the zona pellucida during exocytosis of the acrosome. *Biochem J* 375(Pt 2):477-488.
- Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C. 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod* 44(3):398-403.

- Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM. 1988. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol* 128(2):376-385.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1980a. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20(3):873-882.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1980b. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 76(1):185-202.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1986. Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J Cell Biol* 102(4):1363-1371.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1990. Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(14):5563-5567.
- Boilard M, Reyes-Moreno C, Lachance C, Massicotte L, Bailey JL, Sirard MA, Leclerc P. 2004. Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa. *Biol Reprod* 71(6):1879-1889.
- Bookbinder LH, Cheng A, Bleil JD. 1995. Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science* 269(5220):86-89.
- Bradley MP, Garbers DL. 1983. The stimulation of bovine caudal epididymal sperm forward motility by bovine cumulus-egg complexes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 115(3):777-787.
- Breitbart H. 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49(3):321-327.
- Breitbart H, Lax J, Rotem R, Naor Z. 1992. Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J* 281 (Pt 2):473-476.
- Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H. 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 68(3):837-845.
- Brose N, Betz A, Wegmeyer H. 2004. Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Curr Opin Neurobiol* 14(3):328-340.
- Burks DJ, Carballada R, Moore HD, Saling PM. 1995. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* 269(5220):83-86.
- Campbell S, Swann HR, Aplin JD, Seif MW, Kimber SJ, Elstein M. 1995. CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. *Hum Reprod* 10(2):425-430.
- Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF. 2003. CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25):14864-14868.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168(4277):697-698.
- Chen H, Griffiths G, Galileo DS, Martin-DeLeon PA. 2006. Epididymal SPAM1 is a marker for sperm maturation in the mouse. *Biol Reprod* 74(5):923-930.

- Cherr GN, Lambert H, Meizel S, Katz DF. 1986. In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev Biol* 114(1):119-131.
- Cherr GN, Meyers SA, Yudin AI, VandeVoort CA, Myles DG, Primakoff P, Overstreet JW. 1996. The PH-20 protein in cynomolgus macaque spermatozoa: identification of two different forms exhibiting hyaluronidase activity. *Dev Biol* 175(1):142-153.
- Cherr GN, Yudin AI, Li MW, Vines CA, Overstreet JW. 1999. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. *Zygote* 7(3):211-222.
- Chiu PC, Wong BS, Chung MK, Lam KK, Pang RT, Lee KF, Sumitro SB, Gupta SK, Yeung WS. 2008. Effects of Native Human Zona Pellucida Glycoproteins 3 and 4 on Acrosome Reaction and Zona Pellucida Binding of Human Spermatozoa. *Biol Reprod*.
- Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG. 1998. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 281(5384):1857-1859.
- Chowpongpan S, Shin HS, Kim EK. 2004. Cloning and characterization of the bovine testicular PH-20 hyaluronidase core domain. *Biotechnol Lett* 26(15):1247-1252.
- Conner SJ, Lefievre L, Hughes DC, Barratt CL. 2005. Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. *Hum Reprod* 20(5):1148-1152.
- Cowan AE, Myles DG, Koppel DE. 1987. Lateral diffusion of the PH-20 protein on guinea pig sperm: evidence that barriers to diffusion maintain plasma membrane domains in mammalian sperm. *J Cell Biol* 104(4):917-923.
- Cowan AE, Primakoff P, Myles DG. 1986. Sperm exocytosis increases the amount of PH-20 antigen on the surface of guinea pig sperm. *J Cell Biol* 103(4):1289-1297.
- Cross NL. 1996a. Effect of cholesterol and other sterols on human sperm acrosomal responsiveness. *Mol Reprod Dev* 45(2):212-217.
- Cross NL. 1996b. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol Reprod* 54(1):138-145.
- Csoka AB, Frost GI, Stern R. 2001. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* 20(8):499-508.
- Cummins JM, Yanagimachi R. 1986. Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated in vitro, in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gamete research vol. 15(no3):187-212*.
- Dadoune JP. 2007. New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobiol* 45(3):141-147.
- Day AE, Quilter CR, Sargent CA, Mileham AJ. 2002. Characterization of the porcine sperm adhesion molecule gene SPAM1- expression analysis, genomic structure, and chromosomal mapping. *Anim Genet* 33(3):211-214.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Hum Reprod* 13 Suppl 1:1-8.
- de Rooij DG. 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121(3):347-354.
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE. 2003. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 278(9):7001-7009.

- DeMott RP, Lefebvre R, Suarez SS. 1995. Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod* 52(6):1395-1403.
- Demott RP, Suarez SS. 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 46(5):779-785.
- Deng X, Czymmek K, Martin-DeLeon PA. 1999. Biochemical maturation of Spam1 (PH-20) during epididymal transit of mouse sperm involves modifications of N-linked oligosaccharides. *Mol Reprod Dev* 52(2):196-206.
- Deng X, He Y, Martin-DeLeon PA. 2000. Mouse Spam1 (PH-20): evidence for its expression in the epididymis and for a new category of spermatogenic-expressed genes. *J Androl* 21(6):822-832.
- Deng X, Meyers SA, Tollner TL, Yudin AI, Primakoff PD, He DN, Overstreet JW. 2002. Immunological response of female macaques to the PH-20 sperm protein following injection of recombinant proteins or synthesized peptides. *J Reprod Immunol* 54(1-2):93-115.
- Desnoyers L, Manjunath P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 267(14):10149-10155.
- Dobrinski I, Smith TT, Suarez SS, Ball BA. 1997. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 56(4):861-869.
- Dobrinski I, Suarez SS, Ball BA. 1996. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biol Reprod* 54(4):783-788.
- Dorval V, Dufour M, Leclerc P. 2002. Regulation of the phosphotyrosine content of human sperm proteins by intracellular Ca^{2+} : role of Ca^{2+} -adenosine triphosphatases. *Biol Reprod* 67(5):1538-1545.
- Dorval V, Dufour M, Leclerc P. 2003. Role of protein tyrosine phosphorylation in the thapsigargin-induced intracellular Ca^{2+} store depletion during human sperm acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 9(3):125-131.
- Eberspacher U, Gerwien J, Habenicht UF, Schleuning WD, Donner P. 1991. Activation and subsequent degradation of proacrosin is mediated by zona pellucida glycoproteins, negatively charged polysaccharides, and DNA. *Mol Reprod Dev* 30(2):164-170.
- Ecroyd HW, Jones RC, Aitken RJ. 2003. Endogenous redox activity in mouse spermatozoa and its role in regulating the tyrosine phosphorylation events associated with sperm capacitation. *Biol Reprod* 69(1):347-354.
- Eddy EM. 1998. Regulation of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9(4):451-457.
- El Hajjaji H, Cole AA, Manicourt DH. 2005. Chondrocytes, synoviocytes and dermal fibroblasts all express PH-20, a hyaluronidase active at neutral pH. *Arthritis Res Ther* 7(4):R756-768.
- Elliott M, Higgins JA. 1983. Capacitation and the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa increase the availability of surface aminophospholipids for labelling by trinitrobenzene sulphonate. *Cell Biol Int Rep* 7(12):1091-1096.
- Ensslin M, Vogel T, Calvete JJ, Thole HH, Schmidtke J, Matsuda T, Topfer-Petersen E. 1998. Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biol Reprod* 58(4):1057-1064.

- Evans EA, Zhang H, Martin-DeLeon PA. 2003. SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: utilizing laser microdissection/RT-PCR. *Reprod Biol Endocrinol* 1(1):54.
- Familiari G, Verlengia C, Nottola SA, Renda T, Micara G, Aragona C, Zardi L, Motta PM. 1996. Heterogeneous distribution of fibronectin, tenascin-C, and laminin immunoreactive material in the cumulus-corona cells surrounding mature human oocytes from IVF-ET protocols--evidence that they are composed of different subpopulations: an immunohistochemical study using scanning confocal laser and fluorescence microscopy. *Mol Reprod Dev* 43(3):392-402.
- Fleming JS, Yu F, McDonald RM, Meyers SA, Montgomery GW, Smith JF, Nicholson HD. 2004. Effects of scrotal heating on sperm surface protein PH-20 expression in sheep. *Mol Reprod Dev* 68(1):103-114.
- Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM. 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* 114(Pt 19):3543-3555.
- Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469(3):197-235.
- Florman Harvey DT. 2006. Fertilization in Mammals. In: Neill JD, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition*: Academic Press; 3 edition (October 1, 2005). pp 55-112.
- Florman HM, Bechtol KB, Wassarman PM. 1984. Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev Biol* 106(1):243-255.
- Florman HM, Corron ME, Kim TD, Babcock DF. 1992. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 152(2):304-314.
- Florman HM, Tombes RM, First NL, Babcock DF. 1989. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 135(1):133-146.
- Florman HM, Wassarman PM. 1985. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41(1):313-324.
- Foster JA, Friday BB, Maulit MT, Blobel C, Winfrey VP, Olson GE, Kim KS, Gerton GL. 1997. AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. *J Biol Chem* 272(19):12714-12722.
- Fox CA, Meldrum SJ, Watson BW. 1973. Continuous measurement by radio-telemetry of vaginal pH during human coitus. *J Reprod Fertil* 33(1):69-75.
- Fraser LR. 1985. Albumin is required to support the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil* 74(1):185-196.
- Gadella BM, Harrison RA. 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 67(1):340-350.
- Giojalas LC, Rovasio RA, Fabro G, Gakamsky A, Eisenbach M. 2004. Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract. *Fertil Steril* 82(1):247-249.

- Gmachl M, Kreil G. 1993. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8):3569-3573.
- Gmachl M, Sagan S, Ketter S, Kreil G. 1993. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett* 336(3):545-548.
- Greube A, Muller K, Topfer-Petersen E, Herrmann A, Muller P. 2001. Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes. *Biochemistry* 40(28):8326-8334.
- Griffiths GS, Galileo DS, Reese K, Martin-DeLeon PA. 2008a. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Mol Reprod Dev*.
- Griffiths GS, Miller KA, Galileo DS, Martin-DeLeon PA. 2008b. Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency. *Reproduction* 135(3):293-301.
- Grootegeod JA, Siep M, Baarends WM. 2000. Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14(3):331-343.
- Gwatkin RB, Williams DT. 1977. Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction. *J Reprod Fertil* 49(1):55-59.
- Hafez ESE. 1980. *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Hardy CM, Clydesdale G, Mobbs KJ, Pekin J, Lloyd ML, Sweet C, Shellam GR, Lawson MA. 2004. Assessment of contraceptive vaccines based on recombinant mouse sperm protein PH20. *Reproduction* 127(3):325-334.
- Hardy DM, Garbers DL. 1995. A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *J Biol Chem* 270(44):26025-26028.
- Harrison RA. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8(4):581-594.
- Harrison RA, Gadella BM. 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63(2):342-351.
- Hawk HW. 1987. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. *J Dairy Sci* 70(7):1487-1503.
- Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA. 2005. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol* 202(3):663-671.
- Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, Moss SB. 2005. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 9(2):249-259.
- Holland MK, Andrews J, Clarke H, Walton C, Hinds LA. 1997. Selection of antigens for use in a virus-vectored immunocontraceptive vaccine: PH-20 as a case study. *Reprod Fertil Dev* 9(1):117-124.
- Honda A, Siruntawinetti J, Baba T. 2002. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum Reprod Update* 8(5):405-412.
- Hou ST, Ma A, Jones R, Hall L. 1996. Molecular cloning and characterization of rat sperm surface antigen 2B1, a glycoprotein implicated in sperm-zona binding. *Mol Reprod Dev* 45(2):193-203.

- Howes L, Jones R. 2002. Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J Reprod Immunol* 53(1-2):181-192.
- Huckins C. 1971. The spermatogonial stem cell population in adult rats. 3. Evidence for a long-cycling population. *Cell Tissue Kinet* 4(4):335-349.
- Hughes DC, Barratt CL. 1999. Identification of the true human orthologue of the mouse *Zp1* gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida? *Biochim Biophys Acta* 1447(2-3):303-306.
- Hunnicutt GR, Mahan K, Lathrop WF, Ramarao CS, Myles DG, Primakoff P. 1996a. Structural relationship of sperm soluble hyaluronidase to the sperm membrane protein PH-20. *Biol Reprod* 54(6):1343-1349.
- Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG. 1996b. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol Reprod* 55(1):80-86.
- Ignotz GG, Lo MC, Perez CL, Gwathmey TM, Suarez SS. 2001. 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* 64(6):1806-1811.
- Ikawa M, Wada I, Kominami K, Watanabe D, Toshimori K, Nishimune Y, Okabe M. 1997. The putative chaperone calmeglin is required for sperm fertility. *Nature* 387(6633):607-611.
- Jagannathan S, Punt EL, Gu Y, Arnoult C, Sakkas D, Barratt CL, Publicover SJ. 2002. Identification and localization of T-type voltage-operated calcium channel subunits in human male germ cells. Expression of multiple isoforms. *J Biol Chem* 277(10):8449-8456.
- Jedrzejak MJ, Stern R. 2005. Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis. *Proteins* 61(2):227-238.
- Jones R. 1990. Identification and functions of mammalian sperm-egg recognition molecules during fertilization. *J Reprod Fertil Suppl* 42:89-105.
- Jones R, Ma A, Hou ST, Shalgi R, Hall L. 1996. Testicular biosynthesis and epididymal endoproteolytic processing of rat sperm surface antigen 2B1. *J Cell Sci* 109 (Pt 10):2561-2570.
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. 2001. Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 3(5):499-502.
- Kanai S, Kitayama T, Yonezawa N, Sawano Y, Tanokura M, Nakano M. 2008. Disulfide linkage patterns of pig zona pellucida glycoproteins ZP3 and ZP4. *Mol Reprod Dev* 75(5):847-856.
- Kerr J.B. LKL, O'Bryan M.K., and de Kretser D.M. 2006. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: Neill JD, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition: Academic Press; 3 edition (October 1, 2005)*. pp 827-947.
- Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. 2005. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(50):18028-18033.
- Kinloch RA, Ruiz-Seiler B, Wassarman PM. 1990. Genomic organization and polypeptide primary structure of zona pellucida glycoprotein hZP3, the hamster sperm receptor. *Dev Biol* 142(2):414-421.
- Kreil G. 1995. Hyaluronidases--a group of neglected enzymes. *Protein Sci* 4(9):1666-1669.

- L OD, Andersen CY, Jessen TE. 2002. Characterization of the coupling activity for the binding of inter-alpha-trypsin inhibitor to hyaluronan in human and bovine follicular fluid. *Reproduction* 124(2):249-257.
- Lalancette C, Dorval V, Leblanc V, Leclerc P. 2001. Characterization of an 80-kilodalton bull sperm protein identified as PH-20. *Biol Reprod* 65(2):628-636.
- Lalancette C, Faure RL, Leclerc P. 2006. Identification of the proteins present in the bull sperm cytosolic fraction enriched in tyrosine kinase activity: a proteomic approach. *Proteomics* 6(16):4523-4540.
- Lapointe S, Sullivan R, Sirard MA. 1998. Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 58(3):747-753.
- Lathrop WF, Carmichael EP, Myles DG, Primakoff P. 1990. cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J Cell Biol* 111(6 Pt 2):2939-2949.
- Lawson C, Goupil S, Leclerc P. 2008. Increased Activity of the Human Sperm Tyrosine Kinase SRC by the cAMP-Dependent Pathway in the Presence of Calcium. *Biol Reprod*.
- Lax Y, Rubinstein S, Breitbart H. 1997. Subcellular distribution of protein kinase C alpha and beta1 in bovine spermatozoa, and their regulation by calcium and phorbol esters. *Biol Reprod* 56(2):454-459.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. 1997. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med* 22(4):643-656.
- Lee MA, Kopf GS, Storey BT. 1987. Effects of phorbol esters and a diacylglycerol on the mouse sperm acrosome reaction induced by the zona pellucida. *Biol Reprod* 36(3):617-627.
- Lefebvre R, Suarez SS. 1996. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol Reprod* 54(3):575-582.
- Lewis B, Aitken RJ. 2001. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. *J Androl* 22(4):611-622.
- Leyton L, Saling P. 1989. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57(7):1123-1130.
- Li MW, Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. 1997. Biochemical characterization of the PH-20 protein on the plasma membrane and inner acrosomal membrane of cynomolgus macaque spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 48(3):356-366.
- Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. 1994. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* 125(5):1157-1163.
- Liu DY, Baker HW. 1997. Protein kinase C plays an important role in the human zona pellucida-induced acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 3(12):1037-1043.
- Lorton SP, First NL. 1979. Hyaluronidase does not disperse the cumulus oophorus surrounding bovine ova. *Biol Reprod* 21(2):301-308.
- Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Gervasi G, Forti G, Baldi E. 1995. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by platelet-activating factor and progesterone in human spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 108(1-2):35-42.

- Mahony MC, Gwathmey T. 1999. Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biol Reprod* 60(5):1239-1243.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. 1994a. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 50(1):27-37.
- Manjunath P, Soubeyrand S, Chandonnet L, Roberts KD. 1994b. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochem J* 303 (Pt 1):121-128.
- Martin-DeLeon PA. 2006. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Mol Cell Endocrinol* 250(1-2):114-121.
- Mayorga LS, Tomes CN, Belmonte SA. 2007. Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* 59(4-5):286-292.
- Meldolesi J. 1998. Calcium signalling. Oscillation, activation, expression. *Nature* 392(6679):863, 865-866.
- Meyer MF, Kreil G, Aschauer H. 1997. The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme. *FEBS Lett* 413(2):385-388.
- Meyers SA. 2001. Equine sperm-oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. *Anim Reprod Sci* 68(3-4):291-303.
- Meyers SA, Rosenberger AE. 1999. A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biol Reprod* 61(2):444-451.
- Meyers SA, Yudin AI, Cherr GN, VandeVoort CA, Myles DG, Primakoff P, Overstreet JW. 1997. Hyaluronidase activity of macaque sperm assessed by an in vitro cumulus penetration assay. *Mol Reprod Dev* 46(3):392-400.
- Miller DJ, Macek MB, Shur BD. 1992. Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 357(6379):589-593.
- Moller CC, Bleil JD, Kinloch RA, Wassarman PM. 1990. Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev Biol* 137(2):276-286.
- Montell C. 2005. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005(272):re3.
- Montfort L, Frenette G, Sullivan R. 2002. Sperm-zona pellucida interaction involves a carbonyl reductase activity in the hamster. *Mol Reprod Dev* 61(1):113-119.
- Morales CR, Badran H, El-Alfy M, Men H, Zhang H, Martin-DeLeon PA. 2004. Cytoplasmic localization during testicular biogenesis of the murine mRNA for Spaml (PH-20), a protein involved in acrosomal exocytosis. *Mol Reprod Dev* 69(4):475-482.
- Morin G, Lalancette C, Sullivan R, Leclerc P. 2005. Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit. *Mol Reprod Dev* 71(4):523-534.
- Mortillo S, Wassarman PM. 1991. Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development* 113(1):141-149.
- Muller P, Greube A, Topfer-Petersen E, Herrmann A. 2002. Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on cholesterol in the presence of phospholipids. *Eur Biophys J* 31(6):438-447.

- Murase T, Roldan ER. 1996. Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the sequence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrosomal exocytosis. *Biochem J* 320 (Pt 3):1017-1023.
- Myles DG, Primakoff P. 1984. Localized surface antigens of guinea pig sperm migrate to new regions prior to fertilization. *J Cell Biol* 99(5):1634-1641.
- Myles DG, Primakoff P. 1997. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* 56(2):320-327.
- Myles DG, Primakoff P, Bellve AR. 1981. Surface domains of the guinea pig sperm defined with monoclonal antibodies. *Cell* 23(2):433-439.
- Nagai T, Niwa K, Iritani A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J Reprod Fertil* 70(1):271-275.
- Nakanishi T, Isotani A, Yamaguchi R, Ikawa M, Baba T, Suarez SS, Okabe M. 2004. Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. *Biol Reprod* 71(3):959-965.
- Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. 1999. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril* 71(5):919-923.
- O'Brien EMEaDA. 1994. The Spermatozoon. In: Ernst Knobil JDN, Gilbert S. Greenwald, Clement L. Markert, and Donald W. Pfaff., editor. *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. New York: Raven Press Ltd.
- Olson GE, Winfrey VP, Bi M, Hardy DM, NagDas SK. 2004. Zonadhesin assembly into the hamster sperm acrosomal matrix occurs by distinct targeting strategies during spermiogenesis and maturation in the epididymis. *Biol Reprod* 71(4):1128-1134.
- O'Rand MG, Matthews JE, Welch JE, Fisher SJ. 1985. Identification of zona binding proteins of rabbit, pig, human, and mouse spermatozoa on nitrocellulose blots. *J Exp Zool* 235(3):423-428.
- O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. 2000. Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 11(5):1571-1584.
- O'Toole CM, Roldan ER, Fraser LR. 1996a. Protein kinase C activation during progesterone-stimulated acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2(12):921-927.
- O'Toole CM, Roldan ER, Fraser LR. 1996b. Role for Ca²⁺ channels in the signal transduction pathway leading to acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 45(2):204-211.
- Overstreet JW, Coats C, Katz DF, Hanson FW. 1980. The importance of seminal plasma for sperm penetration of human cervical mucus. *Fertil Steril* 34(6):569-572.
- Overstreet JW, Lin Y, Yudin AI, Meyers SA, Primakoff P, Myles DG, Katz DF, Vandervoort CA. 1995. Location of the PH-20 protein on acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa of cynomolgus macaques. *Biol Reprod* 52(1):105-114.
- Parekh AB, Putney JW, Jr. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85(2):757-810.

- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38(5):1171-1180.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Graham JK. 1999. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology* 51(2):461-472.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 40(5):1020-1025.
- Patterson RL, Boehning D, Snyder SH. 2004. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem* 73:437-465.
- Phelps BM, Koppel DE, Primakoff P, Myles DG. 1990. Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *J Cell Biol* 111(5 Pt 1):1839-1847.
- Phelps BM, Myles DG. 1987. The guinea pig sperm plasma membrane protein, PH-20, reaches the surface via two transport pathways and becomes localized to a domain after an initial uniform distribution. *Dev Biol* 123(1):63-72.
- Phelps BM, Primakoff P, Koppel DE, Low MG, Myles DG. 1988. Restricted lateral diffusion of PH-20, a PI-anchored sperm membrane protein. *Science* 240(4860):1780-1782.
- Phillips DM, Jones R, Shalgi R. 1991. Alterations in distribution of surface and intracellular antigens during epididymal maturation of rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 29(4):347-356.
- Pomeroy M, Jones RC, Holland MK, Blake AE, Beagley KW. 2002. Restricted entry of IgG into male and female rabbit reproductive ducts following immunization with recombinant rabbit PH-20. *Am J Reprod Immunol* 47(3):174-182.
- Pomeroy KO, Dodds JF, Seidel GE, Jr. 1988. Caffeine promotes in vitro fertilization of mouse ova within 15 minutes. *J Exp Zool* 248(2):207-212.
- Primakoff P, Cowan A, Hyatt H, Tredick-Kline J, Myles DG. 1988a. Purification of the guinea pig sperm PH-20 antigen and detection of a site-specific endoproteolytic activity in sperm preparations that cleaves PH-20 into two disulfide-linked fragments. *Biol Reprod* 38(4):921-934.
- Primakoff P, Hyatt H, Myles DG. 1985. A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* 101(6):2239-2244.
- Primakoff P, Lathrop W, Woolman L, Cowan A, Myles D. 1988b. Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. *Nature* 335(6190):543-546.
- Primakoff P, Myles DG. 1983. A map of the guinea pig sperm surface constructed with monoclonal antibodies. *Dev Biol* 98(2):417-428.
- Pryer NK, Wuestehube LJ, Schekman R. 1992. Vesicle-mediated protein sorting. *Annu Rev Biochem* 61:471-516.
- Ramalho-Santos J, Moreno RD, Sutovsky P, Chan AW, Hewitson L, Wessel GM, Simerly CR, Schatten G. 2000. SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization. *Dev Biol* 223(1):54-69.
- Ranganathan S, Bharadwaj A, Datta K. 1995. Hyaluronan mediates sperm motility by enhancing phosphorylation of proteins including hyaluronan binding protein. *Cell Mol Biol Res* 41(5):467-476.

- Ringuette MJ, Chamberlin ME, Baur AW, Sobieski DA, Dean J. 1988. Molecular analysis of cDNA coding for ZP3, a sperm binding protein of the mouse zona pellucida. *Dev Biol* 127(2):287-295.
- Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. 2004. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 70(2):518-522.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, Russell DL. 2003. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction* 126(4):415-424.
- Rodriguez-Martinez H, Ekstedt E, Einarsson S. 1990a. Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int J Androl* 13(3):238-243.
- Rodriguez-Martinez H, Nicander L, Viring S, Einarsson S, Larsson K. 1990b. Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs. *Anat Histol Embryol* 19(1):16-36.
- Rothman JE. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372(6501):55-63.
- Rutllant J, Meyers SA. 2001. Posttranslational processing of PH-20 during epididymal sperm maturation in the horse. *Biol Reprod* 65(5):1324-1331.
- Saacke RG, Almquist JO. 1964. Ultrastructure of Bovine Spermatozoa. I. The Head of Normal, Ejaculated Sperm 1,2,3. *Am J Anat* 115:143-161.
- Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. 1998. Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote* 6(2):103-111.
- Sakkas D, Leppens-Luisier G, Lucas H, Chardonens D, Campana A, Franken DR, Uner F. 2003. Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding. *Biol Reprod* 68(4):1463-1469.
- Schulz JR, Sasaki JD, Vacquier VD. 1998. Increased association of synaptosome-associated protein of 25 kDa with syntaxin and vesicle-associated membrane protein following acrosomal exocytosis of sea urchin sperm. *J Biol Chem* 273(38):24355-24359.
- Schulz JR, Wessel GM, Vacquier VD. 1997. The exocytosis regulatory proteins syntaxin and VAMP are shed from sea urchin sperm during the acrosome reaction. *Dev Biol* 191(1):80-87.
- Seaton GJ, Hall L, Jones R. 2000. Rat sperm 2B1 glycoprotein (PH20) contains a C-terminal sequence motif for attachment of a glycosyl phosphatidylinositol anchor. Effects of endoproteolytic cleavage on hyaluronidase activity. *Biol Reprod* 62(6):1667-1676.
- Shalgi R, Matityahu A, Gaunt SJ, Jones R. 1990. Antigens on rat spermatozoa with a potential role in fertilization. *Mol Reprod Dev* 25(3):286-296.
- Shur BD, Rodeheffer C, Ensslin MA, Lyng R, Raymond A. 2006. Identification of novel gamete receptors that mediate sperm adhesion to the egg coat. *Mol Cell Endocrinol* 250(1-2):137-148.
- Si Y, Okuno M. 1999. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biol Reprod* 61(1):240-246.
- Siddiquey AK, Cohen J. 1982. In-vitro fertilization in the mouse and the relevance of different sperm/egg concentrations and volumes. *J Reprod Fertil* 66(1):237-242.
- Smith TT, Yanagimachi R. 1991. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil* 91(2):567-573.
- Soubeyrand S, Manjunath P. 1997. Novel seminal phospholipase A2 is inhibited by the major proteins of bovine seminal plasma. *Biochim Biophys Acta* 1341(2):183-188.

- Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 53(6):1280-1285.
- Stewart-Savage J. 1993. Effect of bovine serum albumin concentration and source on sperm capacitation in the golden hamster. *Biol Reprod* 49(1):74-81.
- Suarez SS. 1996. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* 17(4):331-335.
- Suarez SS. 2006. Gamete and Zygote Transport. In: Neill JD, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition*: Academic Press; 3 edition (October 1, 2005). pp 113-145.
- Suarez SS, Dai XB, DeMott RP, Redfern K, Mirando MA. 1992. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *J Androl* 13(1):75-80.
- Suarez SS, Revah I, Lo M, Kolle S. 1998. Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca²⁺-dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-a trisaccharide. *Biol Reprod* 59(1):39-44.
- Sullivan R, Frenette G, Girouard J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 9(4):483-491.
- Sullivan R, BG. 1985. Interaction of isolated components from mammalian sperm and egg. *Gamete research* 12(1):101-116.
- Sutovsky P, Flechon JE, Pavlok A. 1995. F-actin is involved in control of bovine cumulus expansion. *Mol Reprod Dev* 41(4):521-529.
- Sutton KA, Jungnickel MK, Florman HM. 2003. Of fertility, cystic fibrosis and the bicarbonate ion. *Nat Cell Biol* 5(10):857-859.
- Tajik P, Niwa K, Murase T. 1993. Effects of different protein supplements in fertilization medium on in vitro penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture. *Theriogenology* 40(5):949-958.
- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61(3):414-424.
- ten Have J, Beaton S, Bradley MP. 1998. Cloning and characterization of the cDNA encoding the PH20 protein in the European red fox *Vulpes vulpes*. *Reprod Fertil Dev* 10(2):165-172.
- Tesarik J, Kopečný V. 1986. Late preovulatory synthesis of proteoglycans by the human oocyte and cumulus cells and their secretion into the oocyte-cumulus-complex extracellular matrices. *Histochemistry* 85(6):523-528.
- Tesarik J, Moos J, Mendoza C. 1993. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* 133(1):328-335.
- Thaler CD, Cardullo RA. 1995. Biochemical characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked hyaluronidase on mouse sperm. *Biochemistry* 34(24):7788-7795.
- Thaler CD, Cardullo RA. 1996. The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is a complex binding event. *J Biol Chem* 271(38):23289-23297.
- Therien I, Bleau G, Manjunath P. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 52(6):1372-1379.
- Thibault Charles LM-C. 2001. *La reproduction chez les mammifères et l'homme : Nouvelle édition entièrement refondue et mise à jour*. Paris. p 928.

- Topfer-Petersen E, Cechova D. 1990. Zona pellucida induces conversion of proacrosin to acrosin. *Int J Androl* 13(3):190-196.
- Travis AJ, Kopf GS. 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 110(6):731-736.
- Tsubamoto H, Hasegawa A, Inoue M, Yamasaki N, Koyama K. 1996. Binding of recombinant pig zona pellucida protein 1 (ZP1) to acrosome-reacted spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 50:63-67.
- Tsubamoto H, Hasegawa A, Nakata Y, Naito S, Yamasaki N, Koyama K. 1999. Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol Reprod* 61(6):1649-1654.
- Tung KS, Primakoff P, Woolman-Gamer L, Myles DG. 1997. Mechanism of infertility in male guinea pigs immunized with sperm PH-20. *Biol Reprod* 56(5):1133-1141.
- Vadnais ML, Galantino-Homer HL, Althouse GC. 2007. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch Androl* 53(3):109-123.
- Vandevoort CA, Cherr GN, Overstreet JW. 1997. Hyaluronic acid enhances the zona pellucida-induced acrosome reaction of macaque sperm. *J Androl* 18(1):1-5.
- Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L. 1999. Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca²⁺ entry channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5):2060-2064.
- Vines CA, Li MW, Deng X, Yudin AI, Cherr GN, Overstreet JW. 2001. Identification of a hyaluronic acid (HA) binding domain in the PH-20 protein that may function in cell signaling. *Mol Reprod Dev* 60(4):542-552.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121(4):1129-1137.
- Visconti PE, Kopf GS. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59(1):1-6.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121(4):1139-1150.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. 2002. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 53(1-2):133-150.
- Vishwakarma P. 1962. The pH and bicarbonate-ion content of the oviduct and uterine fluids. *Fertil Steril* 13:481-485.
- Walensky LD, Snyder SH. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol* 130(4):857-869.
- Wang XF, Zhou CX, Shi QX, Yuan YY, Yu MK, Ajonuma LC, Ho LS, Lo PS, Tsang LL, Liu Y, Lam SY, Chan LN, Zhao WC, Chung YW, Chan HC. 2003. Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Nat Cell Biol* 5(10):902-906.
- Ward CR, Storey BT, Kopf GS. 1994. Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem* 269(18):13254-13258.

- Wang L, Beserra C, Garbers DL. 2004. A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization. *Dev Biol* 267(1):203-215.
- Yamagata K, Nakanishi T, Ikawa M, Yamaguchi R, Moss SB, Okabe M. 2002. Sperm from the calmegin-deficient mouse have normal abilities for binding and fusion to the egg plasma membrane. *Dev Biol* 250(2):348-357.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian Fertilization. In: E. Knobil JDN, editor. *The physiology of Reproduction*, Second edition. Second Edition ed. New-York: Raven Press Ltd. pp 189-317.
- Yokoo M, Miyahayashi Y, Naganuma T, Kimura N, Sasada H, Sato E. 2002. Identification of hyaluronic acid-binding proteins and their expressions in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 67(4):1165-1171.
- Yonezawa N, Amari S, Takahashi K, Ikeda K, Imai FL, Kanai S, Kikuchi K, Nakano M. 2005. Participation of the nonreducing terminal beta-galactosyl residues of the neutral N-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev* 70(2):222-227.
- Yonezawa N, Aoki H, Hatanaka Y, Nakano M. 1995. Involvement of N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida in sperm-egg binding. *Eur J Biochem* 233(1):35-41.
- Younis AI, Brackett BG. 1991. Importance of cumulus cells and insemination intervals for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts in vitro. *Theriogenology* 36(1):11-21.
- Yu Y, Xu W, Yi YJ, Sutovsky P, Oko R. 2006. The extracellular protein coat of the inner acrosomal membrane is involved in zona pellucida binding and penetration during fertilization: characterization of its most prominent polypeptide (IAM38). *Dev Biol* 290(1):32-43.
- Yudin AI, Li MW, Robertson KR, Cherr GN, Overstreet JW. 2001. Characterization of the active site of monkey sperm hyaluronidase. *Reproduction* 121(5):735-743.
- Yudin AI, Vandervoort CA, Li MW, Overstreet JW. 1999. PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 53(3):350-362.
- Zarintash RJ, Cross NL. 1996. Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biol Reprod* 55(1):19-24.
- Zeng Y, Clark EN, Florman HM. 1995. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 171(2):554-563.
- Zhang H, Martin-DeLeon PA. 2001. Mouse epididymal Spam1 (PH-20) is released in vivo and in vitro, and Spam1 is differentially regulated in testis and epididymis. *Biol Reprod* 65(5):1586-1593.
- Zhang H, Martin-DeLeon PA. 2003. Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J Androl* 24(1):51-58.
- Zhang H, Martin-DeLeon PA. 2003. Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: evidence for its expression in the female reproductive tract. *Biol Reprod* 69(2):446-454.
- Zhang H, Morales CR, Badran H, El-Alfy M, Martin-DeLeon PA. 2004. Spam1 (PH-20) Expression in the Extratesticular Duct and Accessory Organs of the Mouse: A Possible Role in Sperm Fluid Reabsorption. *Biol Reprod* 71(4):1101-1107.

Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA. 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev* 40(3):338-344.

Chapitre 2 / Chapter 2

Caractérisation de la protéine spermatique bovine PH-20 (p80) et analyses de ses modifications au cours du transit épидидymaire des spermatozoïdes

Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit

Cet article est publié dans la revue "Molecular Reproduction and Development" sous la référence suivante: Morin G, Lalancette C, Sullivan R, Leclerc P. Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit. Mol Reprod Dev. 2005 Aug;71(4):523-34

This article has been published in the journal revue "Molecular Reproduction and Development" on the following reference: Morin G, Lalancette C, Sullivan R, Leclerc P. Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit. Mol Reprod Dev. 2005 Aug;71(4):523-34

Résumé

Nous avons identifié une protéine de 80 kDa (p80) qui est localisée dans les régions acrosomale et post-acrosomale de la tête du spermatozoïde bovin éjaculé. Elle possède une activité hyaluronidase et une homologie avec la protéine PH-20, une glycoprotéine de surface impliquée durant les interactions spermatozoïdes/ovocytes. Le but de la présente étude était de caractériser la protéine spermatique p80 au niveau nucléotidique et peptidique afin de déterminer s'il s'agit de la protéine orthologue PH-20 bovine. La séquence en nucléotides complète, obtenue par RT-PCR, 3' et 5'RACE, démontre que p80 possède une homologie de séquence avec PH-20 tant au niveau de sa séquence en nucléotides que déduite en acides aminés. L'expression du message de p80 ainsi que la localisation de la protéine furent déterminées par Northern blot et immunohistochimie. Les résultats révèlent que la protéine est d'origine testiculaire (expression dans les spermatocytes et les spermatides). La détection de p80 au cours de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes bovins fut effectuée par immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps monoclonal reconnaissant strictement la protéine p80 chez le spermatozoïde bovin. Les résultats montrent que p80 est localisée dans les régions acrosomale et post-acrosomale de la tête des spermatozoïdes et ce tout au long de leur transit épидидymaire. Une augmentation de l'intensité du signal fut observée au fur et à mesure que les spermatozoïdes transitent dans l'épididyme. Les modifications post-traductionnelles apportées à la protéine au cours de la maturation épидидymaire furent étudiées par analyse Western blot sur des extraits protéiques provenant de spermatozoïdes de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme. L'état de glycosylation de p80 sur les spermatozoïdes éjaculés et épидидymaires fut aussi étudié et les résultats obtenus démontrent que le patron de glycosylation de p80 est modifié au cours de la maturation épидидymaire. Les analyses de l'activité hyaluronidase de p80 provenant de spermatozoïdes de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme démontrent qu'à tous les endroits, l'activité hyaluronidase est plus active à pH 7 qu'à pH 4 et que la maturation épидидymaire n'affecte pas cette activité. Les résultats présentés ici suggèrent que p80 est la PH-20 bovine.

2.1 Abstract

We have identified an 80 kDa protein in ejaculated bull spermatozoa (p80) which is found in acrosomal and post-acrosomal areas of the head. It has a hyaluronidase activity and shares homologies with PH-20, a sperm surface glycoprotein involved in sperm-egg interaction. The aim of the present study was to characterize bull sperm p80 protein at the nucleic and amino acid levels to determine whether it is the bovine PH-20 ortholog. The complete nucleotide sequence determined by RT-PCR, 3'- and 5'-RACE show that bull p80, displays identity with the PH-20 nucleotide and amino acid sequences. Messenger RNA and protein expressions determined by Northern blot and immunohistochemistry revealed that the protein is testicular (expressed in spermatocytes and spermatids). The localization of p80 on spermatozoa, determined by indirect immunofluorescence using a monoclonal antibody, shows the protein in acrosomal and post acrosomal areas of the head with an increase in the signal intensity as sperm progress through the epididymis. Post-translational modifications of the protein were investigated during the epididymal maturation by western blot on protein extracts from sperm collected in the caput, corpus and cauda portions of bull epididymis. Glycolysation studies of sperm p80 protein on proteins from ejaculated and epididymidal sperm shown that the glycosylation status is modified as spermatozoa migrate through the epididymis. Hyaluronidase activity evaluated in protein extracts from spermatozoa of the three different epididymal sections revealed that the activity is higher at pH 7 than 4 and is not affected by epididymal maturation. These data strongly suggest that p80 is the bovine PH-20.

Keyword: PH-20, hyaluronidase, spermatozoa, glycosylation, testis, epididymis

2.2 Introduction

Along its way within the female reproductive tract, sperm must undergo multiple biochemical changes in order to cross physical barriers such as the cumulus oophorus, which is composed of granulosa cells (cumulus cells) embedded in an extracellular matrix of protein and hyaluronic acid. The cumulus oophorus is known to possess multiple functions during fertilization where it acts as a filter to prevent abnormal sperm from reaching the oocyte (Tanghe et al. 2002) and may optimize the sperm's response to the zona pellucida glycoproteins (Sabeur et al. 1998; Vandervoort et al. 1997). Once in the female tract, sperm must acquire their fertilizing potential through a process termed capacitation. Only capacitated acrosome-intact sperm can cross the cumulus matrix (Tanghe et al. 2002), while other sperm become trapped within the matrix or at the exterior. Other sperm are trapped in the matrix and doomed at the exterior of the cumulus-oocyte complex. The penetration through the cumulus matrix by capacitated spermatozoa can be achieved by their ability to cleave the hyaluronic acid by hyaluronidase on the surface of their plasma membrane (Lin et al. 1994; Yanagimachi 1994).

Six hyaluronidase-like genes have been described in human and mouse (Csoka et al. 2001). Among them, two were detected in significant quantity in the testis: Hyal3 and PH-20 (Csoka et al. 2001). Hyal3, which is also found in high quantity in bone marrow, appears to be involved in stem cell regulation (Csoka et al. 2001) whereas PH-20 would be the only hyaluronidase involved in the fertilization process. PH-20 is believed to be required for the sperm penetration through the cumulus mass (Myles and Primakoff 1997). This protein, which is linked to the sperm membrane by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Phelps et al. 1988), also contains a hyaluronidase domain located in the N-terminal portion of the protein (Cherr et al. 1996; Gmachl et al. 1993; Lin et al. 1994; Thaler and Cardullo 1995). Because of the c-terminal location of the GPI anchor, the hyaluronidase domain is expressed on the cell surface.

After making their way through the cumulus, capacitated sperm bind to the egg zona pellucida. This other important physiological barrier is an extracellular matrix

secreted by the growing oocyte. Primary sperm binding is mediated by ZP3, a major glycoprotein of the zona pellucida, which also promotes the sperm acrosome reaction (Primakoff and Myles 2002). This exocytotic event characterized by the fusion of the outer acrosomal membrane with the overlaying plasma membrane, results in the release of acrosomal content and exposure of the inner acrosomal membrane to the zona pellucida. A secondary binding, most likely promoted by ZP2, another glycoprotein from the zona pellucida and an inner acrosomal sperm membrane protein, is required. The binding to ZP2 enables the sperm cell to penetrate the zona pellucida and reach the egg plasma membrane to finally bind and fuse with it.

Several sperm proteins have been identified as putative receptors for zona pellucida proteins during secondary binding. Among them, pro-acrosin and PH-20 are the most studied candidates. PH-20, also named SPAM1 in human and mouse (Deng et al. 1997; Jones et al. 1995) and 2B1 in rat (Hou et al. 1996), is a glycoprotein present on the sperm plasma membrane surface and on the inner acrosomal membrane (Cowan et al. 1986; Myles and Primakoff 1984). This protein is suspected to act as the mediator of the secondary binding through its C-terminal domain (Hunnicuttt et al. 1996; Primakoff et al. 1985). During the process of the acrosome reaction, post-acrosomal PH-20 migrates to the inner acrosomal membrane where it joins the PH-20 protein population already present (Cowan et al. 1986; Myles et al. 1987; Myles and Primakoff 1984). This migration process is well characterized in guinea pig. In the macaque monkey, the importance of PH-20 over acrosin in the secondary sperm binding and penetration of the zona pellucida was emphasized by the inhibition of these processes by an antibody directed against PH-20 whereas the anti-acrosin had no effect (Yudin et al. 1999).

This multifunctional protein has long been thought to be specific to the testis/spermatozoa although recent studies have shown the presence of PH-20 in the epididymis and in the female reproductive tract as well (Deng et al. 2000; Evans et al. 2003; Zhang et al. 2004a; Zhang and Martin-DeLeon 2003). In the epididymis, this protein is secreted with a lipid anchor that allows its attachment to the sperm cells (Zhang and Martin-DeLeon 2003). Originally identified in Guinea Pig as a 66 kDa protein (Phelps and

Myles 1987), PH-20 homolog are present in many different species. In the bovine however, little is known about this protein and its role during gamete interactions has never been unvalled. Most of the information on bovine PH-20 protein comes from the amino acid sequence analysis of the soluble bull testis hyaluronidase (Meyer et al. 1997). Recently, an 80 kDa sperm protein (p80) present in the post-acrosomal and acrosomal areas of ejaculated bull spermatozoa was identified as a putative PH-20 ortholog by sequence homology of internal tryptic peptides (Lalancette et al. 2001). Moreover, as p80 possesses hyaluronidase activity, the goal of the present study was to obtain the entire nucleic acid sequence encoding for p80 and to further characterize the bull 80 kDa protein in order to determine whether it is the bovine PH-20.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Materials

Bull tissues were obtained from local slaughterhouse and brought on ice to the laboratory within 2h after animal death. TriZol-reagent, SuperscriptII reverse transcriptase pre-amplification system, transfection vectors (pCRII and pCR2.1), dNTP and INV α F' competent cells were from Invitrogen (Carlsbad, ON, Canada). RNase-free DNase, Terminal transferase and pGEM-T vector were from Promega (Madison, WI). RNeasy kit for RNA clean up, Taq DNA polymerase PCR Kit and QIAQUICK PCR purification kit came from QIAGEN (Mississauga, ON, Canada). MMLV reverse transcriptase pre-amplification system was bought from GibcoBRL-life technologies (Burlington, ON, Canada); random oligonucleotide hexamer (Pd(N)₆), polyd(T)₁₂₋₁₈ and ECL kit for western blotting revelation were from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada). Protein molecular weight standards were from BIORAD (Mississauga, ON, Canada). The 5'/3' RACE kit was purchased from Boehringer Mannheim (Montreal, QC, Canada); GeneScreen Plus nylon membrane was from NEN Life Science (Boston, MA) and the nitrocellulose membrane (0.22 μ m pore size) from Micron Separations Inc. (Westboro, MA). BCA protein assay kit was from Pierce (Rockford, IL), 3,3'Diaminobenzidine (DAB), Glycopeptidase F, Hyaluronic acid, mouse IgG and the goat-anti mouse IgG coupled with fluorescein were from Sigma (St-Louis, MO). The monoclonal antibody LA-074 was from Quality Biotech (Camden, NJ). Biotin coupled goat anti-mouse IgG, streptavidine coupled to horseradish peroxidase (HRP) and goat-anti-mouse IgG coupled to HRP were from Jackson Immuno research laboratories inc. (West Grove, PA). The 18S ribosomal RNA oligonucleotides were obtained from Ambion (Austin, TX). All other chemicals were from reagent grade and nucleic acid sequencing were done by automatic sequencing at the Laval University facility service.

2.3.2 Isolation of haploid bull testis germ cells

Haploid germ cells were isolated from bull testis as previously described (Malkov et al. 1998; Mays-Hoopers et al. 1995) with slight modifications. A piece of bull testis (2 cm x

2 cm x 1 cm) was taken underneath the tunica albuginae and rinsed in D-PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) to get rid of the blood. The volume was adjusted to 15 ml with D-PBS and the biopsy was minced with scissors. The cells were then treated with 0.1% trypsin (Invitrogen) for 10 min at 37°C without shaking before addition of 150 mM MgCl₂ and 30 µg deoxyribonuclease I (DNase I, Sigma) and further incubation at 37°C for another 10 minutes with shaking. Fetal bovine serum (1.5 ml) was next added and the seminiferous tubules were dissociated by pipetting. The preparation was filtered on a 70 µm nylon mesh strainer (Becton-Dickinson, Bedford, MA) to recover the isolated cells. The debris were rinsed with 15 ml D-PBS, vortexed and filtered again. The cells were centrifuged for 15 minutes at 250 x g, the pellet was resuspended in 15 ml D-PBS supplemented with DNase I, and centrifuged for another 15 minutes at 250 x g. The resulting pellet was resuspended in Isoton II solution (167 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 10 mM HEPES pH 7.0). Hoescht 33342 (Sigma) was added to a 5 µg/ml final concentration, and the cells were incubated at 37°C for 1 hour before sorting according to their DNA content. Cell sorting was performed using a fluorescence-activated cell sorter (FACS; Epics Elite ESP, Beckman Coulter, Miami, FL; equipped with a HeCd laser, Omnichrome Model 100, Omnichrome, Chino, CA) with an excitation wavelength of 325 nm.

2.3.3 RNA isolation, first strand cDNA synthesis and PCR amplification

Total RNA from bovine tissues and haploid cells were extracted using TriZol reagent according to the manufacturer's protocol. All RNA used for PCR and RACE experiments were treated with RNase-free DNase to remove any contaminating DNA. First strand cDNA synthesis was performed using either the MMLV reverse transcriptase with 1 µg of total testis RNA and pd(N)₆ as a starting primer (0.75 µg/µl) or the superscriptII reverse transcriptase with 2 µg of RNA and polyd(T)₁₂₋₁₈ (24 ng/µl) as starting primer, according to the manufacturer's protocol.

Polymerase chain reaction were performed with either 2 or 5 µl of first strand cDNA using 0.2mM dNTPs, 0.2µg/µl of forward and reverse primers, in a final reaction

volume of 50 μ l containing 0.5 unit of Taq DNA polymerase (QIAGEN). PCR using the p81B forward and reverse primers (Table 2.1) was performed with 5 μ l of first strand cDNA for 35 cycles: 1.5 minutes denaturation at 94°C, 2 minutes annealing at 50°C and 3 minutes elongation at 72°C. This was completed by a further 10 minutes elongation at 72°C. The PCR using Frap-for forward and p81-int reverse primers were performed with 2 μ l of first strand cDNA for 35 cycles of 94°C for 45 sec, 60°C for 2 min and 72°C for 1.5 min after an initial denaturation step of 2 min at 94°C. Again, a further 10 min elongation at 72°C was done.

Primers	Nucleotide sequences
p81A-forward	5'-GTN-GAY-TTY-GAR-CAN-GCN-GG-3'
p81A-reverse	5'-TAR-TAN-GND-ATR-TCR-TTY-TTN-GC-3'
p81B-forward	5'-AAY-GAY-ATH-GCN-TAY-TAY-ATH-CC-3'
p81B-reverse	5'-TTN-CCN-GCN-CTY-TCR-AAR-TC-3'
FRAP-for	5'-GAY-TTY-AGA-GCA-CCY-CCY-CTN-AT-3'
p81 int-rev	5'-CCA-GGT-AGG-CCT-CCA-GTT-TTC-3'
p81 seq-rev	5'-CAC-ATT-TTG-GCG-GCT-AGG-G-3'
p80 5'UTR	5'-CGC-AAG-GTT-ACA-GAT-GAA-GC-3'

Tableau 2.1: Oligonucleotide sequences of the primers use for the PCR and 3'/5'RACE amplification

The PCR products were ligated to either pGEM-T or pCR2.1 vector according to the manufacturer's protocol and cloned respectively in DH5 α or INV α F' competent cells. For each ligation, more than six colonies were grown overnight, their plasmid isolated and the inserts sequenced. For 3'RACE, first cDNA strand was synthesized from 2 μ g of bull testis RNA using the SuperscriptII reverse transcriptase using oligo(dT)-anchor primer (provided in the kit) at 1.44 μ M. PCR amplification was next performed using 2 μ l of the resulting cDNA product with FRAP-for as forward primer (table 2.1) and the anchor primer as 3'reverse primer. The PCR was performed under the following condition: 94°C for 2 min, then 35 cycles at 94°C for 45 sec, 55°C for 2 min and 72°C for 3 min. A further 10 min elongation period at 72°C was next performed. The final product was ligated into pCRII vector, cloned and amplified in INV α F' competent cells and sequenced. For 5'RACE, the first strand of cDNA was synthesized using 2 μ g of bovine testis RNA using

SuperscriptII and p81 seq-rev (0.6 μ M; table 2.1) as the starting gene specific primer. The remaining RNA was hydrolysed with 2 μ l of 6N NaOH at 65°C for 30 min and the reaction was stopped by adding 2 μ l of 6N acetic acid (Eyal et al. 1999). The resulting cDNA was purified and the tailing was done according to the 5'/3' RACE KIT protocol. The first amplification run was done using 5 μ l of tailed cDNA using oligodT-anchor (1.44 μ M) as forward primer and p81 int-rev (0.25 μ M) as reverse primer under the following conditions: 94°C for 2 min, 35 cycles at 94°C for 30 sec, 55°C for 45 sec, 72°C for 1.5 min, followed by a 10 min elongation period at 72°C. The PCR product was ligated in pCRII vector, cloned into INV α F' competent cells, the plasmid of positive clones were isolated and their insert sequenced.

2.3.4 Expression of p80 in bovine tissues by Northern blot

Total RNA (5 μ g) from bovine testis, caput, corpus and cauda epididymidis, liver, kidney, spleen, lung, heart, muscle, brain, ovary and uterus were resolved in a 1% agarose containing 6,7% of formaldehyde and transferred overnight to GeneScreen Plus nylon membrane by capillarity. A 350bp cDNA fragment obtained by PCR using FRAP-for and p81int-rev primers (table 2.1) was used as a probe. The fragment was labelled with [³²P] α -dCTP using exonuclease Klenow fragment. The membrane was pre-hybridized in a buffer containing 1% BSA, 1 mM EDTA, 0.5 M NaPO₄ pH 7.4, 7% SDS, 0.2 mg/ml salmon sperm DNA and 0.1% Na pyrophosphate at 65°C for 2h. Hybridization was performed with the labelled p80 cDNA probe at 2 x 10⁶ cpm/ml in the same buffer at 65°C for 10-20 h. The membrane was rinsed then washed with SSPE (1X concentration: 0.1 M NaCl, 6.6 mM NaH₂PO₄, 0.65 mM EDTA pH 8.0) at 3 successive strength, 3X, 0.3X and 0.15X, in 0.1% SDS at 65°C for 20 min. Positive signal was obtained by autoradiography using Fuji film and exposure was performed at -80°C. The membrane was stripped, washed and reprobred with ³²P-labelled 18S ribosomal RNA oligonucleotides as a control for equal RNA loading in each lane.

2.3.5 Expression of the p80 protein during spermatogenesis

Bull testes were rapidly fixed by injecting 25 to 50 ml of bouin fixation solution. Small pieces of testes were excised and further incubated in bouin for 3 hours at room temperature. Tissues were dehydrated through increasing ethanol concentration bath and mounted in paraffin blocks. Immunohistochemistry were performed on 5 μ m-thick sections. The slides were immersed in baths containing 1% lithium carbonate in 70% ethanol to inactivate the residual picric acid from bouin solution and free aldehydes were blocked using a 300 mM glycine (pH 7.4) (Pelletier et al. 1999). The testis section were washed in PBS (137 mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl and 1.5 mM KH₂PO₄) and none-specific sites were blocked with 1% BSA in PBS. The slides were next incubated for 2h at room temperature in the presence of a monoclonal antibody (LA-074) that recognizes only the p80 protein in bull spermatozoa (Lalancette et al. 2001). Tissue sections were washed with PBS and then put in the presence of a goat anti-mouse IgG coupled to biotin for 1h at room temperature. After 5 washes in PBS, streptavidin-HRP was deposited on tissues, incubated for 30 min at room temperature and the immune complex was revealed using 3,3'Diaminobenzidine (DAB). The slides were next mounted in mowiol (Calbiochem, La Jolla, Ca USA) and observed by light microscopy.

2.3.6 Detection of p80 in epididymal spermatozoa and fluid

Spermatozoa were taken from the caput, corpus and cauda portions of bull epididymidis, resuspended in D-PBS then washed by centrifugation at 380 x g for 5 min. An aliquot of the epididymal fluid was taken, diluted in SDS-PAGE sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% 2-mercaptoethanol), heated at 95°C for 5 min then stored at -20°C until use. The sperm pellet was resuspended in D-PBS, washed one more time and sperm proteins were solubilized in SDS-PAGE sample buffer, heated at 95°C for 5 min and kept at -20 °C until use. The protein concentration of the epididymal fluid was determined by BCA protein assay after precipitation with trichloro acetic acid. Proteins extracted from 10⁶ spermatozoa and 10 μ g of epididymal fluid proteins were separated by electrophoresis on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel (Laemmli 1970) and transferred to nitrocellulose (Towbin et al. 1979) for western blot analysis. The

nitrocellulose membranes were blocked with 5% defatted dry-milk in TBST (0.9% NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.6 and 0.1% Tween-20) for one hour at room temperature then probed for one hour with a monoclonal antibody that recognize only p80 in bull spermatozoa (Lalancette et al. 2001). After 5 washes in TBST, HRP coupled goat anti-mouse IgG was used as secondary antibody and putative immunodetected protein were revealed by chemiluminescence using ECL after extensive washes.

2.3.7 Immunolocalization of p80 on epididymal spermatozoa

Spermatozoa were obtained from caput, corpus and cauda epididymidis and washed in D-PBS as described earlier. Thirty-five microliter of a 20×10^6 spz/ml suspension were put on poly-L lysine coated coverslips and allowed to settle at room temperature for 30 min. Fixation and permeabilization of spermatozoa was conducted by incubation for 10 min at 20°C in methanol. The methanol was removed and spermatozoa were allowed to dry, and then stored at 4°C until use. Indirect immunofluorescence was performed on spermatozoa re-hydrated with PBS and the coverslips were incubated for 1 h in PBS containing 1% BSA to block non specific binding sites. The sperm cells were incubated with either the monoclonal antibody recognizing bull sperm p80 or a commercial non-immune mouse IgG. After extensive washes in PBS, spermatozoa were incubated with an FITC conjugated goat-anti mouse IgG. The coverslips were then submitted to extensive washes in PBS and mounted on slides with DABCO (220 mM 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane in 90% glycerol) as an antibleaching reagent. Spermatozoa were observed by epifluorescence microscopy.

2.3.8 In Gel Hyaluronidase Activity

In-gel hyaluronidase assay was performed as described by Cherr et al (Cherr et al. 1996). Protein extracted from 5×10^5 spermatozoa from the caput, the corpus and the cauda portion of bull epididymis were separated under non-reducing conditions on 7.5% SDS-polyacrylamide gels copolymerized with 0.17 mg/ml hyaluronic acid. Following the electrophoresis, the gels were incubated in Tris buffered saline (0.9% NaCl, 20mM Tris-Cl pH 7.6) containing 3% Triton X-100 for 2 hours at room temperature to remove the SDS.

The gels were next incubated in 100 mM sodium acetate solution (pH 4.0 or 7.0) for 20 h at 37°C. At the end, the gels were incubated in the presence of 0.5% Alcian Blue in 3% acetic acid for 2h at room temperature to stain hyaluronic acid within the gel and destained in 7% acetic acid solution. The areas with hyaluronidase activity were visualized as clear regions in the gels.

2.3.9 N-Deglycosylation of the sperm p80 protein

Ten millions ejaculated or epididymal spermatozoa were lysed in a 0.5% SDS, 2.5% 2-mercaptoethanol solution for 3 minutes at 100°C. The lysate was incubated in glycopeptidase buffer as described by Khunsook et al (Khunsook et al. 2002). Glycopeptidase-F (Sigma) was added at a final concentration of 15 units/ml, and the reaction allowed to proceed for 20h at 37°C. The reaction was stopped by the addition of SDS-PAGE sample buffer and heated at 100°C for 5 min. Sperm proteins were next separated by SDS-PAGE transferred to nitrocellulose and processed for immunodetection as described earlier.

2.4 Results

2.4.1 Protein sequencing

In a previous study, the 80 kDa bull sperm protein was identified as a putative PH-20 ortholog according to the amino acid sequence of N-terminal (FRAPPLI) and internal tryptic peptides (VDFETAGK; AKNDIAYYIPNDSVGA) (Lalancette et al. 2001). Therefore, the first objective of the present study was to determine the entire sequence of this protein.

Degenerated oligonucleotide primers were designed from the obtained internal peptide sequences (Lalancette et al. 2001). Two sets of primers were designed: one with VDFETAG being upstream of AKNDIAYY (p81A) and the other with NDIAYYIP upstream of DFETAGK (p81B) (Table 2.1). The p81B PCR amplification gave a single product of 210 bp (Fig. 2.1). This 210bp PCR product was cloned and its sequence showed >80% (NCBI blast analysis) homology to the one encoding for PH-20. A specific oligonucleotide reverse primer (p81 int-rev, table 2.1) was designed within the 210bp PCR product and was used with a degenerate forward primers encoding for the peptide determined by N-terminal sequencing DFRAPPLI (Lalancette et al. 2001) (FRAP-for; table 2.1). PCR amplification using this set of primers result in a 350bp fragment (Fig. 2.1), showing also >80% (NCBI blast analysis) homology to PH-20. This cDNA fragment was further used as a cDNA probe for Northern blot (see below).

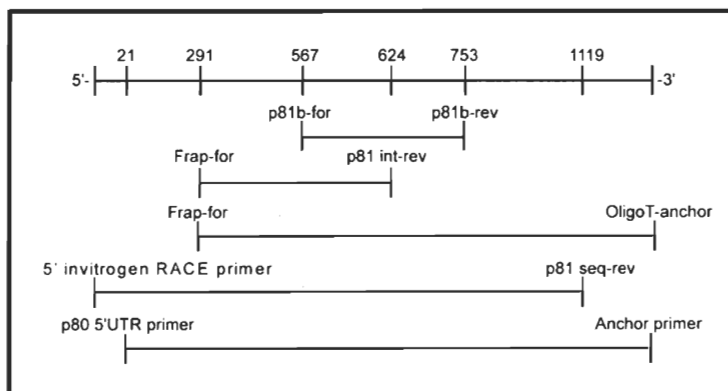


Figure 2.1 : p80 nucleotide sequence obtained by RT-PCR, 3' and 5'RACE using different forward and reverse primers for elongation. Putting the sequence together, a complete nucleotide sequence of 1914 bp encoding for PH-20 homologue proteins can be detected.

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) experiments were next done to obtain the complete nucleotide sequence encoding for our 80 kDa protein. 3'RACE was first achieved using FRAP-for and oligodT-anchor primers. A major band of 1600 nucleotides was obtained (Fig. 2.1) which, upon cloning and sequencing displayed >80% (NCBI blast analysis) homology to PH-20. Identical results were obtained using RNA extracted from haploid germ cells isolated from bull testis (result not shown).

A gene specific reverse primer, p81 seq-rev (table 2.1), was designed within the amplicon obtained by 3'RACE to perform 5'RACE in conjunction with the oligodT-anchor as starting primers. A major fragment of 750bp was obtained (Fig. 2.1) and its sequence revealed a >80% (NCBI blast analysis) homology with the RNA coding for the PH-20 protein. As for the 3'RACE, identical result was obtained using the RNA from haploid germ cells (result not shown). When the nucleotides sequences obtained by 5' and 3'RACE were merged together, a 1914 bp cDNA with an open reading frame of 1659 bp encoding for a 553 amino acid protein was obtained (Fig. 2.2, accession number # AY781776). The entire length of the ORF was confirmed by PCR using specific forward primer designed in the 5' UTR and using anchor primer as reverse primer from cDNA obtained by reverse transcriptase using oligo-(T)-anchor as starting primer (result not show).

The analysis of the deduced amino acid sequence revealed that the protein is a 62.3 kDa with an isoelectric point (pI) of 8.85. It contains a signal peptide (aa 35 to 36) and a hyaluronidase domain from the amino acid 38 to 376 (Fig. 2.2). The analysis further revealed that the protein possesses several serine, threonine and tyrosine phosphorylation sites (NetPhos 2.0 www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) mostly at its c-terminal end. The protein contains 2 potential trans-membrane sites (aa 14 to 38 and 330 to 348; (TMPred; www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html); 9 potential N- glycosylation and 14 O-glycosylation sites (NetNGlyc and NetOGlyc; www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/, www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/); no GPI-anchoring site was revealed by amino acid sequence analysis (DGPI; http://129.194.185.165/dgpi/index_en.html). Identities to the

PH-20 protein from different species ranging from 60 to 74% for the nucleotide sequences and from 46 to 58% for the amino acid sequences were obtained (table 2.2).

MRMLRRHHIS	FRSFAGSSGT	<u>PQAVTFELL</u>	<u>PCCLALDFRA</u>	PPLISNTSFL	50
WAWNAPVERC	VNRRFQLPPD	LRLF <i>SVKRSP</i>	<i>QNSATGQFIT</i>	LFYADRLGYY	100
PHIDEK <i>TKGT</i>	VFGGIPQLGN	LKSHLEKAKN	VIAYYIPNDS	VGLAVIDWEN	150
WRPTWARNWK	PKDVY <i>RDES</i> V	ELVLQKNPQL	<i>SFPEASKIAK</i>	VDFETAGKSF	200
MQETLKLKGL	LRPNHLWGY	LFPDCYNHH	NQPT <i>YNGNCP</i>	DVEKRRNDL	250
EWLWKESTAL	FPSVYLNIRL	<i>KSTQNAALYV</i>	RNRVQEAIRL	<i>SKIASVESPL</i>	300
PVFVYARPVF	<i>TDGSSTYLSQ</i>	GDLVNSVGEI	<u>VSLGASGIIM</u>	<u>WGSINLSISM</u>	350
QSCVNLGTYL	NTTLNPIIIN	VTLAAKMCSQ	VLCHNEGCT	RKHWNSSDYL	400
HLNPMNFAIQ	<i>TGEGGKYTVP</i>	GTVTLEDLQK	FSDTFYCSCY	ANIHCKKRV	450
IKNVHSVNVC	MAEDICIDSP	VKLQPSDHSS	<i>SQEASTTTF</i> S	<i>SISPTTTAT</i>	500
VSPCTPEKHS	PECLKVRCSE	VIPNVTQKAC	QSVKLNISY	QSPIQNIKNO	550
TTY					553

Figure 2.2: Amino acid sequence of bull sperm p80 deduced from the nucleotide sequences. A complete 1914 bp sequence was obtained by 3'- and 5'-RACE. The sequence contains a 1659 bp open reading frame sequence encoding for a 553 amino acids protein. Sequence analysis reveals a peptide signal sequence (*), a hyaluronidase domain (italic), two potential transmembrane domains (underline), thirty-six potential phosphorylation sites (bold), fourteen potential O-glycosylation (↓) sites and nine potential N-glycosylation sites (↓↓).

Species	% of amino acids identity with PH-20 from other species
Sus scrofa	61%
Vulpes vulpes	59%
Homo sapiens	56%
Mus musculus	50%
Rattus norvegicus	47%
Macaca fascicularis	55%
Bos taurus	92%
Cavia Cobaya	52%
Species	% of identity with PH-20 of other species (nucleotides from ATG to poly A tail)
Sus scrofa	73%
Vulpes vulpes	74%
Homo sapiens	60%
Mus musculus	65%
Rattus norvegicus	63%
Macaca fascicularis	69%
Cavia Cobaya	65%

Tableau 2.2: Comparative homology of the p80 protein with the PH-20 of other species (accession number: *Sus scrofa* NM_214011, *Vulpes vulpes* U41412, *Homo sapiens* S67798, *Mus musculus* U33958, *Rattus norvegicus* NM_053967, *Macaca fascicularis* L13780, *Cavia Cobaya* X56332, *Bos taurus* (Meyer et al. 1997)). Sequence were analysed using ALIGN software <http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>

2.4.2 Expression of p80

The tissue distribution of p80 mRNA was first evaluated by Northern blot. As shown in figure 2.3A, a single band was observed after 14 days of exposure and its presence was detected only in the testis (lane 1), suggesting that the protein is expressed almost exclusively in this organ. The next step was to determine which cell type, within the testis, expresses p80. This was achieved by immunohistochemistry. A positive signal was detected in spermatocytes, round and elongated spermatids (Fig. 2.4B and D).

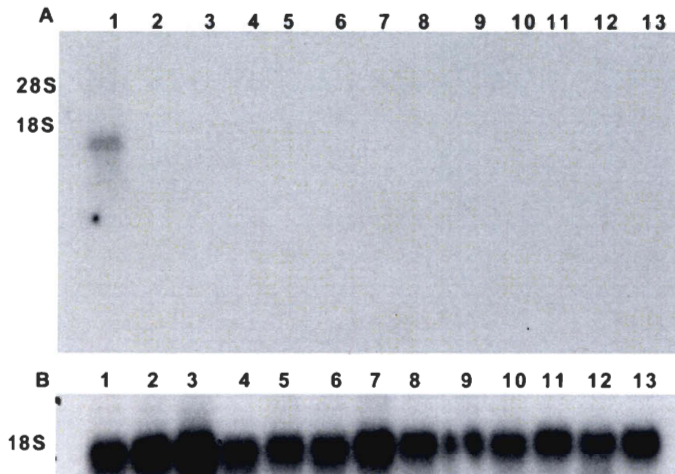


Figure 2.3: Northern blot analysis of p80 mRNA expression in different bovine tissues. A) Detection mRNA coding for the p80 in bovines tissues. B) The blots were reprobed for bovine 18S ribosomal sub-unit as control for equal loading. The experience was performed using total RNA from bovine testis (1), caput (2), corpus (3) and cauda (4) epididymidis, liver (5), kidney (6), spleen (7), lung (8), heart (9), muscle (10), brain (11), ovary (12) and uterus (13).

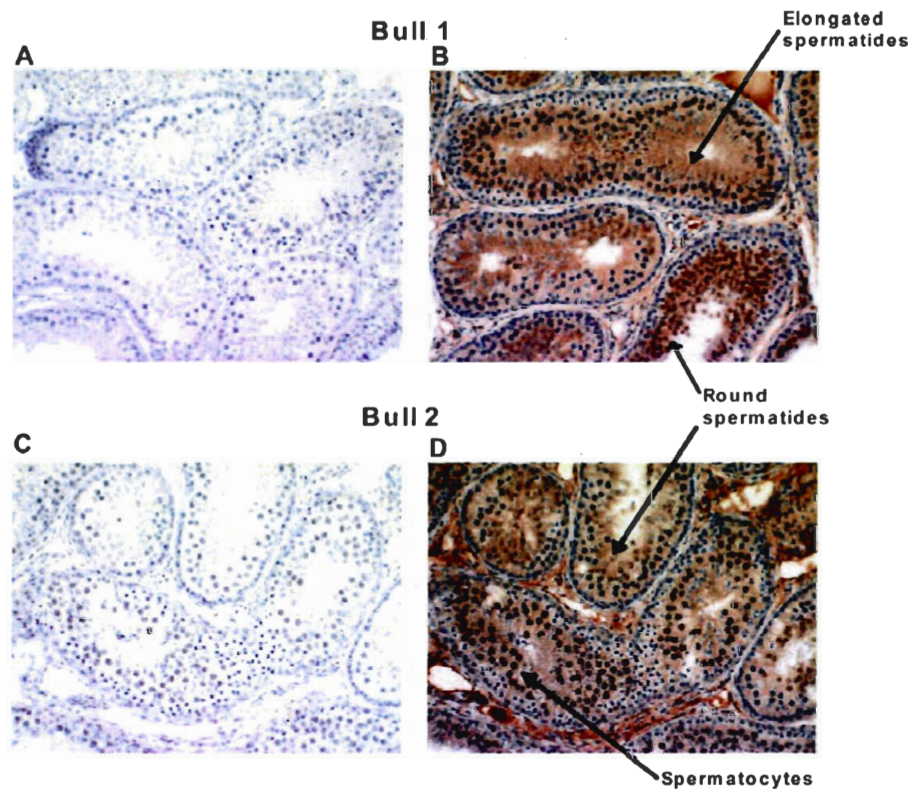


Figure 2.4: Testicular expression of bull sperm p80 protein. The testicular tissues from 2 different bulls were fixed in Bouin's solution and embedded in paraffin. Five μ m sections were used for immunohistochemistry using monoclonal antibody known to detect bull sperm p80 (B, D). No specific signal was observed when commercial mouse IgG was used as a negative control (A, C). Magnification of 1000 X.

2.4.3 Effect of epididymal maturation on sperm p80 protein

To investigate whether or not the p80 protein was undergoing any modification during the sperm transit through the epididymis, western blots on protein extracts from spermatozoa collected in the caput, corpus and cauda epididymidis were performed. As shown in figure 2.5A, the mass of p80 was slightly higher in caput epididymal sperm when compared to the corpus or cauda ones. On the other hand, a slight decrease in the mass was observed in the protein detected in the caudal epididymal fluid (Fig. 2.5B). Since no protease inhibitor were used to prevent protein degradation even though sperm samples were boiled as they were lysed, it cannot be undoubtedly determined whether the lower band ($\cong 50$ kDa) detected was caused by protein degradation or the result of an endoproteolytic cleavage as previously shown (Jones et al. 1996).

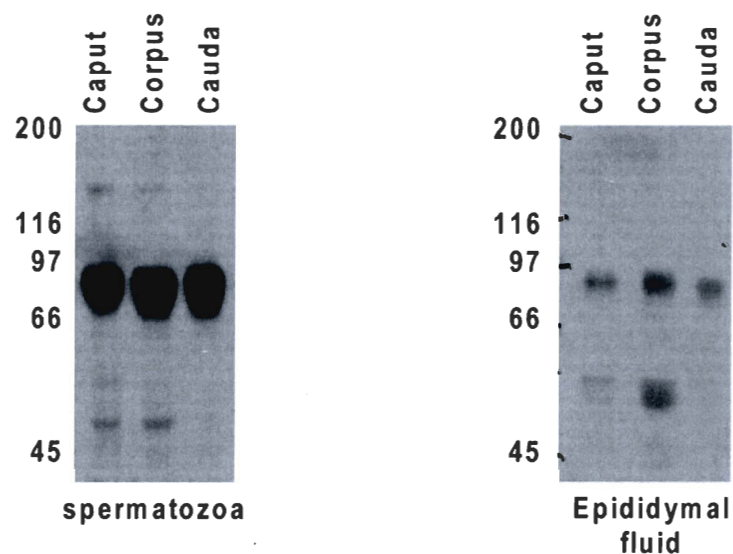


Figure 2.5: Western blot detection of the p80 in protein extracts from caput, corpus and cauda epididymal sperm (A) and fluids (B) probed with p80 monoclonal antibody. Protein extracts from 10^6 sperm cells were load on gel (A), where $10\mu\text{g}$ of protein from each epididymal fluid samples were separated by SDS-PAGE (B). The loading were control by α -tubulin detection. The molecular weight standards (kDa) are indicated on the left of each panel

The localization of the p80 protein was next investigated on permeabilized spermatozoa collected in different sections of the epididymis to determine whether or not the protein changes its localization during sperm epididymal transit. Our results clearly show a progressive increase in the intensity of the signal as spermatozoa moves from the

caput to the cauda portion of the epididymis (Fig. 2.6). The protein was detected on the acrosomal and/or post-acrosomal areas of the sperm head. No signal was detected at the equatorial segment. From our results with more than four different bulls, there was no evidence for antigen displacement as spermatozoa progresses through the epididymis.

The next step was to determine whether sperm hyaluronidase activity was affected during the epididymal transit. As previously shown in ejaculated bull spermatozoa (Lalancette et al. 2001), p80 hyaluronidase activity in caput, corpus and cauda epididymal spermatozoa was higher at pH 7.0 than pH 4.0 (Fig. 2.7). In addition, there was no difference in the hyaluronidase activity between the different regions of the epididymis from which spermatozoa were taken.

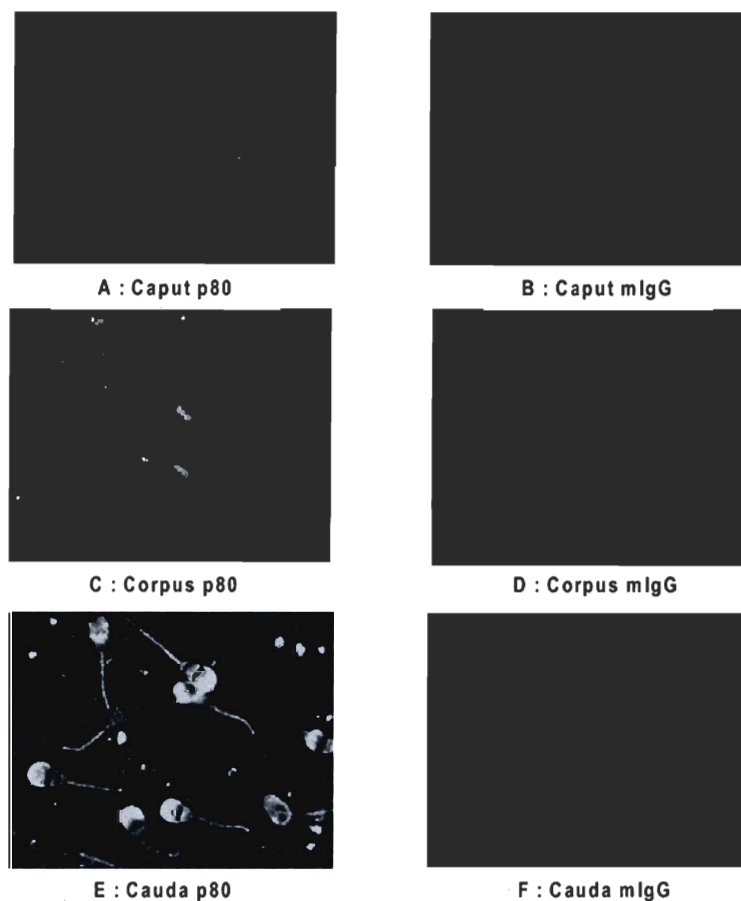


Figure 2.6: Immunolocalization of p80 on bull spermatozoa collected from the caput corpus and cauda epididymidis. Methanol permeabilized spermatozoa were incubated with a p80 monoclonal antibody (A, C and E) or with a mIgG used as negative control (B, D and F). Immune complexes were revealed using an FITC-conjugated goat anti-mouse antiserum. Magnification of 1000 X.

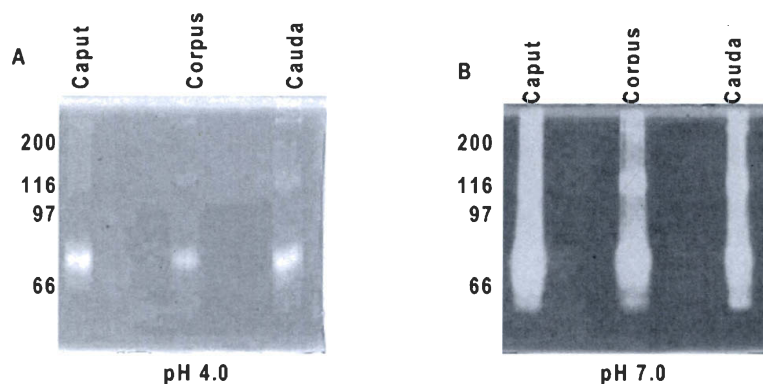


Figure 2.7: Detection of the hyaluronidase activity of epididymal spermatozoa from the caput, corpus and cauda epididymis were separated on a 7.5% SDS-PAGE containing 0.17 mg/ml of hyaluronic acid, the gel was incubated in the presence of Triton X-100 to remove SDS and then incubated in sodium acetate solution at pH 4.0 (A) or 7.0 (B). The hyaluronic acid in the gel was stained with alcian blue. The absence of staining is an indication of hyaluronidase activity. Molecular weight markers are indicated on the left.

2.4.4 N-deglycosylation of the p80 protein

PH-20 is known as a glycosylated protein (Deng et al. 1999; Li et al. 2002) and the deduced amino acid sequence reported in the present study reveals that the bull sperm protein also possesses glycosylation sites. Therefore, experiments were conducted to determine whether p80 is glycosylated using glycopeptidase F to remove N-linked oligosaccharides. A decrease of 8 kDa is observed in the electrophoretic mobility of ejaculated sperm p80 when the cell lysate is treated for N-deglycosylation (Fig. 2.8A lane 2). Differences in the deglycosylation pattern were observed according to the epididymal area spermatozoa were taken from. The effect of glycopeptidase F on sperm p80 mass was more pronounced when the lysate was prepared from corpus or cauda epididymal sperm than the caput ones (Fig. 2.8B lane 3, 5 and 1 respectively).

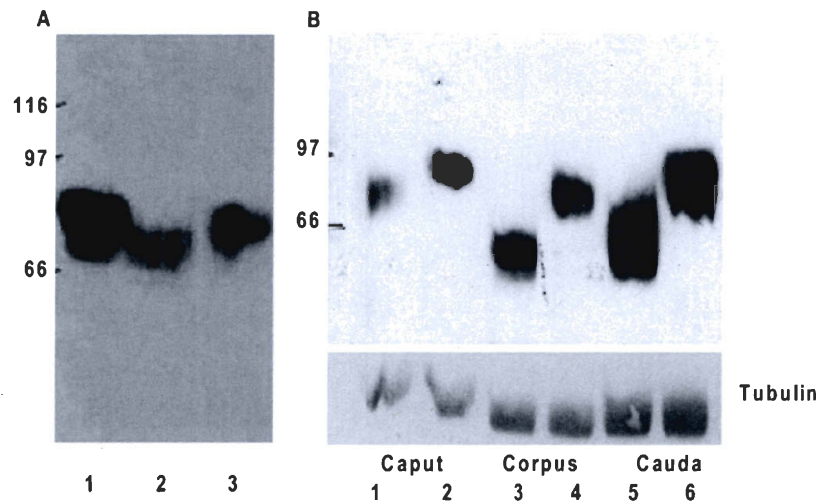


Figure 2.8: Western blot detection of N-deglycosylated p80 bull sperm protein. Protein extracts from ejaculated (A, lane 2) and from caput, corpus and cauda epididymal (B, lanes 1, 3, and 5, respectively) spermatozoa were treated with Glycopeptidase-F for enzymatic N-deglycosylation. Sperm proteins were separated by SDS-PAGE, transferred on membrane of nitrocellulose and probe with p80 monoclonal antibody. Lane 3 in Panel A and lanes 2, 4, 6 in Panel B represent protein extracts incubated under the same conditions in absence of glycopeptidase. Lane 1 in Panel A shows total untreated sperm proteins. Molecular weight markers are indicated on the left.

2.5 Discussion

The aim of this study was to characterize an 80 kDa bull sperm protein suspected as a PH-20 homolog according to its pI, hyaluronidase activity and amino acid sequence of N-terminal and internal tryptic peptides (Lalancette et al. 2001). As shown in the present study, the deduced amino acid sequence of our p80 displays good homology with the PH-20 from different species. It also reveals an active hyaluronidase domain ranging from amino acid 38 to 376 as well as several putative N- and O-linked glycosylation sites.

Despite of the similarities, differences have also been observed. Unlike guinea pig PH-20 (Phelps et al. 1988), the amino acid sequence of bovine p80 has no consensus glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchoring site. This result is in perfect agreement with previous data from our laboratory showing that PI-PLC treatment did not detach p80 from sperm cells (Lalancette et al. 2001). On the other hand, two potential helical transmembrane domains, amino acids 14 to 38 and amino acids 330 to 348, on both sides of the hyaluronidase domain were deduced from the p80 amino acid sequence. As the first putative transmembrane domain resides within the signal peptide, which is removed from the bull sperm p80 protein according to our previous N-terminal sequencing of the protein (Lalancette et al. 2001), the mature protein most likely has a single transmembrane domain, exposing the hyaluronidase domain on the extracellular side of the cell. This is in complete agreement with the post-acrosomal localization of p80 in non-permeabilized ejaculated bull sperm (Lalancette et al. 2001) and the role of PH-20 to help spermatozoa cross the cumulus to reach and fertilize the egg (Myles and Primakoff 1997). Potential transmembrane domains were also detected on different species PH-20 (Hou et al. 1996).

When assessed by Northern blot, p80 expression appeared restricted to the testis. Within the seminiferous tubules, the protein p80 is found in spermatocytes, round, elongating and elongated spermatids. This was confirmed by PCR on tetraploid and haploid testis germ cells. This indicates that p80 is an endogenous sperm protein expressed during spermatogenesis. In mouse, the presence of PH-20 was also detected in the female as well as in the male extratesticular reproductive tract by RT-PCR and In Situ hybridization (Deng et al. 2000; Evans et al. 2003; Zhang and Martin-DeLeon 2003; Zhang et al. 2004b). We were also successful at detecting p80 encoding RNA in caput, corpus and

cauda epididymis by RT-PCR procedures (data not shown) using the same primers as for northern blot mRNA probe construction. Therefore, as presented by our and other groups (Lin et al. 1993), the positive Northern blot signal detected only in the testis suggests that the p80 protein is expressed mostly and primarily in this organ. As shown in figure 2.5, p80 was also detected in the epididymal fluid and although the intensity of the signal increases on spermatozoa as they go through the epididymis (Fig. 2.6), it is not known whether this protein is produced in the epididymis and secreted into the lumen as observed in mouse (Zhang and Martin-DeLeon 2001) and rat (Zhang et al. 2004a).

Bull sperm p80 has been named after its mass of 80 kDa in 1-D SDS-PAGE (Lalancette et al. 2001) which differs from the mass of 62.3 kDa predicted from the deduced amino acid sequence. However, as the signal peptide is most likely removed from the mature protein, the deduced amino acid sequence should encode a 58.3 kDa protein with a pI of 8.64, which also differs from the observed pI of the different isoforms ranging from 7.4 to 8.2 in 2D electrophoresis (Lalancette et al. 2001). Compared to PH-20 from other species, the bovine p80 protein has a higher molecular mass in 1-D SDS-PAGE. Most form of PH-20 has a migration mass ranging from 50 to 70 kDa (Cherr et al. 1996; Jones et al. 1996; Phelps and Myles 1987; Thaler and Cardullo 1995). This might be partially explained by the amino acid sequence of the p80 protein which is longer than the one reported from other species (553 aa vs 493-540 aa). The sequence of a bovine testicular PH-20 hyaluronidase has been published, encoding for 474 amino acid (Chowpongpan et al. 2004). When compared with our sequence, it is identical at 96%. However, their shorter sequence could encode for a soluble variant. Similarly, a 534 amino acid-containing protein corresponding to a 60 kDa protein isolated from soluble commercial bull testis hyaluronidase was reported (Meyer et al. 1997). In that latter study, however, the amino acid sequence of a 75 kDa protein from the same hyaluronidase preparation, which appears to be more closely related to our 80 kDa protein, was not assessed further than the first 20 amino acids which were identical to the first 20 amino acids of the 60 kDa protein. In addition to the 19 amino acids difference between our sequence and the one reported by Meyer's group, when the two sequences were aligned, the

last 13 C-terminal aminoacids of their sequence differed completely from those reported in the present study.

The differences observed between the predicted mass and pI can also be explained by post-translational modifications. PH-20 is well-recognized as a glycosylated protein (Lathrop et al. 1990) and its deglycosylation occurs during sperm epididymal transit (Deng et al. 1999). Putative glycosylation sites, both N- and O-linked, have been identified in the deduced amino acid sequence of sperm p80. The glycosylation status of our protein was confirmed using glycopeptidase-F to perform enzymatic N-deglycosylation. An 8 kDa decrease in the mass of the protein was measured in ejaculated sperm while decrease in mass was more pronounced in sperm collected from the corpus or cauda epididymidis than in those taken from the caput portion of the epididymis (15 kDa vs 7 kDa). This might suggest that caput epididymal sperm are, either, less N-glycosylated than the cauda ones or that caput epididymal sperm have other type of post-translational modification such as O-linked glycosylation sites. According to the deduced amino acid sequence, the bull sperm p80 protein contains a unique “clump” of 14 putative O-linked glycosylation sites within a stretch of 21 consecutive amino acids. Whether these amino acids are glycosylated and this glycosylation “clump” play a role in sperm functions remain to be elucidated.

In mouse, as spermatozoa go through the epididymis, their hyaluronidase activity increases (Deng et al. 1999). In the present study, spermatozoa from the caput epididymidis possess hyaluronidase activity which does not vary significantly from the one measured in cauda epididymal sperm. As previously shown in ejaculated spermatozoa (Lalancette et al. 2001), bull epididymal sperm hyaluronidase activity is higher at neutral than acidic pH, in agreement with what was reported for membrane-bound PH-20 (Cherr et al. 1996). Although the results from in-gel hyaluronidase assay shows that several sperm proteins display hyaluronidase activity, it has to be recalled that PH-20 loses its hyaluronidase activity if its disulfide bridges are reduced (Cherr et al. 1996). Therefore, sperm proteins were processed under non-reducing conditions which does not disrupt protein complexes. When the high molecular weight proteins (>120 kDa) with hyaluronidase activity were extracted after protein separation on a non-reducing SDS-

PAGE gel, incubated under reducing conditions and migrated through a second electrophoresis gel, a single band of 80 kDa was detected by western blot procedure (data not shown), suggesting that p80 might associate with other proteins or form oligomers. In addition to protein glycosylation, Ser, Thr, Tyr phosphorylation are also post-translational modification that affect protein mass and pI. Several Ser/Thr/Tyr consensus phosphorylation motifs are present within the deduced amino acid sequence. It has to be determined whether these amino acids are phosphorylated and whether this type of modification affect its hyaluronidase activity.

In different species, it has been demonstrated that PH-20 changes its localization during the epididymal transit (Phelps and Myles 1987). Although testicular sperm expresses PH-20 all over the head, this protein becomes localized to the posterior head surface during sperm epididymal transit. In the present study, it is clearly shown that p80 is localized on both the post-acrosomal and acrosomal portion of the head but is not detected in the equatorial segment of fixed/permeabilized epididymal spermatozoa. This result was similar to what was observed in ejaculated bull spermatozoa (Lalancette et al. 2001) and was not affected by the epididymal section from which spermatozoa were taken. On the other hand, an increase in the signal intensity was observed as spermatozoa move from the caput to the cauda epididymidis. As stated earlier, it is not known whether p80 is secreted in the epididymal lumen and binds to spermatozoa, or whether the antigen becomes more accessible to the antibody as sperm move across the epididymis. Because no difference in the antibody labeling was observed on western blots (denatured conditions), it is more likely that the increased signal observed is caused by a modification in protein folding or a better permeabilization of the cell as sperm cross the epididymis, facilitating the antibody access to the antigen. Similar to what was observed in ejaculated spermatozoa (Lalancette et al. 2001), p80 was detected only in the post-acrosomal area of non-permeabilized cells (data not shown).

From this and a previous study from our group (Lalancette et al. 2001), there are strong evidence that bull sperm 80 kDa protein, p80, is the bovine PH-20. It possesses sequence homology with other species PH-20 ranging from 60 to 74% for the nucleotide

sequence and from 47 to 61% for the amino acid sequence, it possesses a hyaluronidase domain, several glycosylation and phosphorylation sites and is found on both the post-acrosomal and acrosomal region of the permeabilized sperm head whereas it is detected only in the post-acrosomal region of the non-permeabilized cells.

2.6 Acknowledgement

The authors are thankful to Dr M. Dufour for his help with the sorting of haploid testicular cells. Special thanks also to Mr G. Frenette for his technical advices on the manipulation of bull epididymis.

2.7 References

- Cherr GN, Meyers SA, Yudin AI, VandeVoort CA, Myles DG, Primakoff P, Overstreet JW. 1996. The PH-20 protein in cynomolgus macaque spermatozoa: identification of two different forms exhibiting hyaluronidase activity. *Dev Biol* 175(1):142-153.
- Chowpongpan S, Shin HS, Kim EK. 2004. Cloning and characterization of the bovine testicular PH-20 hyaluronidase core domain. *Biotechnol Lett* 26(15):1247-1252.
- Cowan AE, Primakoff P, Myles DG. 1986. Sperm exocytosis increases the amount of PH-20 antigen on the surface of guinea pig sperm. *J Cell Biol* 103(4):1289-1297.
- Csoka AB, Frost GI, Stern R. 2001. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* 20(8):499-508.
- Deng X, Czymmek K, Martin-DeLeon PA. 1999. Biochemical maturation of Spaml (PH-20) during epididymal transit of mouse sperm involves modifications of N-linked oligosaccharides. *Mol Reprod Dev* 52(2):196-206.
- Deng X, He Y, Martin-DeLeon PA. 2000. Mouse Spaml (PH-20): evidence for its expression in the epididymis and for a new category of spermatogenic-expressed genes. *J Androl* 21(6):822-832.
- Deng X, Moran J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Primakoff P, Martin-DeLeon PA. 1997. The mouse Spaml maps to proximal chromosome 6 and is a candidate for the sperm dysfunction in Rb(6.16)24Lub and Rb(6.15)1Ald heterozygotes. *Mamm Genome* 8(2):94-97.
- Evans EA, Zhang H, Martin-DeLeon PA. 2003. SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: utilizing laser microdissection/RT-PCR. *Reprod Biol Endocrinol* 1(1):54.
- Eyal Y, Neumann H, Or E, Frydman A. 1999. Inverse single-strand RACE: an adapter-independent method of 5' RACE. *Biotechniques* 27(4):656-658.
- Gmachl M, Sagan S, Ketter S, Kreil G. 1993. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett* 336(3):545-548.
- Hou ST, Ma A, Jones R, Hall L. 1996. Molecular cloning and characterization of rat sperm surface antigen 2B1, a glycoprotein implicated in sperm-zona binding. *Mol Reprod Dev* 45(2):193-203.
- Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG. 1996. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol Reprod* 55(1):80-86.
- Jones MH, Davey PM, Aplin H, Affara NA. 1995. Expression analysis, genomic structure, and mapping to 7q31 of the human sperm adhesion molecule gene SPAM1. *Genomics* 29(3):796-800.
- Jones R, Ma A, Hou ST, Shalgi R, Hall L. 1996. Testicular biosynthesis and epididymal endoproteolytic processing of rat sperm surface antigen 2B1. *J Cell Sci* 109 (Pt 10):2561-2570.
- Khunsook S, Alhadeff JA, Bean BS. 2002. Purification and characterization of human seminal plasma alpha-L-fucosidase. *Mol Hum Reprod* 8(3):221-227.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-685.
- Lalancette C, Dorval V, Leblanc V, Leclerc P. 2001. Characterization of an 80-kilodalton bull sperm protein identified as PH-20. *Biol Reprod* 65(2):628-636.

- Lathrop WF, Carmichael EP, Myles DG, Primakoff P. 1990. cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J Cell Biol* 111(6 Pt 2):2939-2949.
- Li MW, Yudin AI, Robertson KR, Cherr GN, Overstreet JW. 2002. Importance of glycosylation and disulfide bonds in hyaluronidase activity of macaque sperm surface PH-20. *J Androl* 23(2):211-219.
- Lin Y, Kimmel LH, Myles DG, Primakoff P. 1993. Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21):10071-10075.
- Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. 1994. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* 125(5):1157-1163.
- Malkov M, Fisher Y, Don J. 1998. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 59(1):84-92.
- Mays-Hoopes LL, Bolen J, Riggs AD, Singer-Sam J. 1995. Preparation of spermatogonia, spermatocytes, and round spermatids for analysis of gene expression using fluorescence-activated cell sorting. *Biol Reprod* 53(5):1003-1011.
- Meyer MF, Kreil G, Aschauer H. 1997. The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme. *FEBS Lett* 413(2):385-388.
- Myles DG, Koppel DE, Cowan AE, Phelps BM, Primakoff P. 1987. Rearrangement of sperm surface antigens prior to fertilization. *Ann N Y Acad Sci* 513:262-273.
- Myles DG, Primakoff P. 1984. Localized surface antigens of guinea pig sperm migrate to new regions prior to fertilization. *J Cell Biol* 99(5):1634-1641.
- Myles DG, Primakoff P. 1997. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* 56(2):320-327.
- Pelletier R, Trifaro JM, Carbajal ME, Okawara Y, Vitale ML. 1999. Calcium-dependent actin filament-severing protein scinderin levels and localization in bovine testis, epididymis, and spermatozoa. *Biol Reprod* 60(5):1128-1136.
- Phelps BM, Myles DG. 1987. The guinea pig sperm plasma membrane protein, PH-20, reaches the surface via two transport pathways and becomes localized to a domain after an initial uniform distribution. *Dev Biol* 123(1):63-72.
- Phelps BM, Primakoff P, Koppel DE, Low MG, Myles DG. 1988. Restricted lateral diffusion of PH-20, a PI-anchored sperm membrane protein. *Science* 240(4860):1780-1782.
- Primakoff P, Hyatt H, Myles DG. 1985. A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* 101(6):2239-2244.
- Primakoff P, Myles DG. 2002. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296(5576):2183-2185.
- Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. 1998. Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote* 6(2):103-111.
- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61(3):414-424.

- Thaler CD, Cardullo RA. 1995. Biochemical characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked hyaluronidase on mouse sperm. *Biochemistry* 34(24):7788-7795.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4350-4354.
- Vandevoort CA, Cherr GN, Overstreet JW. 1997. Hyaluronic acid enhances the zona pellucida-induced acrosome reaction of macaque sperm. *J Androl* 18(1):1-5.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian Fertilization. In: E. Knobil JDN, editor. *The physiology of Reproduction*, Second edition. Second Edition ed. New-York: Raven Press Ltd. pp 189-317.
- Yudin AI, Vandevoort CA, Li MW, Overstreet JW. 1999. PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 53(3):350-362.
- Zhang H, Jones R, Martin-DeLeon PA. 2004a. Expression and secretion of rat SPAM1(2B1 or PH-20) in the epididymis: role of testicular lumicrine factors. *Matrix Biol* 22(8):653-661.
- Zhang H, Martin-DeLeon PA. 2001. Mouse epididymal Spam1 (PH-20) is released in vivo and in vitro, and Spam1 is differentially regulated in testis and epididymis. *Biol Reprod* 65(5):1586-1593.
- Zhang H, Martin-DeLeon PA. 2003. Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J Androl* 24(1):51-58.
- Zhang H, Martin-DeLeon PA. 2003. Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: evidence for its expression in the female reproductive tract. *Biol Reprod* 69(2):446-454.
- Zhang H, Morales CR, Badran H, El-Alfy M, Martin-DeLeon PA. 2004b. Spam1 (PH-20) expression in the extratesticular duct and accessory organs of the mouse: a possible role in sperm fluid reabsorption. *Biol Reprod* 71(4):1101-1107.

Chapitre 3 / Chapter 3

La protéine Spam1 bovine (p80) existe sous deux isoformes chez le spermatozoïde éjaculé. Leurs localisation et orientation différentielles dans les membranes suggèrent différents rôles

Bovine Spam1 exists as two isoforms in ejaculated sperm. Different protein orientations within the membranes suggest different roles

Guillaume Morin, Robert Sullivan et Pierre Leclerc

Cet article est présentement soumis à la revue "Biology of Reproduction"

This paper is presently submitted to the journal "Biology of Reproduction"

3.1 Résumé

Nous avons préalablement caractérisé Spam1 chez le bovin, une protéine requise durant les interactions entre les spermatozoïdes et l'ovule, et nous avons démontré qu'elle ne possédait pas d'ancre GPI. L'analyse de sa séquence en acides aminés suggère toutefois la présence d'un domaine transmembranaire séparant le domaine hyaluronidase du domaine potentiel de liaison de la protéine à la zone pellucide (ZP). À l'aide de deux anticorps reconnaissant spécifiquement le domaine hyaluronidase (N-terminal) ou le domaine potentiel de liaison à la zone pellucide (C-terminal), nous démontrons, dans cet article, la présence de deux isoformes de la protéine Spam1 sur les spermatozoïdes bovins. Le premier est détecté par les deux anticorps et est localisé dans la région antérieure de la tête des spermatozoïdes alors que le deuxième est détecté seulement par l'anticorps N-terminal et est localisé dans la région post-acrosomale de la tête. Le premier isoforme est internalisé alors que le deuxième expose son domaine hyaluronidase à l'environnement extracellulaire. Suivant la séparation des protéines par électrophorèse en deux dimensions, deux protéines furent identifiées à l'aide de l'anticorps N-terminal (80 et 70 kDa) alors qu'une seule protéine (80kDa) fut détectée à l'aide de l'anticorps C-terminal. Les analyses LC/MS/MS de la protéine de 80 kDa nous ont permis de confirmer la séquence en acides aminés de Spam1 bovin déduite de sa séquence nucléotidique alors que la séquence de la protéine de (70 kDa) serait une forme plus courte de p80 où une partie de l'extrémité C-terminale serait absente. Les analyses Western blot démontrent que la forme courte de Spam1 est originaire de l'épididyme alors que la forme complète quant à elle, origine du testicule. Ces résultats démontrent clairement que Spam1 existe sous deux formes chez les spermatozoïdes bovins éjaculés; une première exprimée à la surface qui pourrait interagir avec l'acide hyaluronique de l'environnement extérieur, et une deuxième qui interagirait avec la zone pellucide suivant la réaction de l'acrosome.

3.2 Abstract

We previously characterized the bovine Spam1, a protein required during sperm/egg interaction and demonstrated that it does not possess a GPI anchor. The deduced amino acid sequence suggests the presence of a transmembrane domain that separates the hyaluronidase domain from the putative zona pellucida (ZP) binding domain. In this report, using two antibodies that specifically recognize the hyaluronidase (N-terminal) or the putative ZP binding domain (C-terminal), we demonstrate that two isoforms of the bovine Spam1 are present on ejaculated spermatozoa. One detected by both antibodies, which is located on the anterior portion of the sperm head; and one detected by the N-terminal antibody, which is located on the postacrosomal portion of the head. The first isoform is not expressed on the sperm surface while the second one has its hyaluronidase domain facing the extracellular environment. Two-dimension electrophoresis of sperm proteins reveals two proteins detected by the N-terminal antibody (80 and 70 kDa) while only one protein was detected (80 kDa) using the C-terminal antibody. LC/MS/MS analysis of the 80 kDa protein confirmed our previous deduced amino acid sequence of bovine Spam1 while the 70 kDa protein would be a shorter form lacking a part of its C-terminus. Western blot analyses demonstrate that the shorter Spam1 form originates from the epididymis while the longer one comes from the testis. These results clearly demonstrate that ejaculated bull sperm possess two forms of Spam1; one expressed on the surface that would interact with extracellular hyaluronic acid, and one that would interact with the ZP after the acrosome reaction.

3.3 Introduction

The penetration of the cumulus matrix and the successful interaction with the zona pellucida are vital events that spermatozoa must achieve in order to fertilize the egg. Many studies have been performed in order to highlight proteins implicated in these processes. From these studies, one major sperm protein that is essential for the achievement of fertilization has been identified: Spam1, also known as PH-20. This protein, first identified in guinea pigs[1], has been described in many species including mouse[2], rat(2B1)[3], macaque[4], fox[5], human[6], horse[7], pig[8], sheep[9] and cattle(p80)[10, 11]. In the male reproductive system, Spam1 is not only found in the testis and sperm cells but also in the epididymis[12], other extratesticular duct and accessory organs[13] as well as in the female reproductive tract[14]. Interestingly, the protein and its encoding mRNA have also been localized in chondrocytes, synoviocytes and dermal fibroblasts[15].

Spam1 is not only important during the interaction between spermatozoa and the cumulus matrix through its hyaluronidase activity[6, 10, 16-18], but also during the secondary binding of acrosome reacted spermatozoa to the zona pellucida[17-20]. Those roles are clearly identified by two distinct domains on the protein: the hyaluronidase domain, localized in the N-terminal portion of the protein and the zona pellucida binding domain, which is located in the C-terminal portion of Spam1[17, 21].

A major characteristic shared by mammalian species is the presence of a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchor at the C-terminal extremity of Spam1 protein[22]. This would allow protein transfer and relocalization during sperm epididymal maturation[23-25] and acrosome reaction[1, 26, 27]. Consequently, the two active domains of the protein would be exposed to the extracellular milieu.

A bovine sperm protein of 80 kDa, termed p80 after its migration on SDS polyacrylamide gel, which possesses similarities with Spam1, was characterized in our laboratory[10, 11]. Like Spam1, p80 is expressed mainly in the testis, possesses N- and O- glycosylation sites and shares 47 to 61% of amino acids homology with the protein from different species. It

is localized in the post-acrosomal and acrosomal areas of bull spermatozoa and its hyaluronidase activity in polyacrylamide gel is higher at neutral than acidic pH. However, bovine Spam1 also possesses some specific characteristics, one of which is the absence, as for the red fox[5], of a GPI-anchor in ejaculated sperm[10], which agrees with the absence of a consensus amino acid sequence motif[11]. According to the deduced amino acid sequence, bovine Spam1 possesses two putative transmembrane domains [11]. Since one is found in the signal peptide that is normally removed from the mature protein, only one transmembrane domain would remain. This domain is located at the end of the hyaluronidase domain, and would separate the hyaluronidase domain from the putative zona pellucida binding domain. This would result in the presence of these two functional domains of the protein on either side of the sperm membrane.

Therefore, one could ask how bovine Spam1 interacts with the hyaluronic acid contained within the cumulus as well as with the zona pellucida upon the acrosomal exocytosis if only one of these two domains is exposed on the sperm surface. The aim of the present study is to characterize bovine Spam1 orientation in the bovine sperm membrane, in order to understand how the protein could fulfill its role as a hyaluronidase and a zona pellucida binding protein during fertilization.

3.4 Materials and Methods

Bull tissues were obtained from local slaughterhouse and brought on ice to the laboratory within 2 hr after animal death. TriZol-reagent, SuperscriptIII reverse transcriptase pre-amplification system, dNTP and Alexa-488-conjugated goat anti-mouse IgG were from Invitrogen (Carlsbad, ON., Canada). RNase-free DNase and pGEM-T Easy vector were from Promega (Madison, WI). PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase, NdeI and BamHI restriction endonuclease were from NEB (Boston, MA). Transfection vector pET16 was from Novagen (VWR, Mississauga, ON., Canada). Taq DNA polymerase and RNeasy kit for RNAClean up came from QIAGEN (Mississauga, ON., Canada). Random oligonucleotide hexamer polyd(T)₁₂₋₁₈, ECL kit for western blot detection, monoclonal anti-His-tag antibody and donkey anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase (HRP) were from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC., Canada). Protein molecular weight standards were from BIORAD (Mississauga, ON., Canada). Nitrocellulose membrane (0.22 µm pore size) was from Micron Separations Inc. (Westboro, MA). BCA protein assay kit was from Pierce (Rockford, IL), Deglycosylation Kit, non-immune mouse and rabbit IgGs, protease inhibitors (aprotinin, leupeptin, pepstatin A and PMSF) were from Sigma (St. Louis, MO). Goat-anti-mouse IgG coupled to HRP and goat-anti-rabbit IgG coupled to fluorescein were from Jackson Immuno Research Laboratories Inc. (West Grove, PA). All other chemicals were from reagent grade. Nucleic acid sequencing was done by the core sequencing facility at our research center.

3.4.1 Antibodies

For this study, two antibodies were used. The first one is a monoclonal antibody (203-7D10) produced from hybridoma culture (American Type Culture Collection, Manassas, VA). This antibody, raised against amino acids 2–17 of p60^{v-src} was shown to recognise specifically Spam1 in bovine sperm[10]. The second one, anti-p80, is a custom made rabbit polyclonal antibody developed by Affinity Bioreagents (Golden CO) and directed against the amino acids 530-550 of the bull Spam1 protein (p80, genbank #AY781776).

3.4.2 Construction and expression of recombinant bovine Spam1 partial domains and characterization of the antibodies

Subcloning of cDNA encoding for partial bovine Spam1 in pET-16b vector were performed as follow. PCR fragments were first generated from pGEM-T EASY plasmid containing full length bull Spam1 (genbank #AY781776) [11] using primer pair #1; p80 5'ORF (5'-GCTCTTTCATATGAGAATGCTGAGG-3') and p80 partial rec 3' (5'-ATGGGATCCTAGACACGATTACG-3'), corresponding to nucleotides 221-1074 of p80 (\approx 33 kDa), and primer pair #2; p80 partial rec 5' (5'-CTGAACCATATGAATTTTGCTATTC-3') and p80 3'ORF (5'-AATGGATCCTTAATAGGTTGTTTG-3'), corresponding to nucleotides 1448-1891 of bovine Spam1 (\approx 19 kDa). These combinations of primers cover respectively the N- and C-terminal sequence of bull Spam1 on each side of the protein transmembrane domain (figure 3.1). The p80 5'ORF and p80 partial rec 5' primers were designed to introduce the *Nde*I restriction site (bold letters) while the p80 partial rec 3' and p80 3'ORF primers were designed to introduce a stop codon and the *Bam*HI (bold-underlined) sites in p80 sequence for directional insertion in the pET-16b vector after digestion. A stretch of 10 histidine residues and 11 other amino acids, contained in the vector sequence, were introduced in our construction at the N-terminal extremity. Plasmids were transformed in *E.coli* DH5 α cells and sequenced to confirm the accuracy of our construction.



Figure 3.1: Detection of the p80 recognition domain by the monoclonal 203-7D10 and polyclonal anti-p80 antibodies. The position of peptide 1, corresponding to amino acids 1-279, and peptide 2, corresponding to amino acids 393-553, is shown according to the putative transmembrane domain of the protein.

For peptide expression procedure, overnight cultures of *E.coli* BL21 (DE3) cells positively transformed with pET-16b containing the N- or C-terminal fragments of bovine Spam1 were inoculated in Luria broth medium (Sigma) containing 50 μ g/ml ampicilin and 34 μ g/ml of chloramphenicol. The bacteria were cultured at 37°C until $A_{600} = 0.6-1$.

Protein expression was induced by the addition of 1 mM isopropyl-thio- β -D-galactoside (IPTG) at 37°C for 1h. The cells were pelleted by centrifugation, resuspended in SDS-PAGE sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 62.5 mM Tris-HCL pH 6.8, 50 mM DTT) then heated at 100°C for 5 min. The protein extracts were separated by electrophoresis on a 15% SDS-polyacrylamide gel[28] and transferred on nitrocellulose[29] for western blot analysis. The nitrocellulose membranes were blocked with 5% defatted dry-milk in TBST (0.9% NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6 and 0.1% Tween-20) for 1 hr at room temperature then probed for 1 hr with either the mouse monoclonal antibody (203-7D10) or the rabbit polyclonal antibody anti-p80. Following several washes in TBST, HRP coupled goat anti-mouse IgG or donkey anti-rabbit IgG were used as secondary antibodies. Following extensive washes, the immunodetected proteins were revealed by chemiluminescence using ECL. Antibody detection of bull Spam1 partial recombinant proteins was confirmed by western blot using a monoclonal anti-His-tag antibody that recognizes a stretch of histidine residues in proteins. From now on in the study, according to the results shown in figures 3.1 & 3.2) the monoclonal 203-7D10 and the polyclonal anti-p80 antibodies will be referred to as N-terminal and C-terminal antibodies, respectively to facilitate comprehension.

3.4.3 Immunolocalization of bovine Spam1 on ejaculated spermatozoa

Freshly ejaculated bull semen was collected at an artificial insemination facility and kindly donated by l'Alliance Semex, Inc. (Ste-Hyacinthe, QC, Canada). The semen was maintained at 23°C until arrival to the laboratory (2.5 h). On arrival, 1 ml of semen was centrifuged (500 x g, 5 min) to remove the seminal plasma and spermatozoa were resuspended in 1 ml of PBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl and 1.5 mM KH₂PO₄). Spermatozoa were next washed by three centrifugations (500 x g, 5 min) to get rid of residual seminal plasma and sperm concentration was evaluated using a hemacytometer. Thirty-five microliter of a 20 x 10⁶ spz/ml suspension were put on poly-L-lysine coated coverslips and allowed to settle at room temperature for 30 min. Sperm on the coverslips were fixed for 15 min at room temperature with 3.7% formaldehyde, washed 5 times with PBS, then permeabilized for 15 min with 0.2% Triton X-100. The formaldehyde/triton treated spermatozoa were kept in PBS at 4°C until use. For indirect

immunofluorescence, the coverslips were incubated in PBS containing 1% BSA to block non specific binding sites. The sperm cells were incubated with the N-terminal, the C-terminal antibodies, or commercial non-immune mouse or rabbit IgGs. After extensive washes in PBS, spermatozoa were incubated with an Alexafluor-488 conjugated goat-anti mouse IgG or a FITC conjugated goat-anti rabbit mouse IgG. The coverslips were then submitted to extensive washes in PBS and mounted on slides with DABCO (220 mM 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane in 90% glycerol) as an antibleaching agent. Spermatozoa were observed by epifluorescence microscopy.

For the unfixed, non-permeabilized, live spermatozoa, 100 μ l of a 50×10^6 spz/ml suspension were incubated 2h at 38.5°C in Sp-TALP medium containing 6 mg/ml BSA and 1 mM sodium pyruvate [30] added with either the N-terminal, the C-terminal, or commercial non-immune mouse or rabbit IgGs. Spermatozoa were washed 2 times with 1 ml Sp-TALP by centrifugation (500 x g, 5 min), then incubated in 100 μ l Sp-TALP for 2h at 38.5°C in the presence of either Alexafluor-488 conjugated goat-anti mouse IgG or a FITC conjugated goat-anti rabbit IgG. After two washes in PBS (500 x g, 5 min), spermatozoa were resuspended in 100 μ l PBS and 25 μ l were deposited between slide and a coverslip for protein localization under an epifluorescence microscope.

3.4.4 Isolation of bovine Spam1

In order to isolate and purify bull Spam1, bull semen was cooled for 15min on ice to immobilize the sperm cells. Spermatozoa were next washed 2 times with HBS (10 mM HEPES pH 7.2, 150 mM NaCl) by centrifugation (1000 x g, 5 min, 4°C) then put in a coupling buffer (100 mM Na₂HPO₄, 0.05% Sodium Azide, pH 7.4) with protease inhibitors (100 μ g/ml each for aprotinin, leupeptin, and pepstatin A, and 0.25 mM PMSF. The sperm suspension was submitted to sonication on ice (3 times, 30 sec each, Ultrasonic Processor, 50% Duty cycle) then centrifuged (2000 x g, 10 min, 4°C) to pellet most of the heads. The supernatant was next submitted to ultracentrifugation (100,000 x g, 60 min, 4°C) to remove the membranes and any particulate materials. The soluble protein fraction was deposited on a pre-equilibrated affinity columns made with protein A agarose beads coupled to the IgGs from the N-terminal antibody according to the procedure described [31], or an affinity

column, AMINOLINK resin (Pierce, Rockford, IL), made with the IgGs from the C-terminal antibody. The suspension was incubated overnight with the beads of either columns at 4°C with end-over-end rotation. In each column, the matrix was allowed to settle and the flow through were collected and kept for further purification. The columns were washed with 5 times diluted coupling buffer (20 mM Na₂HPO₄, 0.01% sodium azide) with protease inhibitors (100 µg/ml each of aprotinin, leupeptin, pepstatin A and 0.25 mM PMSF). The proteins were next eluted with seven 1 ml-fractions of glycine-HCl (100 mM, pH 2.8) in tubes containing 50 µl of Tris-HCl (1 M, pH 9.0) to neutralize the pH. Positive fractions were selected according to their A₂₈₀. The columns were next washed with 1 M NaCl and re-equilibrated with coupling buffer. Positive protein fractions were precipitated with trichloro-acetic acid, then solubilized and pooled together in SDS-PAGE sample buffer and separated by 7.5% SDS-PAGE. The purified proteins were finally visualized by silver staining of the gels.

3.4.5 Deglycosylation of soluble sperm protein

Sperm soluble protein fractions were deglycosylated (N-linked, O-linked and total deglycosylation) using the enzymatic protein deglycosylation kit (Sigma) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 100 µg of proteins were dissolved in deionized water. After addition of the 5x reaction buffer and the denaturation solution, proteins were heated for 5 min at 100°C then cooled to room temperature. Triton X-100 was added, then PNGase F, O-Glycosidase, α -2(3,6,8,9) Neuraminidase, β (1-4)Galactosidase and β -N-Acetylglucosaminidase were introduced for total deglycosylation. For N-deglycosylation, only PNGase F was introduced while it was omitted for O-deglycosylation. The enzymatic deglycosylation was performed for 3 h at 37°C. Total, N- and O- deglycosylated proteins were then processed for SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membrane. Western blot analyses were done using the N- and C-terminal antibodies as described above. Total deglycosylated proteins were also processed for 2D analysis as described below.

3.4.6 Identification of bovine Spam1

The presence of p80 was assessed on protein extracts from epididymal fluid, as well as on epididymal and ejaculated spermatozoa by western blot after 1-dimension SDS-PAGE as previously described[11] and on proteins extracts from testis germ cells and from the soluble fractions of bovine ejaculated spermatozoa after 2-dimension electrophoresis. One hundred micrograms of proteins from testicular germ cells, deglycosylated and non-deglycosylated sperm proteins were first precipitated in trichloroacetic acid (TCA) and resuspended in isoelectric focusing buffer containing 8 M urea, 4% CHAPS, 0.5% IPG buffer (Amersham), 50 mM DTT, and Bromophenol blue. The proteins were then separated on an 3-10 linear pH gradient Immobiline Dry-Strip according to the manufacturer's instructions (IPGphor IEF System; Amersham). For the second dimension, the proteins were separated on 7.5% SDS-polyacrylamide gels. The gels were processed for Coomassie G-250 blue staining or transferred onto nitrocellulose for western blot analysis as previously described. The positive spots revealed by western blot were identified on the stained gel and excised for MALDI-TOF and LC-MS/MS analysis (Service de protéomique de l'Est du Québec, QC, Canada).

3.4.7 RNA isolation, first strand cDNA synthesis, and PCR amplification

To confirm the amino acid sequence of the C-terminal portion of the protein, total RNA from bull testis, caput, corpus and cauda epididymides were extracted using TriZol reagent according to the manufacturer's protocol. The RNAs were treated with RNase-free DNase; reverse transcription was done using the Superscript III using 100 ng of RNA and polyd(T)12-18 as the starting primer, according to the manufacturer's protocol. Polymerase chain reactions were performed with 2 µl of first strand cDNA using 200 µM dNTPs, 250 µM of forward (Frap-for 5'-GAYTTYAGAGCACCYCCYCTNAT-3') and the reverse primers p81int-rev (5'-CCAGGTAGGCCTCCAGTTTTTC-3') or p80 3'ORF (5'-AATGGATCCTTAATAGGTTGTTTG-3'), 3% DMSO in a final reaction volume of 50 µl containing 1 unit of Phusion DNA polymerase (NEB). PCR was performed for 35 cycles (10 s denaturation at 98°C, 30 s annealing at 60°C and 30 s elongation at 72°C) after an initial denaturation step of 30 s at 98°C. This was completed by a further 10 min elongation

at 72°C with the Taq DNA polymerase. PCR amplifications were visualized on 1% agarose gel.

3.5 Results

3.5.1 Characterization of the bull Spam1 antibodies

In order to predict the orientation of bovine Spam1 in the sperm membrane, we first had to determine which domain of the protein was recognized by our antibodies. Western blot analysis on recombinant proteins corresponding to the N- or C-termini of bull Spam1 clearly showed that the monoclonal 203-7D10 antibody strictly recognized the N-terminal portion of bull Spam1 (figure 3.2A, lane 2) while our rabbit polyclonal anti-p80 antibody strictly recognized the C-terminal portion of the protein (figure 3.2B, lane 3). Specific detection of the recombinant protein by the antibodies was confirmed using the anti-His-tag antibody which detected both recombinant proteins by their histidine tail in transformed cells and failed to detect any proteins in non-transformed induced bacteria (figure 3.2C, lane 1). These results indicated that both antibodies recognized either one side or the other of bovine Spam1 transmembrane domain; with 203-7D10 specific to the hyaluronidase domain (N-terminal) and anti-p80 specifically directed to the C-terminal domain of bovine Spam1, which contained the putative O-linked glycosylation stretch (figure 3.1). Therefore, these 2 antibodies are now referred to as the N-term and C-term antibodies, respectively.

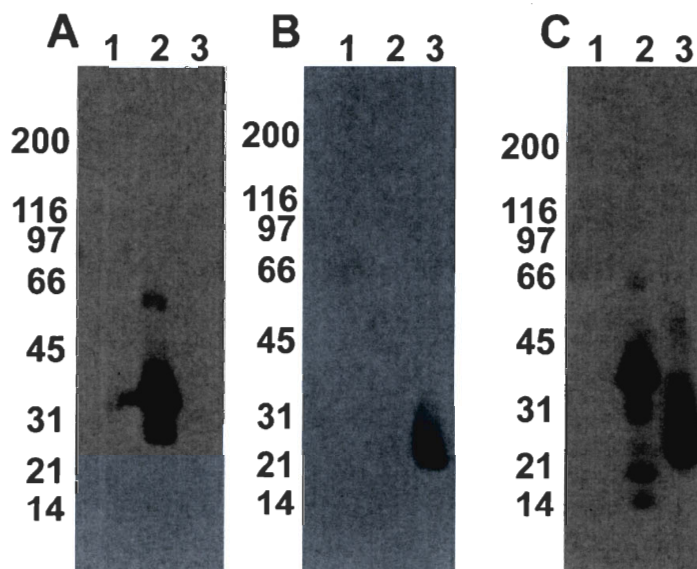


Figure 3.2: Identification of the recognition domain by the 203-7D10 monoclonal antibody (now referred to as N-terminal antibody) (A) and anti-p80 polyclonal (C-terminal) antibody (B) by western blot on cell lysate from non-transformed (lane 1) or transformed bacteria with either the N-terminal (lane 2) or C-terminal portion (lane 3) of p80. Ten micrograms of total protein from each cell lysate were subjected to SDS-PAGE. An anti-His-tag antibody was used to monitor the protein expression by the transformed cells (C). The molecular weight standards are indicated on the left of each panel.

3.5.2 Orientation of bovine Spam1 within the sperm membrane

The orientation of bull Spam1 in the membrane of ejaculated sperm was assessed by indirect immunofluorescence on permeabilized or non-permeabilized cells. Using the monoclonal N-terminal antibody, which recognizes the hyaluronidase domain, a positive signal was observed in the post-acrosomal portion of the untreated living sperm (figure 3.3). When the cells were fixed and permeabilized, the N-terminal antibody also displays a positive staining in the acrosomal area. Conversely, our C-terminal antibody, directed against the amino acids 535-550 of the protein, detected the protein strictly in the acrosomal portion of permeabilized spermatozoa (figure 3.3). This antibody failed to detect any bovine Spam1 in the post-acrosomal region of the head in both permeabilized and non-permeabilized living sperm. No signal was detected when commercial mouse or rabbit IgGs were used as negative control (not shown).

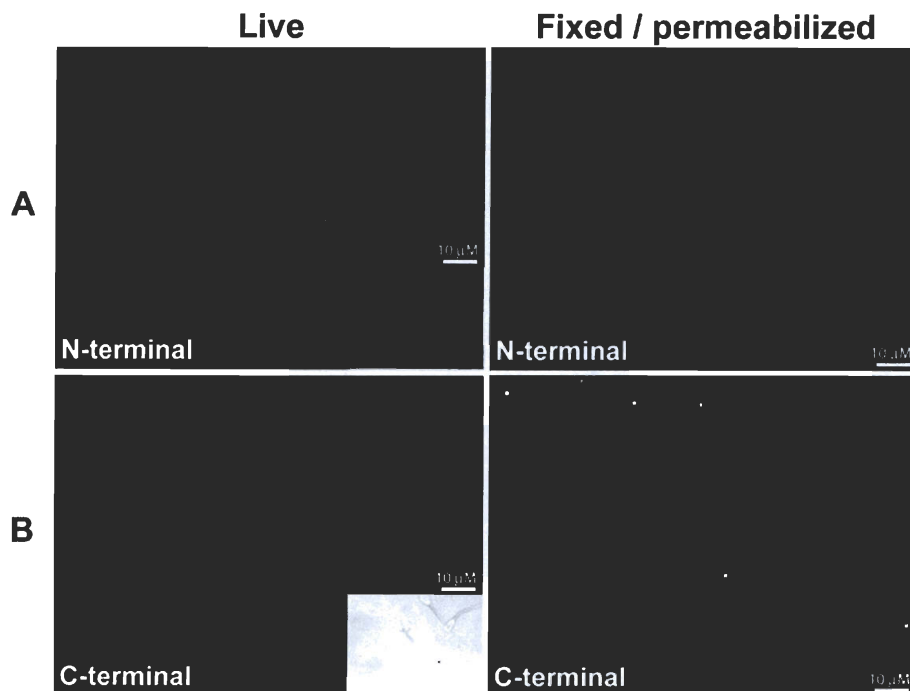


Figure 3.3: Immunolocalization of Spam on bull spermatozoa. Washed ejaculated sperm, either live or fixed/permeabilized, were incubated with the N-terminal (lane A) or C-terminal (lane B) antibodies. Immune complexes were revealed using an AlexaFluor488-conjugated goat anti-mouse IgG (lane A) or a FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (lane B). Magnifications of 1000 X. No signal was obtained when concomitant samples were incubated with commercial mouse or rabbit IgGs as negative controls (not shown).

3.5.3 Protein purification and identification

The inability of the C-terminal polyclonal antibody to detect any protein in the post-acrosomal area of fixed/permeabilized sperm suggests that the two antibodies recognize different proteins. Affinity chromatography columns were prepared with the IgGs from each antibody to enrich their antigenic protein for identification. As shown in figure 3.4, a major 80 kDa protein was enriched when the cytosoluble fraction of ejaculated sperm was subjected to the affinity column coupled to the polyclonal C-terminal antibody (figure 3.4, lane 1) while 2 major bands, closely migrating at 80 and 70 kDa, were enriched using the affinity column coupled to the monoclonal N-terminal antibody (figure 3.4, lane 2). These results were confirmed by western blot on sperm cytosoluble proteins separated by 2-D electrophoresis. Two different spots were detected using the N-terminal antibody while only one, the heaviest, was detected when the same membrane was reprobated with the C-terminal antibody (figure 3.5A & B). These two bands did not result from different

glycosylation patterns of the proteins as 2-D electrophoresis of deglycosylated soluble sperm proteins also revealed isoforms of different mass when subjected to the monoclonal N-terminal or polyclonal C-terminal antibodies (data not shown).

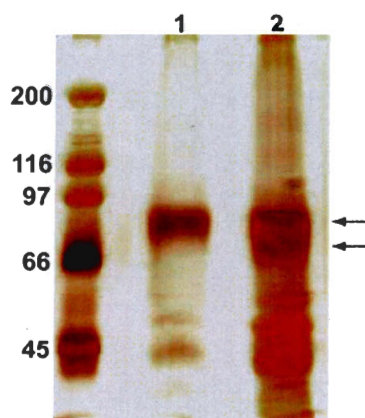


Figure 3.4: Affinity-purification of Spaml1 from the soluble fraction of ejaculated bull spermatozoa. Proteins were deposited on an affinity column coupled to either the C-terminal (1) or to N-terminal antibody (2). The position of the two major enriched proteins of 80 and 70 kDa, recognized by the antibodies by western blot are indicated by the arrows. The molecular weight standards are indicated on the left.

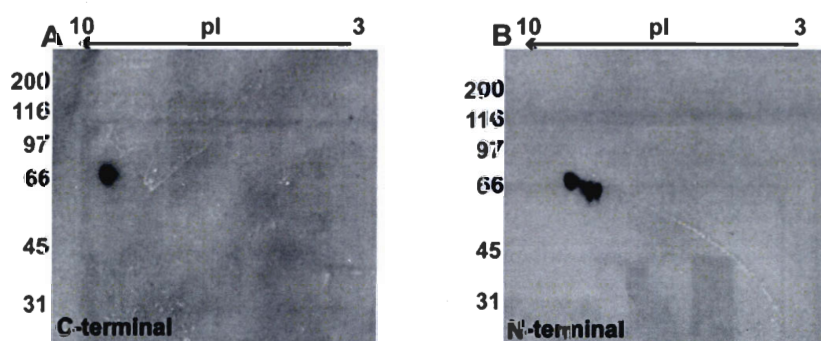


Figure 3.5: Immunodetection of the two Spaml1 isoforms from bull sperm cytosoluble proteins using the C-terminal (A) or the N-terminal (B) antibodies. Sperm proteins (100 μ g) were subjected to 2-D electrophoresis then transferred onto nitrocellulose membranes in order to perform Western blot analysis. The molecular weight standards and pI are indicated on each panel.

Experiments were next performed to determine whether both forms of the protein share the same origin. Bi-dimensional electrophoreses were performed on bull testicular germ cells to investigate whether the two forms are expressed in the testis and, most likely, during spermatogenesis. As expected, results clearly show the C-terminal antibody detecting a single protein as observed in sperm, which correspond to the heaviest form of

the protein (figure 3.6A). When the N-terminal monoclonal antibody was used, although several other non-related protein spots of lower molecular weight were seen, only the same form of Spaml was detected (figure 3.6B) suggesting that the smallest form is not expressed during spermatogenesis. As the N-terminal antibody is not specifically raised against bull Spaml, other testicular proteins, the identity of which is unknown, reacted with the antibody. Experiments were next designed to determine whether the smaller form of the protein originates from the epididymis and then binds to sperm during their epididymal transit. Western blots were performed on epididymal spermatozoa and fluid. As shown in figure 3.7C and 3.7D, the N-terminal antibody recognized the protein in both sperm and fluid from the epididymis while the C-terminal antibody failed to detect p80 in the epididymal fluid (figure 3.7A).

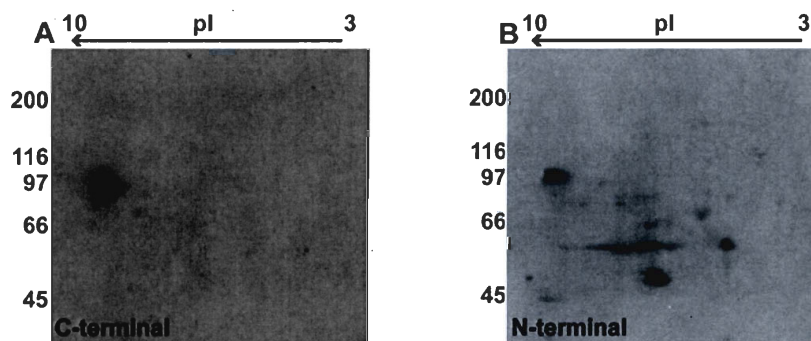


Figure 3.6: Immunodetection of the two Spaml isoforms from testicular germ cells proteins. 100 μ g of total proteins extracted from testicular germ cells were subjected to 2-D electrophoresis, transferred onto nitrocellulose membranes and probed with the C-terminal (A) or N-terminal (B) antibodies. The molecular weight standards and pI are indicated on each panel.

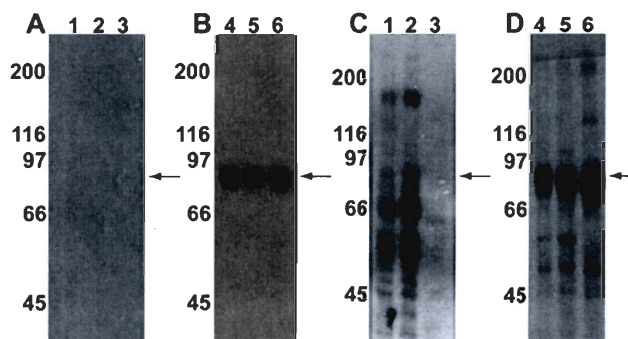


Figure 3.7 : Western blot detection of the two isoform of Spaml in protein extracts from the fluid (line 1,2 and 3) and sperm (line 4,5 and 6) obtained from the caput, corpus, and cauda epididymis. Protein extracts from 10^6 sperm cells or epididymal fluid samples (20 μ g) were separated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and probed

with the C-terminal (A and B) or N-terminal (C and D) antibodies. The molecular weight standards (kDa) are indicated on the left of each panel.

These results were confirmed by PCR on cDNA prepared from the testis and the caput, corpus and cauda epididymal tissues. As expected, a 350 bp product from the hyaluronidase domain of the protein was detected in the testis as well as in the three parts of the epididymis (figure 3.8). Unlike what was observed in the testis, in none of the epididymal regions, was a PCR product amplified (1500 bp) when the reverse oligonucleotide primer was designed at the end of the coding sequence of the bull Spam1 protein, where the immunizing peptide for the C-Terminal antibody was designed (figure. 3.8). This suggests that the testicular and the epididymal proteins have a different C-terminal domain.

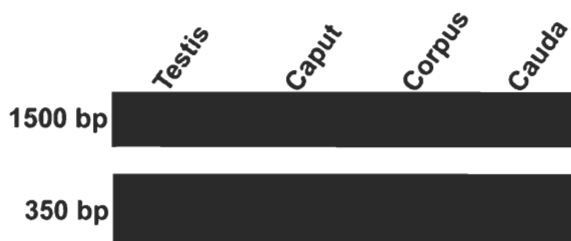


Figure 3.8: PCR amplification of the cDNA encoding for the full length (1500 bp, upper lane) and a portion of the hyaluronidase domain of the Spam1 protein (350 bp, bottom lane). The RNA isolated from bull testis or caput, corpus and cauda epididymides were treated with RNase-free DNase and reverse transcribed using a poly d(T)₁₂₋₁₈ oligonucleotide primer. Fragment of the bovine β -actin cDNA was amplified to certified the amount of cDNA used in each condition (not shown).

In order to clearly identify the two forms of the protein, 2-D electrophoresis was performed on bull cytosoluble sperm protein fraction followed by LC/MS-MS analyses on the two spots identified by the two antibodies (figure 3.9). The peptides obtained were compared to the amino acid sequences of p80[11] and soluble testicular bovine hyaluronidase previously reported[32]. As shown in table 3.1, the 80 kDa protein generated 39 unique peptides that positively matched to the bovine Spam1 amino acid sequence with 43% coverage. When compared to the soluble testicular hyaluronidase, 38 unique peptides were present in the sequence, corresponding also to a 43% coverage. In contrast, the 70 kDa protein yielded 31 unique peptides that covered 38% of the amino acid sequence of p80 and 34 peptides that covered 40% of the soluble testis hyaluronidase. The

low yield of protein coverage could be explained by the fact that ejaculated bull Spam1 is N- and O-glycosylated (figure 3.10). This could either interfere with the cleavage process during the enzymatic digestion of the protein or strongly affect the mass of the resulting peptides that would not match any mass in proteome databases. The peptides from the 70 kDa strictly matched to common sequence shared by the bovine Spam1 and the soluble testis hyaluronidase whereas 3 peptides from the 80 kDa proteins corresponded to the amino acids 529-548 of bovine Spam1, which is specific to the protein and absent from the soluble testis hyaluronidase (Table 3.1).

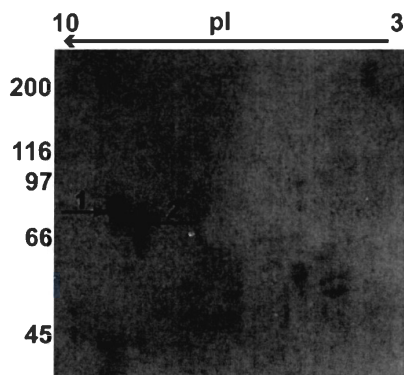


Figure 3.9: Identification of the proteins selected for LC/MS/MS analysis. Bull sperm cytosolic proteins (100 μ g) were separated by 2-D electrophoresis and stained with Coomassie blue G-250. The 80 kDa protein recognized by both the N- and C-terminal antibodies and the 70 kDa detected only by the N-terminal monoclonal antibody were excised from the gel and subjected for LC/MS-MS analysis at the Centre de Proteomique de l'Est du Québec.

Unique peptides identified	Protein 1 (80 kDa)	Protein 2 (70 kDa)	Amino acids p80	Amino acids Soluble Hyase
RFQLPPDLR	X	X	64-72	64-72
FQLPPDLR	X	X	65-72	65-72
FQLPPDLRLFSVK	X		65-77	65-77
FQLPPDLRLFSVKGSPQK	X		65-82	65-82
LFSVK	X	X	73-77	73-77
LFSVKGSPQK	X	X	73-82	73-82
GSPQK	X		78-82	78-82
GSPQKSATGQFITLFYADR	X	X	78-96	78-96
LGYYPHIDEK	X	X	97-106	97-106
GYYPHIDEKTKG	X	X	98-109	98-109
TGKTVFGGIPQLGNLK	X	X	107-122	107-122
TVFGGIPQLGNLK	X	X	110-122	110-122
TVFGGIPQLGNLKSHEK	X	X		110-127
DVYRDESVLVLQK	X	X	163-176	163-176
DESVLVLQK	X	X	167-176	167-176
NPQLSFPEASK	X	X	177-187	177-187
NPQLSFPEASKIAK	X	X	177-190	177-190
IAKVDFETAGK	X	X	188-198	188-198
IAKVDFETAGKSFMQETLK	X		188-206	188-206
VDFETAGK	X	X	191-198	191-198
VDFETAGKSFMQETLK	X	X	191-206	191-206
VDFETAGKSFMQETLKLKG	X	X	191-209	191-209
SFMQETLK	X	X	199-206	199-206
SFMQETLKLKG	X	X	199-209	199-209
ESTALFPSVYLNIR	X	X	256-269	256-269
LKSTQNAALYVR	X	X	270-281	270-281
STQNAALYVR	X	X	272-281	272-281
NRVQEAIR	X	X	282-289	282-289
NRVQEAIRLSK	X	X	282-292	282-292
VQEAIR	X	X	284-289	284-289
VQEAIRLSK		X		284-292
IASVESPLPVFVYAR	X	X	293-307	293-307
MCSQVLCHNEGVCTR	X	X	377-391	377-391
MCSQVLCHNEGVCTRK	X	X	377-392	377-392
YTVPGTVTLEDLQK	X	X	417-430	417-430
FSDTFYCSCYANIHC	X	X	431-446	431-446
KRVDIK	X		447-452	447-452
NVHSVNVCMACIDISPVK		X		453-472
LQPSDHSSSQK	X			473-483
HSPECLK	X	X	509-515	510-516
ACQSVKLG	X		529-536	
LKNISYQSPIQNIK	X		535-548	
NISYQSPIQNIK	X		537-548	

Tableau 3.1: Peptide identified from the 80 and 70 kDa protein by LC/MS/MS analysis that were positively mapped either on the p80 or the commercial soluble bull testis hyaluronidase sequence

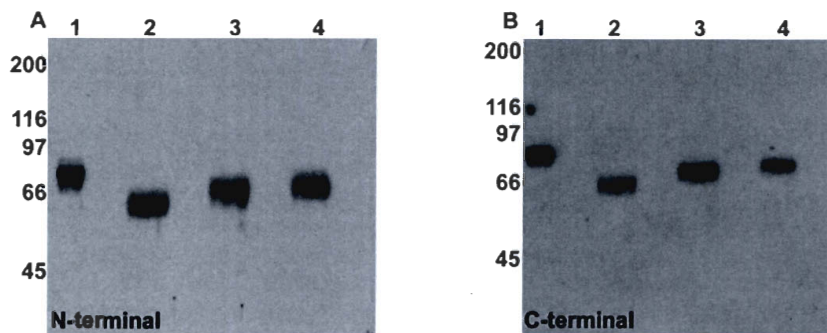


Figure 3.10: Immunodetection of the cytosoluble fraction of ejaculated spermatozoa before (lane 1) or after total (lane 2), N- (lane 3) and O-deglycosylation (lane 4). Protein extracts were treated with PNGase F, O-Glycosidase, α -2(3,6,8,9) Neuraminidase, β (1-4)Galactosidase and β -N-Acetylglucosaminidase for total deglycosylation. For N-deglycosylation, PNGase F was introduced alone while for O-deglycosylation, only PNGase F was omitted. Sperm proteins were separated by SDS-PAGE, transferred on nitrocellulose membrane and probe with the N-terminal (A) or C-terminal (B) antibodies. Molecular weight markers (kDa) are indicated on the left.

3.6 Discussion

The original goal of this study was to determine the orientation of the bovine Spam1, previously named p80 or bull PH-20 protein, within the sperm membrane, in order to understand how the protein could act as a hyaluronidase and as a putative zona pellucida binding protein. As previously reported, Spam1 can play these two roles through domains located in the N-terminal and C-terminal portion of the protein, respectively[17]. According to the bovine Spam1 deduced amino acid sequence (GenBank accession number #AY781776), the two sites would be separated by a transmembrane domain located between amino acids 330 and 348 of the protein[11]. This was confirmed using two different antibodies, a monoclonal one directed against the N-terminal (hyaluronidase) and a custom-made polyclonal one directed against the C-terminal end of the protein.

When sperm were submitted to indirect immunolocalisation as living cells, without fixation/permeabilisation treatment, bull Spam1 was detected in the post-acrosomal region of the sperm head, only when the monoclonal antibody directed against the N-terminal portion of the protein was used. This result indicates that the hyaluronidase domain of bull Spam1 is expressed at the surface of the post-acrosomal region of the head to promote its interaction with the hyaluronic acid present in the cumulus surrounding the egg. Conversely, the C-terminal portion of the protein was detected only on fixed/permeabilized cells and restricted to the acrosomal region of the head. Interestingly, the antibody directed against the N-terminal portion of the Spam1 protein, detected the protein in the same area of fixed/permeabilized sperm. Capacitation and acrosome reaction did not have an influence on the detection pattern of the proteins using the N-and C-terminal antibody (data not shown). These results clearly suggest that, in the sperm acrosomal area, both the N- and C-terminal portions of bovine Spam1 are present in the intracellular side of the membrane. On the other hand, it could not be determined whether or not these two parts of the protein are separated by the inner or outer acrosomal membrane. Transmission electron microscopy associated with indirect immunogold approaches were attempted to solve that question without any success.

Surprisingly, no signal was detected in the post-acrosomal region of the sperm head when the antibody directed against the C-terminal portion of the protein was used with or without membrane permeabilization treatment. Two hypotheses can explain this discrepancy. First, the antibody directed against Spam1 N-terminus recognizes two proteins that differ in their C-terminus; second; a sub-population of the protein, present in the post acrosomal region of the sperm head lost its C-terminal domain through an endoproteolytic action or other mechanism that needs to be further investigated. To solve this question, sperm proteins were enriched on affinity columns coupled with either of the two antibodies. And as shown in figure 3.4, the N-terminal antibody clearly bound to two proteins whereas only one was observed when the affinity column was coupled to the C-terminal antibody. This result is in complete agreement with results obtained by Western blots after the 2-D electrophoresis of sperm proteins. The antibody directed against the N-terminus detected an 80 and a 70 kDa proteins whereas the C-terminus antibody detected strictly the 80 kDa protein. Differences between the two proteins recognized by the antibodies were also noted when sperm cytosolic fraction was subjected to N- and O-deglycosylation treatment prior to 2-D electrophoresis. This latter result clearly indicates that a difference in the glycosylation patterns does not explain the difference in the proteins detected by the two antibodies and does not support the idea that glycosylation could mask the antigenic sites in the C-terminal domain of the protein in the sub-population of Spam1 located in the sperm post-acrosomal region.

The next step was to determine the origin of the difference between the two proteins recognized by the antibodies directed against the N-terminal (hyaluronidase) and C-terminal domains of bull sperm Spam1. Because the entire coding sequence of bovine Spam1 was obtained from the RNA isolated from the testis as well as from haploid germ cells[11], testicular germ cells were first investigated. After 2-D gel electrophoresis of testicular germ cell proteins, the two antibodies recognized the same protein, which corresponded to the one detected by the C-terminal antibody in ejaculated sperm (compare figures 3.5A vs 3.6A and B). This suggests that the 70 kDa protein recognized only by the N-terminal antibody in mature spermatozoa does not originate from the testis during spermatogenesis. Since it has been demonstrated in mouse that spam1 (mouse PH-20) is

also secreted by the epididymis and binds to sperm via a lipid anchor[12, 33], we next investigated whether the 70 kDa form of proteins present on bull sperm post-acrosomal surface originates from the epididymis. As previously shown[11], the antibody directed against the protein N-terminus, detected the protein in the fluid as well as in the sperm cells whereas the antibody directed against the C-terminal portion of bovine Spam1 only detected the protein extracted from the sperm cells (figure 3.7). This result therefore suggests that the epididymis, mostly in the caput and corpus sections, secretes a Spam1 protein with a C-terminus different from the one produced in the haploid germ cells. This is further supported by the absence of PCR amplification of the entire coding sequence of bull sperm Spam1 using the cDNA synthesized from the caput, corpus or cauda epididymis while amplification of a 350 bp sequence from bull sperm Spam1 hyaluronidase domain was successfully achieved (figure 3.8). According to the results presented in this study, the protein secreted by the epididymal cells would bind to the post-acrosomal surface of the sperm head. How would this protein be integrated in the sperm membrane remains to be elucidated since no GPI-anchor is found on bovine Spam1 [10, 11].

It was important to determine how similar the two proteins recognised by the N-terminal antibody are, and to characterize the differences between these two forms. As revealed by the LC/MS-MS analysis, most of the peptides generated by the two enzymes, trypsin and Endo-Lys C, were present within the deduced amino acid sequence of the previously published bovine Spam1[11], confirming its accuracy. Furthermore, as reported and clearly shown in the present study (figure 3.10), bull Spam1 is highly N- and O-glycosylated, which explains the relatively low percentage of protein coverage (~40%) in the LC/MS-MS experiments. There was no peptide with a significant match in the protein domains putatively N- or O-glycosylated (8 and 14 putative sites, respectively)[11]. When the 70 and 80 kDa proteins were compared, most of the generated peptides were shared by the two proteins, confirming the high degree of identity. When compared with the 80 kDa protein, although the 70 kDa protein lacks a few peptides of bull Spam1, the most striking difference between the two proteins is the absence of peptides corresponding to the C-terminal part, amino acids 529-548 of the published bovine Spam1 sequence[11] when the 70 kDa protein was analyzed. The amino acid sequence of a commercial bull testis soluble

hyaluronidase has been reported[32] and, when compared with the bovine Spam1 sequence, is 19 amino acid shorter and differs in its C-terminal end, from amino acid 519 to amino acid 534. Unfortunately, because of its amino acid composition and the proteolytic enzymes used, we could not expect any peptide matching the C-terminal sequence of the soluble testis hyaluronidase.

On the other hand, whether the epididymal secreted protein with a different C-terminal domain results from alternate splicing would require further study. When the bovine Spam1 nucleotide sequence was aligned on the complete bovine genome sequence, it mapped from 99 to 100% on chromosome 4 in its three exons. No other significant DNA sequences were matched on any other chromosome. On the other hand, the entire *Bos taurus* genome sequence predicts a protein similar (68%) to Spam-1, XP_586790.3, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) composed of 550 amino acids, which is also encoded on the chromosome 4. However, most of the peptides obtained in the LC/MS-MS experiment were not found within the amino acid sequence of this predicted protein. Therefore, as the common sequence shared by both 80 and 70 kDa proteins matched only to the unique sequence (of 3 exons) in the bovine genome, alternate splicing could be responsible for the shorter 70 kDa protein as has previously demonstrated for Spam1[33]. Another possibility would be that bovine Spam1 undergoes post-translational modification, such as proteolytic cleavage during sperm epididymal maturation as previously shown for rat Spam1(rat 2B1)[34].

This study clearly demonstrates that there are two forms of Spam1 in the bovine sperm head. One is located in the intracellular side of the anterior sperm head membrane and is expressed during spermatogenesis, and the second one located on the post-acrosomal region of the head with its hyaluronidase domain facing the environment. We suggest that bull Spam1 present in the anterior part of the head is located inside the plasma membrane and on the inner acrosomal membrane, and would be exposed as spermatozoa undergo the acrosome reaction. It would then interact with the zona pellucida as previously demonstrated in some species[17]. PH-20 present in the post-acrosomal region would interact with the hyaluronic acid present in the cumulus matrix. This protein population

would be secreted by the epididymal fluid and would be transferred to sperm during its transit through the epididymis. In this study, the deduced amino acid sequence of bovine Spam1 obtained from 3'/5'-RACE[11] was confirmed by the LC/MS/MS peptide mapping. The exact C-terminal amino acid sequence of the epididymal protein as well as the mechanisms involved in its binding to sperm plasma membrane is presently under investigation.

3.7 Acknowledgements

The authors are thankful to Mr G. Frenette for his technical advices on protein isolation and also to l'Alliance Semex Inc. for the kind donation of freshly ejaculated bull semen.

3.8 References

1. Myles DG, Primakoff P. Localized surface antigens of guinea pig sperm migrate to new regions prior to fertilization. *J Cell Biol* 1984; 99: 1634-1641.
2. Thaler CD, Cardullo RA. Biochemical characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked hyaluronidase on mouse sperm. *Biochemistry* 1995; 34: 7788-7795.
3. 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.
4. Overstreet JW, Lin Y, Yudin AI, Meyers SA, Primakoff P, Myles DG, Katz DF, Vandevort CA. Location of the PH-20 protein on acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa of cynomolgus macaques. *Biol Reprod* 1995; 52: 105-114.
5. ten Have J, Beaton S, Bradley MP. Cloning and characterization of the cDNA encoding the PH20 protein in the European red fox *Vulpes vulpes*. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 165-172.
6. Gmachl M, Sagan S, Ketter S, Kreil G. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett* 1993; 336: 545-548.
7. Meyers SA. Equine sperm-oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. *Anim Reprod Sci* 2001; 68: 291-303.
8. Day AE, Quilter CR, Sargent CA, Mileham AJ. Characterization of the porcine sperm adhesion molecule gene SPAM1- expression analysis, genomic structure, and chromosomal mapping. *Anim Genet* 2002; 33: 211-214.
9. Fleming JS, Yu F, McDonald RM, Meyers SA, Montgomery GW, Smith JF, Nicholson HD. Effects of scrotal heating on sperm surface protein PH-20 expression in sheep. *Mol Reprod Dev* 2004; 68: 103-114.
10. Lalancette C, Dorval V, Leblanc V, Leclerc P. Characterization of an 80-kilodalton bull sperm protein identified as PH-20. *Biol Reprod* 2001; 65: 628-636.
11. Morin G, Lalancette C, Sullivan R, Leclerc P. Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 523-534.
12. Deng X, He Y, Martin-DeLeon PA. Mouse Spam1 (PH-20): evidence for its expression in the epididymis and for a new category of spermatogenic-expressed genes. *J Androl* 2000; 21: 822-832.
13. Zhang H, Morales CR, Badran H, El-Alfy M, Martin-DeLeon PA. Spam1 (PH-20) Expression in the Extratesticular Duct and Accessory Organs of the Mouse: A Possible Role in Sperm Fluid Reabsorption. *Biol Reprod* 2004; 71: 1101-1107.
14. Zhang H, Martin-DeLeon PA. Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: evidence for its expression in the female reproductive tract. *Biol Reprod* 2003; 69: 446-454.
15. El Hajjaji H, Cole AA, Manicourt DH. Chondrocytes, synoviocytes and dermal fibroblasts all express PH-20, a hyaluronidase active at neutral pH. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R756-768.
16. Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* 1994; 125: 1157-1163.

17. Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol Reprod* 1996; 55: 80-86.
18. Yudin AI, Vandevoort CA, Li MW, Overstreet JW. PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 1999; 53: 350-362.
19. Myles DG, Hyatt H, Primakoff P. Binding of both acrosome-intact and acrosome-reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during in vitro fertilization. *Dev Biol* 1987; 121: 559-567.
20. Primakoff P, Hyatt H, Myles DG. A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* 1985; 101: 2239-2244.
21. Martin-DeLeon PA. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250: 114-121.
22. Phelps BM, Primakoff P, Koppel DE, Low MG, Myles DG. Restricted lateral diffusion of PH-20, a PI-anchored sperm membrane protein. *Science* 1988; 240: 1780-1782.
23. Seaton GJ, Hall L, Jones R. Rat sperm 2B1 glycoprotein (PH20) contains a C-terminal sequence motif for attachment of a glycosyl phosphatidylinositol anchor. Effects of endoproteolytic cleavage on hyaluronidase activity. *Biol Reprod* 2000; 62: 1667-1676.
24. Zhang H, Martin-DeLeon PA. Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J Androl* 2003; 24: 51-58.
25. Phelps BM, Myles DG. The guinea pig sperm plasma membrane protein, PH-20, reaches the surface via two transport pathways and becomes localized to a domain after an initial uniform distribution. *Dev Biol* 1987; 123: 63-72.
26. Cowan AE, Primakoff P, Myles DG. Sperm exocytosis increases the amount of PH-20 antigen on the surface of guinea pig sperm. *J Cell Biol* 1986; 103: 1289-1297.
27. Myles DG, Koppel DE, Cowan AE, Phelps BM, Primakoff P. Rearrangement of sperm surface antigens prior to fertilization. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 513: 262-273.
28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
29. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4354.
30. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38: 1171-1180.
31. Harlow Ed LD. Antibodies: A Laboratory Manual. In. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988: 519-523.
32. Meyer MF, Kreil G, Aschauer H. The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme. *FEBS Lett* 1997; 413: 385-388.
33. Zhang H, Martin-DeLeon PA. Mouse epididymal Spam1 (PH-20) is released in vivo and in vitro, and Spam1 is differentially regulated in testis and epididymis. *Biol Reprod* 2001; 65: 1586-1593.
34. Jones R, Ma A, Hou ST, Shalgi R, Hall L. Testicular biosynthesis and epididymal endoproteolytic processing of rat sperm surface antigen 2B1. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 10): 2561-2570.

Chapitre 4 / Chapter 4

Étude des fonctions de la PH-20 bovine, une protéine requise pour la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide entourant l'ovule

Functional role of the bovine PH-20; a protein required for sperm binding to the egg's zona pellucida

Guillaume Morin, Isabelle Laflamme, Claude Robert, Robert Sullivan et Pierre Leclerc

Le contenu de ce chapitre sera soumis pour publication dans la revue "Reproduction"

The content of this chapter will be submitted to the journal "Reproduction"

4.1 Résumé

Nous avons précédemment caractérisé la protéine spermatique bovine PH-20 (p80) et avons démontré qu'elle possédait une activité hyaluronidase ainsi que des sites potentiels de phosphorylation sur ses résidus tyrosine. Il fut démontré que PH-20 peut interagir avec l'acide hyaluronique. Cette interaction favorise la réaction de l'acrosome et provoque une augmentation des concentrations en calcium intracellulaire chez le spermatozoïde (SPZ). Dans cet article, nous avons évalué l'état de phosphorylation des résidus tyrosine de la PH-20 bovine au cours de la capacitation et de la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes. Nous avons aussi vérifié si l'acide hyaluronique produit un effet sur les concentrations de calcium intracellulaire chez les spermatozoïdes bovins et si PH-20 peut influencer cet effet. Finalement, nous avons déterminé le rôle de PH-20 au cours de l'interaction entre les spermatozoïdes et la zone pellucide (ZP) au cours de la fécondation. L'analyse des résultats obtenus montre que PH-20 n'est pas phosphorylée sur ses résidus tyrosines au cours de la capacitation ou de la réaction de l'acrosome. De plus, l'acide hyaluronique n'a aucun effet sur la modulation du calcium intracellulaire chez le spermatozoïde bovin. D'autre part, le relâchement du calcium intracellulaire des réservoirs induit par la thapsigargin n'est pas affecté par la présence ou l'absence d'acide hyaluronique dans le milieu. Quant aux essais d'interaction SPZ/ZP, les résultats démontrent que PH-20 est impliquée dans la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide via le domaine C-terminal de la protéine. La présence de PH-20 purifiée diminue la liaison SPZ/ZP de 50% alors que la présence de l'anticorps reconnaissant l'extrémité C-terminale de PH-20 produit une inhibition de liaison de 85%. De plus, les expériences de déglycosylation démontrent que le pouvoir inhibiteur de PH-20 purifiée lors des essais de compétition n'est pas relié aux structures carbohydrates retrouvées sur celle-ci. Les résultats présentés dans cet article démontrent clairement que la PH-20 bovine n'est pas phosphorylée sur ses résidus tyrosines et n'est pas impliquée dans les événements signalétiques qui affectent la modulation du calcium intracellulaire. Toutefois, les résultats démontrent l'importance de PH-20 lors de la liaison des spermatozoïdes bovins à la zone pellucide de l'ovule au cours des événements de fécondation.

4.2 Abstract

We have previously characterized the bull sperm PH-20 protein (p80) and found that it possesses hyaluronidase activity and potential tyrosine phosphorylation sites. PH-20 has been reported to interact with hyaluronic acid. This interaction promotes acrosome reaction and increases intracellular calcium concentration in spermatozoa. In this paper, we have evaluated the capacity of bull PH-20 to phosphorylate during capacitation and acrosome reaction. We also have determined if hyaluronic acid has an effect on bull sperm intracellular calcium concentration and if PH-20 could mediate this effect. Finally, we have evaluated the implication of PH-20 in the interaction between bull spermatozoa and the zona pellucida during the fertilization process. Here we report that bull PH-20 is not phosphorylated on tyrosine residues either during sperm capacitation or acrosome reaction. Similarly, hyaluronic acid does not affect intracellular calcium modulation. Moreover, liberation of calcium from their intracellular storage by thapsigargin was not affected whether spermatozoa were incubated with or without hyaluronic acid. On the other hand, PH-20 is implicated in the binding of bovine spermatozoa to the zona pellucida via its C-terminus since the sperm purified protein inhibits the interaction by 50% and the antibody directed against the C-terminal domain of the protein inhibits the interaction by 85%. Carbohydrate moieties of the protein are not required during sperm/zona binding since deglycosylation of the purified protein has no effect on its inhibition action. This paper clearly demonstrates that bovine PH-20 is not tyrosine phosphorylated or required in signalling events that affect intracellular calcium but is important for the sperm binding of to the zona pellucida during fertilization.

4.3 Introduction

In order to fertilize the egg, capacitated spermatozoa must go through the cumulus matrix surrounding the oocyte with the help of the hyaluronidase present on its surface. Spermatozoa will next bind to zona pellucida (primary binding) and undergo the exocytotic event known as the acrosome reaction (Florman Harvey 2006; Yanagimachi 1994). This event is mainly characterized by the fusion of the plasma membrane with the outer acrosomal membrane, which results in the release of the acrosomal content in the extracellular environment and exposes the inner acrosomal membrane to the surface. Acrosome reacted spermatozoa will bind again to the zona pellucida via its inner acrosomal membrane (secondary binding) and will penetrate it. Spermatozoa found in perivitelline space would finally be able to bind and fuse with the oocyte plasma membrane (Florman Harvey 2006; Yanagimachi 1994).

Many proteins have been proposed to play a role in one or many part of this phenomenon. Among all, PH-20, also termed Spam1, is one of the most conserved protein of the sperm membrane (Lathrop et al. 1990; Martin-DeLeon 2006) that is required during the fertilization process. First identified in guinea pigs (Myles and Primakoff 1984), PH-20 is now identified in many species including mouse (Thaler and Cardullo 1995), rat(2B1) (Shalgi et al. 1990), macaque (Overstreet et al. 1995), fox (ten Have et al. 1998), human (Gmachl et al. 1993), horse (Meyers 2001), pig (Day et al. 2002), sheep (Fleming et al. 2004) and cattle (p80) (Lalancette et al. 2001; Morin et al. 2005). The main roles played by this protein is to help sperm to cross the cumulus via its hyaluronidase activity (Gmachl et al. 1993; Hunnicutt et al. 1996; Lalancette et al. 2001; Lin et al. 1994; Yudin et al. 1999) and to allow acrosome reacted sperm to bind to the zona pellucida (Hunnicutt et al. 1996; Myles et al. 1987; Primakoff et al. 1985; Yudin et al. 1999). Moreover, those two functions are mediated by two independent domains of the protein: the hyaluronidase domain in the N-terminal portion of PH-20 and the zona binding domain in the C-terminal portion of the protein (Hunnicutt et al. 1996; Martin-DeLeon 2006). Inhibition of one domain does not have an impact on the function of the other since both domains are independent from each other (Hunnicutt et al. 1996).

In addition, PH-20 has also been reported to be implicated in signaling event in human and macaque. The first report comes from Vandervoort et al. who observed that the incubation of macaque spermatozoa in the presence of hyaluronic acid had a positive impact on the induction of acrosome reaction by zona pellucida (Vandervoort et al. 1997). Further studies in human demonstrated that this positive influence was mediated by the interaction of PH-20 with the hyaluronic acid since the improvement of the sperm acrosome reaction induced by hyaluronic acid was prevented by PH-20 antibody (Sabeur et al. 1998). Moreover, interaction of hyaluronic acid and PH-20 was associated with an increase in sperm intracellular calcium level (Cherr et al. 1999). This effect was mediated via an hyaluronic acid binding domain of the protein that was distinct from the catalytic hyaluronidase domain (Vines et al. 2001).

All these observation lead to the point that, PH-20, via its interaction with the hyaluronic acid present in the cumulus complex, would have a positive influence on signalling events leading to the acrosome reaction. We have identified the bovine sperm PH-20 in our laboratory and demonstrated that it has hyaluronidase activity (Lalancette et al. 2001; Morin et al. 2005). We have also demonstrated that two populations of PH-20 can be found on the sperm head. The first one is localized in the post-acrosomal portion of the head with its hyaluronidase domain facing the extracellular environment while the second is localized internally on plasma and acrosomal membrane; on the anterior region of the head (Morin et al. submitted paper). However, some functions of the bull PH-20 has not been studied yet, like its role during sperm/zona pellucida interaction. Also, our previous results in the laboratory indicated that bovine PH-20 could be phosphorylated on its tyrosine residues. Amino acid sequence reveals potential tyrosine phosphorylation sites (Morin et al. 2005). Bull PH-20 was also identified in sperm sub-cellular fraction enriched in tyrosine kinase activity obtained from Poly-Glu:Tyr(4:1)-agarose affinity chromatography of bull sperm proteins (Lalancette et al. 2006). Since tyrosine phosphorylation of sperm proteins is observed in the signalling events that occur during capacitation and acrosome reaction (Leclerc et al. 1996; Leclerc et al. 1997; Leclerc et al. 1998; Luconi et al. 1995; Tesarik et al. 1993; Visconti and Kopf 1998), it would be interesting to evaluate the phosphorylation potential of PH-20 during these events. Therefore, in the present study, we investigated the functional roles of bull sperm SPAM1

during both the signalling events preceding, as well as the sperm/zona interaction itself. The status of Spam1 tyrosine phosphorylation was determined during capacitation and acrosome reaction in addition to its potential role in sperm intracellular calcium modulation as it has been reported in primates.

4.4 Materials and Methods

ECL kit for western blot detection, donkey anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase (HRP) were from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC., Canada). Protein molecular weight standards were from BIORAD (Mississauga, ON., Canada). Nitrocellulose membrane (0.22 μm pore size) was from Micron Separations Inc. (Westboro, MA). Thapsigargin, hyaluronic acid, IBMX, calcium ionophore A23187, deglycosylation kit, non-immune mouse and rabbit IgGs, protease inhibitors (aprotinin, leupeptin, pepstatin A and PMSF) were from Sigma (St. Louis, MO). Goat-anti-mouse IgG coupled to HRP were from Jackson Immuno Research Laboratories Inc. (West Grove, PA) while goat-anti-rabbit IgG coupled to HRP were from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC., Canada). All other chemicals were from reagent grade unless specified. Indo-1/AM, Pluronic acid F-127 and propidium iodide were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA)

4.4.1 Antibodies

For this study, two antibodies recognizing the N- or C-terminal domain of bull sperm PH-20 (Morin et al., submitted paper) were used. Briefly, the N-terminal one is a monoclonal antibody produced from hybridoma (203-7D10) culture (American Type Culture Collection, Manassas, VA). This antibody was shown to recognise exclusively PH-20 in bovine sperm (Lalancette et al. 2001). The C-terminal one, anti-Spam1, is a custom made rabbit polyclonal antibody directed against the amino acids 530-550 of the bull PH-20 protein (p80, genbank #AY781776) (Morin et al., Submitted paper). Also, two anti-phosphotyrosine antibodies were used for this study, the clone 4G10 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) and PY-20 (BD biosciences, Mississauga, ON, Canada)

4.4.2 Sperm preparation

Freshly ejaculated bull semen was collected at an artificial insemination facility (CIAQ Inc., St-Hyacinthe, QC, Canada) and kindly donated by l'Alliance Semex Canada. The semen was maintained at 23°C until arrival at the laboratory (within 2.5 h). On arrival,

the sperm cells were washed twice by centrifugation (500 x g, 5 min) and resuspended in Sp-TALP medium (Parrish et al. 1988) supplemented with BSA (6 mg/ml) and sodium pyruvate (1 mM). For capacitation and induction of protein phosphorylation, the sperm cells were next diluted to 50×10^6 sperm/ml in Sp-TALP medium supplemented with BSA and sodium pyruvate containing either heparin (10 μ g/ml), heparin (10 μ g/ml) and IBMX (100 μ M) or sodium orthovanadate (100 μ M) and were incubated at 39°C for 5 h in humid atmosphere containing 5% CO₂. For the induction of acrosome reaction, samples were washed by centrifugations (250 x g, 10 min) and resuspended in Sp-TALP supplemented with BSA and sodium pyruvate and incubated at 39°C for another 30 min in the presence of 5 μ M calcium ionophore A23187.

For each condition, at the end of the incubation, the sperm cells were washed by two centrifugations (250 x g, 10 min) in Sp-TALP without BSA or pyruvate in the presence of 200 μ M sodium orthovanadate to prevent phosphatase activity. Aliquots were taken before and after incubations with A23187 and processed to evaluate the acrosome reaction using PSA conjugated to FITC (Mendoza et al. 1992). The samples were next processed for protein solubilisation and immunoprecipitation.

4.4.3 Solubilization and immunoprecipitation

Washed spermatozoa were resuspended in native solubilisation buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% (v/v) NP-40, 1 mM CaCl₂, 0.2 mM Na orthovanadate) containing protease inhibitors (250 μ M PMSF, 10 μ g/ml each of aprotinin, pepstatin A and leupeptin) for 30 min on ice and vortexed every 5 min. Solubilised proteins (soluble fraction) were collected by a 20 min centrifugation at 10 000 x g at 4°C. One microgram IgG of anti-phosphotyrosine (PY20) or anti-Spam1 antibodies were added and the suspension was incubated for two hours at 4°C with end over end rotation. Protein G-coupled sepharose beads were next added and incubated with rotation for 2 h at 4°C. The immune complex associated with the beads was pelleted by centrifugation. The beads were washed three times by centrifugation (3 min at 4500 x g at 4°C) with the solubilisation buffer and then, resuspended in SDS-PAGE sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 62.5 mM Tris-HCL pH 6.8, 50 mM DTT). The protein-bead complex was heated at 100°C for 5 min then centrifuged 1 min at 16000 x g. Supernatant containing

the solubilised immunoprecipitated proteins was next subjected to electrophoresis and western blot analysis.

4.4.4 Western immunoblotting

Solubilised proteins in sample buffer were separated by 7.5% SDS–polyacrilamide gel electrophoresis under reducing conditions (Laemmli, 1970) and electro-transferred on nitrocellulose membranes (Towbin et al., 1979). Membrane non-specific binding sites were blocked with 5% defatted dry skim milk in TBST (0.9% NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6 and 0.1% Tween-20) for 1 h at room temperature. The membranes were next incubated with either the anti-Spam1 antibody or with the anti-phosphotyrosine (clone 4G10) for 1h at room temperature. After extensive washes in TBST, the membranes were incubated in the presence of the corresponding HRP-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature, washed again then processed for detection. Immunodetected proteins were revealed by chemiluminescence using ECL and film exposure.

4.4.5 Evaluation of bull sperm intracellular free Ca^{2+} concentration

Freshly ejaculated bull spermatozoa collected as described earlier were washed three times by centrifugation (500 x g, 5 min) in calcium free Sp-TALP medium supplemented with BSA (6 mg/ml) and sodium pyruvate (1 mM). Washed sperm were diluted to 25×10^6 cells/ml in calcium-free Sp-TALP medium supplemented with BSA and sodium pyruvate and incubated for 30 min at 39°C in the presence of 2.5 μM Indo-1/AM and 0.00625% Pluronic acid F-127 as previously described (Collin et al. 2000). The sperm suspension was centrifuged (10 min at 500 x g) with calcium-free Sp-TALP medium supplemented with BSA and sodium pyruvate to remove the non-internalized Ca^{2+} probe. The spermatozoa were then resuspended at 50×10^6 sperm/ml either in Ca^{2+} -containing Sp-TALP medium supplemented with BSA and sodium pyruvate with or without heparin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and hyaluronic acid (100 ng/ml). Sperm in the four different media were incubated for 4 h at 39°C, under 5% CO_2 . For the evaluation of intracellular free Ca^{2+} concentration, sperm were diluted to $2,5 \times 10^6$ cells/ml in Sp-TALP medium supplemented with BSA and sodium pyruvate. As an indicator of sperm viability, propidium iodide (PI, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was

added to the sperm suspension. Measurements were performed by flow cytometry, using an Epics Elite ESP (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) flow cytometer, equipped with a HeCd laser (Omnichrome Model 100; Omnichrome, Chino, CA, USA) with an excitation wavelength of 325 nm. Calcium modulations (violet 381 nm Ca^{2+} bound / blue 525 nm Ca^{2+} unbound Indo-1 emission ratios) were plotted versus time, as described by Dorval et al. (Dorval et al. 2003). The kinetic analysis was performed using the shareware WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu>). Basal intracellular levels were assessed during 30 s before addition of either thapsigargin (10 μM) or hyaluronic acid (100 ng/ml). Calcium measurements were followed up for a further 5 minutes.

4.4.6 Native bovine PH-20 protein isolation

Bull PH-20 was purified as recently described by us (Morin et al. submitted paper). Briefly, freshly ejaculated bull semen was cooled for 15 min on ice to immobilize the sperm cells. Spermatozoa were next washed 2 times with HBS (10 mM Hepes pH 7.2, 150 mM NaCl) by centrifugation (1000 x g, 5 min, 4°C) then put in a coupling buffer (100 mM Na_2HPO_4 , 0.05% Sodium Azide, pH 7.4) with protease inhibitors (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each for aprotinin, leupeptin, and pepstatin A, and 0.25 mM PMSF). The sperm suspension was submitted to sonication on ice (3 times, 30 sec each, Ultrasonic Processor, 50% Duty cycle) then centrifuged (2000 x g, 10 min, 4°C) to pellet most of the heads. The supernatant was next submitted to ultracentrifugation (100,000 x g, 60 min, 4°C) to remove the membranes and any particulate materials. The soluble protein fraction was deposited on a pre-equilibrated affinity columns made with protein A agarose beads coupled to the IgGs from the PH-20 N-terminal antibody according to the procedure described (Harlow Ed 1988), or on an affinity column of AMINOLINK resin (Pierce, Rockford, IL), coupled with the IgGs from the PH-20 C-terminal antibody. The suspension was incubated overnight with the beads of either column at 4°C with end-over-end rotation. In each column, the matrix was allowed to settle and the flow through were collected and kept for further purification. The columns were washed with 5 times diluted coupling buffer (20 mM Na_2HPO_4 , 0.01% sodium azide) with protease inhibitors (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each of aprotinin, leupeptin, pepstatin A and 0.25 mM PMSF). The proteins were next eluted with seven 1 ml-fractions of glycine-HCl (100 mM, pH 2.8) in tubes containing 50 μl of Tris-HCl (1 M, pH 9.0) to neutralize

the pH. Positive fractions were selected according to their A_{280} , pooled together and concentrated on amicon YM-5 (Millipore, Billerica, MA, USA). The columns were next washed with 1 M NaCl and re-equilibrated with coupling buffer.

4.4.7 PH-20 native total, N- and O-deglycosylation

Bull sperm PH-20 were deglycosylated under native conditions (N-linked, O-linked and total deglycosylation) using the enzymatic protein deglycosylation kit according to the manufacturer's protocol. Briefly, the purified proteins were diluted in deionized water. After addition of the 5x reaction buffer, PNGase F, O-Glycosidase, α -2(3,6,8,9) Neuraminidase, β (1-4)Galactosidase and β -N-Acetylglucosaminidase were introduced for total deglycosylation. For N-deglycosylation, only PNGase F was added while it was omitted for O-deglycosylation. The enzymatic deglycosylation was performed for 5 days at 37°C.

4.4.8 Oocytes Recovery and Selection

Bovine ovaries were collected at a local slaughterhouse and transported to the laboratory in a 0.9% NaCl aqueous solution containing antimycotic agent (Invitrogen, Carlsbad, ON., Canada). Cumulus-oocyte complexes (COCs) from 3- to 6-mm follicles were collected with an 18-gauge needle attached to a 10-ml syringe. Healthy COCs with at least five layers of cumulus cells were selected to proceed.

4.4.9 *In Vitro* Maturation

COCs were put through in vitro maturation after three washes in HEPES-buffered Tyrode lactate medium (TLH)(Parrish et al. 1988) supplemented with 0.3% bovine serum albumin (BSA fraction V), 0.2 mM pyruvic acid, and 50 μ g/ml gentamycin. Groups of 10 COCs were placed in droplets of media under mineral oil. Each droplet consisted of 50 μ l of maturation medium composed of modified synthetic oviductal fluid (SOF) medium(Holm et al. 1999) supplemented with 10% fetal calf serum (Medicorp, Montreal, QC, Canada), modified Eagle medium (MEM) essential and nonessential amino acids

(Gibco BRL, Burlington, ON, Canada), as well as 1 mM glutamine supplemented with 0.5 µg/ml FSH, 5 µg/ml LH (Sorono), and 1 µg/ml 17β-estradiol. The droplets containing COCs were incubated in a humidified atmosphere for 24 h at 38.5°C with 5% CO₂. Metaphase II (MII) oocytes were collected at that time and mechanically denuded from their cumulus by repetitive pipetting using a sharpened pipette. The oocytes were washed at least three times with *in vitro* fertilization (IVF) medium composed of modified Tyrode lactate medium (Parrish et al. 1988) supplemented with 0.6% BSA fatty acid free (Sigma-Aldrich), 0.2 mM pyruvic acid, 10 µg/ml heparin, and 50 µg/ml gentamycin. The MII oocytes were then processed for sperm/zona binding assay.

4.4.10 Sperm/Zona binding assay

For zona binding assay, groups of five matured oocytes were added to 48-µl droplets IVF medium under mineral oil containing either native, total, N- or O-deglycosylated affinity purified bull sperm Spam1 (100 ng/ml). Matured oocytes were also added to droplet medium containing only the deglycosylation buffer and enzymes as controls. The oocytes were incubated 2h in a humidified atmosphere at 38.5°C in 5% CO₂ and then washed twice in IVF medium to get rid of proteins that did not adhere to the zona pellucida. Afterwards, the same group of five oocytes were added to 48-µl droplets IVF medium under mineral oil prior to sperm addition. The semen used consisted of a cryopreserved pooled semen from five bull (CIAQ Inc., St-Hyacinthe, Qc, Canada). The semen was thawed in 37°C water for 1 min, put on a 45% Percoll diluted in 1X PBS (GE Healthcare Bio-Sciences Inc, Baie d'Urfé, QC, Canada) and centrifuged at 700 x g for 20 min at 25°C to remove the cryoprotectant and extender. The pellet was resuspended in 10 ml of Sp-TALP medium supplemented with BSA and sodium pyruvate and centrifuged at 500 x g for 10 min at 25°C. The supernatant was discarded and the spermatozoa were resuspended in IVF medium to obtain a final concentration of 6.25 x 10⁶ sperm cells/ml. Finally, 2 µl of the sperm suspension were added to each droplet and the incubation took place in a humidified atmosphere at 38.5°C in 5% CO₂ for 6 h. Oocytes were washed twice in IVF medium followed by a washed in PBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl and 1.5 mM KH₂PO₄) and then were deposited on poly-l-lysine hydrobomide coverslips. Oocyte were fixed with 2% paraformaldehyde, washed three times with PBS

and then mounted on slide with VECTASHIELD HardSet Mounting Medium containing DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) to facilitate sperm count.

In a second set of experiments, oocytes were added to droplets containing 10 $\mu\text{g/ml}$ of the antibodies recognizing the N- or C-terminal domain of bull sperm Spam1. Again, 2 μl of the 6.25×10^6 sperm cells/ml suspension prepared as described above were added to each droplet and the incubation took place in a humidified atmosphere at 38.5°C in 5% CO_2 for 6 h. Oocytes were next washed, fixed, and mounted on slide for sperm count as described earlier.

4.5 Results

4.5.1 Tyrosine phosphorylation of bull sperm PH-20

In order to determine if bull sperm PH-20 can be phosphorylated on its tyrosine residues during sperm capacitation, bull spermatozoa were incubated with two agents known to promote protein tyrosine phosphorylation: IBMX, a general phosphodiesterase inhibitor and vanadate, a general inhibitor of phosphotyrosyl protein phosphatases. As shown in figure 1A, anti-phosphotyrosine antibody positively detected proteins in total and insoluble sperm protein fractions, which indicates that capacitation in presence of IBMX or Vanadate (not shown) positively induces tyrosine phosphorylation of protein.

Weaker detection of phosphorylated proteins by the antibody in the soluble fraction can be explained by the fact that proteins at this stage are diluted in a great volume and only a small fraction of this volume is taken for SDS-PAGE analysis. When anti-Spam1 was used for Western blot analysis, Spam1 was positively detected in the total and the supernatant sperm fraction (figure 4.1B), which indicates that a large amount of PH-20 protein was solubilised. According to these results, bull PH-20 was not tyrosine phosphorylated during capacitation since it would have been detected by the anti-phosphotyrosine antibody in the supernatant sperm fraction considering its abundance in the fraction.

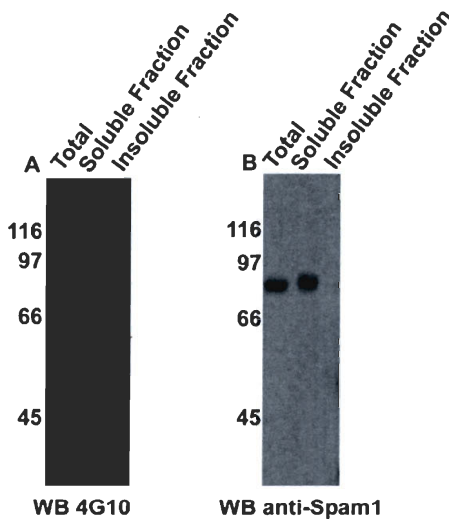


Figure 4.1: Detection of the tyrosine phosphorylated content (A) and bull PH-20 protein (B) from the total, soluble and insoluble of sperm treated with heparin and IBMX (100 μ M). Detection of tyrosine phosphorylated protein or PH-20 were performed by western blot using anti-phosphotyrosine 4G10 (A) or bull PH-20 C-terminal (anti-Spam1) antibody (B). The molecular weight standards are indicated on the left of each panel. 10^6 sperm were deposited in each well.

Confirming this result, the anti-phosphotyrosine antibody (4G10), which positively detected phosphorylated proteins from immunoprecipitated fractions with anti-phosphotyrosine PY-20 (figure 4.2A), failed to detect bull PH-20 in protein fractions immunoprecipitated with anti-Spam1 antibody (figure 4.2C). Furthermore, bull Spam 1, which was positively immunoprecipitated by the anti-Spam1 antibody (figure 4.2D), was not detected in the fractions immunoprecipitated with anti-phosphotyrosine PY-20 (figure 4.2B). These results did not change whether sperm were in presence of IBMX or vanadate.

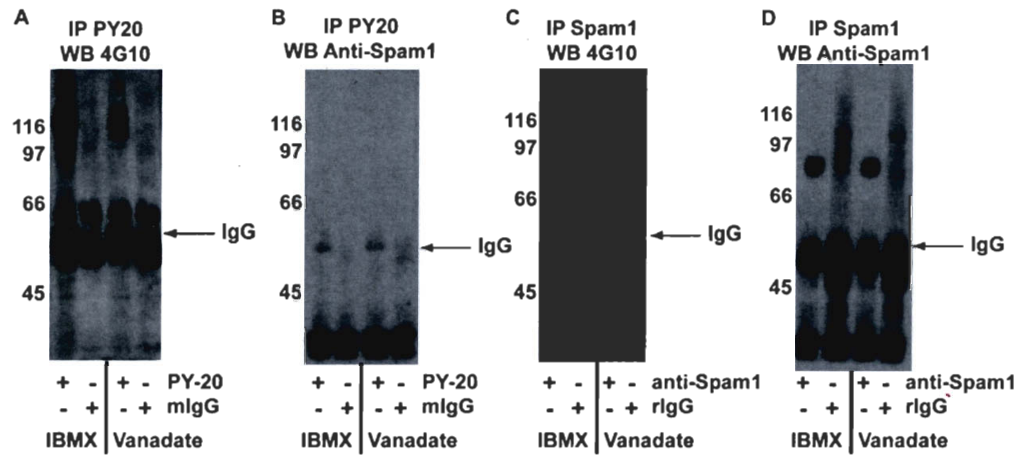


Figure 4.2: Evaluation of the phosphorylated state of bull PH-20 from spermatozoa incubated in presence of either IBMX or sodium orthovanadate. PH-20 proteins were solubilised and the soluble fraction (supernatant, figure 1) was processed for immunoprecipitation using either the anti-phosphotyrosine PY-20 (A and B) or PH-20 anti-Spam1 antibody (C and D). Detection of tyrosine phosphorylated protein or PH-20 were performed by western blot using anti-phosphotyrosine 4G10 (A and C) or PH-20 C-terminal antibody (B and D). The molecular weight standards are indicated on the left of each panel. 10^6 sperm were deposited in each well.

When calcium ionophore A23187 was used to determine if bull PH-20 could be phosphorylated during acrosome reaction, similar results to those obtained during capacitation experiments were obtained. Anti-Spam1 antibody failed to detect Spam1 from anti-phosphotyrosine PY-20 immunoprecipitated fractions (figure 4.3A). In the same order anti-phosphotyrosine 4G10 failed to detect tyrosine phosphorylated PH-20 in protein fractions immunoprecipitated with the C-terminal antibody directed against bull Spam1 (figure 4.3B). These results clearly indicate the absence of tyrosine phosphorylation on SPAM1 during the acrosome reaction in the bovine.

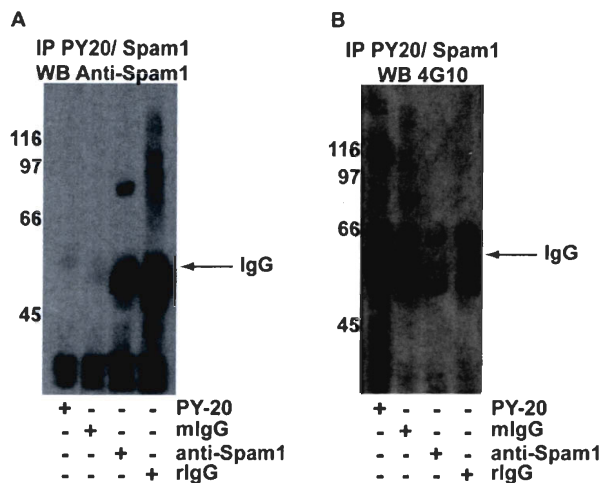


Figure 4.3: Evaluation of the phosphorylated state of Bull PH-20 from acrosome reacted spermatozoa. Capacitated bovine spermatozoa were submitted to acrosome reaction by the addition of ionophore A23187 in the medium. Sperm proteins were next solubilised and the soluble fraction (supernatant, figure 1) was processed for immunoprecipitation using either the anti-phosphotyrosine or anti-Spam1 antibody. Detection of PH-20 or tyrosine phosphorylated protein were performed by western blot using the anti-Spam1 antibody (A) or anti-phosphotyrosine 4G10 (B). The molecular weight standards are indicated on the left of each panel.

4.5.2 Calcium modulation

To determine if bull PH-20 is involved in the regulation of intracellular calcium via its interaction with hyaluronic acid, spermatozoa were incubated five hours under capacitating and non-capacitating conditions. Free intracellular calcium was measured before and after the addition of thapsigargin or hyaluronic acid. As shown in figure 4.4, addition of thapsigargin on samples incubated under non-capacitating medium provoked a liberation of calcium in sperm that is detected within the time range 84-96 s (about 55 s following its addition) whereas hyaluronic acid had no effect at all. Identical results were obtained with sperm incubated under capacitating condition, in the presence of heparin or by increasing hyaluronic acid concentration up to 100 $\mu\text{g/ml}$ in the medium (data not shown). From these results, it can be concluded that hyaluronic acid has no effect on the regulation of sperm intracellular calcium in capacitated spermatozoa. It did not promote any calcium modulation from internal stores.

To determine if hyaluronic acid could affect intracellular calcium concentration and storage, spermatozoa were incubated under capacitating and non-capacitating conditions,

and in the presence or absence of hyaluronic acid in the medium. No differences were noted whether or not hyaluronic acid was present in the incubation medium (figure 4.5). The mobilisation of Ca^{2+} by thapsigargin was not affected by the presence of hyaluronic acid in the incubation medium.

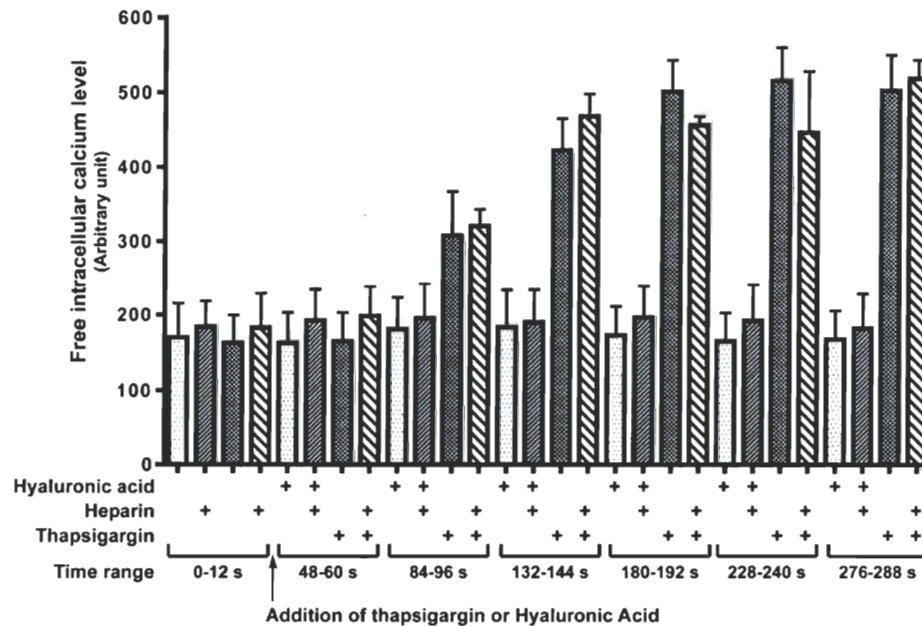


Figure 4.4: Short term effect of hyaluronic acid and thapsigargin on the free intracellular Ca^{2+} level of individual capacitated (heparin⁺) and non-capacitated sperm. Indo-1/AM loaded sperm were incubated with or without heparin for 4 h at 39°C and then processed for flow cytometry to evaluate intracellular Ca^{2+} levels. Calcium levels were measured for 5 minutes. The arrow (time = 30 s) indicates the addition of thapsigargin (10 μM) or hyaluronic acid (100 ng/ml). The relative Ca^{2+} level is indicated on the left.

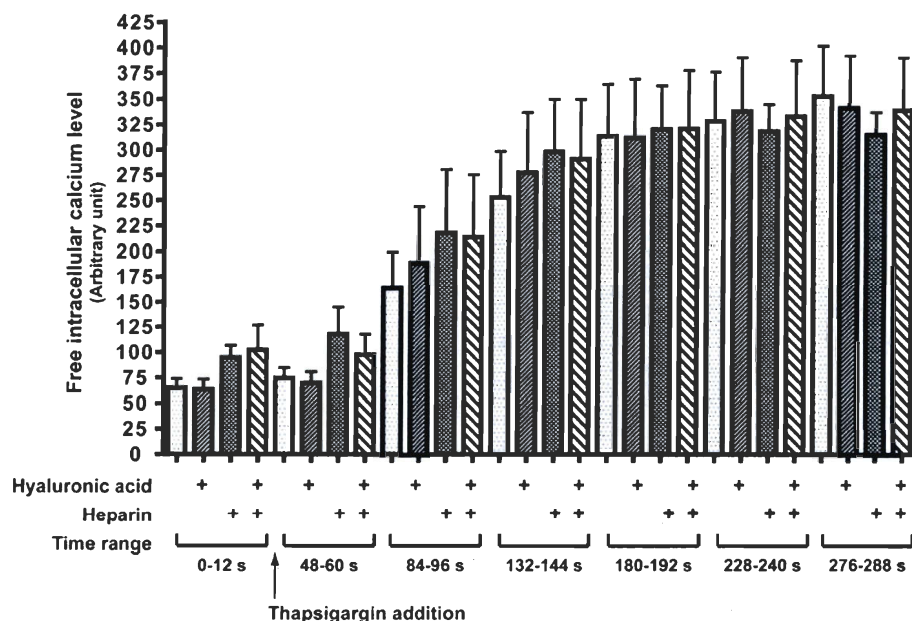


Figure 4.5 : Effect of hyaluronic acid on the regulation of free intracellular Ca^{2+} level of capacitated (heparin⁺) and non-capacitated sperm. Indo-1/AM loaded sperm were incubated for 4 h at 39°C in the presence or absence of hyaluronic acid (100 ng/ml) and then processed for flow cytometry to evaluate intracellular Ca^{2+} levels. Calcium levels were measured for 5 minutes. The arrow (time = 30 s) indicates the addition of thapsigargin (10 μ M). The relative Ca^{2+} level is indicated on the left.

4.5.3 Sperm/zona binding assay

In order to determine if bovine Spam1 interacts with zona pellucida, sperm/zona binding assay were performed using *in vitro* matured eggs pre-incubated with purified bull sperm PH-20. Results reported in figure 4.6 show that PH-20, at a final concentration of 100 ng/ml, inhibited sperm binding by about 50% compared with the control. This effect was dependent of the protein concentration since the purified protein at 1 μ g/ml further inhibits the sperm binding to the zona (data not shown). Since oocytes were washed and transferred in a new droplet for sperm binding assay, it is assumed that bull sperm PH-20 bound to the zona pellucida is responsible for the inhibitory effect observed in our assay. Moreover, when the washing step were omitted before the addition of bull spermatozoa, we observe a further reduction of the number of sperm bound to the zona confirming that the bull sperm PH-20 purified protein present in the medium contribute to sperm/zona binding inhibition (data not shown).

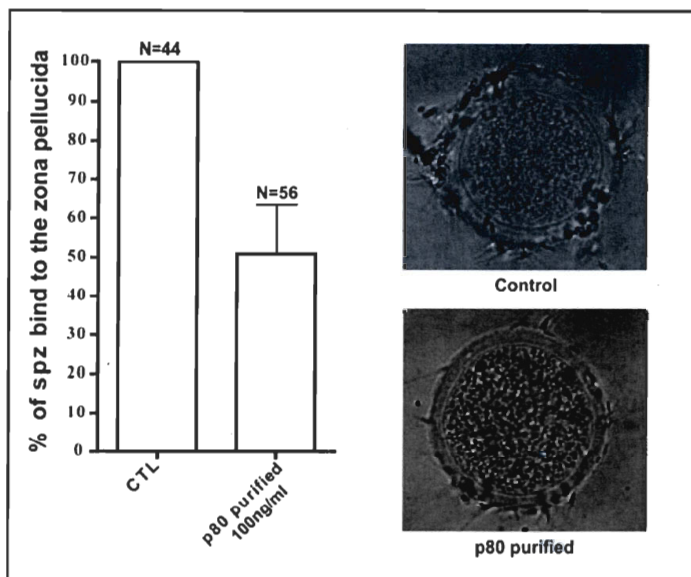


Figure 4.6: Sperm/zona pellucida binding assay using denuded oocytes pre-incubated with purified bull Spam1 protein. *In vitro* matured oocytes were denuded and incubated 2 h in the presence or absence (Ctl) of purified bull sperm PH-20 protein (100 ng/ml) then washed prior to the addition of spermatozoa. Spermatozoa and oocyte were then allowed to interact during 6 h before washing. Upon paraformaldehyde fixation, the numbers of spermatozoa bound to the zonae were then counted and expressed as percentage of the control. Experiments were repeated six times and the total number of oocytes is indicated on the top of each graph bar.

The importance of spam 1 glycosylation on sperm/egg binding was next assessed. N-, O- or total deglycosylation were performed on purified bull sperm PH-20 and used in sperm/zona binding assay. Figure 4.7 clearly shows that total, N- and O- deglycosylation did not block the inhibitory effect of bull PH-20 on sperm binding to the zona since in each condition, $\approx 50\%$ inhibition of sperm/zona binding was obtained which is similar to the results obtained with the non-deglycosylated intact purified protein (figure 4.6). No effect of deglycosylation buffer present in the control droplet medium were noted on the sperm/zona binding compared to deglycosylation buffer free droplet control (data not shown).

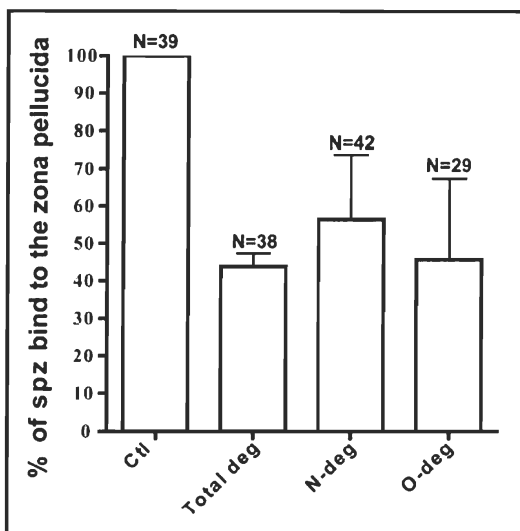


Figure 4.7: Importance of the glycosylation status of sperm PH-20 in the sperm binding to the zona pellucida. Matured and denuded oocytes were incubated 2 h in the presence or absence (Ctl) of deglycosylated (total, N- and O-) purified bull sperm Spam protein (100 ng/ml) then washed prior to addition of spermatozoa. Spermatozoa and oocytes were allowed to interact for 6 h before washing and paraformaldehyde fixation. Results are expressed as in figure 4.6. Experiments were repeated three times and total number of oocytes is indicated on the top of each graph bar.

In order to determine which domain of PH-20 is responsible for the interaction of the sperm binding to the zona, PH-20 N- and C-terminal antibodies were used in the sperm/zona competition binding assay. As shown in figure 4.8, the antibody detecting the N-terminal (hyaluronidase) domain of the protein reduced sperm/zona binding by about 30%, which is similar to the effect of the commercial mouse IgG. This suggests that the N-terminal portion of the protein is not involved in the process. On the other hand, the antibody directed against the C-terminal part of the protein provoke an 85% inhibition of the sperm/zona binding while commercial rabbit IgG inhibited sperm/zona binding by only 10%, showing here the specificity of the inhibition.

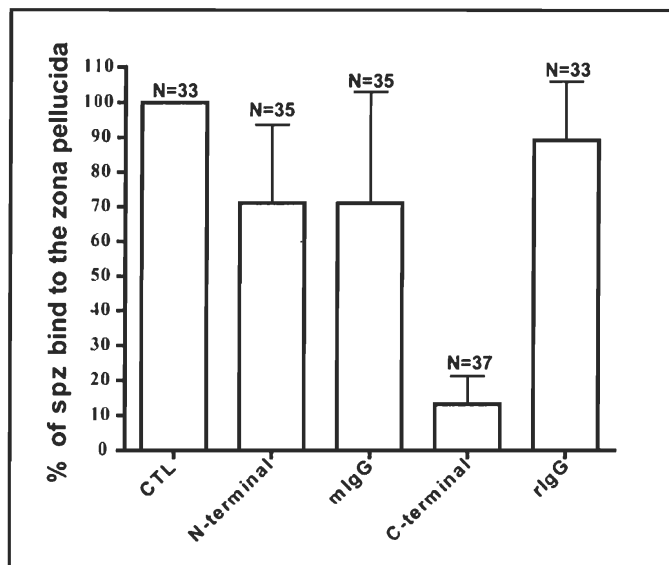


Figure 4.8: Involvement of the N- or C-terminal domain of bovine PH-20 in sperm binding to the zona pellucida. Matured and denuded oocytes were incubated in the presence of a monoclonal antibody recognizing the N-terminal portion of bull sperm Spam1 or with a rabbit polyclonal antibody directed against the C-terminal portion of the protein. Commercial mouse or rabbit IgG (10 μ g/ml final concentration) were used as internal control. Matured and denuded oocytes were also incubated in absence of antibody as native control (Ctl). Spermatozoa and oocyte were allowed to interact for 6 h before washing and paraformaldehyde fixation. Results are expressed as in figure 4. Experiments were repeated four times and total number of oocytes is indicated on the top of each graph bar.

4.6 Discussion

4.6.1 Bull PH-20 is not phosphorylated during *in vitro* capacitation and induced acrosome reaction.

The aim of this study was to determine the functional roles of the sperm bull 80 kDa protein that we have previously characterized in our laboratory (Lalancette et al. 2001; Morin et al. 2005). Since this protein is the bovine PH-20 homologue, we wanted to verify if the protein is involved in sperm/zona pellucida binding but also sperm intracellular calcium regulation. We also wanted to determine if bull PH-20 is phosphorylated on its tyrosine residues during capacitation and acrosome reaction. As stated earlier, previous studies from our laboratory suggest that bull PH-20 is phosphorylated on tyrosine residues (Lalancette et al. 2006; Morin et al. 2005). Sperm capacitation and acrosome reaction are associated with an increase in protein phosphorylation on tyrosine residues (Leclerc et al. 1996; Leclerc et al. 1997; Leclerc et al. 1998; Luconi et al. 1995; Tesarik et al. 1993; Visconti and Kopf 1998). Therefore, it was important to determine if bull PH-20 could be tyrosine phosphorylated during these events. Using immunoprecipitation, we failed to identify bull PH-20 as a tyrosine phosphorylated protein following capacitation or acrosome reaction.

Putative tyrosine phosphorylation sites on bull PH-20 were proposed following analysis of the deduced amino acid sequence of the protein (Morin et al. 2005). As reported by the protein sequence analysis, 9 potential tyrosine phosphorylation sites were identified on the protein (Morin et al. 2005). Also, as stated above, bull PH-20 was identified in sperm sub-cellular fraction enriched in tyrosine kinase activity obtained from Poly-Glu:Tyr(4:1)-agarose affinity chromatography of bull sperm protein (Lalancette et al. 2006). Why the bull Spam1 was retained by this column while the protein is not tyrosine phosphorylated is still unexplained. However, in addition to the tyrosine phosphorylation sites, there are also 5 threonine and 22 serine putative phosphorylation sites (p80 amino acid sequence analysis at NetPhos 2.0 www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/). Whether bull PH-20 is phosphorylated on these residues would be interesting to determine since PKA and PKC has been reported in sperm with a suggested role during acrosome reaction (Breitbart et al. 1992; Flesch and Gadella 2000). Sequence analysis of bull Spam1 protein using the Group-based Phosphorylation Scoring Method (GPS,

ustc.org/gps_web/predict.php) report the presence of 7 and 8 phosphorylation sites for PKA and PKC respectively using the default cut off as standard. When the cut off was set to high stringency, only one site was detected for PKC on the N-terminal portion of the protein. Whether these sites become phosphorylated remains to be determined. Another possibility would be that bull Spam1 interacts with protein that are phosphorylated on their tyrosine residues. This has been reported by Cherr et al. who found that macaque PH-20 was associated with a 92 kDa protein that undergoes tyrosine phosphorylation when macaque sperm were incubated with hyaluronic acid (Cherr et al. 2001). Whether this happens in bull sperm remains to be investigated.

4.6.2 Bovine Spam1 does not affect intracellular calcium concentration during capacitation

The second part of this study was to determine if PH-20 is part of the signalling pathway involved in the regulation of intracellular calcium level as reported in human and macaque sperm (Cherr et al. 1999; Sabeur et al. 1998). It was first important to determine whether hyaluronic acid affects intracellular calcium level as reported in previous studies (Cherr et al. 1999; Sabeur et al. 1998). As reported here, hyaluronic acid (HA) had no effect (within 4 min) on intracellular calcium level from capacitated or non-capacitated bull sperm whereas thapsigargin clearly induced a release of calcium that was detected within one minute following its addition. Calcium measurement lasted for 5 minute in each condition but no further change was observed when calcium was monitored for 10 minutes (data not shown). Since an increase of intracellular Ca^{2+} is observed preceding sperm acrosome reaction and because hyaluronic acid is present in the cumulus and within the zona pellucida, it was interesting to determine whether or not HA contribute to this Ca^{2+} elevation. However, from the observations exposed here, this hypothesis can be ruled out.

Also, basic levels of free intracellular calcium of capacitated and non-capacitated sperm before addition of thapsigargin were similar whether hyaluronic acid was added or not. Capacitation is also associated to an intracellular Ca^{2+} increase, which is associated with an increase of Ca^{2+} storage in preparation for the induction of the acrosome reaction. The fact that HA did not affect the basic levels of the free intracellular calcium during capacitation implies that it is probably not implicated in this event either. From all these

results, it is unlikely that hyaluronic acid affects intracellular calcium modulation during sperm capacitation. Consequently, it would be also unlikely that bull PH-20 would be implicated in this event. Whether hyaluronic acid has an impact on bull sperm acrosome reaction through PH-20 as reported in human (Sabeur et al. 1998) remains to be determined. Since this observation occurred with an increase in intracellular calcium concentration induced by PH-20, this scenario would also be unlikely.

4.6.3 Bull PH-20 is involved in sperm binding to the egg zona pellucida

The third part of this study was to evaluate the role played by bull PH-20 during sperm/zona pellucida interaction. Our data suggest that bull PH-20 binds to the zona pellucida and then prevent the access of sperm to their binding sites on the zona. As shown in figure 4.6, 100 ng/ml of the purified protein reduced by 50% the sperm binding to the zona. Since oocytes were washed after the incubation with the purified protein and before the incubation with spermatozoa, this strongly suggests that the inhibition came from the purified PH-20 protein bound to the zona that block sperm binding site. Also, this inhibition is concentration dependent since higher protein concentration (up to 1000 ng/ml) further reduced the sperm/zona binding (data not shown). One may argue that addition of non-specific proteins in the media would have the same effect on sperm/zona binding. In our condition, however, the medium was already supplemented with 6 mg/ml BSA. Therefore, the 100 ng/ml purified bull PH-20 is negligible, it can be concluded that bull sperm PH-20 has a direct effect on the sperm/zona binding.

The next step was to investigate if post-translational modifications of PH-20 were responsible for its interaction with the zona pellucida. According to its deduced amino acid sequence, bull PH-20 has numerous N- and O-glycosylation sites, particularly in its C-terminal domain where 14 potential O-glycosylation sites were suggested in a 22 amino acid sequence length (Morin et al. 2005). Experimental evidences clearly show that bull sperm PH-20 is both N- and O- glycosylated (Morin et al, submitted paper). As shown in figure 4.7, total, N- or O-deglycosylation had no effect on the inhibitory action of purified bull Spam1 on sperm/zona binding since at equal concentration, deglycosylated and non-deglycosylated Spam1 induce the same diminution of number of sperm attached to the zona pellucida (compare figure 4.7 and 4.6). These results suggest that PH-20 glycosylation is

not required for sperm attachment to the zona pellucida and that the interaction is probably mediated by an amino acids domain of the protein rather than its carbohydrate moieties.

The last objective of this study was to determine which domain of PH-20 (N- or C-terminal) was responsible in the binding. Our results clearly show that it is the C-terminal portion of PH-20 that is responsible for the interaction between the zona pellucida and bull sperm (figure 4.8). This finding is in agreement with our previous report which showed two populations of bull PH-20 on the sperm head: one detected only by the N-terminal antibody that is localised on the post-acrosomal portion of the sperm head with the hyaluronidase domain facing the extracellular environment and the other, detected by the C-terminal antibody who is localized internally on the anterior portion of the sperm head (Morin et al., submitted paper). According to these data, it would be fair to suggest that not only the C-terminal domain of PH-20 is required for sperm/zona binding but also that it is required following the acrosome reaction. These results are similar to those reported by Hunnicut et al. which state that PH-20 possesses two distinct domains, a hyaluronidase domain localised in the N-terminal portion of the protein and a zona pellucida binding domain localized in the C-terminal portion of PH-20.

The present study demonstrated that bull PH-20 is not phosphorylated on its tyrosine residues during capacitation or acrosome reaction and that hyaluronic acid has no effect on intracellular calcium in bull spermatozoa. Also, we report that the bull PH-20 is required for sperm binding to the zona pellucida, most likely from acrosome reacted sperm. This interaction is mediated by the C-terminal domain of the protein and would not imply carbohydrate moieties.

4.7 Acknowledgements

The authors are also thankful to l'Alliance Semex Inc. for the kind donation of freshly ejaculated bull semen. PL holds a senior Chercheur-boursier scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

4.8 References

- Breitbart H, Lax J, Rotem R, Naor Z. 1992. Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J* 281 (Pt 2):473-476.
- Cherr GN, Yudin AI, Li MW, Vines CA, Overstreet JW. 1999. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. *Zygote* 7(3):211-222.
- Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. 2001. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol* 20(8):515-525.
- Collin S, Sirard MA, Dufour M, Bailey JL. 2000. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. *J Androl* 21(6):938-943.
- Day AE, Quilter CR, Sargent CA, Mileham AJ. 2002. Characterization of the porcine sperm adhesion molecule gene SPAM1- expression analysis, genomic structure, and chromosomal mapping. *Anim Genet* 33(3):211-214.
- Dorval V, Dufour M, Leclerc P. 2003. Role of protein tyrosine phosphorylation in the thapsigargin-induced intracellular Ca(2+) store depletion during human sperm acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 9(3):125-131.
- Fleming JS, Yu F, McDonald RM, Meyers SA, Montgomery GW, Smith JF, Nicholson HD. 2004. Effects of scrotal heating on sperm surface protein PH-20 expression in sheep. *Mol Reprod Dev* 68(1):103-114.
- Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469(3):197-235.
- Florman Harvey DT. 2006. Fertilization in Mammals. In: Neill JD, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition: Academic Press; 3 edition (October 1, 2005).* pp 55-112.
- Gmachl M, Sagan S, Ketter S, Kreil G. 1993. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett* 336(3):545-548.
- Harlow Ed LD. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 519-523.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. 1999. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52(4):683-700.
- Hunnicuttt GR, Primakoff P, Myles DG. 1996. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol Reprod* 55(1):80-86.
- Lalancette C, Dorval V, Leblanc V, Leclerc P. 2001. Characterization of an 80-kilodalton bull sperm protein identified as PH-20. *Biol Reprod* 65(2):628-636.
- Lalancette C, Faure RL, Leclerc P. 2006. Identification of the proteins present in the bull sperm cytosolic fraction enriched in tyrosine kinase activity: a proteomic approach. *Proteomics* 6(16):4523-4540.
- Lathrop WF, Carmichael EP, Myles DG, Primakoff P. 1990. cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J Cell Biol* 111(6 Pt 2):2939-2949.

- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. 1996. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 55(3):684-692.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. 1997. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med* 22(4):643-656.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. 1998. Interaction between Ca²⁺, cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *J Androl* 19(4):434-443.
- Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. 1994. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* 125(5):1157-1163.
- Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Gervasi G, Forti G, Baldi E. 1995. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by platelet-activating factor and progesterone in human spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 108(1-2):35-42.
- Martin-DeLeon PA. 2006. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Mol Cell Endocrinol* 250(1-2):114-121.
- Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J. 1992. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil* 95(3):755-763.
- Meyers SA. 2001. Equine sperm-oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. *Anim Reprod Sci* 68(3-4):291-303.
- Morin G, Lalancette C, Sullivan R, Leclerc P. 2005. Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit. *Mol Reprod Dev* 71(4):523-534.
- Myles DG, Hyatt H, Primakoff P. 1987. Binding of both acrosome-intact and acrosome-reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during in vitro fertilization. *Dev Biol* 121(2):559-567.
- Myles DG, Primakoff P. 1984. Localized surface antigens of guinea pig sperm migrate to new regions prior to fertilization. *J Cell Biol* 99(5):1634-1641.
- Overstreet JW, Lin Y, Yudin AI, Meyers SA, Primakoff P, Myles DG, Katz DF, Vandervoort CA. 1995. Location of the PH-20 protein on acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa of cynomolgus macaques. *Biol Reprod* 52(1):105-114.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38(5):1171-1180.
- Primakoff P, Hyatt H, Myles DG. 1985. A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* 101(6):2239-2244.
- Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. 1998. Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote* 6(2):103-111.
- Shalgi R, Matityahu A, Gaunt SJ, Jones R. 1990. Antigens on rat spermatozoa with a potential role in fertilization. *Mol Reprod Dev* 25(3):286-296.
- ten Have J, Beaton S, Bradley MP. 1998. Cloning and characterization of the cDNA encoding the PH20 protein in the European red fox *Vulpes vulpes*. *Reprod Fertil Dev* 10(2):165-172.

- Tesarik J, Moos J, Mendoza C. 1993. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* 133(1):328-335.
- Thaler CD, Cardullo RA. 1995. Biochemical characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked hyaluronidase on mouse sperm. *Biochemistry* 34(24):7788-7795.
- Vandevoort CA, Cherr GN, Overstreet JW. 1997. Hyaluronic acid enhances the zona pellucida-induced acrosome reaction of macaque sperm. *J Androl* 18(1):1-5.
- Vines CA, Li MW, Deng X, Yudin AI, Cherr GN, Overstreet JW. 2001. Identification of a hyaluronic acid (HA) binding domain in the PH-20 protein that may function in cell signaling. *Mol Reprod Dev* 60(4):542-552.
- Visconti PE, Kopf GS. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59(1):1-6.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian Fertilization. In: E. Knobil JDN, editor. *The physiology of Reproduction*, Second edition. Second Edition ed. New-York: Raven Press Ltd. pp 189-317.
- Yudin AI, Vandevoort CA, Li MW, Overstreet JW. 1999. PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 53(3):350-362.

Chapitre 5 : Discussion et Conclusion

Il ne fait nul doute que plusieurs protéines sont essentielles au succès de la fécondation et PH-20 n'y fait pas exception. La conservation de cette protéine parmi les espèces le démontre clairement. Chez l'espèce bovine, la protéine PH-20 n'était toujours pas identifiée. C'est pourquoi il fut important de vérifier au cours de mes travaux de doctorat si la protéine spermatique bovine p80, identifiée au sein de notre laboratoire, est bel et bien la PH-20 bovine et si, par le fait même, elle est impliquée dans l'interaction entre les gamètes lors de la fécondation. Pour ce faire, les principaux objectifs de cette thèse étaient de : 1) Caractériser p80 et déterminer son homologie avec PH-20. 2) Déterminer son orientation dans les membranes spermatiques puisque p80 était liée à la membrane via un domaine transmembranaire séparant les deux domaines fonctionnels de la protéine (hyaluronidase / attachement à la zone pellucide) 3) Élucider si p80 est phosphorylée sur ses résidus tyrosines, si elle contribue à provoquer un influx de calcium intracellulaire chez le spermatozoïde et si elle est impliquée dans les événements de liaisons entre les spermatozoïdes et la zone pellucide.

Les résultats présentés au chapitre 2 démontrent clairement que p80 est bien la protéine PH-20 chez le bovin. De plus la séquence peptidique de p80 déduite à partir de la séquence nucléotidique obtenue par RT-PCR, 3' et 5'RACE fut confirmée par les résultats de LC/MS-MS obtenus au chapitre 3. Ces résultats ont permis d'affirmer hors de tout doute que la séquence de p80 est exacte puisque des peptides furent identifiés un peu partout sur la séquence de la protéine. D'autre part, la confirmation de l'extrémité C-terminale de la séquence de p80, grâce aux analyses LC/MS-MS de la protéine et à l'aide de l'anticorps développé contre les derniers acides aminés de p80, m'a permis d'affirmer que la séquence de p80 était bel et bien différente de celle rapportée par Meyer et al.[1]. Enfin, l'absence d'identification de peptide dans la région comportant le domaine d'O-glycosylation potentiel supporte indirectement sa présence et est en parfait accord avec les résultats d'O-déglycosylation obtenus.

Les analyses de la séquence obtenue ont aussi permis de confirmer que p80 ne possède pas d'ancre GPI tout en suggérant la présence d'un domaine transmembranaire séparant le domaine hyaluronidase du domaine C-terminal de la protéine. Sachant que le domaine de liaison à la zone pellucide se retrouve en extrémité C-terminale de la protéine, il était important de connaître l'orientation de p80 dans les membranes afin de déterminer si la protéine était en mesure de cliver les liens d'acide hyaluronique contenu dans le cumulus et de lier la zone pellucide lors de l'interaction entre les spermatozoïdes et la zone pellucide. C'est grâce à ce questionnement qu'il fut possible de démontrer la présence de deux isoformes chez p80. De plus, le fait que l'isoforme plus court, situé en position post-acrosomale de la tête, ait son domaine hyaluronidase exposé à l'environnement extracellulaire, assure l'activité enzymatique de la protéine lors du passage des spermatozoïdes au travers du cumulus. De même, il est logique de croire que la population située dans la région antérieure de la tête soit internalisée de façon à ce qu'elle puisse interagir avec la zone pellucide suivant la réaction de l'acrosome. Il est donc juste de suggérer ici que les deux populations de p80 présentes sur les spermatozoïdes bovins possèderaient leur fonction distincte. Il serait intéressant de pouvoir identifier la ou les membranes contenant p80 au niveau de la région antérieure de la tête. Puisqu'au cours de la réaction de l'acrosome, le spermatozoïde va perdre sa membrane plasmique ainsi que la membrane externe de l'acrosome au niveau antérieur de sa tête, la localisation de p80 sur la membrane plasmique, interne ou externe de l'acrosome lui attribuera un rôle différent au cours de l'interaction entre la protéine et la zone pellucide. La présence de p80 sur la membrane externe de l'acrosome ou plasmique implique que la protéine serait relâchée dans le milieu extracellulaire alors que sa présence sur la membrane interne de l'acrosome lui permettrait de demeurer liée aux spermatozoïdes. Il est peu probable que p80 soit liée à la membrane plasmique puisqu'un de ses domaines, soit N-ou C-terminal aurait été détecté par un des deux anticorps (domaine N- ou C-terminal) utilisés au cours des expériences d'immunofluorescence indirecte sur les spermatozoïdes non fixés et non perméabilisés. De même, le relâchement de p80 au cours de la réaction de l'acrosome est peu probable puisqu'il signifie que la protéine agirait comme une protéase, telle l'acrosine[2], afin de permettre le passage de la zone pellucide par le spermatozoïde. La seule activité de clivage reconnue chez PH-20 est son activité hyaluronidase et selon les résultats obtenus au

chapitre 4, il est peu probable que cette activité soit impliquée pour la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide puisque la présence de l'anticorps N-terminal (cible le domaine hyaluronidase de p80) n'a aucun effet inhibiteur sur cette interaction. C'est pourquoi il est juste de suggérer que la population de p80 située dans la région antérieure de la tête des spermatozoïdes est probablement localisée sur la membrane interne de l'acrosome. Bien que les tentatives d'observation de p80 par microscopie électronique se sont révélées infructueuses jusqu'à maintenant, l'optimisation de la technique utilisée pourrait peut-être pallier au problème et ainsi éclaircir ce point.

Les résultats rapportés au chapitre 3 suggèrent fortement que la population post-acrosomale de p80 serait d'origine épидидymaire. Un résultat similaire fut rapporté auparavant chez la souris par Deng et al.[3]. Toutefois, chez la souris, les protéines épидидymaire et testiculaire sont identiques, ce qui ne semble pas être le cas chez le taureau. En effet, la deuxième population de p80 isolée à 70 kDa par électrophorèse en deux dimensions et analysée par LC/MSMS semble posséder une extrémité C-terminale plus courte. Aucun peptide n'a pu être identifié des acides aminés 517 à 553. Fait intéressant, un seul gène code pour p80 tout comme chez la souris. Il est donc possible que, tout comme chez la souris, un élément régulateur situé en amont du site d'initiation de la transcription[4] serait responsable de l'expression du message codant pour la protéine mais qu'en plus, un événement d'épissage surviendrait afin de produire une protéine plus courte. Une deuxième possibilité serait la modification de la protéine suivant son expression par clivage endoprotéolytique. Quoiqu'il en soit, il est nécessaire de déterminer la séquence en acides aminés de la population p80 épидидymaire pour répondre à cette question. De plus, il serait intéressant de déterminer par quel moyen la protéine est transférée aux spermatozoïdes au cours de la maturation épидидymaire. Il est connu que plusieurs protéines sont transférées aux spermatozoïdes via les épидидyosomes[5]. Toutefois, des études préliminaires n'ont pu montrer la présence de p80 sur des extraits protéiques des épидидyosomes. Il existe toutefois une voie de sécrétion mérocrine au niveau de l'épидидyme où les protéines sont sécrétées de façon soluble. Il se peut que p80 soit transférée aux spermatozoïdes via ce mode de sécrétion[6].

Du point de vue fonctionnel, les rôles de p80 furent clairement démontrés. Tout d'abord, p80 possède, tout comme ses homologues, une activité hyaluronidase[7] ce qui est en parfait accord avec la séquence déduite en acides aminés[8]. Toutefois, contrairement à la souris[9], p80 n'a pas à subir de modification au cours de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes afin d'acquérir son activité enzymatique. Par la suite, le rôle de la protéine au cours des interactions entre les spermatozoïdes et la zone pellucide fut démontré à l'aide de la protéine purifiée des spermatozoïdes et à l'aide d'anticorps. Le fait que ce soit l'anticorps dirigé contre la portion C-terminale de p80 qui est responsable de l'inhibition de la liaison entre le spermatozoïde suggère que p80 est impliquée dans l'attachement secondaire des spermatozoïdes à la zone pellucide. En effet, puisque seule la population interne de p80 est détectée par l'anticorps C-terminal, la protéine ne peut exercer ses fonctions que suite à la réaction acrosomique.

p80 possède un grand domaine d'O-glycosylation dans la partie C-terminale de la protéine. Ce domaine n'est toutefois pas impliqué dans l'interaction entre p80 et la zone pellucide puisque la déglycosylation n'affecte pas le pouvoir inhibiteur de p80. Le domaine d'O-glycosylation n'est peut-être pas requis pour l'interaction protéine-protéine entre p80 et la zone pellucide mais pour une interaction avec une protéine spermatique tel que décrit plus bas. D'autre part, plusieurs rôles sont attribués à l'O-glycosylation. Il peut donner de la stabilité à la structure de la protéine ainsi que lui fournir des propriétés hydrophiles, une résistance à la température, une résistance aux protéases ou tout simplement servir à l'expression des protéines à la surface de la cellule[10]. Il est donc tout à fait possible que le domaine d'O-glycosylation retrouvé chez p80 soit requis pour ces différents rôles. Quoiqu'il en soit, il semble que c'est via une séquence peptidique et non via une modification post-traductionnelle apportée à la protéine que p80 va lier la zone pellucide. La production de protéine recombinante tronquée pourrait servir à identifier les acides aminés requis dans cette interaction.

p80 fut détectée parmi les protéines isolées à l'aide d'une colonne Poly-Glu:Tyr(4:1)-agarose[11], suggérant que p80 pourrait être phosphorylée sur ses résidus tyrosines, ou du moins, interagir avec des tyrosines kinases. D'autre part, les études de

Rivlin et al.[12] rapportent aussi la phosphorylation en tyrosine d'une protéine spermatique bovine de 80 kDa via l'action des dérivés actifs de l'oxygène. Pourtant les résultats obtenus au chapitre 4 démontrent bien que p80 n'est pas phosphorylée en tyrosine pendant la capacitation et la réaction de l'acrosome, deux événements reconnus où la phosphorylation en tyrosine est impliquée. Rien n'exclut toutefois que p80 pourrait interagir avec une protéine elle-même phosphorylée en tyrosine tel que démontré chez le macaque[13] et que cette interaction s'effectue via le domaine de O-glycosylation de p80. Des expériences de « pool down » et de déglycosylation permettraient de vérifier cette hypothèse. Rien n'exclut non plus, tel que discuté au chapitre 4, que p80 pourrait être phosphorylée en thréonine ou en sérine puisque plusieurs sites potentiels furent identifiés. De plus, l'implication des protéines PKA et PKC au cours de la réaction de l'acrosome fut suggérée[14, 15] et tel que rapporté dans le chapitre 4, quelques séquences cibles de PKA et PKC furent identifiées suite à l'analyse de la séquence peptidique de p80 à l'aide du software GPS (http://bioinformatics.lcd-ustc.org/gps_web/predict.php). Il serait intéressant de vérifier si oui ou non, ces sites sont réellement la cible de ces kinases.

Le fait que p80 pouvait être impliquée dans les événements de phosphorylation suggère un rôle de celle-ci dans les processus de signalisation retrouvés au cours de la capacitation. De plus, avec les observations rapportées chez l'humain et le macaque quant à l'implication de PH-20 dans la modulation du calcium intracellulaire et ce via son interaction avec l'acide hyaluronique, il était important de vérifier l'implication de p80 dans ces événements. Comparativement à l'humain et le macaque[16, 17], l'acide hyaluronique n'a aucun effet sur la modulation du calcium intracellulaire du spermatozoïde bovin et ce, que ce soit chez les spermatozoïdes capités ou en voie de capacitation. Il est donc peu probable que p80 soit impliquée dans cet événement. De plus, chez le taureau, un glycoaminoglycan similaire à l'héparine retrouvé dans le fluide de l'oviducte pourrait contribuer à cette modulation de calcium intracellulaire[16-20]. Il est fort possible que l'implication de PH-20 dans la modulation du calcium intracellulaire soit spécifique uniquement à l'humain et au macaque, deux espèces relativement rapprochées dans l'évolution.

Pour conclure, au cours de mes travaux de doctorat, j'ai démontré que la protéine spermatique de 80 kDa identifiée dans notre laboratoire est l'homologue bovine de PH-20, que cette protéine possède deux isoformes liés aux membranes probablement via un domaine transmembranaire et que l'origine tissulaire de ces isoformes diffère. De plus, j'ai démontré que la population p80 post-acrosomale expose son domaine hyaluronidase au milieu extracellulaire, ce qui lui permet d'interagir avec l'acide hyaluronique du cumulus alors que la population internalisée à la région antérieure de la tête des spermatozoïdes est requise pour l'attachement secondaire de ceux-ci à la zone pellucide. C'est via une séquence peptidique et non via une modification post-traductionnelle située à l'extrémité C-terminale que p80 va lier la zone pellucide. C'est probablement l'orientation de Spam1 dans les membranes qui lui permettrait d'effectuer ses fonctions. La figure 5.1 représente une hypothèse de l'arrangement de p80 dans les membranes spermatiques bovines. Au niveau de la membrane plasmique, le domaine hyaluronidase est exposé à l'environnement extracellulaire du spermatozoïde, lui permettant d'agir en tant qu'hyaluronidase. Au niveau de la membrane acrosomale, le domaine hyaluronidase serait exposé à l'extérieur de la membrane, laissant le domaine de liaison à la zone pellucide à l'intérieur de l'acrosome. Puisque la membrane externe et interne de l'acrosome est continue, lors de la réaction de l'acrosome, le domaine de liaison à la zone pellucide de p80 deviendrait exposé et pourrait donc interagir avec celle-ci afin de poursuivre le processus de fécondation.

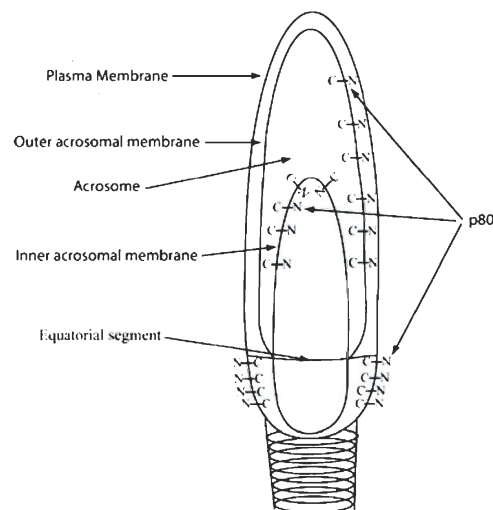


Figure 5.1: Schéma de représentation de la protéine Spam1 bovine (p80) dans la membrane du spermatozoïde.

5.1 Références

1. Meyer MF, Kreil G, Aschauer H. The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme. *FEBS Lett* 1997; 413: 385-388.
2. Howes L, Jones R. Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 181-192.
3. Deng X, He Y, Martin-DeLeon PA. Mouse Spam1 (PH-20): evidence for its expression in the epididymis and for a new category of spermatogenic-expressed genes. *J Androl* 2000; 21: 822-832.
4. Zhang H, Martin-DeLeon PA. Mouse epididymal Spam1 (PH-20) is released in vivo and in vitro, and Spam1 is differentially regulated in testis and epididymis. *Biol Reprod* 2001; 65: 1586-1593.
5. Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 2007; 9: 483-491.
6. Hermo L, Jacks D. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 394-410.
7. Lalancette C, Dorval V, Leblanc V, Leclerc P. Characterization of an 80-kilodalton bull sperm protein identified as PH-20. *Biol Reprod* 2001; 65: 628-636.
8. Morin G, Lalancette C, Sullivan R, Leclerc P. Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 523-534.
9. Deng X, Czymmek K, Martin-DeLeon PA. Biochemical maturation of Spam1 (PH-20) during epididymal transit of mouse sperm involves modifications of N-linked oligosaccharides. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 196-206.
10. Wopereis S, Lefeber DJ, Morava E, Wevers RA. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. *Clin Chem* 2006; 52: 574-600.
11. Lalancette C, Faure RL, Leclerc P. Identification of the proteins present in the bull sperm cytosolic fraction enriched in tyrosine kinase activity: a proteomic approach. *Proteomics* 2006; 6: 4523-4540.
12. Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 2004; 70: 518-522.
13. Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol* 2001; 20: 515-525.
14. Breitbart H, Lax J, Rotem R, Naor Z. Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J* 1992; 281 (Pt 2): 473-476.
15. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1469: 197-235.
16. Cherr GN, Yudin AI, Li MW, Vines CA, Overstreet JW. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. *Zygote* 1999; 7: 211-222.
17. Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote* 1998; 6: 103-111.

18. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38: 1171-1180.
19. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Graham JK. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology* 1999; 51: 461-472.
20. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 1989; 40: 1020-1025.